

低剂量辐射对小鼠血清蛋白差异表达的影响

陈伟 何颖 沈先荣 蒋定文 王庆蓉 侯登勇

刘玉明 李珂娴 刘琼 钱甜甜

(海军医学研究所 上海 200433)

摘要 应用蛋白质组学方法筛选对低剂量 γ 射线敏感的蛋白质,并采用双向凝胶电泳和基质辅助激光解析飞行时间串联质谱技术分离、鉴定不同低剂量 γ 射线导致的小鼠血清差异表达蛋白。不同低剂量 γ 射线照射后,对实验组与对照组的血清双向电泳图谱进行比较分析,通过质谱鉴定得到7个差异表达点,分别是载脂蛋白C-III、 β 珠蛋白、腮腺分泌蛋白、 α_2 巨球蛋白前体、转甲状腺蛋白晶体结构H链、Clqc蛋白和丛生蛋白。提示低剂量 γ 射线辐照能导致小鼠血清中某些蛋白表达发生变化。

关键词 低剂量辐射, 血清蛋白, 差异表达, 蛋白质组学, 小鼠

中图分类号 R811.5, TL71

以往对 γ 射线辐照的生物效应研究主要集中在大剂量一次性照射引起的生物体损伤,包括对造血系统的损伤、对免疫系统的损伤以及对代谢系统的损伤等。近年来,随着核工业的发展,有可能接受低剂量辐射(LDR)的人群数量逐年增加^[1]。目前国内外对低剂量辐射生物学效应的机制研究不多,并且多集中于单个或少数几个基因或蛋白质,不能完全地、系统地、动态地解释低剂量辐射生物学效应的全部过程^[2]。蛋白质组学技术的飞速发展为其研究提供了新的思路和技术平台。本研究将小鼠暴露于一定剂量范围的低剂量 γ 射线,建立 γ 射线辐照损伤动物模型,利用双向凝胶电泳(2-DE)结合基质辅助激光解析飞行时间串联质谱(MALDI-TOF-MS)分离并鉴定不同低剂量 γ 射线辐射作用下小鼠外周血清蛋白的表达变化,寻找潜在的低剂量电离辐射损伤生物标志物,为低剂量 γ 射线的防护提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组与处理

40只雄性Balb/c小鼠,体重(20 ± 2)g,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,动物许可证号码:SCXK(沪)2008-0016。动物饲养于海军医学

研究所实验动物中心普通级小鼠实验室内,室温18–24℃,12h照明,12h黑暗。饲以小鼠标准饲料,笼内自由饮用自来水。动物按体重随机分为4组,分别为正常对照组、0.1Gy照射组、0.5Gy照射组和1.0Gy照射组,每组10只。各照射组在海军医学研究所辐照室进行照射,⁶⁰Co γ 射线,单次照射,剂量率为500mGy/h,剂量分别为0.1、0.5和1.0Gy。

1.2 主要仪器与试剂

酶标仪(美国Thermo Electron公司),紫外可见分光光度计(上海奥谱勒仪器有限公司,759UV spectrophotometer),MEK-5216K型血细胞分析仪(日本Nihon Kohden公司),Ettan IPGphor 3等电聚焦系统、ImageQuant 300图像分析系统(美国GE公司),SE 600垂直电泳仪(美国Amersham Biosciences公司)。IPG固相线性PH梯度预制胶条(PH3-10)、IPG buffer和覆盖液(美国Amersham Biosciences公司),蛋白质定量试剂盒、去除血清高丰度蛋白试剂盒(美国Bio-Rad公司)。

1.3 双向电泳样品制备

辐照结束后2h从眼静脉丛采集小鼠外周血,4℃静置1h后,3000r·min⁻¹(640g)离心15min,

基金项目: 全军计划科研项目(AHJ09J012)、总后科技攻关项目(2009183006)和全军医学科技十二五重大项目(AWS11J003)资助

第一作者: 陈伟,男,1981年5月出生,2013年于第二军医大学获硕士学位,主要从事辐射防护医学研究,助理研究员, E-mail: vip2050@sina.com

通讯作者: 沈先荣,博士,研究员, E-mail: xianrong_sh@163.com

收稿日期: 初稿 2013-09-03, 修回 2013-11-01

取上清, 于冰箱中 -70°C 保存备用。用 Bio-Rad Proteominer 低丰度蛋白富集试剂盒去除高丰度蛋白, 用 Bradford 法测定血清中总蛋白浓度。取适量体积用于双向凝胶电泳。

