论著

文章编号:1000-5404(2008)12-1144-04

大鼠肝叶切除后肝细胞再生相关蛋白的蛋白质组学分析

陈 胤,陈 平,何中林,王晓枫,还勇为 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所肝胆外科,重庆 400042)

摘 要:目的 通过对肝叶切除后6、24 h的肝细胞与正常肝细胞的蛋白质组分析,筛选出与肝细胞再生相关的蛋白质。**方法** 选择雄性SD大鼠9只(体质量200 g),分3组,6 h组、24 h组和对照组,每组3只,建立大鼠70%肝叶切除模型。6 h组在肝叶切除后6 h分离肝细胞,24 h组在肝叶切除后24 h分离肝细胞,对照组为正常肝细胞。裂解液裂解细胞提取总蛋白,运用蛋白组学相关技术分析3组细胞的蛋白组学差异。**结果** 总共得到47个差异蛋白质点,鉴定出42个。**结论** 我们的数据显示:24 h组与对照组和6 h组都有重叠,而6 h组和对照组重叠部分较少,推测其可能的原因为6 h组肝细胞处于肝再生的启动阶段,与对照组差异较大,而24 h组,肝再生已启动,各种维持肝细胞正常功能的蛋白质也开始表达。

关键词: 肝切除;肝再生;蛋白组学;二维电泳;肽质量指纹谱
中图法分类号: R322.47;R394.3;R657.3 **文献标识码:** A

Proteomic analysis of rat hepatocyte regeneration related proteins after liver resection

CHEN Yin, CHEN Ping, HE Zhong-lin, WANG Xiao-feng, HUAN Yong-wei (Department of Hepatobiliary Surgery, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To screen proteins related with liver regeneration by studying the proteomic difference between the hepatocytes 6 h and 24 h after the 70% hepatotectmy and the normal ones. Methods Nine male SD rats (weight 200 g) were selected and randomly divided into 3 groups: the control group, the 6 h group and the 24 h group, each one with 3 rats. The rats 70% hepatectomy model was built. The hepatocytes in the control group were immediately isolated from the rat liver and those in the 6 h group and 24 h group were isolated after 6 h and 24 h respectively. We extracted the total proteins with cell lysis and anselyzed the proteomic differences between the 3 groups. Results We found 47 different proteins and identified 42 of them. Conclusion The results indicated that the proteins produced in the 24 h group are to a large extent identical with those in the 6 h group and the control group, however, the proteins produced in the 6 h group are seldom the same with those in the control group. This is because the hepatocytes in the 6 h group was in the start state of liver regeneration while the hepatocytes in the 24 h not only produced proteins related to the liver regeneration but also the proteins maintaining the normal physiological function of the hepatocytes.

Key words: hepatotectomy; liver regeneration; proteomics; Two-dimensional electrophoresis; peptide mass fingerprint

自从1931年,Higgins建立大鼠2/3肝叶切除(partial hepatectomy, PH)模型以来,肝再生的研究有了飞速的发展。术后5 min至7 d,PH触发的参与肝再生的事件都能被观察到。目前大多数学者认为肝叶切除后门静脉系统的改变是肝再生的始动因素。门静脉系统的改变将触发一系列分子生物学改变进而引起再生。其过程大致可分为:①启动阶段的分子调控,主要有肿瘤坏死因子alpha(TNF-α)、白介素6(IL-6)等的参与;②增殖阶段的分子调控,主要有肝细胞生长因子(HGF)、转化生长因子alpha(TGF-α)、表皮生长因子(EGF)等的参与;③停止阶段的分子调控,主要有转化生长因子beta(TGF-β)、activin(属TGF-β超家族)的参与[1]。

肝再生过程是多种蛋白质相互作用的过程,但目

作者简介:陈 胤,男,重庆市人,硕士研究生,主要从事肝再生方面的研究。电话:(023)60556646,E-mail: cheny-2007@163.com
通信作者:陈 平,电话:(023)68757966, E-mail: chenping@263.net.
收稿日期:2007-11-25;修回日期:2008-03-15

