

急性放射损伤小鼠血清蛋白质组分析

王治东 陈肖华 董波 张军权 饶亚兰 高荣莲 侯丽莉 毛秉智

(军事医学科学院放射医学研究所 北京 100850)

摘要 为寻找急性放射病早期诊断指标和新的治疗靶点,探讨辐射损伤的发病机理,采用蛋白质组学的双向电泳和蛋白质氨基酸序列分析技术研究了 8Gy γ 射线照射后 24h 小鼠血清蛋白质的变化,鉴定有差异的蛋白质,并用蛋白质印迹(Western blotting)方法进行验证。结果显示,双向电泳发现 8Gy 照射后 24h 小鼠血清有一显著变化蛋白点,分子量约为 15ku,经氨基酸序列分析发现为结合珠蛋白(Haptoglobin, Hp)的 α 亚单位。Western blotting 方法进一步验证了双向电泳的结果。结果表明,经 8Gy γ 射线照射后 24h 小鼠血清中结合珠蛋白发生显著增加,可能在辐射损伤中发挥着一定的作用,此结果为探索急性放射损伤的发病机理提供了新的线索。

关键词 急性放射损伤,双向电泳,正交加速电喷雾串联质谱,结合珠蛋白

中图分类号 R.818.04

早期剂量估算直接影响急性放射病患者的治疗和预后,目前急性放射病患者的剂量评估指标有物理剂量、生物剂量和临床症状及实验室指标,这些方法所需时间相对较长,且需操作者具有较丰富的经验。为了寻找急性放射病的早期诊断新指标和新的治疗靶点,本工作用蛋白质组学的方法对 8Gy γ 射线照射后 24h 小鼠血清蛋白质的变化进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 动物

C57/6BJ 小鼠,雄性,体重(18—22)g,购自军事医学科学院动物中心,共 12 只,随机分为照射组和正常对照组。

1.2 照射条件

本院 ^{60}Co 源照射,照射率 174.3 R min^{-1} ,一次全身照射剂量 8Gy。

1.3 血清提取

小鼠摘眼球取血约 0.5mL 于 1.5mL 的 EP 管中,4℃静置 1h,5000r/min 离心 5min,取上清置于无菌 EP 管中。将同组 6 只动物血清各取 50 μL 混合,以消除个体之间的差异。用 Bradford 法测定血清中总蛋白浓度。两种血清各取适量体积(含总蛋白

1.4mg)用于双向电泳。

1.4 小鼠血清的双向电泳

1.4.1 第一向固相 pH 梯度等电聚焦 分别取正常对照小鼠、8Gy 照射后 24h 小鼠血清 42.56 μL 、37.6 μL ,含蛋白质总量均为 1.4mg,采用胶内泡胀方法将蛋白样品与适量泡胀缓冲液(8.0mol/L 脲,CHAPS 2%,微量溴酚蓝)总体积为 350 μL ,其中含有 DTT 20mmol/L,IPG Buffer 0.5%,按照 Amersham Pharmacia Biotech 公司的等电聚焦设备 IPGphor 操作说明小心加样(胶条 pH 范围为线性 4—7,18cm)。等电聚焦条件为 20℃,总电压时为 45—48kV h。

1.4.2 平衡 将等电聚焦后的固相 pH 梯度胶条放入适量平衡液(1.5mol/L Tris,6mol/L 脲,30%甘油,2%SDS,微量溴酚蓝)中,于摇床上震荡 2 $\times$ 15min。其中,第一种平衡液中含有 DTT 20mmol/L,而第二种平衡液中代之以 100mmol/L 碘乙酰胺。

1.4.3 第二向垂直 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 根据 IPG conversion Kit 的体积,配制大小为 200mm $\times$ 200mm $\times$ 1mm、13%的均匀胶。将平衡后的固相 pH 胶条移到凝胶的上方用 0.5%的琼脂糖/电泳缓冲液封闭,电泳缓冲液为 Tris-Glycine-SDS,在 14—15℃以每根胶条 30mA 恒流直至溴酚蓝前沿至玻

