

高胆固醇血症小鼠肝脏的差异表达蛋白

冯亚敏¹, 朱叶飞², 陈秀英¹, 沙家豪², 范乐明¹, 陈琪¹

(南京医科大学 1. 动脉粥样硬化研究中心, 2. 江苏省生殖医学重点实验室, 江苏省南京市 210029)

[关键词] 病理学与病理生理学; 高胆固醇血症的差异表达蛋白; 双向电泳; 质谱; 肝脏; C57BL/6 小鼠
[摘要] 运用以双向电泳为基础的蛋白质组学研究手段, 比较分析高胆固醇血症小鼠与正常小鼠肝脏差异表达蛋白。用高脂饲料复制小鼠高胆固醇血症模型, 饲喂 14 周后高脂组小鼠血浆中总胆固醇为 9.5 ± 3.9 mmol/L, 肝脏中总胆固醇为 35.3 ± 3.7 mg/g, 均明显高于对照组 ($P < 0.001$)。提取两组小鼠肝脏总蛋白, 双向凝胶电泳分离蛋白质, 所获得的凝胶图谱经软件分析后确定差异点及其等电点与分子质量, 利用质谱技术对差异蛋白进行肽质量指纹谱分析鉴定, 再与蛋白质数据库中的小鼠肝脏标准图谱匹配验证。双向凝胶电泳分离蛋白质样品的分辨率好、重复性较高, 两组间至少有 16 个点有稳定的差异表达 (2 倍以上), 鉴定其中 4 个点个为主要尿蛋白系列, 2 个点为碳酸酐酶 III, 2 个点为谷胱甘肽 S-转移酶 P2。实验结果提示: 主要尿蛋白、碳酸酐酶 III 及谷胱甘肽 S-转移酶等受雄激素调控的蛋白质表达下调, 可能与饮食引起的高胆固醇血症相关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Studies on the Differentially Expressed Proteins in Liver of Hypercholesterolemic Mice

FENG Ya-Min¹, ZHU Ye-Fei², CHEN Xiu-Ying¹, SHA Jia-Hao², FAN Le-Ming¹, and CHEN Qi¹

(1. Atherosclerosis Research Center; 2. Key Laboratory of Reproductive Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

[KEY WORDS] Hypercholesterolemia; Two Dimensional Electrophoresis; Mass Spectrometry; Liver; C57BL/6 mice

[ABSTRACT] **Aim** To compare the liver protein profiles of hypercholesterolemic and normal mice by using the technology of proteomics. **Methods** The hypercholesterolemic mice were obtained after feeding atherogenic diet for 14 weeks. Protein extractions from mice livers were separated by two-dimensional electrophoresis and the gels were analysed with image analysis software. The differentially expressed proteins were identified primarily by mass spectrometry and then confirmed by comparing with the nice gel image in protein database Swiss Prot. **Results** The hypercholesterolemic mouse model has been successfully prepared. The total cholesterol levels in plasma and liver of hypercholesterolemic mice increased significantly. The protein extractions separated by two-dimensional electrophoresis have got high resolution and reproducibility. Sixteen differentially expressed protein spots (> 2 fold) have been found and 8 of which were identified as major urinary proteins (MUPs), carbonic anhydrase III and Glutathione S-transferase P2. **Conclusion** The under-expression of MUPs, carbonic anhydrase III and Glutathione S-transferase P2, which regulated by androgens, may be related to diet-induced hypercholesterolemia.

在不同应激或病理状态下, 蛋白质组系细胞或组织在特定条件下表达的所有蛋白质组成和含量都会发生变化。比较蛋白质的表达水平, 是目前蛋白质组学研究的主要内容, 在很多疾病的研究中有着广泛的应用前景^[1]。肝脏作为强大的蛋白质合成器官一直成为蛋白质组学的研究热点。尤其在脂代谢平衡中, 肝脏作为外源性和内源性脂代谢途径的交汇点及调节中心, 发挥着特别重要的作用, 其蛋白质组的变化在近几年中成为关注的焦点。Steiner 等^[2]研究了洛伐他丁对肝脏蛋白质组的影响, Edvardsson 等^[3]研究了过氧化体增殖物激活型受体 γ 选择性激