前对肝再生研究大多局限在单个蛋白或是单条信号通路上,这样的研究尚不能很好的阐述肝再生的机制。因此我们采用蛋白质组学技术,筛选肝切除后不同时相点的差异白质,并通过生物信息方法,从整体上讨论肝再生的分子机制。

1　材料与方法

1.1　实验动物分组和动物模型的制作

健康雄性 SD 大鼠 9 只(体质量 200 g),分为 6、24 h 组和对照组,每组 3 只。肝叶切除的动物模型采用由 Goss 介绍的方法并加以改进。水合氯醛 0.06 ml/g 腹腔注射麻醉,腹部正中切口入腹,切除中叶和左叶(占全肝 70%)后关腹。3 组模型制作时间均为上午 8:00 -9:00。

1.2　肝细胞的分离、冻存

采用 Seglen 的方法并加以改进。0.06 ml/g 水合氯醛腹腔注射麻醉后,将大鼠四肢固定于鼠夹板上,十字切口剪开大鼠腹壁,打开腹腔,游离门静脉及肝上下腔静脉,门静脉插管、固定,用前灌液、胶原酶、D-Hank 液将肝脏原位消化,得到的细胞悬液置于 30 ml 离心管,Beckman 低温冷冻离心机于 4 ℃、50 × g、离心 3 min。分装于 1.5 ml Eppendof 管,于 -70 ℃冻存。

1.3　总蛋白提取

配置样品裂解液工作液:8 mol/L 尿素,4% CHAPS, 65 mmol/L DTT,pmsf 1 μl/10 μl 裂解液。于取得的细胞样品中加入裂解缓冲液(1.5 × 10^6 个细胞大约加入 100 μl 裂解液),-70 ℃ 反复冻融 5 min × 5 次,14 000 × g 离心 15 min;吸取上清并用 Brandford 法定量蛋白,然后分装至 Eppendof 管里,-70 ℃ 保存。

1.4　二维电泳及图像采集、分析

用 17 cm IPG(pH3 - 10 NL)预制非线性胶条对制备的肝细胞蛋白样品进行 2DE 分离,总电压-时间积为 60 000 Vh。样品上样量为 200 μg。SDS-PAGE 凝胶垂直电泳,我们使用 Protean Ⅱ xi(20 cm × 20 cm)(Bio-Rad),5 mA 运行 1 h,30 mA 直到溴酚蓝跑到胶底,大约需要 6 h。采用质谱兼容的银染方法染色后,使用 Imagermaster VDS-CL 图像分析系统对二维电泳凝胶扫描,利用 ImagerMaster 2D Elite 2002.2 软件(Amersham Pharmacia Biotech)进行凝胶图像分析。

1.5　肽质量指纹谱(peptide mass fingerprinting,PMF)鉴定蛋白

将电泳染色后凝胶中的蛋白点切下,用超纯水清洗几次后,用 30 mmol/L 铁氰化钾和 100 mmol/L 硫代硫酸钠贮备液,1∶1 均匀混合,用此混合液 30 ~ 50 μl 浸泡胶片,涡旋混合器振荡至凝胶中的棕黄色褪尽,弃去溶液,胶片用水洗至无淡黄色溶液产生。然后将胶片真空离心干燥 20 min,使其完全脱水体积缩小,加入 5 ~ 10 μl 酶液(0.01 μg/μl,含 25 mmol/L NH_4HCO_3),4 ℃冰箱中放置 20 ~ 30 min,待酶液完全被吸收,补充 5 ~ 10 μl 25 mmol/L NH_4HCO_3 液,37 ℃保温 15 h 后,加 5% TFA 50 ~ 100 μl 于 40 ℃保温 1 h,吸出上清液,加 2.5% TFA、50% CAN 50 ~ 100 μl 于 30 ℃保温 1 h,吸出上清,合并上清液,冰冻干燥。加 5 ~ 10 μl 0.5% TFA 溶液混匀后用于 MALDI-TOF-MS 质谱分析。

