文章编号:1000-5404(2005)12-1259-03

论著

应用蛋白芯片技术从烧伤大鼠早期血清中快速筛选低分子量差异蛋白

王 涛,艾国平,章 波,钟 波,粟永萍 (第三军医大学预防医学院防原医学教研室,全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 筛选正常大鼠血清与烧伤大鼠早期血清中差异表达的低分子量蛋白,为进一步解释烧伤血清生物效应奠定基础。**方法** 利用SELDI(surfaced enhanced laser desorption/ionization)蛋白质芯片技术对烧伤大鼠早期血清差异蛋白进行筛选,通过相应软件结合生物信息学方法进行初步分析。**结果** 与正常血清比较,烧伤后12 h与24 h血清与之分别存在11个和31个差异蛋白峰,烧伤后12 h与24 h血清之间存在15个差异蛋白峰,并发现一些呈现一定的正常与烧伤、烧伤后不同时相点规律性变化的蛋白质。**结论** 正常与烧伤、烧伤后不同时相点血清中低分子量蛋白存在明显差异,这种差异蛋白可能与烧伤病理生理和烧伤后血清生物效应密切相关。

关键词:SELDI;烧伤血清;差异蛋白
中图法分类号:R394-33;R446.1;R644.02 **文献标识码**:A

The rapid detection of low molecular mass proteins differentially expressed in the early serum of burned rat using proteinchip technology

WANG Tao, AI Guo-ping, ZHANG Bo, ZHONG Bo, SU Yong-ping (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To detect differentially expressed low mass proteins in the serum between normal and burned rats, and lay a foundation to further explanation of the biological effect of the burn serum. **Methods** The differentially expressed low mass proteins were detected by SELDI proteinchip technology, and primarily analyzed by related software as well as bioinformatic method. **Results** As compared to the normal rat serum, the serum of postburn 12 h and 24 h had 11 and 31 differentially expressed protein peaks respectively. There are 15 differentially expressed protein peaks between the serum of postburn 12 h and 24 h. Meanwhile, a series of protein peaks were found, which changed depending on the degree of burn injury and the time of postburn. **Conclusion** There are obvious differentially expressed low mass proteins in the sera between normal and burned rats, which maybe have close relationship with the burn pathophysiology and the biological effect of burn serum.

Key words: SELDI; burn serum; differentially expressed proteins

烧伤是以免疫、应激为核心的全身性的复杂病理生理过程,其突出特征是局部的损伤导致整个内稳态的失衡,进而影响到全身多个系统。烧伤血清是机体内稳态失衡的产物,与正常血清相比其在不同的组织细胞表现出复杂的生物效应而且表现出一定的时间依赖性[1,2],然而由于技术手段的限制对于产生效应的物质基础始终没有得到很好的解释。SELDI(surfaced enhanced laser desorption/ionization)蛋白芯片是一种新的蛋白质组技术手段,能通过不同的表面修饰而选择性捕获蛋白质,从而有效降低被检样品蛋白成分的复杂性,因此SELDI蛋白芯片用于检测成分复杂的血清尤为合适。SELDI蛋白质芯片技术的出现部分的弥补了双向电泳技术的不足,使筛选低丰度小分子蛋白成为现实。本研究采用蛋白芯片技术检测了正常和烧伤12、24 h大鼠的血清中的蛋白质谱的变化,初步筛选出了一些具有一定变化规律的低分子量差异蛋白。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂及芯片 乙腈、三氟乙酸、尿素、CHAPS、DTT、

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30230360)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30230360)
作者简介:王 涛(1978-),男,河北省定州市人,硕士研究生,助教,主要从事复合伤复合效应方面的研究。电话:(023)68771725
通讯作者:粟永萍,电话:(023)68752009,E-mail: suyping@yahoo.com
收稿日期:2005-06-05;修回日期:2005-06-10

Tris-HCl 和 OPG 均购自 Sigma 公司。WCX2 蛋白芯片购自美国 Ciphergen 公司。

1.1.2 蛋白质芯片阅读机 蛋白质芯片阅读机(美国 Ciphergen 公司生产)是一台激光解吸电离飞行时间质谱,可以检测 1×10^3 小分子蛋白/多肽,也可检测 500×10^3 以下的大分子物质。它和蛋白芯片联合应用构成了蛋白芯片检测系统。