动剂在肥胖小鼠肝脏中所引起的蛋白质的变化^[4]。而高脂饮食作为一种可以导致高胆固醇血症的外源性因素, 其对于肝脏蛋白质表达谱的影响却鲜见报道。本研究运用以双向电泳为基础的蛋白质组学研究手段, 可以从整体水平对高脂饮食所导致的肝脏蛋白表达谱变化进行分析。

1 材料和方法

1.1 动物

雄性 6 周龄 C57BL/6 小鼠, 清洁级, 由上海西普尔—必凯实验动物有限公司提供 (沪动合证字第 153 号)。

1.2 试剂和仪器

尿素、固相 pH 梯度胶条缓冲液 (immobilized pH gradients Buffer, IPGB)、丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、过硫酸胺和四甲基乙二胺、溴酚蓝、低分子质量蛋白质

[收稿日期] 2004-02-25 [修回日期] 2004-05-18

[基金项目] 江苏省自然科学基金 (BJ2000022) 资助

[作者简介] 冯亚敏, 硕士, 研究方向为脂代谢的分子机制。朱叶飞, 博士, 主要从事蛋白质组学的研究。陈琪, 博士, 教授, 博士研究生导师, 本文通讯作者, 主要从事脂代谢及动脉粥样硬化性疾病分子机制研究, 联系电话 025-86862610, E-mail 为 qichen@njmu.edu.cn。

标准品和固相 pH 梯度胶条 (IPG 胶条, Ph3-10, 线性) 均购自 Amersham 公司。3-[(3-胆酰胺基)-二乙胺]-丙磺酸 {3-[(3-Chloamidopropyl) dimethyl-ammonio]-1-propanesulfonate, CHAPS}、硫脲、乙腈、碳酸氢铵、三氟乙酸购于 Sigma 公司。二硫苏糖醇、十二烷基磺酸钠、甘氨酸、硫代硫酸钠、低熔点琼脂糖、三羟甲基氨基甲烷、考马斯亮兰 G250 均为 Amresco 进口分装。序列修饰后胰蛋白酶(modified trypsin)购于 Promega 公司。脂质检测试剂盒购于北京中生公司。

双向电泳第一向采用的 IPG phor 聚焦系统, 第二向采用的 Hoefer SE600 和双向电泳图象分析软件均为 Amersham 公司产品。质谱分析仪 AUTOFLEX 为德国 Bruker 公司产品。超速离心机为 Beckman 公司产品。

1.3 动物造模与标本取材

取 6 周龄雄性 C57BL/6 小鼠 10 只, 随机分为 2 组, 分别给予普通饲料及高脂饲料(配方为在普通饲料基础上加入 15% 猪油, 1.25% 胆固醇, 0.5% 胆酸钠^[5]), 喂养 14 周后, 禁食过夜, 颈椎脱臼法处死, 摘眼球取血, 取其肝脏, 迅速放入预冷的 PBS 溶液中漂洗, 分装至冻存管, 液氮速冻, -80℃ 保存。

1.4 脂质测定

采用试剂盒测定血浆中总胆固醇 (total cholesterol, TC) 和甘油三酯 (triglyceride, TG), 肝脏中脂质含量用冷抽提法提取后同样用试剂盒测定。

1.5 肝脏中总蛋白的提取

取出冻存的肝脏, 按 W/V 约等于 1/5 加入裂解液后冰上匀浆。裂解液配方如下: 7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 4% (W/V) CHAPS, 65 mmol/L 二硫苏糖醇, 40 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷, 2% (V/V) IPG Buffer。匀浆后混悬液 4℃ 放置 1h 以使蛋白质充分溶解, 30 kr/min 4℃ 离心 1 h, 吸取上清分装后 -70℃ 保存。同时用 Bradford 法测定提取物中蛋白浓度。

