

氡染毒大鼠支气管肺泡灌洗液蛋白质的双向电泳分析

徐乃玉¹ 张素萍² 聂继华² 丁建松² 童建²

¹ (苏州大学药学院 苏州 215123)

² (苏州大学放射医学与公共卫生学院, 江苏省放射医学与防护重点实验室, 苏州 215123)

摘要 观察氡染毒后大鼠支气管肺泡灌洗液 (Bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 蛋白质表达谱的变化。雄性 Wistar 大鼠吸入氡的累积剂量达 200 工作水平月 (Working level month, WLM) 后, 收集大鼠 BALF, 提取 BALF 细胞总蛋白, 采用双向电泳技术 (Two-dimensional electrophoresis, 2-DE) 分离总蛋白质, 银染显色, 进行差异蛋白质的分析。ImageMaster 2D Platinum 软件分析结果显示正常组和氡染毒组大鼠 BALF 细胞总蛋白双向电泳图谱上分别可见到 645 和 554 个蛋白点, 共获得 48 个显著的蛋白质差异点, 其中 23 个点在正常大鼠 BALF 中表达或表达明显增强, 25 个点在染毒大鼠 BALF 中表达或表达明显增强。结果提示, 正常大鼠与氡染毒大鼠 BALF 细胞的蛋白质表达谱存在差异。

关键词 双向电泳, 氡, 肺泡灌洗液, 蛋白质组

中图分类号 R994.2, R818.03

氡(²²²Rn)是地壳中铀的天然衰变产物, 普遍存在于环境空气中, 氡及其子体可经呼吸道暴露诱发肺癌, 国际癌症研究机构(International agency for research on cancer, IARC)已将其归为 I 类致癌因素^[1]。目前, 有关氡及其子体吸入的早期生物学效应的研究有靶器官的损伤^[2]、DNA 损伤^[3]、氧化应激^[4]、对免疫系统的影响等内容^[5], 本试验以 Wistar 大鼠为对象, 运用蛋白质组学技术比较分析了大鼠吸入氡后支气管肺泡灌洗液 (Bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 蛋白质表达图谱的变化, 为寻找氡染毒早期生物效应的相关蛋白提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

ImmobilineTM Drystrip 干胶条 (pH3-10L, 24cm)、IPG Buffer (pH3-10) 购于 Amersham 公司; Tris、十二烷基磺酸钠 (Sodium dodecyl sulfate, SDS)、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、苯甲基磺酰氟 (Phenylmethyl sulfonyl fluoride, PMSF)、超纯尿素、过硫酸铵、N,N,N',N'-四甲基乙二胺 (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine, TEMED)、二硫苏糖醇 (1,4-Dithiothreitol, DTT)、甘氨酸、甘

油均购于 BBI 公司; 3-[3-(胆酰胺基丙基)二甲氨基]丙磺酸盐 (3-(3-(Cholamidopropyl)dimethylammonio)propanesulfonate, CHAPS)、碘代乙酰胺、硫脲购于 Amersco 公司; 低分子量标准蛋白质购于上海生化所; 其余试剂均为分析纯以上试剂。HD-3 型多功能生态氡室为华东地质学院产品; 高速离心机为德国 Beckman 公司产品; EttanTMIPGphorTM 等电聚焦电泳系统、EttanTMDALT-six 大型垂直电泳系统、ImageScannerTM 扫描仪、ImageMaster 2D Platinum (Version 5.00) 软件均为 Amersham 公司产品。

1.2 动物染毒

健康雄性 Wistar 大鼠 10 只 (由中国科学院上海动物中心提供, 动物证号: 中科动管会第 001 号), 体重 (150±5)g 左右。随机分为正常对照组、氡染毒组各 5 只, 染氡组动物整体暴露于 HD-3 型多功能生态氡室, 平均每天 14h, 累积受照剂量为 200 工作水平月 (Working level month, WLM)。