第一作者:王治东,男,1977 年 11 月出生,军事医学科学院放射医学研究所在读博士研究生,主要从事辐射血液学研究
通讯联系人:陈肖华

收稿日期:初稿 2004-07-21,修回 2004-09-27

玻璃下缘。按常规考马斯亮蓝染色方法固定、染色、脱色。

1.5 双向电泳结果的处理

用 Amersham Pharmacia Biotech 公司的图像分析软件 ImageMaster 2D Elite3.10 分析电泳结果。

1.6 差异蛋白质从聚丙烯酰胺凝胶中的酶切、提取及序列分析

将双向电泳胶上经考马斯亮蓝染色的斑点用刀片切下,切成 1mm×1mm 的胶块,置于 Eppendorf 管中,用 100 μ L 50%乙腈/100mmol L⁻¹ 碳酸氢铵洗 2—3 次,每次 20min 至脱色干净。脱色后的胶片置于真空干燥器 SpeedVac (Savant Instruments, Holbrook, NY, USA) 中干燥 20min, 然后加入 10ng/ μ L 的胰蛋白酶液 (25mmol/L 碳酸氢铵溶液, pH 8.0) 5—10 μ L, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱放置 40min 使胶片完全吸收酶液,再补加 10 μ L 25mmol/L 碳酸氢铵缓冲液,于 37 $^{\circ}$ C 温育过夜。用 5% TFA 50—100 μ L 于 40 $^{\circ}$ C 提取酶切肽段 1 次/h,再用相同体积的 50% ACN/2.5% TFA 溶液于 30 $^{\circ}$ C 提取 1 次/h,最后用 50 μ L ACN 超声提取一次,合并 3 次提取液,用真空干燥器 SpeedVac (Savant Instruments, Holbrook, NY, USA) 进行干燥。干燥后的样品用 3—5 μ L 0.1% 的甲酸溶液溶解。而后用英国 Micromass 公司的正交

加速电喷雾串联质谱仪 Q-TOF2 进行分析。

1.7 数据库检索初步鉴定蛋白质

利用美国国立图书馆网站上的 Blast 软件对质谱所得的氨基酸序列进行蛋白质序列分析。

1.8 蛋白质印迹 (Western blotting) 分析

取正常及 8Gy γ 射线照射后 24h 小鼠血清各 1 μ L 进行 Western blotting 分析。12% SDS-PAGE 电泳后转到硝酸纤维素膜上。兔抗人 haptoglobin 抗体 (DaKo) 1:1000 稀释,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (中山公司) 1:10000 稀释, DAB 显色。

2 结果

2.1 小鼠血清双向电泳结果及图像分析

图 1 为小鼠血清蛋白质经双向凝胶电泳、考马斯亮蓝染色的图谱,图 1 (左) 为正常对照小鼠血清的双向电泳图谱,图 1 (右) 为 8Gy 照射后 24h 小鼠血清的双向电泳图谱。两图谱在等电聚焦和 SDS-PAGE 电泳及染色过程中为平行操作。电泳结果经扫描后用 ImageMaster 2D Elite 3.10 双向电泳图像分析软件分析。图中箭头所示的蛋白点为三次双向电泳均出现的差异蛋白点,而且是变化差异最明显的蛋白点,我们对该蛋白点进行了进一步分析。

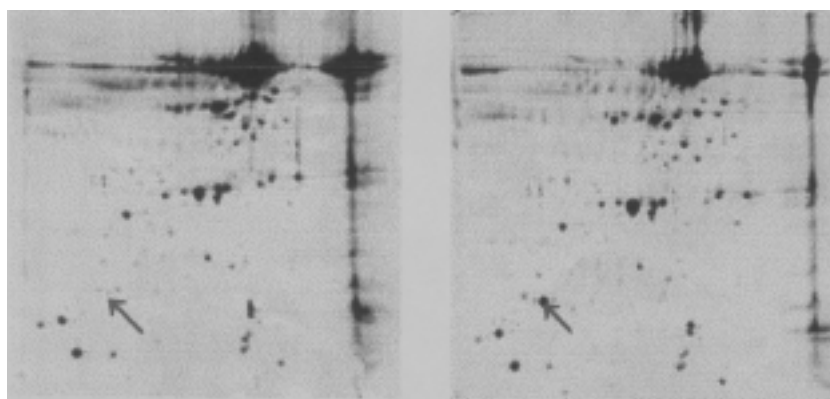


Fig.1 2-DE gel map of serum proteins from normal mice (left) and irradiated mice (right),(CBB stained)