1.1.3 蛋白质芯片 本实验采用 WCX2(弱阳离子交换芯片)芯片,其表面结合有弱型阴离子羧基,可以和被分析物质表面的正电荷基团相互作用(如赖氨酸、精氨酸和组氨酸)而捕获蛋白可用于检测高等电点的蛋白和分子标志物。

1.2 方法

1.2.1 动物分组和血清制备 健康雄性 Wistar 大鼠 12 只(SPF 级,购自重庆医科大学实验动物中心),体质量 220 ~ 250 g,随机分为烧伤组($n=8$)和正常对照组($n=4$)。烧伤选用5 kW 的溴钨灯辐射致全身 15% Ⅲ度烧伤(经病理检查证实)。烧伤后即以生理盐水 40 ml/kg 经腹腔进行补液,然后分别在伤后 12、24 h 取股动脉血 4 ℃静置 60 min,待血凝块退缩,3 000 r/min,10 min,取血清,分装,于 -70 ℃低温保存。同时取少量血清以 Bradford 法测定各样品的总蛋白浓度。

1.2.2 样品处理 融解冻藏血清,离心 13 000 r/min,10 min。以 1 mol/L 尿素处理样品,使其蛋白浓度相等;每个样品取 20 μl 血清,分别置于 1.5 ml EP 管内,加入 40 μl U9(9 mol/L 尿素,2% CHAPS,1% DTT)缓冲液,摇床震荡 50 min,加入 200 μl 乙酸钠缓冲液(100 mmol,pH 4.0)摇床震荡 30 min 充分混匀,取 100 μl 上样。

1.2.3 蛋白芯片实验步骤 将芯片安装于 Bioprocessor 上,芯片 A-H 点加入 150 μl 结合缓冲液(100 mmol 乙酸钠缓, pH 4.0,含 OPG),振荡室温下孵育 5 min,弃掉液体,重复 3 次。每点分别加入不同组别的经过前述处理过的样品 100 μl,振荡孵育 60 min,弃掉液体。用 150 μl 洗脱缓冲液(100 mmol 乙酸钠缓冲液, pH 4.0)洗涤芯片 3 次,每次 5 min,用双蒸水冲洗 1 次,卸去 Bioprocessor,待芯片表面自然晾干后,各点加两次 0.5 μl SPA,芯片表面干后,用蛋白质芯片阅读机(PBS Ⅱ型)进行蛋白质谱分析。

1.2.4 数据采集及结果分析 蛋白芯片采用蛋白质芯片阅读机(PBS Ⅱ型)读取数据。(仪器每天用标准多肽和低于 200×10^3 的蛋白质标准分子校正,系统的质量偏差为 1%)。检测芯片时蛋白质芯片阅读机设置:激光强度 230,检测敏感度 8,优化分子量为 $(2\sim20)\times10^3$,最高分子量 50×10^3,每个样品收集 50 个点,采用 Ciphergen proteinchip 3.02 自动采集数据,采用 Biomarker Wizard 分析正常大鼠血清和烧伤后 12、24 h 的大鼠血清的蛋白质谱差异。

1.3 统计学分析

采用 Ciphergen proteinchip 3.02 分析软件对数据进行统计处理,组间蛋白峰比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 蛋白芯片重复性分析

随机选取一个样本进行芯片的重复性分析。将该样本处理后,点到同一条芯片的 7 个点上,进行质谱测定以检测蛋白质芯片阅读机和芯片内部的重复性。结果显示,在 M/Z 值为 3 000 ~ 10 000 选取的 5 个蛋白质峰计算出的变异系数(CV)均小于 20%,表明同一块芯片内部各点具有较好重复性。同时以 64 名正常人血清组成的血清池作为各条芯片间的标准质控点,以检测同一种芯片的组间差异。

