

• 论 著 •

蛋白质组学技术分析小鼠中脑能量代谢蛋白

杜国华, 王宏旭, 刘子良

(中国医学科学院 & 北京协和医学院药物研究所, 新药作用机制研究与药效评价

北京市重点实验室, 北京 100050)

摘要:目的 采用蛋白质组学技术鉴定小鼠中脑部位与能量代谢相关的蛋白, 探讨这些蛋白与神经性疾病的关系。**方法** 提取小鼠中脑蛋白质, 采用双向电泳分离, 切取蛋白点进行基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)鉴定。**结果** 双向电泳技术结合 MALDI-TOF MS 成功鉴定出 24 个与能量代谢相关蛋白。**结论** 建立了小鼠中脑部位蛋白质的鉴定方法, 为探讨这类蛋白质在神经系统疾病中的作用奠定了基础。

关键词: 中脑; 能量代谢相关蛋白; 蛋白质组学; 双向电泳; 基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.13.019

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)13-1846-03

Proteomic analysis of energy metabolism-related proteins of mice midbrain

Du Guohua, Wang Hongxu, Liu Ziliang

(Beijing Key Laboratory of New Drug Mechanism and Pharmacodynamics Evaluation, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: **Objective** To identify energy metabolism-proteins of mice midbrain by using the proteomic technique, and to investigate the relationship between these proteins and neural diseases. **Methods** Two-dimensional gel electrophoresis was used to separate totally soluble proteins extracted from mice midbrain. Some protein spots on two-dimensional gel electrophoresis gels were analyzed by using matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). **Results** 24 protein spots related with energy metabolism were separated by two-dimensional gel electrophoresis and identified by using MALDI-TOF MS successfully. **Conclusion** The establishment of energy metabolism-related proteins map of mice midbrain lays a foundation for the research on the involvement of these proteins in neural disease pathogenesis.

Key words: midbrain; energy metabolism-related proteins; proteomics; two-dimensional gel electrophoresis; matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry

神经退行性疾病在老年人群中发病率较高, 随着社会人口的老齡化, 其发病率呈逐年上升的趋势, 因此, 对老年退行性疾病的研究具有非常重要的意义。神经退行性疾病的病因复杂, 线粒体功能障碍学说、氧化应激学说、蛋白质发生错误折叠聚集、炎症、免疫功能缺陷、基因突变等已得到认可。其中线粒体功能障碍是阿尔兹海默病(AD)的重要原因, 相关蛋白、酶类的异常会影响能量代谢, 导致多种疾病的发生。线粒体损伤引起的细胞凋亡也与其他多种神经退行性疾病有关, 如亨廷顿病、帕金森病(PD)、线粒体肌病等。因此研究能量代谢相关蛋白至关重要, 有利于从该类蛋白中发现药物治疗神经疾病的新靶点。蛋白质组学技术能够从整体水平分析蛋白质的变化, 是探索疾病病因、发病机制、药物开发的有力工具。相关研究一直很活跃, 如王杉等^[1]研究了黄连解毒汤对快速老化模型小鼠海马蛋白表达的影响, 李红杰等^[2]做了诱导 PC12 细胞损伤的蛋白质组学研究工作, 杨国锋等^[3]开展了丁苯酞对缺氧致 PC12 细胞损伤保护作用的比较蛋白质研究。本实验采用蛋白质组学的方法鉴定小鼠中脑内的多个能量代谢相关蛋白, 为神经退行性疾病药物开发提供可能的靶点, 为神经病理学研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性 C57 小鼠, 体质量 23~25 g, 购于维通利华实验动物技术有限公司。所有小鼠均自由摄食和饮水, 适应

1 周后进行实验, 实验中所有操作均遵循北京市实验动物伦理委员会的规定。

1.2 仪器与试剂 Ettan IPGphor3 等电聚焦仪、Ettan DALTsix 垂直电泳槽、ImageScanner III 扫描仪、LabScan6.01 凝胶扫描软件及 ImageMaster6.01 凝胶图像分析软件(美国 GE Healthcare 公司); 基质辅助激光解吸电离飞行时间串联(MALDI-TOF/TOF)质谱仪(美国 Applied Biosystems 公司)。所有进口试剂均购于美国 Sigma 和 Promega 公司; 固相 pH 梯度干胶条(18 cm、线性、pH 3~10)、IPG 缓冲液(pH 3~10)均购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司; 其余试剂均为国产分析纯。所有溶液均用 Milli Q 水配制。

