

[文章编号] 1007-3949(2009)17-03-0197-05

• 实验研究 •

RAW 264.7 细胞泡沫化前后差异蛋白质组分析

沈驰斌, 卢德赵, 沃兴德, 李晓娟, 江婷婷, 王 科

(浙江中医药大学生命科学院, 浙江省杭州市 310053)

[关键词] 泡沫细胞; RAW 264.7 细胞; 蛋白质组

[摘要] 目的 应用凝胶内差异显示电泳技术和质谱技术研究小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 泡沫化前后蛋白质组的差异。方法 体外培养 RAW 264.7 细胞, 用氧化型低密度脂蛋白作用使其转变为泡沫细胞。分别提取 RAW 264.7 细胞泡沫化前后的细胞总蛋白, 用荧光染料 Cy3 或 Cy5 进行标记, 与 Cy2 标记的内标等量混合后在同一胶中进行电泳分离, 经不同光激发后扫描得到不同样品的蛋白质组图谱。采用 DeCyder 6.5 软件进行差异蛋白质组分析, 筛选出 12 个差异蛋白质。经质谱鉴定和分析, 其中 10 个蛋白质得到鉴定。结果 RAW 264.7 细胞泡沫化后, 应激蛋白 70、二硫键异构酶、细胞质肌动蛋白和一种未命名的蛋白质表达量降低, 而葡萄糖调节蛋白、烯醇酶、Eno1 蛋白、Peroxiredoxin 4、Stathmin 1 和 BID 蛋白表达量上升。结论 本研究建立了巨噬细胞泡沫化前后蛋白质组图谱, 并成功进行差异蛋白质组分析, 从蛋白质组水平增加了对细胞泡沫化的机制认识, 为细胞泡沫化形成动脉粥样斑块的干预研究提供新思路和新靶点。

[中图分类号] Q7

[文献标识码] A

Differential Proteomics Research in the RAW 264.7 and Foam Cells Induced from RAW 264.7

SHEN Chi-Bin, LU De-Zhao, WO Xing-De, LI Xiao-Juan, JIANG Ting-Ting and WANG Ke

(College of Life-Science, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China)

[KEY WORDS] Foam Cells; RAW 264.7 Cells; Proteomics

[ABSTRACT] **Aim** Two-dimensional difference gel electrophoresis (2-D DGE) and mass spectrum were used to analyse the differential proteins between RAW 264.7 cells and foam cells. **Methods** RAW 264.7 cells cultured in vitro was transformed to foam cells by treating with ox-LDL. The total proteins of the RAW 264.7 cells and foam cells were extracted and labeled with Cy3 and Cy5. Each Cy3-labeled sample and Cy5-labeled sample were mixed on the same 2-D gel along with a Cy2-labeled mixture of all samples as an internal standard and run on the same gel. All images were analyzed by DeCyder software DGE technology with internal standard. 12 unique proteins were selected, and in which 10 proteins were successfully identified. **Results** The expression of Stress protein 70, Disulfide bond isomerase and Cytoplasm actin were decreased in foam cells, then the expression of Glucose regulated protein, Enol protein, Peroxiredoxin 4, Stathmin 1 and BID protein were increased. **Conclusions** The proteomics maps of RAW 264.7 cells and foam cells were established, and some different proteins were selected and identified. Molecular mechanisms about the formation of foam cells was explored from proteomics-level and provided new routes and new targets for the intervention study of foam cells transformation to atherosclerotic plaque.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是常见的危害严重的心血管疾病, 主要累及大、中型动脉。巨噬细胞源性泡沫细胞是早期动脉粥样硬化斑块的主要组成, 是巨噬细胞通过表面的多种受体大量摄取氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL) 颗粒及其他配体, 在胞内大量蓄积胆固醇酯和甘油三酯而形成。巨噬细胞泡沫化后很多细胞功能均发生变化, 继而影响动脉

粥样硬化形成和发展。本研究以小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 作为研究材料, 研究其泡沫化前后蛋白质表达的差异, 分析泡沫细胞形成的分子机制, 为动脉粥样硬化及其他与泡沫细胞相关疾病的早期预防和治疗提供一些新的靶点^[1]。