1.3 支气管肺泡灌洗液 (Bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 细胞制备

大鼠于末次染毒后 1h 内, 5%水合氯醛麻醉大鼠 (1mL/100g) 后, 无菌条件下暴露气管和肺, 环状

国家自然科学基金 (30671784)、江苏省研究生创新工程项目 (ZY320505) 资助

第一作者: 徐乃玉, 女, 1971 年 7 月出生, 2003 年于苏州大学获医学硕士学位, 现为卫生毒理学专业在读博士研究生, 讲师

通讯联系人: 童建

收稿日期: 初稿 2006-12-04, 修回 2007-02-07

软骨下方插管, 结扎右肺, 左肺用生理盐水灌洗 3 次, 收集 BALF 约 15mL, 双层无菌纱布过滤, 离心、洗涤收获 BALF 细胞。取右肺同一部位作常规病理切片, 10%甲醛固定 24h, 石蜡包埋切片, 苏木精-曙红 (Hematoxylin-eosin, HE) 染色, 观察氡及其子体对大鼠肺损伤程度。

1.4 蛋白质样品的制备

2×10^6 细胞中加入 200 μ L 细胞裂解液, 混匀, 在 -80°C 冰箱中反复冻融三次以充分裂解细胞, 加入 RNaseA 和 DNase I, 4°C 放置 15min, 40000g, 离心 30min, 收集上清液, Bradford 法测定其蛋白浓度, -80°C 冻存储备用。

1.5 双向电泳 (2-DE)

等电聚焦 (Isoelectric focusing, IEF) 在 EttanTM IPGphorTM 等电聚焦仪上进行, 选用 24cm 干胶条 (pH3-10L), 泡涨上样 150 μ g, IEF 参数设置: 30V, 水化 12h; 500V 线性升压 1h; 1000V 快速升压 1h; 8000V 线性升压 8h; 总电压时间积为 Vh 约达 66000Vh。IEF 结束后, 胶条经两步骤平衡转移至第二向电泳, 第二向电泳用 EttanTM DALT-six 大型垂直电泳仪, 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 进行。

1.6 银染

SDS 电泳后凝胶银染参照郭尧君介绍的方法

进行^[6]。

1.7 图像采集与分析

双向电泳凝胶 2-DE 分析软件 (ImageMaster 2D Platinum) 进行背景扣除、标准化、点探测、匹配以及蛋白质表达水平的定量比较, 蛋白点量被定义为构成这个点的所有像素点强度值的总和, 为了比较准确的反映蛋白质斑点量的变化, 将整块胶中每个点的量 (体积) 除以每一个蛋白点数量的累加值称为该蛋白质点所占胶内所有蛋白质总量的百分含量, 也称相对含量。不同处理组蛋白匹配点相对含量的比值 >2 或 <0.5 可判为含量有差异。此软件对不同样本蛋白质点的定量比较采用 Students't-test。蛋白点分子量和等电点采用二维校正法 (2D calibration) 确定。

2 实验结果

2.1 组织学检查

HE 染色结果提示, 5 只正常对照组大鼠肺组织结构完整, 无明显炎症反应, 粘膜上皮整齐无脱落 (见图 1a)。5 只氡染毒组大鼠肺内均存在不同程度的病变现象, 出现小支气管粘膜层及平滑肌周围大量炎症细胞, 部分区域浸及肺泡上皮, 肺泡膈增厚, 出现灶性肺气肿, 部分气道腔内可见脱落的气道上皮细胞、渗出的炎症细胞与气道分泌物共同形成混合栓子等变化 (见图 1b 和图 1c)。