1.4 双向凝胶电泳

蛋白上样量为 $300\text{ }\mu\text{g}$, 用双向凝胶电泳方法进行血清蛋白质的分离, 利用硝酸银染色法进行电泳凝胶染色。

1.5 凝胶图像采集与分析

ImageQuant 300 图像分析系统扫描凝胶, 然后利用 ImageMaster 2D Platinum 6.0 二维电泳处理软件对凝胶图像进行分组、强度校正、蛋白点检测及点配对分析, 选取仅在一种样品出现的蛋白斑点和两种样品中同一蛋白存在两倍以上光密度差异的蛋白斑点作为差异表达的蛋白质点。

1.6 差异表达点的质谱鉴定

切取差异蛋白点, 进行脱色、胶内胰酶酶切和肽段提取, 然后用 MALDI-TOF-MS/MS 进行肽质量指纹谱(PMF)分析。检索结果的可靠性用肽段匹配率、得分值(Score)和匹配肽段在对应蛋白内的序列覆盖率进行评价。

1.7 数据库查询

将获得的串联质谱测序图, 以 MASCOT 软件检索美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)非冗余(nr)的数据库, 获得差异蛋白名称、序列等信息。物种来源选择 Rattus。

2 结果

2.1 小鼠血清的双向电泳及图像分析结果

双向电泳中采用的小鼠血清样品是将同组 10 只小鼠的血清混合, 因此, 基本可以忽略个体差异。经 ImageMaster 2D Platinum 6.0 软件及手工分析, 每块 2-DE 胶可分离近 400 个蛋白点左右, 每组样品经过 3 次以上的重复试验, 同一份标本平行电泳的匹配率在 95%以上, 各蛋白点的强度变化无显著性差异, 说明实验条件具有很高的稳定性和重复性。各实验组与对照组的血清双向电泳图谱进行比较, 发现实验组表达上调的蛋白点 6 个, 表达下调的蛋白点 1 个, 结果见图 1。各实验组与对照组差异表达点在 2-DE 图谱上局部放大图见图 2。

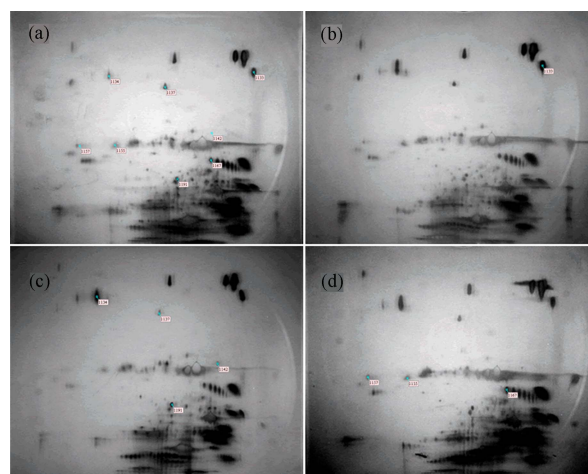


图 1 低剂量照射组和对照组小鼠外周血清 2-DE 凝胶电泳图: (a) 0 Gy, (b) 0.1 Gy, (c) 0.5 Gy, (d) 1.0 Gy

Fig.1 2-DE gel maps of serum proteins from the control group and the groups exposed to LDR: (a) 0 Gy, (b) 0.1 Gy, (c) 0.5 Gy, (d) 1.0 Gy

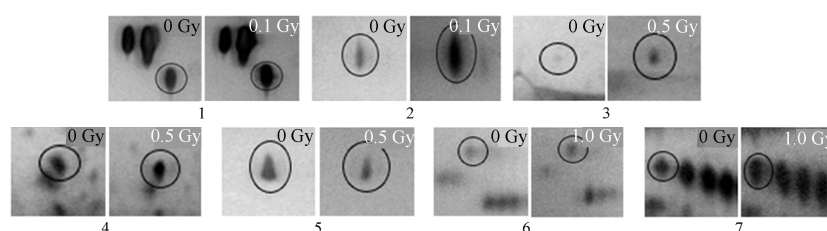


图 2 低剂量照射组和对照组差异表达蛋白点局部放大图

Fig.2 Close-up sections of the differentially-expressed proteins between the control group and the groups exposed to LDR

2.2 质谱分析及数据库检索结果

2-DE 凝胶上的差异表达蛋白点从胶上切割后

用胰酶消化, 进行 MALDI-TOF-MS 检测。通过质谱分析, 鉴定得到 7 个差异表达点, 具体见表 1。

表 1 各组差异蛋白点的质谱鉴定

Table 1 Differential proteins between the groups exposed to LDR and the control group identified by MALDI-TOF-MS/MS