1 材料和方法

1.1 材料

血浆购自浙江省血液中心; DMEM 培养基 (含青霉素、链霉素)、胎牛血清和胰蛋白酶购自杭州昊天生物技术有限公司; 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、尿素、硫脲、甘氨酸、Tris、CHAPS、SDS、碘乙酰胺、固

[收稿日期] 2008-12-04 [修回日期] 2009-03-01

[作者简介] 沈驰斌, 研究方向为动脉粥样硬化发生与发展机制, E-mail 为 nbsecl@nbu.net; 卢德赵, 博士, 讲师, 主要研究方向为蛋白质组学研究, E-mail 为 ludezhao@126.com; 通讯作者沃兴德, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为脂质代谢与动脉粥样硬化, E-mail 为 woxdtm@126.com。

相 pH 干胶条 (24 cm, pH4~7)、IPG buffer 4-7、2-D clean up试剂盒、Decyder荧光染料和 2-D 蛋白质定量试剂盒均为 GE healthcare 公司产品。

1.2 氧化型低密度脂蛋白的制备

200 mL 健康供血者血浆,经密度梯度离心法及凝胶过滤法获取低密度脂蛋白 (LDL),将其稀释到 50 mg/L 后加入 1:100 (体积比)的 1 mmol/L CuSO_4 溶液,37℃下放置 24 h 使 LDL 氧化。氧化结束后将样品转入透析袋,4℃下于含 0.1% EDTA 的 PBS 缓冲液中充分透析,经浓缩后用 2-D 蛋白质定量试剂盒测定浓度。

1.3 细胞培养与泡沫细胞的生成

小鼠巨噬细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中。每 2~3 天传代 1 次,传 3 代后的 RAW 264.7 细胞用于实验。泡沫细胞组 (ox-LDL 处理组) 细胞离心弃去培养液,加入 DMEM 培养基与 75 mg/L ox-LDL 共同孵育 24 h 用油红 O 染色证实细胞中形成大量脂质小滴,提示 RAW 264.7 细胞已转化为泡沫细胞。对照组 (RAW 264.7) 细胞离心后加入等体积的 DMEM 培养基,37℃培养 24 h 用于实验。

1.4 样品蛋白质的抽提

用细胞刮刀刮下细胞, PBS 缓冲液洗细胞 3 次后将细胞转移到 1.5 mL Eppendorf 管中,加入 200 μL 裂解缓冲液 (30 mmol/L Tris, 8 mmol/L Urea, 4% CHAPS, pH 8.5), 4℃孵育 30 min 超声后于 4℃、12000 r/min 离心 30 min 取上清并用 Lowry 测定蛋白质浓度,然后分装至 Eppendorf 管, -80℃保存备用。

1.5 荧光标记蛋白质

将 CyDye (Cy2, Cy3 和 Cy5) 从 -20℃取出,室温放置 10 min 加入 25 μL 二甲基甲酰胺 (DMF), 涡旋混匀。12000 g 离心 30 s 取 2 μL 配成 200 $\mu\text{mol/L}$ 的工作液。每样品各取 50 μg 蛋白质,调节 pH 至 8.5 分别加入 400 μmol 相应的染料,振荡混匀,冰上避光孵育 30 min 后加入 1 μL 10 mmol/L 赖氨酸中止反应。剧烈振荡并冰上避光放置 10 min 加入等体积的 2 倍体积缓冲液 [8 mmol/L 尿素, 130 mmol/L DTT, 4% (W/V) CHAPS, 2% (V/V) Phamalyte 4~10], 冰浴 10 min。

1.6 双向凝胶电泳

参照文献 [2, 3]。将分别由 Cy2, Cy3, Cy5 的三个样品混合,用水化液 (8 mmol/L 尿素, 2% CHAPS, 13 mmol/L DTT, 0.5% IPG Buffer, 0.002% 溴酚蓝) 定溶到 450 μL , 制成第一向等电聚焦体系,采用胶

