论著

文章编号:1000-5404(2008)10-0914-03

GBLP在人脐静脉内皮细胞中差异表达的验证

毛小琴[1],邱 峰[2],邱宗荫[1],陈世知[3],贾雄飞[4] (重庆医科大学:[1]医学检验系,临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室,[2]附属第一医院药剂科,重庆 400016,[3]附属第二医院核医学科,重庆 400010;[4]第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验实,重庆 400038)

摘 要:目的 验证经手性药物比较蛋白质组学筛选鉴定的差异表达蛋白G蛋白β亚单位2样1蛋白(guanine nucleotide-binding protein subunit beta 2-like 1, GBLP)。**方法** 分别用80 μmol/L的R/S-普萘洛尔(R/S- propranolol, R/S-PRO)处理人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)3 h。采用比较蛋白质组学方法分离鉴定差异表达蛋白-GBLP,Western blot法和激光共聚焦扫描显微镜(LSCM)分别验证经R/S-PRO作用后,HUVEC细胞中GBLP的表达丰度差异和细胞内定位。**结果** Western blot和LSCM都证实,GBLP在S-PRO作用后的HUVEC中的表达丰度明显低于经R-PRO作用后的表达($P=0.011$);GBLP定位于HUVEC的细胞膜和细胞质中,在细胞质中呈均匀分布,在膜上有局部聚集分布现象。**结论** Western blot和LSCM验证结果与蛋白质组学鉴定结果一致。

关键词: 蛋白质组学;GBLP;普萘洛尔;对映异构体;人脐静脉内皮细胞; Western blot;激光共聚焦扫描显微镜

中图法分类号: R322.123;R394-33;R394.3 **文献标识码:** A

Verification of differential expression of GBLP in HUVEC treated by R/S-propranolol

MAO Xiao-qin[1], QIU Feng[2], QIU Zong-yin[1], CHEN Shi-zhi[3], JIA Xiong-fei[4] ([1]Department of Laboratory Medicine, Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics of Ministry of Education, [2]The First Affiliated Hospital, Chongqing 400016, [3]The Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010; [4]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To verify the differential expression of the protein – guanine nucleotide-binding protein subunit beta 2-like 1 (GBLP) that has been identified by comparative proteomics methods. Methods Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were treated with R/S-propranolol (R/S-PRO) respectively for 3 h, then the differentially expressed GBLP protein was isolated and identified by comparative proteomics methods. Western blot analysis and the confocal laser scanning microscopy (LSCM) were used to further verify the expression abundance and display location of GBLP in two enantiomers treated HUVEC. Results Both results of Western blot and LSCM exhibited that the expression abundance of GBLP in S-PRO treated HUVEC was lower than that in R-PRO treated cells. GBLP located in cytoplasm and plasma membrane in HUVEC, homogeneously distributed in cytoplasm and aggregatively distributed in plasma membrane. Conclusion The differential expression of GBLP proven by Western blot and LSCM is consistent with that identified by proteomics methods.

Key words: proteomics; GBLP; Propranolol; enantiomers; human umbilical vein endothelial cell; Western blot; confocal laser scanning microscopy

基金项目: 重庆市自然科学基金(2005BB5227)

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (2005BB5227)

作者简介: 毛小琴,女,四川省成都市人,博士研究生,主要从事药物蛋白质组学方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)60900816,E-mail:maoxq_123@163.com

通信作者: 邱 峰,电话:(023)89012410, E-mail:qiufeng.cn@gmail.com

收稿日期: 2007-09-03;**修回日期:** 2007-12-21

在前期应用手性药物比较蛋白质组学方法探讨普萘洛尔(propranolol, PRO)两个对映异构体在人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)上的立体选择性工作中,分离鉴定了 1 个差异表达蛋白 G 蛋白 β 亚单位 2 样 1 蛋白(guanine nucleotide-binding protein subunit beta 2-like 1, GBLP)。GBLP 又称为活化的蛋白激酶 C 受体 1(receptor of activated C kinase1,RACK1),是新近发现的 RACK 家族成员之一。研究表明,RACK1 是细胞内多种信号分子的底物和相互作用蛋白,参与细胞内多种受体信号通路级联反应[1-5],故推测其很可能在普萘洛尔生物学效应发生机制中也有重要作用,但目前尚少见报道。由于目前蛋白质组学方法本身的不足和局限性,有必要对质谱鉴定的结果进行验证,以确保实验结果的可靠性。因此,本实验对 GBLP 蛋白再次进行二维电泳分离和质谱分析,并采用 Western blot 和激光共聚焦扫描显微镜(confocal laser scanning microscopy, LSCM),验证经 R-普萘洛尔(R-propranolol, R-PRO)和 S-普萘洛尔(S-propranolol, S-PRO)作用后的 HUVEC 中 GBLP 的表达差异和细胞内定位,为下一步 GBLP 功能蛋白质组学研究奠定实验基础和依据。