2.2 差异蛋白质氨基酸序列分析

对于三次电泳中变化差异最明显的蛋白质点 (图 1 中箭头所示) 从胶上切割后用胰酶消化,进行 Q-TOF-MS 检测,分析部分氨基酸序列。质谱分析图像见图 2, 对应的氨基酸序列为: Ala Glu Gly Asp Gly Val Tyr Thr Leu Asn Asp Glu Lys。

2.3 差异点蛋白质数据库检索结果

经过数据比较分析,质谱测序所得的序列与数据库中小鼠 Haptoglobin 蛋白的一段序列 100% 相同,下面所示为小鼠 Hp 蛋白质的全部氨基酸序列,方框内部分为质谱所得的序列,黑体所标记的序列为 H α 亚单位,其余部分为 β 亚单位。

1 mralgavvtl llwgqlfave lgndamdfed dscpkppeia ngv
 vehlvry rcrqfyrira
 61 egdgvytlnd ekqwwntvag hklpeceavc gpkphvpdqv
 qriiggsmda kgsfpwqakm
 121 isrhglttga flisdqwlit taknlfnhs etasakditp
 tltlyvgknq lveiekvvhl

181 pnhsvvdigl ikllqrvltv ervmpiclpv kdiapgrvg
 yvsgwgrnan frfdrlyv
 241 mlpvadqdkc vvhyenstvp ekknltspvg vqpilnehtf
 cagltkyqed tcygdagsaf
 301 aihdmeedtw yaagilsfdk tcavaeygvy vratdlkdvw
 qetmakn