1.3 双向电泳 C57 小鼠断头取脑, 冰上分离中脑, 用非变性裂解液提取中脑总蛋白, 采用 Bradford 法定量蛋白浓度。按照双向电泳操作指南将制得的蛋白样品进行分离, 然后考马斯亮蓝染色, 脱色, 采用 LabScan6.01 软件控制的 ImageScanner III 扫描仪扫描得到双向电泳图谱。

1.4 质谱测定 切割双向电泳凝胶上的蛋白质点置于 Eppendorf 管进行胶内酶切, 经过脱色、还原、烷基化、酶解等步骤处理获得样品, 将制备好的样品与基质 α -氰基-4-羟基肉桂酸混匀点样, 于质谱仪测定。通过一级质谱获得肽指纹图, 对一级质谱获得的高丰度肽段进行二级质谱分析, 用 Mascot 软件

进行肽段鉴定,选择 Swiss-Prot 数据库进行搜索。

2 结 果

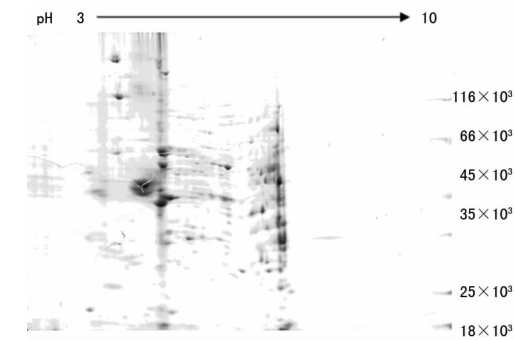
2.1 双向电泳的凝胶谱图 通过优化实验条件,获得了小鼠中脑的双向电泳图谱(见图 1),显示所鉴定蛋白的胶上分布,小鼠中脑蛋白的等电点多数在 4.0~8.0 之间。Im-

ageMaster6.01 软件对所获的 3 张图谱分析后,确认重复性良好的蛋白点进行质谱分析。

2.2 质谱鉴定蛋白质 从电泳胶上切取蛋白点进行一级和二级质谱鉴定,所得到的可信鉴定结果中,能量代谢相关蛋白 24 个,见表 1。

表 1 蛋白质组学方法所鉴定的小鼠中脑内的能量代谢相关蛋白

序号	蛋白质名称	蛋白质 ID	相对分子质量 (×10 ³)	等电点	肽数目	蛋白质得分	置信区间(%)
1	三磷酸腺苷合成酶 D 链	ATP5H	18.66	5.52	7	367	100.00
2	三磷酸腺苷合成酶 α 亚基	Q03265	59.83	9.22	5	116	100.00
3	三磷酸腺苷合成酶 d 亚基	Q9DCX2	18.79	5.52	7	371	100.00
4	肌酸激酶	S24612	47.38	8.39	14	256	100.00
5	肌酸激酶 B 型	Q04447	42.98	5.40	11	524	100.00
6	糖原磷酸化酶	Q9ET01	97.83	6.63	17	57	97.06
7	磷酸丙糖异构酶	P17751	27.04	6.90	9	653	100.00
8	磷酸甘油酸变位酶 1	Q9DBJ1	28.93	6.67	7	393	100.00
9	乳酸脱氢酶 B 亚基	P16125	36.83	5.70	8	236	100.00
10	β-烯醇酶	P21550	47.34	6.73	5	89	100.00
11	α-烯醇酶	P17182	47.46	6.37	14	404	100.00
12	磷酸甘油醛脱氢酶	P16858	36.08	8.44	7	179	100.00
13	果糖二磷酸醛缩酶 A	P05064	39.80	8.31	16	372	100.00
14	果糖二磷酸醛缩酶 C	P05063	39.78	6.67	21	596	100.00
15	谷氨酰胺合成酶	P15105	42.85	6.64	9	183	100.00
16	磷酸烯醇丙酮酸羧基激酶	Q8BH04	71.35	6.92	7	60	98.42
17	鸟苷酸合成酶	Q3THK7	77.43	6.29	9	65	99.45
18	丙酮酸脱氢酶 E1 成分 β 亚基	Q9D051	39.26	6.41	8	60	98.19
19	丙酮酸激酶同工酶 M1/M2	P52480	58.38	7.18	6	227	100.00
20	碳酸酐酶 2	P00920	29.13	6.49	7	358	100.00
21	载脂蛋白 A-I	Q00623	30.57	5.64	7	83	99.99
22	苹果酸脱氢酶	P14152	36.66	6.16	7	266	100.00
23	谷氨酸脱氢酶 1	P26443	61.64	8.05	14	386	100.00
24	二氢硫辛酸脱氢酶	O08749	54.75	7.99	4	197	100.00