编号 No.	蛋白名称 Protein name	分子量 Mr.	等电点 Isoelectric point	数据库编号 Accession No. of NCBI	得分 Score	倍数 Fold change
1	载脂蛋白 C-III Apolipoprotein C-III, isoform CRA_b	7324	4.60	gi 148693736	217	2.44 (0.1 vs. 0)
2	β 珠蛋白 Beta-globin	15844	7.12	gi 290756194	202	3.31 (0.5 vs. 0)
3	腮腺分泌蛋白 Parotid secretory protein	22307	4.87	gi 220939489	80	2.22 (0.5 vs. 0)
4	$\alpha 2$ 巨球蛋白前体 Alpha-2-macroglobulin precursor	165748	6.24	gi 110347469	248	2.10 (0.5 vs. 0)
5	转甲状腺蛋白晶体结构 H 链 Chain H, crystal structure of mouse transthyretin	13771	5.76	gi 161172190	236	-2.32 (0.5 vs. 0)
6	C1qc 蛋白 C1qc protein	25950	8.67	gi 55249610	252	2.17 (1.0 vs. 0)
7	丛生蛋白 Clusterin	48356	5.77	gi 148669125	255	2.40 (1.0 vs. 0)

3 讨论

目前低剂量电离辐射对机体的作用机制的研究主要集中在对个别或少数蛋白质的作用进行探讨，低剂量辐射对机体的生物效应表现在多个系统和多个层面，有必要用更高通量的方法全面地分析其发生机制^[3]。本研究采用 2-DE 和 MALDI-TOF-MS/MS 技术对低剂量电离辐射暴露和正常对照组小鼠血清进行比较蛋白质组学研究，发现载脂蛋白 C-III、 β 珠蛋白、腮腺分泌蛋白、 $\alpha 2$ 巨球蛋白前体、转甲状腺蛋白晶体结构 H 链、C1qc 蛋白和丛生蛋白在不同剂量的低剂量电离辐射暴露小鼠血清中存在差异表达。与对照组比较，0.5 Gy 组分离鉴定获得的差异表达蛋白最多，1.0 Gy 组次之，0.1 Gy 组最少，这可能与低剂量范围内生物效应的多样性有关。研究认为单次低剂量照射在 0.2–0.5 Gy 时将诱导机体产生低剂量辐射超敏感反应^[4]，由于电离辐射对机体的作用是通过基因、蛋白的表达调控来实现的，因此，机体发生辐射超敏感反应时，发生表达变化的基因和蛋白也就相对较多，这在我们采用基因芯片对不同低剂量 γ -射线(0.1、0.5 和 1.0 Gy)诱导 AHH-1 细胞基因表达谱变化的研究中也得到了相同的结果：即聚类分析结果表明，0.1 Gy 组和 1.0 Gy 组的基因表达谱相似程度最高，0.5 Gy 组次之，0 Gy 组最低^[5]。

载脂蛋白 C3 可引起脂质代谢异常，还直接参

与致血管内皮细胞功能失调过程，几乎参与动脉粥样硬化形成的全过程，被视为一个促炎和促粥样硬化的独立因素^[6]。小鼠实验中发现，肝脏过度表达 apoC3 可活化 PKC ϵ ，引发脂肪肝和胰岛素抵抗^[7]。0.1 Gy 照射后，小鼠血清中 apoC3 含量增加，提示低剂量电离辐射可以引起脂代谢异常，可能导致动脉粥样硬化等心血管疾病。过去，ICRP 没有将循环系统疾病列入受照器官组织的辐射危害中。近年来，国内外放射生物学家将除癌症之外的躯体疾病，如心脑血管疾病和消化疾病，称为非癌症疾病。ICRP 第一委员会近几年收集和评述了有关非癌症疾病的大量文献和科学信息，申明要对眼晶体和心血管系统的辐射效应给予特别关注。近年发表的文献显示，引起这些系统辐射效应的辐射剂量比以前报道或认定的要低很多。从目前的证据判断，心脑血管疾病的急性照射阈剂量约为 0.5 Gy，在此剂量照射下，10 年以后有 1% 的受照人员发生心脑血管疾病^[8]，提示在辐射流行病学研究中，应高度关注低剂量电离辐射暴露职业人群的心血管系统的发病率，并在其日常的辐射防护中加大对心血管系统的防护。

β -珠蛋白合成减少可致 β 地中海贫血和镰状细胞疾病。腮腺分泌蛋白是一种腮腺特异性表达的蛋白，除与口腔的免疫相关之外可能还与消化相关^[9]。 $\alpha 2$ 巨球蛋白在肝细胞和单核巨噬细胞中合成，能与不少蛋白水解酶结合，有选择性地保护某些蛋白酶活性，这在免疫反应中具有重要意义^[10]。在低白蛋