1　材料与方法

1.1　HUVEC 细胞株

由第三军医大学西南医院全军烧伤研究所馈赠。

1.2　主要试剂与仪器

R-PRO 和 S-PRO(Sigma 公司,TLC 级),IPG Buffer、ReadyStrip IPG Strip (pH 3 ~ 10,17 cm)、Pharmalyte (pH 3 ~ 10)、30% 丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺(29∶1)(Bio-Rad 公司),测序级胰酶(Promega 公司),兔抗人 GBLP 多克隆抗体(Santa Cruz 公司),β-tubulin 单克隆抗体(Epitomics 公司),HRP 标记的羊抗兔 IgG 多克隆抗体(Pierce 公司),Cy3 标记的羊抗兔 IgG 多克隆抗体(Sigma 公司),正常兔血清封闭液、WB 封闭剂(博士德公司),ECL 试剂盒(Bio-Rad 公司),哺乳动物细胞全蛋白提取试剂盒(BioVision 公司)。SDS-PAGE 垂直电泳槽(Bio-Rad 公司),扫描仪(Kodak 公司),LSCM(TCS 公司)。

1.3　细胞全蛋白的制备

分别用 80 μmol/L 的 R-PRO 和 S-PRO 处理 HUVEC 细胞 3 h 后,用刮除法收集细胞,按试剂盒说明书提取细胞全蛋白,-80 ℃保存。

1.4　双向电泳与质谱鉴定

1.4.1　双向电泳　　各蛋白样品均用固相 pH 胶条(17 cm, pH 3 ~ 10)进行分析。100 μg 蛋白样品在重泡胀液(7 mol/L尿素,2 mol/L 硫脲,4% CHAPS,30 mmol/L DTT,0.5% IPG 缓冲液,痕量溴酚蓝)中重悬,被动水化过夜(12 ~ 16 h)。之后进行双向电泳(一向:IEF;二向:12% SDS-PAGE 电泳),根据 Bio-Rad 双向电泳实验指南进行。2-DE 的分离结果用经典质谱兼容银染法染色后进行图像扫描,以 PDQest 7.4.0 图像分析软件分析凝胶并寻找差异点。根据差异分析结果,两种样品中的同一种蛋白质如存在 1.5 倍以上的光密度差异,则视为具有表达量的差异。

1.4.2　基质辅助激光解吸电离-飞行时间-质谱(MALDI-TOF-MS)鉴定　　挖取目标蛋白点后,依次进行洗胶、脱色(30 mmol/L 铁氰化钾 和 100 mmol/L 硫代硫酸钠)、冷冻干燥、酶解(0.002 g/L)和萃取肽段、冷冻干燥、质谱点样,获得的肽指纹图谱(peptide mass fingerprint, PMF)利用 Mascot 搜索引擎在 SwissProt 最新数据库中进行检索,以蛋白质得分(Mascot Score)具有统计学差异时认为该蛋白获得鉴定。

1.5　Western blot 验证 GBLP 的表达丰度差异

为了验证 MALDI-TOF-MS 鉴定结果,本实验对感兴趣蛋白-GBLP 用经典的 Western blot 法[6]进行了验证。选用 β-tubulin 作为矫正上样量的内参蛋白,化学发光法(ECL)进行显色和 Kodak EDAS 290 扫描仪成像。以比值 A(A = 目的蛋白带的发光强度/同泳道内参蛋白带的发光强度)代表该目的蛋白在样品中的相对含量。以上实验重复 3 次。各样品中目的蛋白的表达丰度差异用比值 A 进行比较,SPSS 10.0 统计软件进行计量资料的两样本 t 检验分析。