胶右侧:相对分子质量;胶上方:等电点。

图 1 小鼠中脑的双向电泳图

3 讨 论

本研究通过优化实验条件,获得了小鼠中脑的双向电泳图

谱,结合飞行时间质谱和生物信息学方法一次鉴定了小鼠中脑内 24 种能量代谢相关蛋白,证明了蛋白质组学技术检测这类蛋白的可行性,为研究神经系统疾病的靶点蛋白奠定基础。

本文鉴定了线粒体三磷酸腺苷合成酶的不同亚型,已有研究报道,三磷酸腺苷合成酶在老化模型小鼠海马中表达明显下调,提示其脑中存在能量代谢障碍^[1]。给予黄连解毒汤后该酶表达明显上调,推测可能是黄连解毒汤使三磷酸腺苷合成酶的氧化减少,活性恢复,减少了脑中能量代谢的异常改变。本研究鉴定的蛋白质中有几种属于糖酵解酶,有研究表明诱导 PC12 细胞损伤时,果糖二磷酸醛缩酶和肌酸激酶的表达均下调,提示这些蛋白可能对神经性疾病的早期诊断和靶向治疗具有重要作用^[2]。黄连解毒汤对快速老化模型小鼠灌胃治疗后^[1],海马中醛缩酶和谷氨酰胺合成酶的表达下调,表明能量代谢相关酶与神经系统老化有重要关系。文献[4]报道大鼠海

马受 6-羟多巴胺(6-OHDA)损伤后磷酸丙糖异构酶上调,重度磷酸丙糖异构酶缺陷可导致神经退行性病变^[5]。有研究表明,DJ-1 敲除的细胞,产生的活性氧(ROS)增多,可以加速 6-OH-DA 介导的细胞凋亡,糖原磷酸化酶的转录水平上调,使得 DJ-1 缺陷的细胞更容易受到氧化应激^[6]。对鱼藤酮 PD 模型中磷酸甘油醛脱氢酶的活性抑制和蛋白表达研究显示,鱼藤酮诱导 PC12 细胞死亡时,磷酸甘油醛脱氢酶过表达,且观察到黑质多巴胺神经元路易小体,而磷酸甘油醛脱氢酶的活性降低,诱发 PD,提示磷酸甘油醛脱氢酶可能是神经保护和治疗策略的新靶标^[7]。

与氨基酸代谢相关的蛋白质鸟苷酸合成酶、谷氨酰胺合成酶和 5 种氨基酸脱氢酶得到了鉴定。其中谷氨酰胺合成酶是一种控制氮代谢的酶,可以使神经兴奋性毒性物质谷氨酸和氨离子转换成谷氨酰胺,其失活会导致氨毒性增强,且氨也是导致 AD 的原因之一^[8]。氨基酸脱氢酶通常调节氨基酸代谢和糖代谢,在细胞的多种生理活动中起重要作用。丙酮酸脱氢酶与线粒体能量代谢相关,是糖有氧氧化的关键酶,其活性下调可引起糖代谢障碍^[9]。

载脂蛋白 A-I 的综述表明,神经退行性疾病血清和脑脊液中载脂蛋白 A-I 的表达下调,载脂蛋白 A-I 在胆固醇转运和炎症调控中起着重要作用^[10]。氧化还原蛋白质组学研究表明载脂蛋白 A-I 容易氧化改性,载脂蛋白 A-I 的氧化导致肿瘤坏死因子- α (TNF- α)外围水平升高,它可以穿越血脑屏障,信号级联放大,促进神经元死亡。提示载脂蛋白 A-I 是一种很有前途的早期诊断用标记物,可用作神经变性疾病治疗策略的靶标。

本研究运用蛋白质组学技术一次鉴定的这些蛋白在糖代谢、氨基酸代谢或者脂质代谢中起着重要的作用,且与神经退行性疾病有密切关系,提示这些蛋白的异常表达可能与脑内的病理变化相关。进一步的研究可以通过调控这些蛋白的表达使脑内的能量代谢障碍及氨基酸代谢紊乱等得以改善,为治疗神经系统疾病提供一条新途径。

参考文献

[1] 王杉,蒋宁,周文霞,等. 黄连解毒汤对快速老化模型小鼠海马蛋白表达的影响[J]. 中国中药杂志,2007,32(21):2289-2294.