白血症时, $\alpha 2$ 巨球蛋白含量可代偿性升高。转甲状腺素蛋白是肝脏及脉络丛合成的糖蛋白, 主要生物学作用以四聚体的形式转运甲状腺激素和视黄醇蛋白, 与 T4 连接尤为紧密^[11]。0.5 Gy 照射后, 小鼠血清 β -珠蛋白、腮腺分泌蛋白和 $\alpha 2$ 巨球蛋白含量增加, 推测 0.5 Gy γ 射线单次照射后, 机体的血液系统和免疫系统可发生了代偿性反应。但由于不同的组织器官对电离辐射敏感程度不同, 同一剂量照射后诱导不同组织器官发生的反应也不尽相同。研究表明甲状腺对电离辐射高度敏感, 本次研究也发现, 0.5 Gy γ 射线单次照射后小鼠血清转甲状腺素蛋白含量降低, 提示低剂量 γ 电离辐射通过下调转甲状腺蛋白表达升高 T4 水平。这一现象在低剂量电离辐射暴露人群中观察到, 但当其脱离低剂量电离辐射环境后, T4 水平很快恢复正常, 说明低剂量电离辐射导致的 T4 升高是可逆的^[12], 提示在对低剂量电离辐射暴露职业人群的辐射防护工作中, 应重点关注其 T4 水平的变化, 有针对性地采取有效的预防和干预措施。

C1qc 是补体经典途径的关键基因 C1q 的 3 个亚基之一, 参与天然免疫和适应性免疫, 它在补体经典激活途径中起着重要作用^[13]。丛生蛋白, 又名羧基抑制性前列腺素使-2 或硫化糖蛋白, 在多种恶性肿瘤细胞中, 丛生蛋白的表达都升高。研究表明, 过度表达的丛生蛋白可以减少细胞凋亡和 Caspase-3 的激活, 而阻断内源性丛生蛋白的表达就会增强凋亡^[14]。1.0 Gy 照射后, 小鼠血清 C1qc 蛋白和丛生蛋白含量增加, 提示单次低剂量 γ 辐射代偿性地调节机体免疫功能, 抑制细胞凋亡。

本研究通过蛋白质组学方法对低剂量辐射后血清蛋白质表达差异进行分析, 发现了某些与低剂量辐射生物效应相关的关键蛋白。但目前研究仅在动物水平进行了初步探索, 还需利用其他生物学方法, 如 ELISA 法, 在人体水平对血清蛋白的差异表达进行验证, 同时, 开展相关功能试验进一步探讨差异表达蛋白与低剂量辐射损伤的关系, 为低剂量辐射暴露人群的辐射损伤提供诊断用生物标志物, 为药物研发提供针对性强的新靶点。

参考文献

- 侯登勇, 沈先荣, 何颖, 等. 低剂量率 ^{60}Co γ 射线对 SD 大鼠的损伤生物效应研究 [J]. 中国辐射卫生, 2012, 21(1): 11-12.
- 张一琼, 李薇, 王冠军. 低剂量辐射后小鼠骨髓造血干、祖细胞的蛋白质组学研究 [J]. 南京大学学报: 自然科学, 2008, 44(4): 435-440.
- 张一琼, 李薇, 王冠军, 等. 应用蛋白质组学方法研究低剂量辐射对人骨髓间充质干细胞的影响 [J]. 中国实验血液学杂志, 2008, 16(1): 151-155.
- 周平坤. 低剂量辐射效应-辐射防护的基础 [J]. 辐射防护通讯, 2005, 25(4): 13-16.
- 何颖, 沈先荣, 钱甜甜, 等. 低剂量 γ 射线辐照对人淋巴瘤细胞基因表达转录谱的影响 [J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2013, 31(5): 050203(10).
- 俞娟, 仲人前, 王惠民. 载脂蛋白 C3 与心血管疾病关系的研究进展 [J]. 临床检验杂志, 2011, 29(6): 460-462.
- Salamone F, Galvano F, Li Volti G. Apolipoprotein C3 gene variants in nonalcoholic fatty liver disease [J]. New England Journal of Medicine, 2010, 363(2): 194-195.
- Borghini A, Luca Gianicolo E A, Picano E, et al. Ionizing

HOU Dengyong, SHEN Xianrong, HE ying, et al. Effect of low dose rate ^{60}Co γ -ray ionizing radiation on SD Rats [J]. Chinese Journal of Radiological Health, 2012, 21(1): 11-12.

ZHANG Yiqiong, LI Wei, WANG Guanjun. The study of the mice haemopoietic stem cell of bone marrow proteome after low dose radiation [J]. Journal of Nanjing University: Natural Sciences Edition, 2008, 44(4): 435-440.