2.2 差异分析

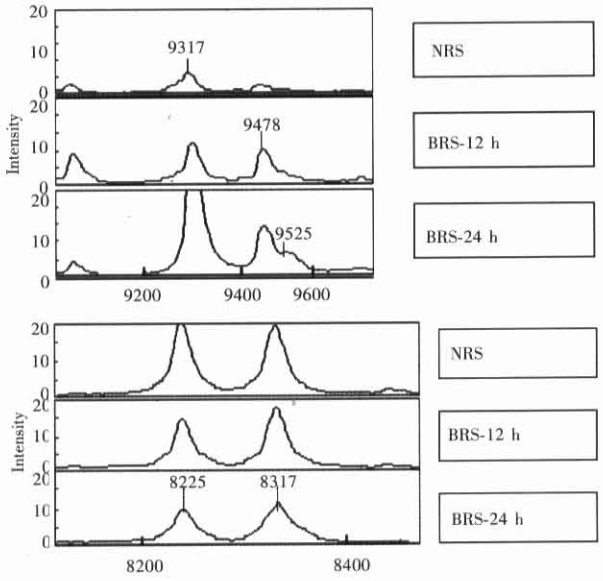
采用 Biomarker Wizard 软件对所有蛋白质谱进行标准化,然后分析正常大鼠血清(NRS)与烧伤早期大鼠 12 h(BRS-12 h)、24 h (BRS-24 h)血清中蛋白质峰数目和相对强度。结果显示,绝大多数蛋白质峰数目和强度在正常大鼠、烧伤 12 h 和烧伤 24 h 大鼠血清中基本相同,但在 3 组之间仍有差别,其中 11 个蛋白质峰在 NRS 和 BRS-12 h,31 个蛋白质峰在 NRS 和 BRS-24 h、15 个蛋白质峰在 BRS-12 h 和 BRS-24 h 的比较中具有统计学意义(表 1 与图 1)(注:本结果为重复 4 次的结果,以每只动物为单位做芯片)。

表 1 烧伤大鼠血清和正常大鼠血清的差异蛋白比较

Tab1 Differentially expressed proteins in the serum between normal and burned rats

DEPs	M/Z value	DEPs	M/Z value
↑	4 934	↓	2 980
↑	6 494	↓	3 747
↑	6 721	↓	3 875
↑	7 409	↓	3 924
↑	9 317	↓	4 430
↑	9 478	↓	6 528
↑	9 525	↓	6 896
↑	18 603	↓	8 225
↓	2 465	↓	8 317
↓	2 795	↓	12 106

DEPs: differentially expressed proteins; ↑: up-regulated proteins in serum after burn; ↓: down-regulated proteins in serum after burn



A: Molecular weight of 9200 - 9600; B: Molecular weight of 8200 - 8400

图 1 差异蛋白峰

Fig1 Differentially expressed protein peaks

3　讨论

血清是机体在宏观水平上对组织细胞调控的重要介质，烧伤后血清成分的变化是烧伤在多种组织器官造成损伤的重要因素。我们前期研究表明[1~3]烧伤血清可以明显促进骨髓红系、粒系等的增殖，并认为是除 EPO 等造血因子以外的物质。其物质基础是什么，我们进行初步探索。

目前，国内外对于血清相关生物活性的物质基础研究主要基于传统的生物化学方法，通过生物效应进行分子量、理化性质等特征的推测。SELDI（surfaced enhanced laser desorption/ionization）蛋白芯片是一种新的蛋白质组技术手段，能通过不同的表面修饰而选择性捕获蛋白质，从而有效降低被检样品蛋白成分的复杂性，因此 SELDI 蛋白芯片用于检测成分复杂的血清尤为合适。我们采用 SELDI 蛋白芯片技术分析了 8 例烧伤大鼠血清和 4 例正常大鼠血清，结果表现出较好的一致性，可信度高。结果显示，与正常大鼠血清相比，烧伤 12 h 大鼠血清筛出 11 个，烧伤 24 h 大鼠血清筛出 31 个差异蛋白；烧伤 12 h 和 24 h 存在 15 个差异蛋白。这种各组间的差异表明烧伤后血清随着时间较正常血清变化更加明显，反应了烧伤这一免疫、应激反应为核心的伤情特点，提示炎症介质的产生、细胞因子的动员有一个时间过程，这构成了不同时相点血清生物效应差别的物质基础。同时我们发现一些呈现一定的正常与烧伤、烧伤后不同时相点规律性变化的蛋白质[5,6]。这些差异蛋白的分子量多数在（2 000 ~ 10 000）× 10^3 这一生物活性多肽相对集中的分子量区域。在蛋白数据库 ExPASy 中利用 TagIdent tool 进行模糊检索得到的结果表明，有若干与所得差异蛋白分子量一致或非常接近的蛋白质存在，它们与急性期反应、葡萄糖代谢、饮食调控等应激事件密切相关，考虑到蛋白质库所提供的只是根据氨基酸序列计算出的理论分子量，而大多数真核生物蛋白质存在一定的修饰，故结果仍需要进一步的验证。

参考文献：

[1] 冉新泽，粟永萍，程天民，等. 放射及复合烧伤大鼠腹腔灌洗液对骨髓造血祖细胞生长的影响[J]. 中华放射医学与防护杂志，2003，23(3)：145－147.