[2] 李红杰,胡林森,常明,等. A β 25-35 诱导 PC12 细胞损伤的蛋白质组学研究[J]. 中风与神经疾病杂志,2009,26(5):527-531.

[3] 杨国锋,高雅,王伟纪,等. 丁苯酞对缺氧致 PC12 细胞损伤保护作用比较蛋白质组研究[J]. 中华神经医学杂志,2013,12(3):251-255.

[4] Dimatelis JJ, Hendricks S, Hsieh J, et al. Exercise partly reverses the effect of maternal separation on hippocampal proteins in 6-hydroxydopamine-lesioned rat brain [J]. Exp Physiol, 2013, 98(1):233-44.

[5] 董雷,蒋宁,周文霞,等. 快速老化模型小鼠海马蛋白质组学初步研究[J]. 高等学校化学学报,2007,28(2):274-277.

[6] Kim SJ, Park YL, Oh YL. Proteomic analysis reveals a protective role for DJ-1 during 6-hydroxydopamine-induced cell death [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 422(1):8-14.

[7] Huang J, Xiong N, Chen C, et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: activity inhibition and protein overexpression in rotenone models for Parkinson's disease [J]. Neuroscience, 2011, 192(1):598-608.

[8] Ovama R, Yamamoto H, Titani K. Glutamine synthetase, hemoglobin alpha-chain, and macrophage migration inhibitory factor binding to amyloid beta-protein: their identification in rat brain by a novel affinity chromatography and in Alzheimer's diseases brain by immunoprecipitation [J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1479(1/2):91-102.

[9] Sunyer B, Diao WF, Kang SU, et al. Cognitive enhancement by SGS742 in OF1 mice is linked to specific hippocampal protein expression [J]. J Proteome Res, 2008, 7(12):5237-5253.

[10] Keeney JTR, Swomley AM, Förster S, et al. Apolipoprotein A-I: Insights from redox proteomics for its role in neurodegeneration [J]. Proteomics Clin Appl, 2013, 7(1/2):109-122.

[1] 王杉,蒋宁,周文霞,等. 黄连解毒汤对快速老化模型小鼠海马蛋白

(上接第 1845 页)

早期诊断中的临床应用[J]. 山西医药杂志,2010,35(5):477-478.

[2] 王火强,郑金旭,刘丽,等. 肿瘤标志物指数用于术前非小细胞肺癌的预后评估[J]. 临床检验杂志,2012,30(1):33-35.

[3] Li X, Asmitananda T, Gao L, et al. Biomarkers in the lungcancer diagnosis: a clinical perspective [J]. Neoplasma, 2012, 59(5):500-507.

[4] 蒙飞,王恒,梁鑫. 肿瘤标志物联合检测在非小细胞肺癌诊断中的应用价值[J]. 国际检验医学杂志,2014,35(19):2638-2643.

[5] 李娜,李国华. 肿瘤标志物联合检测在肺癌诊断及鉴别诊断中的应用价值[J]. 国际检验医学杂志,2014,35(16):2171-2173.

[6] 江涛. 比较 5 种血清肿瘤标志物联合检测对肺癌诊断和治疗的临床效果[J]. 中国医学创新,2014,11(3):62-64.

[7] 韦月梅,邹洪才,孔建忠,等. 血清 CA125、CEA、CA199 联合检测

对肺部疾病的诊断价值[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2010,31(20):3215-3216.

[8] 王明丽,徐笑红,樊璠. 6 种血清肿瘤标志物对肺癌检测的临床评价及其诊断价值[J]. 中国卫生检验杂志,2010,20(8):1968-1970.

[9] 郭满盈,陈扬,邱黎霞. 不同血清肿瘤标志物联合检查在老年人肺癌诊断中的价值[J]. 中华老年医学杂志,2010,29(8):677-678.

[10] Loboda A, Nebozhyn M, Zhang T, et al. Methods and gene expression signature for assessing ras pathway activity; US Patent Application 12/761,772 [P]. 2010-4-16.

[11] 李海燕,刘红,王静,等. 肿瘤标志物联合检测在肺癌诊断中的价值[J]. 中国老年学杂志,2012,32(1):46-48.

[12] 曾聪,全国莉,王春莲. 联合检测 6 种血清肿瘤标志物在肺癌诊断中的意义[J]. 广东医学,2012,36(6):808-810.

(收稿日期:2015-04-28)

(收稿日期:2015-05-10)