2　结果

2.1　2D 电泳结果

对 3 组内的 3 只大鼠肝细胞的总蛋白进行 2D 电泳,每个细胞样品分成 3 份,所得电泳图谱经过计算机分析后,2D 电泳图谱重复性高,同一细胞的 3 份蛋白样品,点匹配率超过 98%,组间点匹配率超过 95%。经过 Imagermaster 2D software 2002.2 胶图分析软件对电泳图进行差异点分析(图 1)。

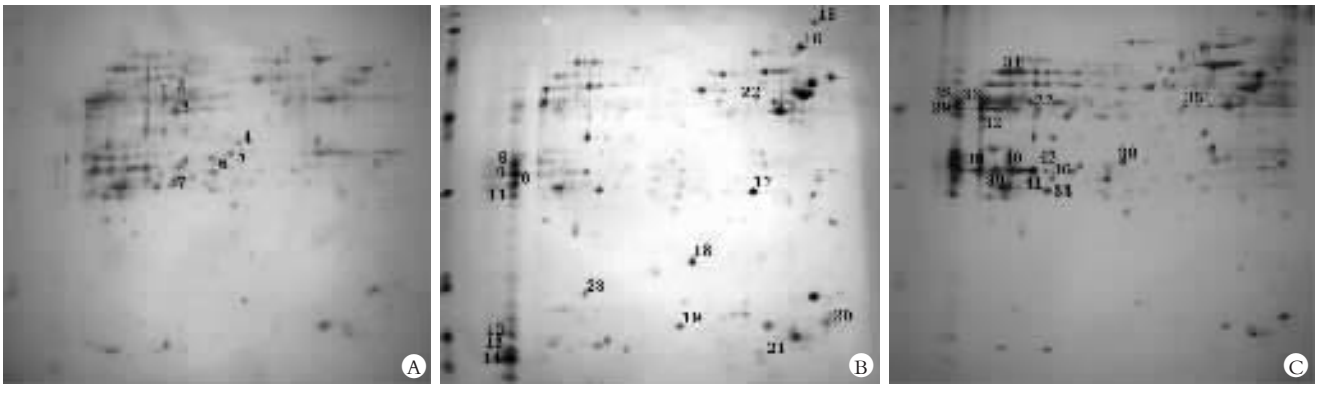
2.2　质谱鉴定结果及差异蛋白质分组

使用 Mascot 软件在 swiss-prot 蛋白数据库里对获得的肽质指纹进行查询和鉴定,并对所得蛋白进行分组和分析(表 1 ~ 5)。

表 1　糖、脂、能量代谢有关的蛋白质

差异蛋白编号	蛋白代码	蛋白通用名
1[ac]	O70475	UDP-glucose 6-dehydrogenase
9[bc]	Q80XN0	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, mitochondrial precursor
10[bc]	Q9Z1B7	Mitogen-activated protein kinase 13
11[bc]	Q9D517	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase gamma
14[b]	Q62425	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 4
32[c]	Q8BWT1	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial (EC 2.3.1.16)
39[ac]	Q6VVW9	Cytochrome P450 2R1 (EC 1.14.14.-) (Vitamin D 25-hydroxylase)
40[ac]	P23589	Carbonic anhydrase 5A, mitochondrial precursor (EC 4.2.1.1) (Carbonic anhydrase VA) (Carbonate dehydratase VA) (CA-VA) (CA Y)

a:对照组高表达; b:6 h 组高表达; c:24 h 组高表达



A:对照组; B: 6 h 组; C: 24 h 组　1 ~ 42 为差异蛋白质点

图 1　各组大鼠肝细胞总蛋白 2D 电泳结果

表2 DNA合成、转录相关蛋白质

差异蛋白编号	蛋白代码	蛋白通用名
6[ac]	Q99LD9	Translation initiation factor eIF-2B subunit beta
2[ac]	Q7TNV0	Protein DEK
17[b]	P29387	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta 4
18[b]	Q9CQM0	Nicolin-1
22[bc]	Q91WD1	DNA-directed RNA polymerase Ⅲ subunit D (EC 2.7.7.6)
23[b]	Q9CQA0	Centromere protein M (CENP-M)