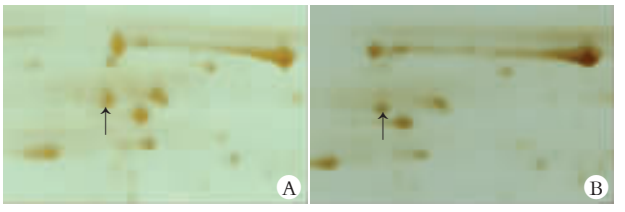
1.6　LSCM 验证 GBLP 的表达丰度和细胞内定位

将处于对数生长期的细胞贴壁爬片后,分别用 80 μmol/L 的 R-PRO 和 S-PRO 同时作用细胞 3 h。取出爬片,用 0.01 mol/L PBS(pH 7.2)洗涤后依次进行如下处理:4% 多聚甲醛室温固定细胞 20 min;滴加正常兔血清封闭液,室温 20 min;滴加 1∶400 用 PBS 稀释的兔抗人的 GBLP 一抗,4 ℃过夜;滴加 Cy3 标记的羊抗兔 IgG,室温 2 h;水溶性封片剂封片,用 LSCM 观察 GBLP 在细胞内的表达和定位情况。

2　结果

2.1　GBLP 在 R-PRO 和 S-PRO 作用后 HUVEC 细胞中的差异表达

箭头示之前鉴定为 GBLP 的同一位置,该蛋白点在 R-PRO 作用后的 HUVEC 细胞中的表达明显高于 S-PRO 作用后的表达(图 1)。



A: R-PRO 作用后; B:S-PRO 作用后

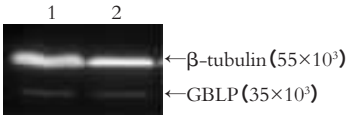
图 1　GBLP(箭头示)在 R-PRO 和 S-PRO 作用后 HUVEC 的 2-DE 图谱中的差异表达

2.2　质谱及数据库检索

根据 MALDI-TOF-MS 分析获得的蛋白点的 PMF,利用 Mascot 搜索引擎在 SwissProt 最新数据库中进行检索,挖取的蛋白点(图 1 中箭头所示)被鉴定为 GBLP,与原鉴定结果一致 。

2.3 Western blot 验证 GBLP 的表达丰度差异

如图 2 所示，GBLP 在经 S-PRO 作用后的 HUVEC 中的表达丰度（0.057 ±0.010）显著低于 R-PRO 作用后的表达（0.098 ± 0.012）（P =0.011），该结果与二维电泳图谱显示结果（图 1）一致。

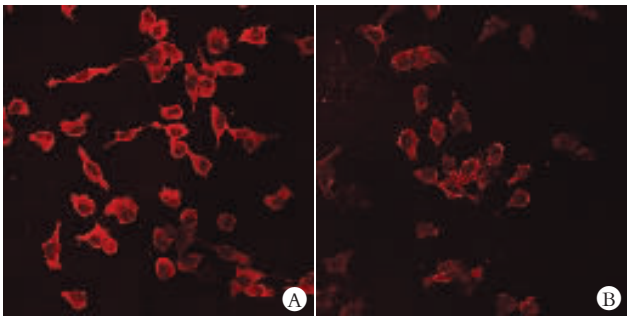


1：S-PRO 作用后；2：R-PRO 作用后

图 2 Western blot 检测 GBLP 在 HUVEC 中的表达丰度

2.4 LSCM 验证 GBLP 表达丰度差异和细胞内定位

结果显示，GBLP 在经 S-PRO 作用后的 HUVEC 中（图 3B）表达丰度明显低于经 R-PRO 作用后（图 3A）的表达，与二维电泳图谱（图 1）中显示结果一致。GBLP 主要定位于细胞质和细胞膜（图 3）。GBLP 在细胞质中呈均匀分布，在细胞膜上有局部聚集分布现象，尤其在是在经 S-PRO 作用后的 HUVEC 中（图 3B）。