ZHANG Yiqiong, LI Wei, WANG Guanjun, et al. Effect of low dose radiation on human bone marrow mesenchymal stem cells by using proteomic analysis [J]. Journal of Experimental Hematology, 2008, 16(1): 151-155.

ZHANG Yiqiong, LI Wei, WANG Guanjun, et al. Effect of low dose radiation on human bone marrow mesenchymal stem cells by using proteomic analysis [J]. Journal of Experimental Hematology, 2008, 16(1): 151-155.

ZHOU Pingkun. Various biological effects of low dose ionizing radiation and the challenge on radiological protection practice [J]. Radiation Protection Bulletin, 2005, 25(4): 13-16.

HE Ying, SHEN Xianrong, QIAN Tiantian, et al. Effects of low dose γ -ray on transcription profiles of human lymphoblastoid cells [J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2013, 31(5): 050203(10).

YU Juan, ZHONG Renqian, WANG Huimin. Relationship of apo c3 and coronary artery diseases [J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2011, 29(6): 460-462.

Salamone F, Galvano F, Li Volti G. Apolipoprotein C3 gene variants in nonalcoholic fatty liver disease [J]. New England Journal of Medicine, 2010, 363(2): 194-195.

Borghini A, Luca Gianicolo E A, Picano E, et al. Ionizing

- radiation and atherosclerosis: Current knowledge and future challenges [J]. *Atherosclerosis*, 2013, **230**: 40-47.
- 9 田兴华, 张表, 樊宝良, 等. 小鼠生后发育过程中腮腺分泌蛋白(PSP)的表达 [J]. *农业生物技术学报*, 2006, **14**(3): 345-348.
TIAN Xinghua, ZHANG Biao, FAN Baoliang, *et al.* Expression of Mouse Parotid Secretory Protein(PSP) in Postnatal Development of Parotid Glands [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2006, **14**(3): 345-348.
- 10 李春. $\alpha 2$ 巨球蛋白抑制聚集素酶 ADAMTS-4 和 5 的表达 [J]. *南华大学学报: 医学版*, 2009, **37**(4): 412-414.
LI Chun. $\alpha 2$ -Macroglobulin Inhibited the Expression of ADAMTS-4 and ADAMTS-5 [J]. *Journal of University of South China: Medical Edition*, 2009, **37**(4): 412-414.
- 11 刘烨, 郝光霞. 转甲状腺素蛋白与 2 型糖尿病 [J]. *中国药物与临床*, 2011, **11**(6): 691-692.
LIU Ye, XI Guangxia. Transthyretin and type 2 diabetes [J]. *Chinese Remedies & Clinics*, 2011, **11**(6): 691-692.
- 12 许加文, 于丕胜, 吴细青, 等. 零九艇长航前后艇员部分内分泌激素的测定 [J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2000, **20**(1): 58-59.
XU Jiawen, YU Pisheng, WU Xiqing, *et al.* Determination of endocrine hormone in submariners before and after a long voyage [J]. *Chinese Journal of Radiological Medicine and Protection*, 2000, **20**(1): 58-59.
- 13 陈玥, 李家乐, 沈玉帮. 草鱼 C1qC 基因的克隆及表达分析 [J]. *中国水产科学*, 2013, **20**(1): 25-34.
CHEN Yue, LI Jiale, SHEN Yubang. Cloning and expression of C1qC gene in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, **20**(1): 25-34.
- 14 Savković V, Gantzer H, Reiser U, *et al.* Clusterin is protective in pancreatitis through anti-apoptotic and anti-inflammatory properties [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, **356**: 431-437.

Effects of low dose radiation on differential expression of serum protein in mice

CHEN Wei HE Ying SHEN Xianrong JIANG Dingwen WANG Qingrong
HOU Dengyong LIU Yuming LI Kexian LIU Qiong QIAN Tiantian
(Naval Medical Research Institute, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT The aim is to find out the key proteins related with low dose radiation (LDR) by proteomic technology, which provided the theory foundation for LDR protection. Two-dimensional electrophoresis (2-DE) was performed on serum protein. Differential expression proteins were identified by matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and database analysis. Compared with the control group, 7 altered proteins was definite in terms of apolipoprotein C-III, beta-globin, parotid secretory protein, alpha-2-macroglobulin precursor, mouse transthyretin, C1qc protein and clusterin. Some proteins related with LDR are found. It may provide some new explanations for the mechanism of LDR.

KEYWORDS Low dose radiation, Serum protein, Differential expression, Proteomics, Mouse

CLC R811.5, TL71