a: 对照组高表达; b: 6 h 组高表达; c: 24 h 组高表达

表3 调节细胞增殖的相关蛋白质

差异蛋白编号	蛋白代码	蛋白通用名
3[ac]	Q91WA3	Histone deacetylase 11
4[a]	O89100	GRB2-related adaptor protein 2
5[ac]	Q9WUH1	Transmembrane protein 115
8[bc]	P47809	MAP kinase kinase 4
10[bc]	Q9Z1B7	Mitogen-activated protein kinase 13
16[bc]	O09012	Peroxisomal targeting signal 1 receptor
20[bc]	P04351	Interleukin-2 precursor (IL-2)
24[bc]	Q8VBW6	Amyloid protein-binding protein 1
25[b]	Q8K479	Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 5 precursor
27[bc]	Q9Z121	Small inducible cytokine A8 precursor (CCL8)
28[bc]	Q64261	Cell division protein kinase 6 (EC 2.7.11.22)
29[bc]	Q63844	Mitogen-activated protein kinase 3
30[bc]	P50580	Proliferation-associated protein 1
33[bc]	Q9QXB9	Developmentally-regulated GTP-binding protein 2 (DRG 2)
34[bc]	Q9DAK2	Parkin coregulated gene protein homolog
36[ac]	Q8VCM5	RING finger protein C1orf166 homolog
37[ac]	Q9CXD9	Leucine-rich repeat-containing protein 17 precursor

a: 对照组高表达; b: 6 h 组高表达; c: 24 h 组高表达

表4 蛋白质合成相关的蛋白质

差异蛋白编号	蛋白代码	蛋白通用名
13[b]	Q6ZWY3	40S ribosomal protein S27-like protein
31[bc]	P22315	Ferrochelatase, mitochondrial precursor (EC 4.99.1.1)
41[ac]	P52840	Sulfotransferase 1A1 (EC 2.8.2.1)
42[ac]	P70195	Proteasome subunit beta type 7 precursor (EC 3.4.25.1)

a: 对照组高表达; b: 6 h 组高表达; c: 24 h 组高表达

表5 其他功能的蛋白质

差异蛋白编号	蛋白代码	蛋白通用名
7[ac]	P97792	Coxsackievirus and adenovirus receptor homolog precursor
15[bc]	O35551	Rab GTPase-binding effector protein 1
26[b]	Q3UW31	Uncharacterized protein C11orf038 homolog precursor
35[bc]	Q3TT38	Uncharacterized protein C6orf106 homolog
38[ac]	Q8R0Z6	Angiopoietin-related protein 6 precursor (Angiopoietin-like 6) (Angiopoietin-related growth factor)

a: 对照组高表达; b: 6 h 组高表达; c: 24 h 组高表达

3 讨论

肝脏再生是一个非常复杂的生物过程,目前的研究还非常肤浅。我们以前的研究和相关文献均提示,肝叶切除后6 h和24 h是DNA合成的两个高峰期,因此我们选择这两个时相点与正常肝细胞进行差异蛋白质组学分析,进而筛选出与肝细胞再生相关的蛋白质[2,3]。

本研究结果显示24 h组与对照组和6 h组都有重叠,而6 h组和对照组重叠部分较少,推测其可能的原因为6 h组肝细胞处于肝再生的启动阶段,与对照组差异较大,而24 h组,肝再生已启动,各种维持肝细胞正常功能的蛋白质也开始表达,换句话说,24 h组的肝细胞既要表达启动肝再生的蛋白又要表达正常肝细胞的蛋白质,而且也有其独有的蛋白质表达。