A：R-PRO 作用后；B：S-PRO 作用后

图 3 LSCM 观察 GBLP 在 HUVEC 中的表达差异和定位 红色荧光代表 GBLP （Cy3 染色 ×400）

3 讨论

目前，手性药物的研究备受关注，蛋白质组学的发展为研究药物作用机制提供了新的思路和策略。普萘洛尔 2 个对映异构体 R-PRO 和 S-PRO 的生物学效应存在显著差异，S-PRO 阻断 β 受体作用是 R-PRO 的 100 倍，但其作用机制尚未完全明了。在前期研究中[7]，我们采用比较蛋白质组学方法鉴定到 1 个差异蛋白 - GBLP。GBLP 结合于蛋白激酶 C（PKC）上，作为细胞内受体使活化的 PKC 锚定在细胞骨架上，参与细胞的多种生物学功能[8-11]。研究者还发现[5]，沉默 ARCK1 基因后，可显著减少 β2 肾上腺素受体（β2-AR）的磷酸化，提示 ARCK1 的表达在 β2-AR 介导的信号传导中起作用。因此推测 GBLP 表达差异很可能在普萘洛尔 2 个对映异构体生物学效应立体选择性发生机制中有重要作用，进一步研究其功能具有重要意义。

为确保后期工作的顺利进行，本研究对 GBLP 表达量和定位同时进行了验证。结果显示，GBLP 在经 S-PRO 处理后的 HUVEC 细胞中表达明显低于经 R-PRO 处理后的表达，具有统计学意义（P =0.011），与蛋白质组学方法显示的结果一致，故可以推测 S-PRO 作用于 HUVEC 细胞后阻断 β 受体脱敏（即恢复 β 受体通路）的能力很可能比 R-PRO 强，从而引起 S-PRO 抗心律失常能力远大于 R-PRO。

综上所述，本实验采用免疫印迹法和激光共聚焦扫描显微镜，共同验证了经蛋白质组学方法筛选出的差异蛋白-GBLP 在经两个普萘洛尔对映异构体处理后的 HUVEC 细胞中的差异表达和细胞内定位，验证结果与蛋白质组学鉴定结果一致，提示前期蛋白质组学鉴定结果的可靠性较高，可以进行下一步的 GBLP 功能蛋白质组学研究。

参考文献：

[1] Chang B Y, Harte R A , Cartwright C A. RACK1: a novel substrate for the Src protein-tyrosine kinase[J]. Oncogene, 2002, 21(50): 7619 - 7629.

[2] Kiely P A, O'Gorman D, Luong K, *et al*. Insulin-like growth factor I controls a mutually exclusive association of RACK1 with protein phosphatase 2A and beta1 integrin to promote cell migration[J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(11): 4041 - 4051.

[3] Geijsen N, Spaargaren M, Raaijmakers J A, *et al*. Association of RACK1 and PKCbeta with the common beta-chain of the IL-5/IL-3/GM-CSF receptor[J]. Oncogene, 1999, 18(36): 5126 - 5130.

[4] Guil S, de-La-Iglesia N, Fernandez-Larrea J, *et al*. Alternative splicing of the human proto-oncogene c-H-ras renders a new Ras family protein that trafficks to cytoplasm and nucleus[J]. Cancer Res, 2003, 63(17): 5178 - 5187.

[5] Bolger G B, Baillie G S, Li X, *et al*. Scanning peptide array analyses identify overlapping binding sites for the signalling scaffold proteins, beta-arrestin and RACK1, in cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D5 [J]. Biochem J, 2006, 398(1): 23 - 36.

[6] Fu Y R, Yi Z J, Yang Y R, *et al*. Changes in the protein spectrum of mitochondria isolated from hydroxycamptothecin-treated hepatoma cells [J]. Anticancer Drugs, 2007, 18(9): 1045 - 1052.

[7] 毛小琴，邱 峰，邱宗荫，等. 普萘洛尔对映异构体诱导 HUVEL 细胞蛋白质表达谱差异[J]. 中国生物化学与分子生物学报，2008，24(2)：165 - 171.

[8] 刘红岩，从玉文，陈 波，等. Mpl 相互作用蛋白 RACK1 的筛选与鉴定[J]. 军事医学科学院院刊，2005，29(3)：204 - 207.

[9] 任京力，赵树进. β 受体的调节与相关疾病研究进展[J]. 解放军药学学报，2000，16(4)：203 - 205.

[10] Barki-Harrington L, Luttrell L M, Rockman H A. Dual inhibition of beta-adrenergic and angiotensin Ⅱ receptors by a single antagonist: a functional role for receptor-receptor interaction *in vivo*[J]. Circulation, 2003, 108(13): 1611 - 1618.

[11] Merlet P, Caussin C, Poiseau E, *et al*. *In vivo* assessment of neurotransmitter system in cardiovascular diseases. Clinical issues[J]. Q J Nucl Med, 1996, 40(1): 108-120.

（编辑 龙 亮）