内泡涨的方法上样。正常细胞样品和泡沫细胞样品被加到同一条 pH4~7 的胶条中,另外每一胶条中还有一个由 Cy2 标记的内标 (所有样品等量混合物),以此消除胶与胶之间的误差,其实实验设计见表 1。等电聚焦参数为 30 V 12 h, 500 V 1 h, 1000 V 1 h, 8000 V 8 h。等电聚焦后,胶条于平衡液 1 (1% DTT, 50 mmol/L TrisCl, 6 mmol/L 尿素, 30% 甘油, 2% SDS, 0.002% 溴酚蓝)、平衡液 2 (4% 碘乙酰胺, 50 mmol/L TrisCl, 6 mmol/L 尿素, 30% 甘油, 2% SDS, 0.002% 溴酚蓝) 中各平衡 15 min 后转移到第二向已制好的 12.5% SDS 胶上,用 0.5% 琼脂糖封顶,进行第二向电泳,二向电泳的参数设定为 20 W 45 min, 80 W 6 h。直到溴酚蓝染料迁移至胶的底部边缘结束电泳。

表 1 凝胶内差异显示电泳实验设计

凝胶号	Cy2 标记的样品	Cy3 标记的样品	Cy5 标记的样品
胶 1	内标	对照组	泡沫细胞组
胶 2	内标	泡沫细胞组	对照组
胶 3	内标	对照组	泡沫细胞组
胶 4	内标	泡沫细胞组	对照组

1.7 荧光标记双向电泳凝胶的图像扫描

荧光标记的蛋白经凝胶电泳后, MillQ 冲洗数次,用 Typhoon 9400 荧光扫描仪 (GE healthcare 公司) 在不同激发光下扫描成像,所用滤光片和 PIM 电压: Cy2 为 Blue2 (488) /60Q, Cy3 为 Green (530) /68Q, Cy5 为 Red (633) /59Q。所得的蛋白质组图谱用 DeCyder ImageQuantTM V5.0 图像分析软件进行点识别、背景消除、点匹配及差异蛋白质分析。

1.8 胶内酶解及质谱分析

扫描后,将 2-DE 胶经固定、敏化、漂洗、银染、漂洗、显色、终止、漂洗后切下感兴趣的蛋白点,置于离心管中,胶内酶解后用于进行 MALDI-TOF-MS 检测,得到肽质量指纹图谱,通过 Mascot 数据搜索,结合 2-D 图谱上初步的蛋白质的分子量、等电点信息鉴定蛋白质。

2 结果

2.1 泡沫细胞的鉴定

倒置显微镜下, ox-LDL 处理组细胞内有大量的红色脂滴颗粒存在,符合泡沫细胞的形态特征,而对照组细胞内未见明显的红色油滴状颗粒 (图 1)。

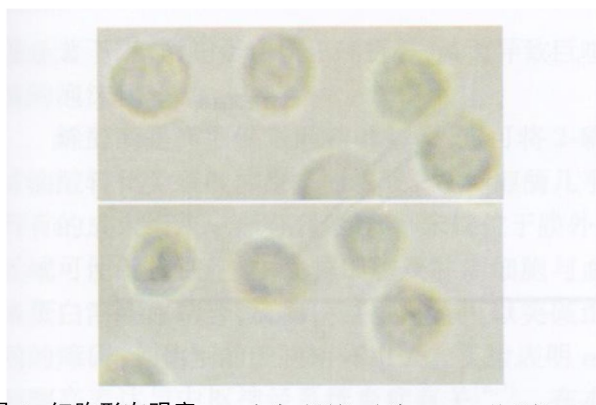


图 1 细胞形态观察 左为对照组, 右为 ox-LDL 处理组。

2.2 双向电泳图谱

双向电泳后, 每块 SDS-PAGE 胶用 488 nm、530 nm 和 633 nm 3 种波长的激发光进行扫描, 图 2 为从胶 2 中扫描得到的蛋白质组图谱, 从左到右分别为 Cy2 标记的内标、Cy3 标记的泡沫细胞和 Cy5 标记的 RAW 264.7 细胞蛋白质组图谱。