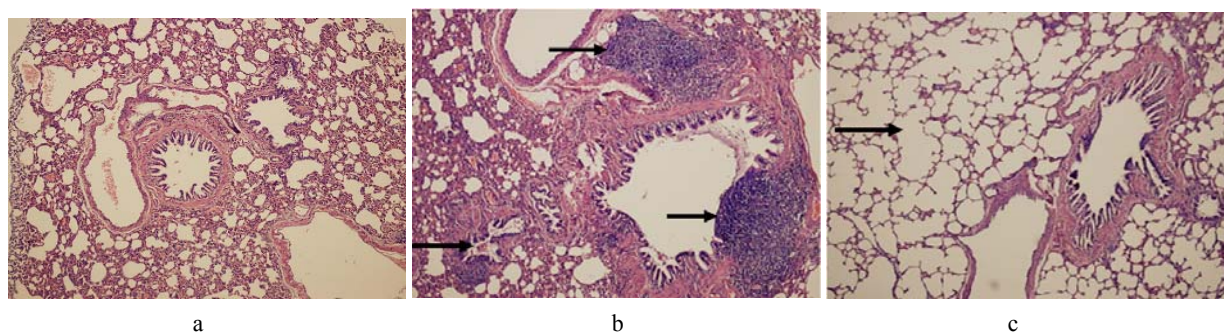


Fig.1 Change of pathology in lung of rats radon-inhaled
a. Control group (HE $\times 100$); b. 200WLM group (HE $\times 100$); c. 200WLM group (HE $\times 100$)

2.2 双向电泳图谱

BALF 细胞蛋白经 2-DE 分离后结果如图 2 所示, 凝胶中斑点的大小、颜色深浅代表不同含量的蛋白质。从图中可以看出, 多数蛋白集中在中间区域, 分布在两端的蛋白斑点较少, 说明中性区蛋白含量较多, 经 ImageMaster 2D Platinum 软件分析

2-DE 凝胶, 正常对照大鼠 BALF 检出蛋白点 645 个, 氡及其子体染毒大鼠 BALF 检出蛋白点为 554 个, 共获得 48 个显著的蛋白质差异点, 其中 23 个点在正常大鼠 BALF 中表达或表达明显增强, 25 个点在染毒大鼠 BALF 中表达或表达明显增强, 差异点放大后如图 3 所示。

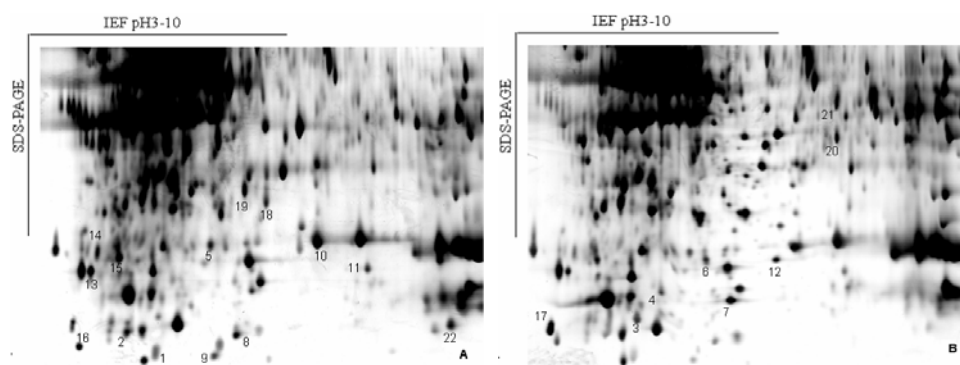


Fig.2 2D-PAGE pattern of proteins extracted from rats' BALF (Control group (A), 200WLM group (B))