1.6 双向凝胶电泳的分离

用 IPG phor 聚焦系统进行第一向等电聚焦, 取 2 根 11 cm 长 Ph3-10 线性胶条, 蛋白质上样量为 50 μg, 等电聚焦步骤如下: 12 h 重泡涨, 其间加低电压 (30 V 6 h, 60 V 6 h) 帮助样品进入 IPC 胶条; 500 V 1 h, 1 kV 1 h, 8 kV 约 2 h, 等电聚焦总 V × h 数为 15 kVh。等电聚焦结束后在平衡液中进行二步平衡, 第一步平衡用 1% 二硫苏糖醇, 第二步将二硫苏糖醇换成 2.5% 的碘乙酰胺。灌制浓度为 12.5% 的 SDS-PAGE 胶, 胶厚 1.5 mm, 将平衡好的等电聚焦胶条转移至 SDS-PAGE 胶上, 用低熔点的琼脂糖封胶后行第二向 SDS-PAGE。

1.7 染色

分析胶采用 Amersham 公司《双向电泳实验手册》中推荐的硝酸银染色方法, 考马斯亮兰染色按 Neuhoff 胶体考马斯亮兰 G-250 的方法进行。

1.8 分析

染色后的胶用 Image Master 扫描, 扫描后用 Elite (Version 4.0) 图象分析软件进行图象处理, 经点的检测、背景消减、等电点与分子质量校正、匹配等步骤比较蛋白点的差异。确定差异的点。

1.9 蛋白质鉴定

选取考染胶上的蛋白点切下, 将切下的胶粒移入 500 μL 的 Eppendorf 管中, 50 mmol/L 碳酸氢铵/乙腈 (1:1) (V/V) 对胶粒进行脱色, 重复 2~3 次至蓝色完全脱去。加入乙腈对胶粒进行脱水, 重复 2~3 次。干燥后的胶粒加入 10 μL 序列修饰后的胰蛋白酶 (浓度 10 mg/L), 37℃ 孵育 30 min 后, 吸去多余液体, 加 20 μL 25 mmol/L 碳酸氢铵 37℃ 孵育过夜。完毕后用 40 μL 含 5% 三氟乙酸和 50% 乙腈的溶液萃取多肽两次, 合并上清, 真空离心干燥。质谱仪检测肽质量指纹谱由北京 Bruker 公司完成, Matrixscience 网站中 MASCOT 搜索引擎进行数据库检索确定蛋白, 再与蛋白质数据库 SWISS-PROT (<http://cn.expasy.org/>) 中的小鼠肝脏二维胶的图谱匹配, 以进一步验证。

1.10 统计学处理

实验所得数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两样本均数的比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 血浆和肝脏脂质水平比较

高脂组与对照组小鼠血浆及肝脏中脂质水平见表 1 (Table 1)。可见高脂组小鼠血浆中 TC 水平高于对照组而 TG 低于对照组; 肝脏中 TC 和 TG 水平均高于对照组。

表 1. 小鼠血浆和肝脏总胆固醇和甘油三酯水平比较 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 5)

Table 1. Comparison of lipid levels in plasma and liver of mice

分 组	总胆固醇		甘油三酯	
	血浆 (mmol/L)	肝脏 (mg/g)	血浆 (mmol/L)	肝脏 (mg/g)
对照组	2.33 ± 0.39	2.63 ± 0.28	0.76 ± 0.12	16.9 ± 5.5
高脂组	9.5 ± 3.9 ^c	35.3 ± 3.7 ^c	0.34 ± 0.11 ^b	27.5 ± 4.1 ^b

b: *P* < 0.01, c: *P* < 0.001, 与对照组比较。

2.2 肝脏组织形态学

肉眼可见高脂组肝组织呈灰白色,HE 染色切片见胞浆内空泡增多。电镜下可见高脂组肝脏胞浆内圆形空泡增多,并有胆固醇结晶状空泡。

2.3 双向凝胶电泳图谱分析

共行 3 组电泳,每组分别为对照与高脂小鼠肝脏各一例。通过软件分析统计,平均每张 11 cm×14 cm 的银染胶上能检测到约 500 个点,谱图基本一致,重复性良好(图 1,Figure 1)。为了减少由染色深