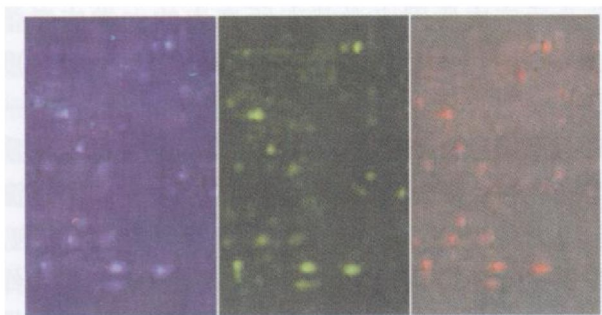


图 2 不同染料标记的样品的蛋白质组图谱

2.3 差异蛋白质组分析

双向电泳后, 每块 SDS-PAGE 胶用 488 nm、530 nm 和 633 nm 3 种波长的激发光进行扫描, 所有 4 块胶扫描所得的 12 张蛋白质组图谱用 DeCyder 6.5 分析软件进行分析, 其中胶 2 中检测到蛋白质最多, 有 924 个, 以此胶作为参考胶, 胶 1、胶 3 和胶 4 与其共有的蛋白质点分别为 624、699 和 797。其中所有图谱其共有蛋白蛋白质点为 601 个, 不能相匹配的

检测点被认为是杂质微粒或者由实验所带来的随机误差点。对上述所有图谱中共有的 601 个蛋白质点进行差异分析, 筛选表达量变化大于 1.2 倍、 t -test 值小于 0.05 的蛋白质点作为差异蛋白质。共找到 12 个差异蛋白质。图 3 显示了差异蛋白质在胶 2 中的分布。其中对照组 (RAW 264.7 细胞) 蛋白质组图谱位于左边, 泡沫细胞蛋白质组图谱位于右边。图谱中 8 号和 11 号蛋白质点的三维图像见图 4。在差异分析中, 8 号蛋白质点在泡沫细胞中表达量提高 2.62 倍, 而 11 号蛋白质点在泡沫细胞中表达量下调了 1.92 倍。图 5 显示了胶 2 中 8 号和 11 号蛋白质点的放大图。图 6 显示了 8 号和 11 号蛋白质点在各胶中的表达量变化。