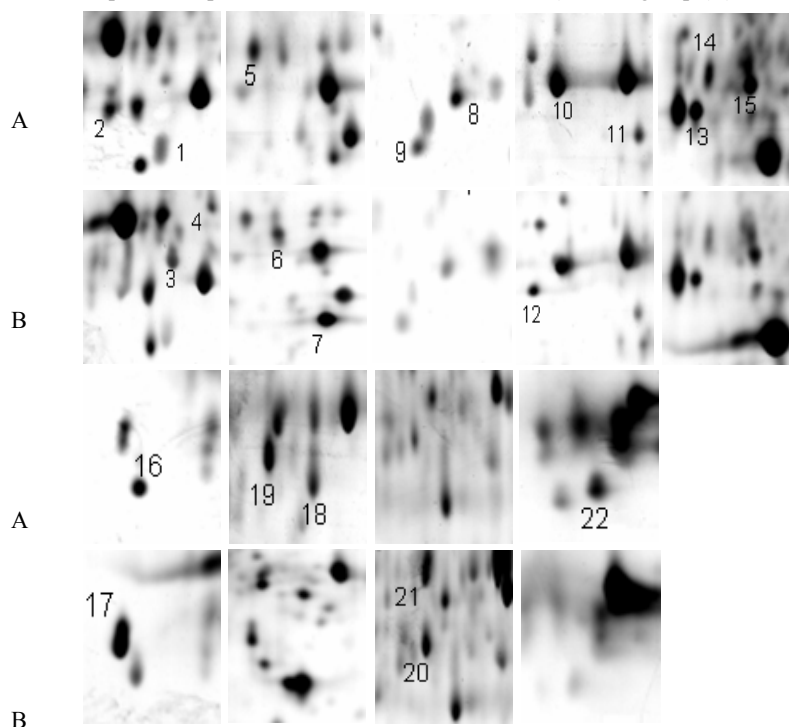


Fig.3 The figures represent highly expressed protein spots in the enlarged regions from Fig.2 (Control group (A), 200WLM group (B))

3 讨论

BALF 作为研究肺泡上皮表层液体中细胞成分和可溶性成分的主要技术方法,已有近百年历史。通过灌洗所收集到的 BALF,经离心可将细胞成分和非细胞可溶性成分分离,细胞成分主要包括肺泡巨噬细胞、淋巴细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞^[7],并随着不同的病理生理状态, BALF 中细胞成分发生变化^[8],分析 BALF 细胞的蛋白质含量和种类,在疾病的诊断及治疗随诊中具有重要的作用。

氢及其子体进入呼吸道后,结合态的氢子体主要沉积在肺区,未结合的氢子体主要沉积在鼻咽区和气管-支气管区,其释放的 α 粒子主要作用的靶细胞是肺支气管上皮细胞,当支气管肺泡上皮发生病变时,可以产生或释放某些物质,并使 BALF 中细胞的分类和计数发生改变,反映出在组织细胞水平

上的损伤。本次实验病理结果表明,染毒组从气管到肺泡都有明显炎性细胞浸润。

BALF 中存在大量的蛋白质,仅仅通过研究某一种或某几种蛋白质含量变化来揭示疾病的发生发展显然是不够的,需要对 BALF 的所有蛋白质进行综合评价。蛋白质组学(Proteomics)正是符合这一要求的研究,“蛋白质组”(proteome)一词于 1994 年由澳大利亚的 Wikins 和 Williams 首先提出^[9],主要基于 3 条理由:(1)从 mRNA 表达水平并不能完全预测蛋白表达水平;(2)蛋白质的动态修饰和加工并非必须来自基因序列;(3)蛋白质组是动态反映生物系统所处的状态^[10]。本实验采用蛋白质组的 2-DE 技术,比较对照组和氢吸入组的双向电泳图