浅及背景所导致的蛋白质点灰度的差异,软件自动计算出每个点的灰度占胶上所有点灰度之和的比值,通过该比值进行比较以消除胶与胶之间的差异。比值相差 2 倍或以上者视为有差异的点。经分析,3 组均相差 2 倍以上的点共有 16 个。其中,该比值相差最大的是点 1~点 4,在高脂组中下降了近二十倍,点 5 和点 6 在高脂组下降了约 6 倍。

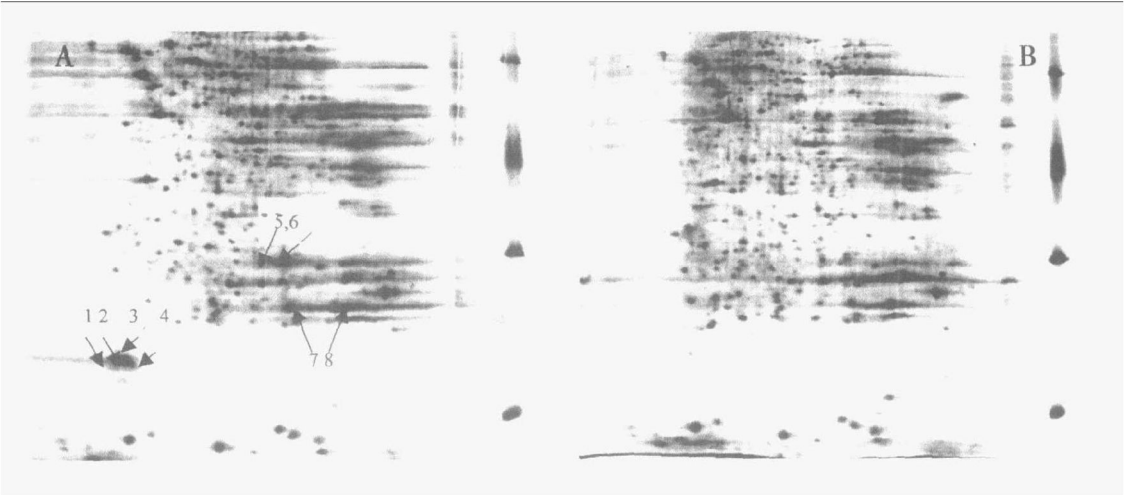


图 1. 小鼠肝脏总蛋白的双向电泳图谱 A 为对照组小鼠,B 为高脂组小鼠;银染胶,用箭头标出的为第 1~8 号差异蛋白。
Figure 1. The 2-DE maps of murine liver

表 2. 5 个差异表达蛋白质点的参数
Table 2. Parameters of five differentially expressed proteins identified by mass spectrometry

蛋白质点	数据库序列号	肽段覆盖率	得分	理论等电点/分子质量(kD)	蛋白质名称
点 2	P04938	80%	129	4.80/19.0	主要尿蛋白 11
	P02762	67%	127	4.80/19.0	主要尿蛋白 8
					主要尿蛋白 6
点 3	P11589	64%	122	4.88/19.0	主要尿蛋白 2
点 5	P16015	15%	35	6.74/27.9	碳酸酐酶 III
点 6	P16015	22%	73	6.98/28.1	碳酸酐酶 III
点 7	P19157	17%	55	7.08/24.9	谷胱甘肽 S-转移酶 P2

2.4 质谱鉴定结果

选取点 1~点 8 进行质谱鉴定,这 8 个点在高脂组小鼠都表现出明显的下调。经鉴定点 1~点 4 为主要尿蛋白系列(major urinary proteins, MUP),点 5 和点 6 为碳酸酐酶 III(carbonic anhydrase III),点 7 和点 8 为谷胱甘肽 S-转移酶 P2(glutathione S-transferase

P2)。表 2 (Table 2)为点 2、点 3、点 5、点 6 和点 7 鉴定出的蛋白质数据。

3 讨论

动脉粥样硬化所致的心脑血管疾病是严重危害人类生命健康的疾病之一。高胆固醇血症是此类疾病的主要危险因子,而它的发生与饮食、运动及遗传等多种因素相关。机体胆固醇水平的调节主要是在转录水平上由固醇反应元件结合蛋白和肝脏 X 受体来完成。肝脏通过分泌载脂蛋白和脂蛋白、脂代谢酶、表达脂蛋白受体等调节血脂水平从而在脂代谢中发挥中心作用。所以,肝脏是研究脂代谢的合适靶器官,我室曾研究过人胚肝脂代谢相关基因的表达谱^[6]。本研究采用高脂饲料复制的高胆固醇血症小鼠模型,其血脂谱改变与相关文献一致^[7],肝脏中脂质蓄积明显,表明造型良好。