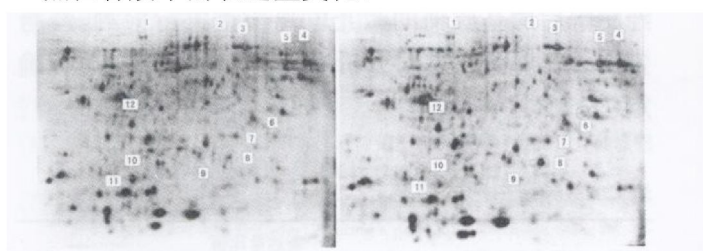


图 3 差异蛋白质在图谱中的分布 左为 Cy5 标记的 RAW 264.7 细胞蛋白质组图谱, 右为 Cy3 标记的泡沫细胞蛋白质组图谱。

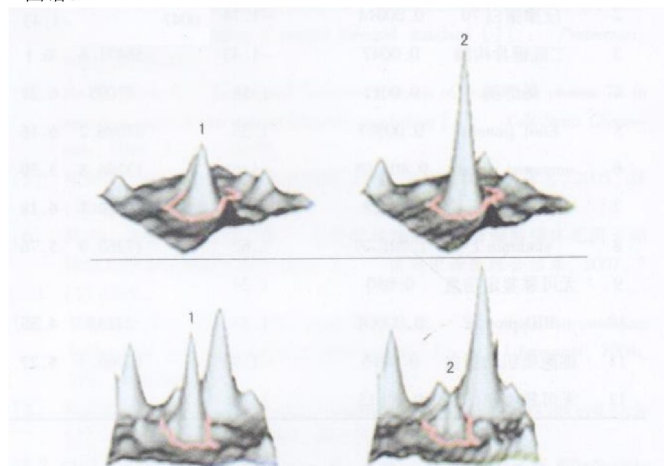


图 4 蛋白质的三维图 1 为 RAW 264.7 细胞, 2 为泡沫细胞; 上图为 8 号蛋白质, 下图为 11 号蛋白质。

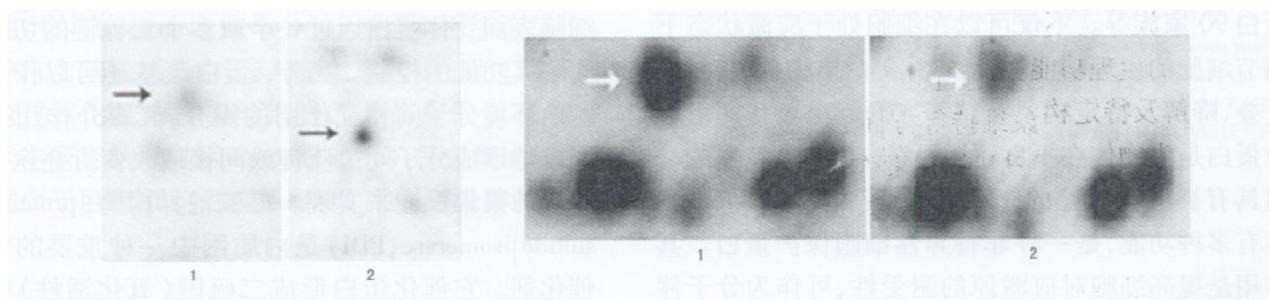


图 5 胶 2 图谱的局部放大图 1 为 RAW 264.7 细胞, 2 为泡沫细胞; 左图为 8 号蛋白质, 右图为 11 号蛋白质。

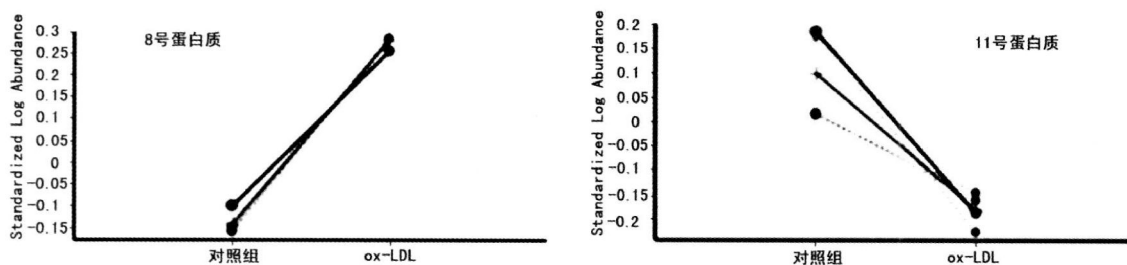


图 6 差异蛋白质在各胶中表达量的变化

2.4 质谱鉴定

经蛋白质图谱分析,巨噬细胞泡沫化前后表达差异大于 1.2 倍, t -test 值小于 0.05 的 12 个蛋白质经酶解后用基质辅助激光电离质谱进行检测, 经与蛋白质文库进行比对分析后, 其中 10 个蛋白质被确定 (表 2)。

表 2 差异蛋白质的鉴定

编号	蛋白质名称	t -test	表达量比值 (泡沫细胞/对照)	MW	PI
1	葡萄糖调节蛋白	0.0077	1.28	72378.4	5.01
2	应激蛋白 70	0.00014	-1.74	73415.6	5.81
3	二硫键异构酶	0.0047	-1.43	56471.6	6.1
4	烯醇酶	0.0011	1.38	47095	6.37
5	Eno1 protein	0.00077	1.33	47086.2	6.16
6	unmaned protein	9.40E-05	-1.61	13296.8	5.39
7	Peroxiredoxin 4	0.0028	1.27	30988.1	6.18
8	stathmin 1	1.70E-07	2.62	17263.9	5.76
9	无可靠鉴定信息	0.050	1.24		
10	BD protein	0.00064	1.37	22235	4.85
11	细胞质肌动蛋白	0.0016	-1.92	10966.3	5.27
12	无可靠鉴定信息	0.00015	1.36		

3 讨论

分子伴侣广泛存在于各种原核和真核生物细胞内, 主要分为伴侣素家族、应激蛋白 70 家族、应激蛋白 90 家族等。不仅可以在细胞处于应激状态下调节细胞的生理功能, 而且还在蛋白质的跨膜转运、折叠、降解及特定构象维持等方面起重要作用。应激蛋白是生物体在不良环境因素作用下所产生的一组具有高度保守性的应激蛋白, 其主要成员 HSP70 具有多种功能, 是一种非特异性细胞保护蛋白。其作用是提高细胞对应激原的耐受性、可作为分子伴侣作用、具有抗凋亡作用; 能减轻过氧化及炎症损伤。Jin 等^[4]报道血清和外周血淋巴细胞的 HSP70