谱, 虽其分辨率还不能分辨大鼠 BALF 细胞的全部蛋白质, 但应用该技术可以初步分析染毒后 BALF 细胞蛋白质组整体变化, 主要表现为 2-DE 图谱中蛋白质斑点的增减以及颜色的深浅上。从本实验结果看, pH3-10 胶条分离后, 蛋白点主要集中在中性区域, 导致许多偏中性、大分子量的蛋白质点没有完全分开, 可以通过改进方法解决这个问题, 如采用窄 pH 范围的胶条或采用非线性 pH 的胶条、降低胶的浓度、增加除盐步骤可以减轻斑点的拖尾现象等方法。实验中得到的差异蛋白点仅为一些表达丰度较高的点, 银染技术虽然灵敏, 但对一些本身含量非常低的点还不能检测, 所以实验图谱中仅能分辨出有限的蛋白点。对照组和氡染毒组中均有一定数量的蛋白质表达上调或下调, 说明氡对动物作用的复杂性, 如果想进一步确定差异点是何种蛋白, 需进一步运用质谱等方法鉴定和验证, 以获得氡染毒后早期生物学效应的相关蛋白质。

参考文献

- 1 The International Programme on Chemical Safety (IPCS). Environmental Health Criteria 211. Geneva: World Health Organization (WHO), 1999. 57-59
- 2 李冰燕, 童建. 卫生毒理学杂志, 2004, **18**(3): 137-140
LI Bingyan, TONG Jian. J Health Toxicol, 2004, **18**(3): 137-140
- 3 李冰燕, 童建, 洪承皎, 等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2003, **21**(2): 116-119
LI Bingyan, TONG Jian, HONG Chengjiao, *et al.* J Radiat Res Radiat Process, 2003, **21**(2): 116-119
- 4 苏世标, 仲恒高, 张卫, 等. 工业卫生与职业病, 2006, **32**(3): 143-146
SU Shibiao, ZHONG Henggao, ZHANG Wei, *et al.* Ind Hlth Occup Dis, 2006, **32**(3): 143-146
- 5 李冰燕, 童建. 中华放射医学与防护杂志, 2004, **24**(3): 199-202
LI Bingyan, TONG Jian. Chin J Radiol Med Prot, 2004, **24**(3): 199-202
- 6 郭尧君编著. 蛋白质电泳实验技术. 北京: 科学出版社, 1999. 141-142
GUO Yaojun ed. Electrophoresis experiment technique in protein. Beijing: science Press, 1999. 141-142
- 7 Mikuz G, Gschwendtner A. Verh Dtsch Ges Pathol, 2000, **84**: 129-135
- 8 Rosenbaum D, Perle S, Holeccek M, *et al.* Radiat Res, 1997, **147**(5): 585-591
- 9 Blackstock W P, Weir M P. Trends Biotechnol, 1999, **17**(3): 121-127
- 10 Haynes P A, Gygi S P, Figeys D, *et al.* Electrophoresis, 1998, **19**(11): 1862-1871

Analysis of different expression proteins of Bronchoalveolar lavage fluid in rats radon-inhaled by two-dimensional gel electrophoresis

XU Naiyu¹ ZHANG Suping² NIE Jihua² DING Jiansong² TONG Jian²

¹(Department of Pharmacy, Soochow University, Suzhou 215123)

²(School of Radiation Medicine and Public Health, Soochow University,

The Key Laboratory of Radiation Medicine and Protection of Jiangsu Province, Suzhou 215123)

ABSTRACT In this paper the different protein expression of BALF in rats inhaled radon was analyzed by use of two-dimensional electrophoresis (2-DE). Male Wistar rats were exposed to radon with the cumulative dose up to 200 working level month (WLM), then the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was collected and the total proteins were extracted. 2-DE was employed to isolate the total proteins of BALF. The gels were stained with silver and differential protein expressions were analyzed with Image Master 2D Platinum software. The total protein spots in the gels of the control and radon-inhaled rats were 654 and 554 respectively, containing 48 differential protein spots in which 23 expressed and obviously increased in the control group and 25 expressed and obviously increased in rats radon-inhaled group. The results indicate that the protein expression of BALF between rats radon-inhaled and the control are different to some extent.

KEYWORDS Two-dimensional electrophoresis (2-DE), Radon, Bronchoalveolar lavage fluid (BALF), Proteome
CLC R994.2, R818.03