[2] Zhang Bo，Su Yongping，Wang Fengchao，*et al*. Identificaiton of differentially expressed proteins of gamma-ray irradiated rat intestinal epithelial IEC-6 cells by two-dimensional gel electrophoresis and matric-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry [J]. Proteomics，2005，5(2)：426－432

[3] 周燕虹，罗成基，郭朝华，等. 烧伤后血清对骨髓红系造血的影响[J]. 重庆医学，1999，28(5)，336－338.

[4] 叶本兰，程天民，萧家思. 放射损伤、烧伤与放烧复合伤早期心功能变化的离体实验研究[J]. 中华创伤杂志，1996，12(3)，180－183.

[5] Varedi M，Lee H M，Greeley G H Jr，*et al*. Gene expression in intestinal epithelial cells，IEC-6，is altered by burn injury-induced circulating factors [J]. Shock，2001，16(4)：259－263.

[6] Duan X，Yarmush D M，Berthiaume F，*et al*. A mouse serum two-dimensional gel map：application to profiling burn injury and infection[J]. Electrophoresis，2004，25(17)：3055－3065.

（编辑　龙　亮）

（上接 1252 页）

性病变，界清，结合牙根的锯齿状吸收，考虑为下颌骨造釉细胞瘤。患者同意行左下 3、4 拔除术加肿物切除术。术中情况：2% 利多卡因局麻下拔除左下 3、4，探牙槽窝底部质地软，有黄褐色胶冻样物质流出，无明显被膜，刮除肿物，周围骨壁光滑，滑动牙龈瓣关闭创口。术后病理报告：下颌骨神经鞘瘤。术后 10 d 拆除口内缝线，伤口愈合好，无下唇麻木感。

2　讨论

神经鞘瘤来自周围神经鞘膜上的雪旺细胞，也称作雪旺细胞瘤，可发生在全身各个部位，沿神经干纵轴生长，多发于脑神经，如：听神经、面神经、迷走神经、舌下神经。肿瘤生长缓慢，无明显自觉症状，大多呈圆形或卵圆形，表面光滑，边界清楚，与周围组织无粘连，活动度良好，沿神经轴左右移动，一般无神经功能障碍，来自于感觉神经的神经鞘瘤有压痛，也可有放射性痛，大多为单发，少数患者可多发，肿瘤体积过大可发生粘液性变，质软如囊肿。发生于颌骨内的神经鞘瘤可压迫骨质吸收及膨隆性骨质破坏，压迫邻近骨质时，X 线片出现明显的骨硬化环和骨外软组织突出阴影。临床上多囊性神经鞘瘤不易与造釉细胞瘤鉴别，单囊性神经鞘瘤注意与颌骨囊肿鉴别，可作针吸细胞学检查辅助诊断，最终确诊需作组织病理学检查和（或）免疫组织化学检查。

颌骨内神经鞘瘤手术治疗的关键是保护神经血管，手术切口要充分暴露瘤体及相关的神经血管，沿瘤体包膜分离仔细解剖，将神经干与瘤体分开，发生于下齿槽神经鞘瘤，尽可能保留神经外膜，对于肿瘤与神经干粘连紧密不易剥离的，若造成神经断裂应及时吻合，否则会引起术后并发症。为避免知名神经损伤，临床常用的包膜内剥离术也适于本病[2]。

关键词：神经鞘瘤；下颌骨

中图法分类号：R730.264　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 于世凤，王说之. 口腔组织病理学[M]. 北京：人民卫生出版社，2003. 336－337.

[2] 赵吉谋，徐　兵，郑家伟，等. 颌骨内神经鞘瘤 11 例临床分析[J]. 上海口腔医学，2003，12(2)：90－93.

（编辑　王　红）