作为蛋白质组学核心技术的双向电泳(two-dimensional electrophoresis, 2DE)目前仍是分离蛋白质混合物的最有效手段。在本研究中,第一向采用商品化固相胶条,获得了重复性良好的图谱,使得组间

更具可比性。软件分析结果表明,高胆固醇血症小鼠的肝脏图谱上至少十几个蛋白点显示出稳定的变化(上调或下调大于2倍)。由于是饮食改变造成了小鼠脂代谢改变,因此我们推测这些差异蛋白可能与脂代谢有着直接或间接的关系。我们所鉴定出的这几种差异蛋白在 Swiss Prot 蛋白数据库中查询均获得了较高的序列覆盖率及得分,且与库中标准图谱匹配结果完全一致,证明本研究结果是可信的。

主要尿蛋白系列(MUP)是一种雄性小鼠特有的蛋白质,由雄激素调控其表达,在肝脏中合成,分泌到血管中,最后由尿液排出体外。MUP 作用是结合小鼠的信息素,延缓信息素在尿液中的挥发,可能与动物的个体识别有关^[8]。在雄性的 C57BL/6J 小鼠中,MUP 的合成占整个肝脏蛋白质合成的 3.5% ~ 4.0%,这与本研究中由软件计算出它的灰度占胶上所有点灰度之和的 3.582% 相吻合。有报道在 Huntington's 病(一种遗传所致的神经退行性疾病)小鼠模型的肝脏中也有类似的变化^[9],在一种中风的动物模型中 MUP 也发现下调^[10],还有报道在正常和肥胖的小鼠肝脏中 MUP2 也表现出了明显的差异^[3]。而碳酸酐酶Ⅲ是反应活性很低的一种碳酸酐酶同工酶,有报道用双向电泳分析新西兰肥胖小鼠与 C57BL/6 小鼠的腹部皮下脂肪组织检测到 4 个明显下调的点,随后用蛋白质序列分析,有 2 个是碳酸酐酶Ⅲ的同源物^[11]。值得注意的是,碳酸酐酶Ⅲ和谷胱甘肽 S-转移酶 Pi 类型的表达也是部分受雄激素调控^[12,13]。

在本研究中,检测出的饮食源性高胆固醇血症小鼠肝脏三种明显下调的差异蛋白都受雄激素调控,其机理不明。可能是因为高胆固醇血症影响了小鼠体内雄激素的合成,从而受其调控表达的几种蛋白的量有了明显的下降。一般认为雄激素是男性更易发生冠状动脉疾病的主要因素。然而近几年已有越来越多的流行病学研究表明男性体内低雄激素的水平与更高的冠状动脉疾病的发病率相关^[14]。血浆中雄激素含量与体内脂肪量成负相关,尤其是内脏中脂质的含量^[15]。最近一些实验研究还表明,体内的天然雄激素对早期动脉硬化的发生发展起着阻遏作用^[16,17]。而同时,也有研究发现高胆固醇血症对于 Leydig 和 Sertoli 细胞的分泌功能、精子发生、精子成熟过程、精子的生殖潜力都有有害的影响^[18]。本研究虽然发现受雄激素调控的几种蛋白质的表达量有所下降,但体内雄激素水平如何变化以及高胆固醇血症是如何影响雄激素水平的还需进

一步研究。也许在高胆固醇血症形成以后,雄激素的合成与分泌也受到影响,这失去了雄激素的阻遏早期动脉硬化的发展的作用,更加剧了病程向动脉粥样硬化的方向发展,从而导致一系列心脑血管疾病的发生。当然,这几种蛋白丰度下降也许还通过其他途径如氧化应激等等,这其中的机理,还需进一步的研究。

[参考文献]