3.1 糖、脂、能量代谢相关的蛋白质

表1中的蛋白质都是与糖、脂代谢相关的蛋白质。肝切除后肝糖元生成能力降低而脂代谢却明显增强,但这两者之间并没有明确的关系。肝细胞内糖元含量明显降低,主要有两个原因:余肝为了代偿其正常情况下控制血糖的功能,通过减少胰岛素的摄取,从而增加肝脏的糖输出量来控制血糖;而且肝细胞DNA合成等也需要通过分解糖元来提供能量[4]。肝细胞DNA的合成以及细胞分裂等各种再生过程都需要大量的脂类物质作为原料来参与各种生化过程。而且很多和再生相关的酶都以脂类物质作为底物,也有很多脂类物质如磷脂酰肌醇(phosphatidylinositols)和鞘磷脂(sphingomyelins)都是再生过程中重要的脂类信使。各种脂类物质也会出现相应的改变,如非酯化脂(肪)酸(nonesterified fatty acid, NFA)和甘油三酯(triglyceride,TG)在肝切除后含量明显增加,而中性脂类(neutral lipid)和磷脂(phospholipid)的含量却降低[5]。

3.2 DNA合成、转录相关蛋白质

表2中的蛋白质都参与了基因的转录和DNA的合成。eIF-2B属于转录起始因子(translation initiation factor),其同属的eIF-4E研究比较多,eIF-4E在调控mRNA合成中起关键作用[6],而eIF3S3的过表达却与肿瘤的发生有关系[7],eIF-2B的研究报道较少,根据我们的研究推测,其可能在肝细胞再生的过程中起负调节。RNA polymerase相关的研究提示DNA-directed RNA polymerase Ⅲ与细胞的生理状态有关,RNA polymerase Ⅱ与细胞的分化以及生长速度有关[8]。Centromere protein S、Centromere protein M为着丝粒蛋白,这些蛋白通过调节着丝粒进而影响细胞的有丝分裂。Centromere protein在细胞增殖的G_1期明显升高,而到了M期则开始快速降解[9]。总之细胞的有丝分裂是多种因子参与、共同调节的复杂的生理过程,目前的研究还有待深入。

3.3 调节细胞增殖的相关蛋白质

肝细胞再生与其他真核细胞增殖有很多类似之处,同样需要许多蛋白质的调节。Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 4、Mitogen-activated

protein kinase 13 属于 MAPK 信号通路,此信号通路是与细胞增殖密切相关的信号通路,目前对此的研究也比较多。其主要受酪氨酸激酶相关的生长因子受体(tyrosine kinase growth factor receptors)及 G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors)的调节。多种来自细胞外的刺激如细胞因子、炎症因子、各种应激情况等都可以启动、调节 MAPK 信号通路。而不同的细胞外刺激,启动不同 MAPK 亚型。如各种应激情况下如血流改变、压力改变等则通过 MAP3K4/MAP2K4/MAPK13 这条通路来启动细胞增殖[10, 11]。本实验发现在肝叶切除后 6、24 h,MAP2K4 及 MAPK13 的表达都明显上调。这说明在肝再生早期启动肝细胞再生的因素主要是各种应激情况。Histone deacetylase 在调节细胞周期、基因转录中有重要作用,抑制 Histone deacetylase 的表达可以诱导正常细胞分化,但是可以抑制肿瘤细胞的增殖[12]。Amyloid protein-binding protein 1 是 Amyloid protein 的受体蛋白,对于 Amyloid protein 的研究还不多,有报道提示:游离的 Amyloid protein 与生长因子相似[13]。本实验中 Amyloid protein 的受体蛋白质减少,可能导致游离的 Amyloid protein 增多,从而促进肝细胞的再生进程。Cell division protein kinase 也是与细胞周期的调控有关的蛋白质,与 Serine/threonine-protein kinase、CDC2/CDKX 有类似的功能。Proliferation-associated protein 1 在 ERBB3-regulated signal transduction pathway 中起重要作用,调节细胞的生长周期[14]。Developmentally-regulated GTP-binding protein(DRG)也对细胞的生长起着重要的作用,属于 GTP1/OBG 家族。DRG1 在多巴胺诱导细胞增殖的过程中发挥作用,DRG2 的高表达能抑制细胞的凋亡[15]。Parkin coregulated gene protein 有保护细胞、抑制细胞的死亡的功能,在细胞遇到各种损害因素,特别是氧化应激时,Parkin coregulated gene protein 表达明显增高[16]。