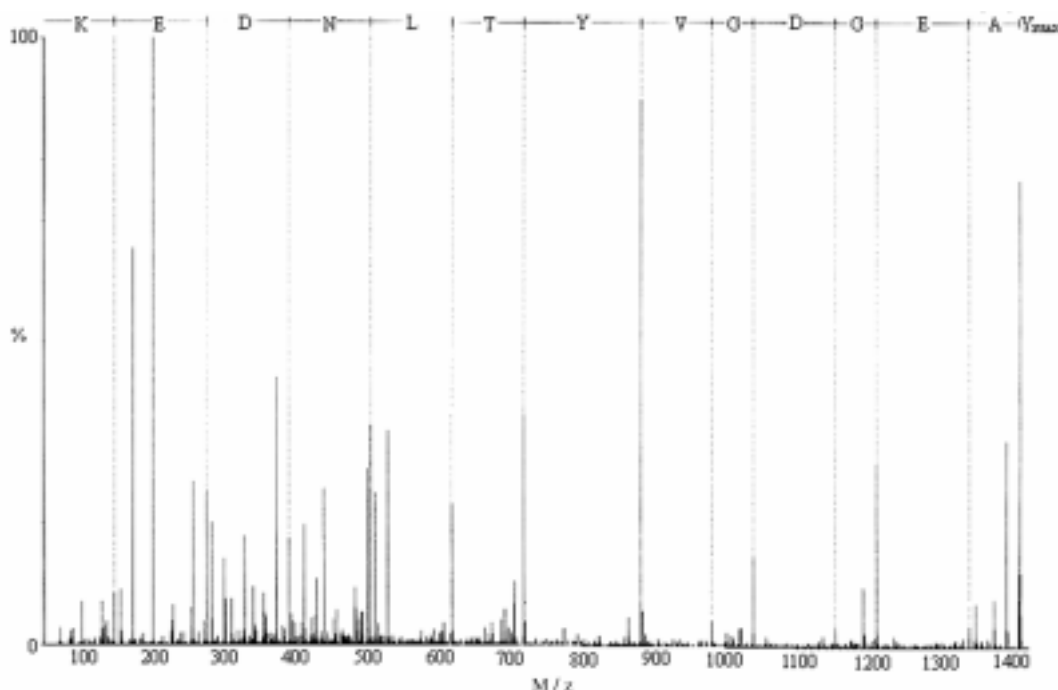


Fig.2 Q-TOF-MS analysis result of the protein spot

2.4 利用 Western blotting 检测小鼠血清中 Hp 蛋白

图 3 为小鼠血清 Western blotting 检测 Hp 蛋白的结果, 分别取正常对照和 8Gy 照射后 24h 小鼠血清 1 μ L, 用 12%SDS-PAGE 分离后转膜, 进行免疫印迹 (DAB 显色)。结果显示, 在小鼠血清中可以检测到两条明显的条带, 经分子量分析确定分别为

结合珠蛋白的 α 亚单位和 β 亚单位, 而且经 8Gy 照射 24h 后小鼠血清中结合珠蛋白 α 亚单位和 β 亚单位。含量较正常小鼠均有明显的升高。

3 讨论

早期判断急性放射病患者的受照剂量对治疗和预后有着很重要的影响。为了探讨急性放射损伤早期血清中蛋白的变化, 我们利用蛋白质组学的方法进行了研究。在标本采集时, 我们将正常对照组的 6 只小鼠血清等体积混合, 并将 8Gy 照射后 24h 的 6 只小鼠血清等体积混合, 这在很大程度上消除了个体之间的差异。目前, 未知蛋白的鉴定主要采用蛋白质氨基酸序列测定和肽质量指纹谱法, 前者较后者更准确、更直接。我们在鉴定差异蛋白的过程中, 采用了蛋白质氨基酸序列测定法。经过 Q-TOF 氨基酸序列测定和数据库检索, 我们确定了差异最明显蛋白质为结合珠蛋白 (Haptoglobin, Hp) 的 α 亚单位。随后我们用兔抗人结合珠蛋白的抗体 (与小鼠有较好的反应性), 进行 Western blotting 进一步验证, 结果显示, 用结合珠蛋白的抗体可在小鼠血清中检测到两条明显的条带, 经分析分别为结合

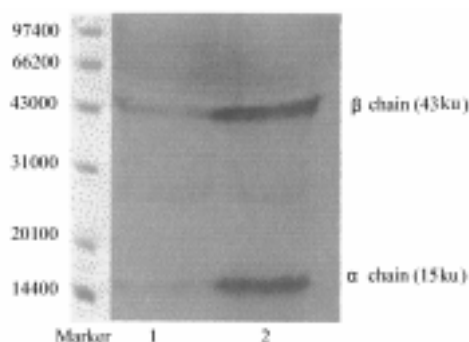


Fig.3 Detection of haptoglobin protein in serum of normal mice(1) and irradiated mice(2). (DAB stained) Mice serum was obtained from normal and irradiated mice. The serum(1 μ L) were analyzed by Western blotting and detected with anti-human Hp antibody were analyzed by western blotting and detected with anti-human Hp antibody