- [1] Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, 2000, 405: 837-846
- [2] Steiner S, Gatlin CL, Lennon JJ, McGrath AM, Aponte AM, Makusky AJ, et al. Proteomics to display lovastatin-induced protein and pathway regulation in rat liver. *Electrophoresis*, 2000, 21 (11): 2 129-137
- [3] Edvardsson U, Bergstrom M, Alexandersson M, Barnberg K, Ljung B, Dahllof B. Rosiglitazone (BRLA9653), a PPAR γ -selective agonist, causes peroxisome proliferator-like liver effects in obese mice. *J Lipid Res*, 1999, 40 (7): 1 177-184
- [4] Edvardsson U, von Lowenhilff HB, Panfilov O, Nystrom AC, Nilsson F, Dahllof B. Hepatic protein expression of lean mice and obese diabetic mice treated with peroxisome proliferator-activated receptor activators. *Proteomics*, 2003, 3 (4): 468-478
- [5] Fazio S, Linton MF. Mouse models of hyperlipidemia and atherosclerosis. *Front Biosci*, 2001, 6: D515-525
- [6] 唐震, 李晓宇, 何龙, 陈秀英, 范乐明, 陈琪. 人胚肝脂代谢相关基因的表达谱. *中国动脉硬化杂志*, 2003, 11 (3): 203-206
- [7] Morrisett JD, Kim HS, Patsch JR, Datta SK, Trentin JJ. Genetic susceptibility and resistance to diet-induced atherosclerosis and hyperlipoproteinemia. *Arteriosclerosis*, 1982, 2 (4): 312-324
- [8] Beynon RJ, Hurst JL. Multiple roles of major urinary proteins in the house mouse, *Mus domesticus*. *Biochem Soc Trans*, 2003, 31 (Pt1): 142-146
- [9] Zabel C, Chamrad DC, Priller J, Woodman B, Meyer HE, Bates GP, et al. Alterations in the mouse and human proteome caused by Huntington's disease. *Mol Cell Proteomics*, 2002, 1 (5): 366-375
- [10] Sironi L, Tremoli E, Miller I, Guernini U, Calvio AM, Eberini I, et al. Acute-phase proteins before cerebral ischemia in stroke-prone rats: identification by proteomics. *Stroke*, 2001, 32 (3): 753-760
- [11] Takahashi H, Oh-Ishi M, Shimizu H, Mori M. Detection and identification of subcutaneous adipose tissue protein related to obesity in New Zealand obese mouse. *Endocr J*, 2001, 48 (2): 205-211
- [12] Shiels A, Jeffery S, Phillips IR, Shephard EA, Wilson CA, Carter ND. Androgen-linked control of rat liver carbonic anhydrase III. *Biochem Biophys Res Commun*, 1983, 114 (5): 475-478
- [13] Hatayama I, Satoh K, Sato K. Developmental and hormonal regulation of the major form of hepatic glutathione S-transferase in male mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 1986, 140 (2): 581-588
- [14] Bhasin S, Herbst K. Testosterone and atherosclerosis progression in men. *Diabetes Care*, 2003, 26 (6): 1 929-931
- [15] Seidell JC, Bjorntorp P, Sjostrom L, Kvist H, Sannerstedt R. Visceral fat accumulation in men is positively associated with insulin, glucose, and C-peptide levels, but negatively with testosterone levels. *Metabolism*, 1990, 39 (9): 897-901
- [16] Alexandersen P, Haarbo J, Byrjalsen I, Lawaetz H, Christiansen C. Natural androgens inhibit male atherosclerosis: a study in castrated, cholesterol-fed rabbits. *Circ Res*, 1999, 84 (7): 813-819
- [17] Nathan L, Shi W, Dinh H, Mukherjee TK, Wang X, Lussis AJ, et al. Testosterone inhibits early atherogenesis by conversion to estradiol: critical role of aromatase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98 (6): 3 589-593
- [18] Yamamoto Y, Shimamoto K, Sofikitis N, Miyagawa I. Effects of hypercholesterolemia on Leydig and Sertoli cell secretory function and the overall sperm fertilizing capacity in the rabbit. *Hum Reprod*, 1999, 14 (6): 1 516-521

(此文编辑 胡必利)