表达量随年龄增长而下降, 他们认为血清和淋巴细胞中的 HSP70 水平可用来评价疾病状态和外界环境的影响程度。我们在实验中发现巨噬细胞泡沫化后应激蛋白 70 表达量明显减少, 因此可能通过影响蛋白质的跨膜转运、折叠、降解而导致细胞活动及细胞内脂类代谢的失常。葡萄糖调节蛋白 (glucose regulated protein, GRP) 是一种内质网分子伴侣, 是细胞为适应内质网应激状态所产生的一类应激蛋白, 与热休克蛋白 (heat shock protein, HSP) 有高度的同源性。葡萄糖调节蛋白功能很多, 它们作为一种分子伴侣参与蛋白质的折叠和转运, 它也是内质网上的一种应激蛋白, 在低糖、低氧、低 Ca^{2+} 等应激状态下大量表达以维持内质网的稳定, 保护细胞。在脂质、蛋白质代谢中, 葡萄糖调节蛋白也起重要作用, 过表达 GRP75 的细胞对缺糖的耐受性增强, 提示 GRP75 在细胞能量代谢障碍中发挥着细胞保护作用。研究表明, 在氧化应激时, GRP75 过表达可以明显抑制细胞凋亡, 提高细胞活力, 减少 LDH 渗漏, 增加细胞存活率, 表明其具有显著的细胞保护作用。本实验结果显示葡萄糖调节蛋白表达量增加, 可能是由于巨噬细胞大量吞噬脂质导致细胞代谢紊乱, 因此机体增加葡萄糖调节蛋白的表达量, 以达到维持内质网的稳定、抑制细胞凋亡的作用。

二硫键是由半胱氨酸侧链巯基 ($-\text{SH}$) 共价交联而成, 它能够稳定蛋白质的折叠构象。二硫键还是许多蛋白功能的切换器, 一些分泌的可溶性蛋白和细胞表面受体蛋白通过一个或多个二硫键的切割来实现其功能的控制。另外, 蛋白巯基还可以作为细胞内环境分子间相互作用的媒介, 其媒介作用通过直接地形成分子间二硫键或间接地改变折叠途径和后续的聚集反应来实现。二硫键异构酶 (protein disulfide isomerase, PDI) 是内质网中一种重要的折叠催化剂。它催化蛋白形成二硫键 (氧化活性) 和催化错误配对二硫键的重排 (异构酶活性), 并具有分子伴侣活性^[5]。泡沫化细胞中二硫键异构酶表达

量显著下降,影响蛋白质正确折叠,从而导致巨噬细胞的泡沫化。

烯醇酶是高度保守的糖酵解酶,它可将 2-磷酸甘油酸转化为磷酸烯醇式丙酮酸。 α -烯醇酶几乎在所有的成人组织中都有表达,羧基末端位于膜外,此区域可使单核细胞、中性粒细胞及肿瘤细胞与血纤维蛋白溶酶原结合,从而使这些细胞可以突破细胞间的障碍,到达别的细胞矩阵中去。实验表明 α -烯醇酶高表达与中枢神经系统炎症有关^[6-7]。在本实验中发现,细胞泡沫化后烯醇酶表达量增加,促使这些细胞分泌炎症因子或化学因子,最终凋亡释放出氧化型油脂的衍生物形成斑块,进一步加重炎症病灶的恶化。

Statmin 是细胞内重要的细胞周期相关蛋白,在序列上高度保守,其多肽链多由极性和较小的氨基酸残基组成,具有微管解聚活性,可调节有丝分裂。抑制 Statmin 活性或表达可使细胞周期阻滞,细胞增殖速度下调^[8]。研究发现,Statmin 在多种恶性肿瘤如口腔鳞状细胞癌、腺样囊性癌、恶性间皮细胞瘤和肺癌中表达升高,且其表达水平与肿瘤恶性度和预后密切相关,可能成为新的肿瘤生物学标记和治疗靶点^[9-12]。Statmin 基因敲除可部分地恢复细胞周期调节并激活凋亡。本研究发现,ox-LDL 诱导巨噬细胞后,Statmin 表达量增加,细胞周期紊乱,促使巨噬细胞转变成泡沫细胞。