珠蛋白的 α 亚单位和 β 亚单位,而且照射后小鼠血清中结合珠蛋白 α 亚单位和 β 亚单位的含量,较正常小鼠均有明显的升高。在2DE检测中发现了Hp α 亚单位对应的蛋白点,而没有发现 β 亚单位对应的蛋白点。对于这一现象,我们认为可能是由于 β 亚单位在分子量和等电点上与血清中某些高丰度蛋白质相近,在2DE中表现为同一蛋白点,从而没能显现出来。Hp是一种主要由肝脏分泌的糖蛋白,小鼠的Hp为四聚体结构,包含两条 α 亚单位和两条 β 亚单位^[1]。Hp的主要功能是结合游离的血红蛋白,将其运送至肝脏代谢分解,参与铁的再利用,阻止游离的血红蛋白对肾脏的损伤。Jun-ichiro等^[2]的研究发现:2Gy、4Gy和6Gy X射线照射后血浆中Hp的蛋白水平升高,在照射后24h达到高峰,而后开始下降,并且随着照射剂量的增加而增加。Zvonko等^[3]在研究直线加速器照射后大鼠血清中急性反应蛋白的变化中发现,4、6.7、9 Gy照射后12h,血清中Hp蛋白含量开始增加,4、6.7Gy照射后24h达到高峰,持续到第3天,然后开始下降,9Gy照射后呈持续升高,照射后1—3d出现一平台期,而后持续升高。照射后血清中Hp蛋白发挥怎样的作用还不是很清楚。最近的研究表明,Hp参与机体抵抗感染和炎症的防御反应过程,调节机体免疫功能。文献[4]的研究发现,Hp能够与外周血中静止或激活状态的CD4⁺和CD8⁺T细胞特异结合,显著的抑制T细胞增殖,而且抑制Th2细胞分泌细胞因子。文献[5]的研究表明,Hp与人肥大细胞系HMC-1细胞相结合,抑制HMC-1细胞的自发增殖。王凤君等^[6-8]的研究表明,相当于烧伤后血清水平的人Hp能抑制ConA刺激的正常小鼠胸腺细胞的增殖、IL-2的产生及IL-2诱导的IL-2依赖细胞株

的增殖,抑制正常小鼠PMN释放H₂O₂,引起M ϕ 抗原呈递功能低下,这说明Hp在烧伤后机体免疫功能抑制中起到一定作用,大剂量 γ 射线照射后骨髓组织受到严重的损害,机体的造血和免疫功能均受到明显的削弱,外周血中增加的Hp是否参与电离辐射后机体免疫功能低下的过程是值得研究的内容。

参考文献

- 1 Funmei Yang, Leslie Linehan, William Friedlrichs, *et al.* Genomics, 1993, **18**(2): 374-380
- 2 Jun-ichiro, Hayakawa, Takehiko Tsuchiya. Radiation Research, 1974, **57**(2): 239-245
- 3 Zvonko Magić, Svetlana Matić-Ivanović, Jovan Savić. Radiation Research, 1995, **143**(2): 187-193
- 4 Arredouani M, Matthijs P, Van Hoeyveld E, *et al.* Immunology, 2003, **108**(2): 144-151
- 5 Ghmati S M EL, Arredouani M, Van Hoeyveld E M, *et al.* Scand J Immunol, 2002, **55**(4): 352-358
- 6 王凤君, 黄文华, 黎鳌. 中华创伤杂志, 1994, **10**(6): 273-274
WANG Fengjun, HUANG Wenhua, LI Ao. Chinese J Traumatol, 1994, **10**(6): 273-274
- 7 王凤君, 黄文华, 黎鳌. 中国免疫学杂志, 1994, **10**(3): 173-175
WANG Fengjun, HUANG Wenhua, LI Ao. Chinese J Immunol, 1994, **10**(3): 173-175
- 8 王凤君, 黄文华, 黎鳌. 中华免疫学杂志, 1996, **12**(6): 347-349
WANG Fengjun, HUANG Wenhua, LI Ao. Chinese J Immunol, 1996, **12**(6): 347-349

Analysis of proteomic changes of the serum of irradiated mice

WANG Zhidong CHEN Xiaohua DONG Bo ZHANG Junquan RAO Yalan
GAO Ronglian HOU Lili MAO Bingzhi

(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850)

ABSTRACT To explore the early diagnostic factors, new therapeutic targets and mechanisms of acute radiation disease. Proteomic changes of the serum of irradiated mice were studied using 2-DE and Q-TOF-MS approaches. One higher level expressed protein after the irradiation was found, and it was identified as α chain of haptoglobin by Q-TOF-MS. We confirmed the result by Western blotting with anti-haptoglobin antibody. Haptoglobin may involve in the process of acute radiation injury.

KEYWORDS Acute radiation injury, 2DE, Q-TOF-MS, Hhaptoglobin

CLC R818.04