3.4　蛋白质合成相关蛋白质

表 4 中的蛋白质参与蛋白质的合成,其中 40S ribosomal protein S27-like protein 参与核糖体的合成,Ferrochelatase, mitochondrial precursor、Sulfotransferase 1A1 则和蛋白质的修饰有关,Proteasome subunit beta type 7 precursor 与蛋白的降解有关。

肝细胞再生是一个复杂的过程,肝细胞再生符合真核细胞增殖的一般规律,很多调节细胞增殖的蛋白质也具有调节肝细胞再生的功能,但是肝细胞具有其特有的结构和功能,肝叶切除后糖、脂代谢的改变对肝细胞再生具有重要作用。我们通过蛋白质组学相关技术对肝细胞再生相关的蛋白质进行筛选,只是对肝细胞再生研究的初步探索,根据本实验结果我们将开展更多的研究。

参考文献:

[1] 刘现忠, 李相成, 仲跻巍, 肝脏再生信号机制研究进展[J]. 中华肝脏病杂志, 2007, 15(2): 158 – 160.

[2] Fausto N, Campbell J S, Riehle K J. Liver regeneration[J]. Hepatology, 2006, 43(2 Suppl 1): S45 – S53.

[3] 袁晟光, 王继见, 董家鸿, 等. 冷保存对大鼠部分移植肝再生的影响[J]. 中华消化外科杂志, 2007, 6(5): 363 – 365.

[4] Nadal C. Nonregenerative stimulation of hepatocyte proliferation in the rat: variable effects in relation to spontaneous liver growth; a possible link with metabolic induction[J]. Cell Prolif, 2000, 33(5): 287 – 300.

[5] Chocian G, Zabielski P, Chabowski A. Liver regeneration after partial hepatectomy. Role of lipid mediators[J]. Postepy Hig Med Dosw, 2002, 56(1): 49 – 71.

[6] Culjkovic B, Topisirovic I, Skrabanek L, *et al*. eIF4E is a central node of an RNA regulon that governs cellular proliferation[J]. J Cell Biol, 2006, 175(3): 415 – 426.

[7] Savinainen K J, Helenius M A, Lehtonen H J, *et al*. Overexpression of EIF3S3 promotes cancer cell growth[J]. Prostate, 2006, 66(11): 1144 – 1150.

[8] Sharma N, Marguerat S, Mehta S, *et al*. The fission yeast Rpb4 subunit of RNA polymerase Ⅱ plays a specialized role in cell separation[J]. Mol Genet Genomics, 2006, 276(6): 545 – 554.

[9] Ruchaud S, Carmena M, Earnshaw W C. Chromosomal passengers: conducting cell division[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8(10): 798 – 812.

[10] 胡钢英, 王晋明, 江　洪, 等. 螺内酯和缬沙坦对高血压大鼠心肌肥大信号通路的影响[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(3): 223 – 226.

[11] 王松柏, 裴树俊, 徐昌富, 等. JAK 抑制剂 AG490 对大鼠组织 iNOS 和 NO 合成的影响[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(15): 1511 – 1513.

[12] Wittich S, Scherf H, Xie C, *et al*. Effect of inhibitors of histone deacetylase on the induction of cell differentiation in murine and human erythroleukemia cell lines[J]. Anticancer Drugs, 2005, 16(6): 635 – 643.

[13] Iino M, Nakatome M, Ogura Y, *et al*. Real-time PCR quantitation of FE65 a beta-amyloid precursor protein-binding protein after traumatic brain injury in rats[J]. Int J Legal Med, 2003, 117(3): 153 – 159.

[14] Kowalinski E, Bange G, Wild K, *et al*. Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of the proliferation-associated protein Ebp1[J]. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2007, 63(Pt 9): 768 – 770.

[15] Yu K H, Rustgi A K, Blair I A. Characterization of proteins in human pancreatic cancer serum using differential gel electrophoresis and tandem mass spectrometry[J]. J Proteome Res, 2005, 4(5): 1742 – 1751.

[16] Yang Y X, Muqit M M, Latchman D S. Induction of parkin expression in the presence of oxidative stress[J]. Eur J Neurosci, 2006, 24(5): 1366 – 1372.

(编辑　龙　亮)