Peroxiredoxin 属于抗氧化蛋白超家族,广泛存在于原核生物和真核生物中。哺乳动物的 Peroxiredoxin 家族包括 6 个成员:Prx iv、⑦、④、⑤、⑥和 v。6 个成员的同源性比较结果表明,Prx iv ~ ④的同源性相对较高,Prx ④的 N 端含有分泌信号,该蛋白在内质网中合成后被转运至细胞外,具有结合肝素的能力。因此,在内质网和细胞外基质可以检测到该蛋白。Prx 该家族基因所编码蛋白的生物化学功能是:通过硫氧还蛋白还原过氧化物或超氧化物,在消除代谢产生的过氧化物中具有重要作用。然而对该家族基因的生物学区功能研究显示其还具有其他的活性:参与细胞的增殖与分化,增强 NK 细胞活性,保护自由基敏感蛋白,参与血红素代谢,通过调节细胞内过氧化氢浓度参与细胞因子信号的级联放大等。本研究结果显示 Peroxiredoxin4 表达量增加,可能是由于巨噬细胞吞噬 ox-LDL 后刺激机体抗氧化系

统。肌动蛋白是一类高度保守的蛋白质,存在于所有真核细胞中,参与细胞分裂、运动、迁移、形态的维持、生长等多种重要生理活动。细胞中肌动蛋白常与其结合蛋白 (actin binding protein, ABP) 结合,以单体、寡聚体及聚合体形式存在,执行不同的生理功能^[13]。本研究结果显示细胞质肌动蛋白表达量降低,这可能使得巨噬细胞维持自身形态的功能下降,促使巨噬细胞逐渐肥大,因而可以在胞内允许大量胆固醇酯和甘油三酯蓄积而变成泡沫细胞。

总之,本研究的亮点在于以泡沫细胞的主要来源之一巨噬细胞为研究对象,探讨巨噬细胞源性泡沫细胞形成过程中蛋白质表达的变化,发现一些与巨噬细胞泡沫化相关的蛋白质,从蛋白质组水平增加对细胞泡沫化的机制认识。

[参考文献]

- [1] 廉馨,王绿娅. 巨噬细胞源性泡沫细胞是动脉粥样硬化治疗的新靶点[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12 (4): 478-489
- [2] Kap NA, Kreil DP, Lilley KS. Determining a significant change in protein expression with DeCyder™ during a pairwise comparison using two-dimensional difference gel electrophoresis [J]. *Proteomics* 2004, 4: 1421-432
- [3] Alban A, David SO, Björksten L. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: Two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard [J]. *Proteomics* 2003, 3: 36-44
- [4] Jin X, Wang R. Serum and lymphocyte levels of heat shock protein 70 in aging: a study in the normal Chinese population [J]. *Cell Stress Chaperones* 2004, 9 (1): 69-75
- [5] 熊向华,刘志敏. 二硫键异构酶 [J]. 中国生物工程杂志, 2005, 25 (B04): 176-179
- [6] 吴鸣,金松华,沈定,等. 儿童病毒性脑炎脑脊液肿瘤坏死因子和神经元特异性烯醇化酶的变化 [J]. 实用中西医结合临床, 2007, 7 (1): 4-5
- [7] Michelsen KS, Doherty TM, Shah PK, et al. Signaling: An emerging bridge from innate immunity to atherogenesis [J]. *J Immunol* 2004, 173: 901-907
- [8] Rubin N, Aweh GF. The role of statmin in the regulation of the cell cycle [J]. *J Cell Biochem*, 2004, 93 (2): 242-250
- [9] Koike H, Uzawa K, Nakashima D, et al. Identification of differentially expressed proteins in oral squamous cell carcinoma using a global proteomic approach [J]. *Int J Oncol* 2005, 27 (1): 59-67
- [10] Lictan YX, Zhou H. Proteomic analysis of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma: Identification of potential tumor markers [J]. *Proteomics* 2005, 5 (4): 1125-139
- [11] Kim JY, Harvard C, You L, et al. Statmin is overexpressed in malignant mesothelioma [J]. *Anticancer Res* 2007, 27 (1): 39-44
- [12] Nakash MD, Uzawa K, Kasamatsu A, et al. Protein expression profiling identifies maspin and statmin as potential biomarkers of adenoid cystic carcinoma of the salivary glands [J]. *J Cancer* 2006, 118 (3): 704-713
- [13] 朱筱娟,曾宪录,宋朝霞,等. 细胞核内肌动蛋白及其功能研究进展 [J]. 科学通报, 2004, 49 (11): 1031-035

(此文编辑 文玉珊)