短篇论著

文章编号:1000-5404(2008)23-2240-02

亚急性红斑狼疮皮损角质形成细胞的蛋白组学初步研究

方 圣,郭 庆,曾凡钦,李伯友,朱晓浚,谭国珍 (中山大学附属第二医院皮肤科,广州 510120)

摘 要:目的 建立亚急性红斑狼疮皮损和正常皮肤角质形成细胞双向电泳图谱,分析二者蛋白质的表达差异及特点。**方法** 运用双向凝胶电泳分离6例亚急性皮肤红斑狼疮患者皮损和正常皮肤角质形成细胞总蛋白,考马斯亮蓝染色,比较分析差异蛋白表达。**结果** 皮损和正常组电泳图谱平均蛋白质点分别为(1 586±41)和(1 601±49),匹配率为78.69%和80.89%。差异蛋白质点共26个,16个在皮损高表达,2个在皮损组低表达,有6个点仅在病例组表达,2个点仅在正常对照组表达。**结论** 获得分辨率高且重复性较好的双向电泳蛋白质组图谱,识别重复表达的差异蛋白。

关键词: 亚急性;红斑狼疮;角质细胞;蛋白质组

中图法分类号: Q755; R593.24 **文献标识码:** A

亚急性皮肤红斑狼疮(subacute cutaneous lupus erythematosus,SCLE)是一种好发于生育期女性的自身免疫性疾病[1],具体的发病机制仍不明了。本研究应用蛋白质组学技术,对人SCLE皮损角质细胞体外培养后进行双向凝胶电泳分离,对图像进行系统分析,识别差异蛋白,有助于加深对SCLE的发病机制的理解。

1 材料与方法

1.1 材料

皮肤组织均来自本院皮肤科门诊SCLE临床确诊患者,皮肤损害的组织病理、免疫荧光证实是红斑狼疮的皮肤损害,要求病史在6个月以上,无其他免疫性疾病及全身性疾病。患者共6例,男性1例,女性5例,年龄17~35岁,平均26.5岁。选择患者自身正常皮肤组织作为实验对照组(患者知情并同意)。

等电聚焦电泳系统、大型垂直电泳系统、图像扫描仪、ImagingMaster 2D 5.0图像分析软件、蛋白质定量试剂盒、IPG胶条、尿素、CHAPS、SDS、Tris、丙烯酰胺、TMED、过硫酸铵、三氟乙酸甘油、甘氨酸、溴酚蓝、琼脂糖、考马斯亮蓝R-250均为瑞典Amersham Biosciences公司产品。胰酶、角质细胞无血清培养基、PBS、Dispase Ⅱ购自GIBCO公司。

1.2 方法

1.2.1 原代角质细胞培养 手术切取患者皮损及正常皮肤3~4 cm^2置于PBS中,剪成0.5 cm×0.5 cm大小,移入0.25% Dispase Ⅱ。4 ℃过夜,次日剥取表皮层移入0.25%胰酶,37 ℃孵育15 min终止消化。筛网滤过,收集细胞。以无血清培养基调定(1~2)×10^6/ml细胞,苔盼蓝染色计数活细胞,接种于培养瓶中,在37 ℃、5% CO_2、90%湿度条件下培养。

1.2.2 双向电泳蛋白质样品的制备 培养细胞生长至对数生长期后,清洗3次,胰酶消化收集沉淀细胞于1.5 ml Eppendorf管中,加入细胞裂解液,反复冻融3个循环,12 000 r/min离心30 min。移取上清液于另一干净Eppendorf管中,测蛋白浓度后保存于-80 ℃备用。

1.2.3 角质细胞总蛋白的双向电泳 第一向固相pH梯度等电聚焦:取450 μg蛋白质加入水化上样液后均匀加在胶条槽,取出IPG胶条缓慢放入槽内,用IPGphor等电聚焦仪,如下程序自动进行:①30 V,10 h泡胀;②200 V,1 h除盐;③1 000 V,2 h除盐;④8 000 V,2 h线性升压;⑤8 000 V,10 h等电聚焦。第二向垂直平板SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE):配制12% SDS- PAGE均匀胶。将平衡后的IPG胶条移至凝胶上方,低熔点琼脂糖封闭。凝固后垂直电泳系统系统进行电泳。电泳参数设置:第1步2.5 W/胶,30 min;第2步17 W/胶,5 h,至溴酚蓝前沿达玻璃板底部停止。考马斯亮蓝染色:将2-DE胶放入固定液中固定后,考马斯亮蓝R-250中染色,后脱色至背景清晰。凝胶图像分析:通过Imagescanner Ⅱ扫描仪以及LabScan扫描软件进行扫描获取图像,利用ImageMaster2D软件对图像进行强度校正、点检测、匹配、比较差异等分析。斑点位置的重复性按Corbett等[2]的方法计算。

2 结果

2.1 细胞培养

初期细胞悬于培养液中,圆形,均质、透明。24 h内,细胞开始贴壁,2 d后细胞由圆形变成扁平形,足突变短;7~10 d细胞逐渐汇合连接成片;11~15 d,细胞完全融合,呈典型铺路石样形态。

2.2 双向电泳图谱特征

皮损组和对照组在凝胶上蛋白质点数分别为(1 586±41)和(1 601±49)。皮损组和对照组的匹配点数分别为(1 248±26)和(1 295±31),匹配率分别为78.69%和80.89%。

利用分析软件对SCLE皮损和正常皮肤角质细胞蛋白质组的图像表达差异进行综合分析后,获得重复差异表达蛋白点26

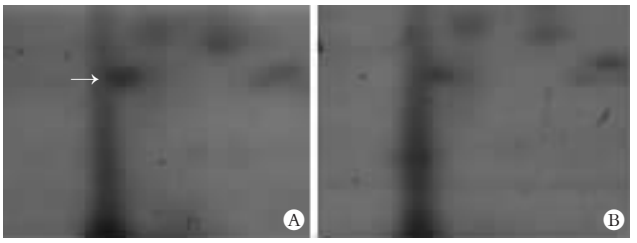
基金项目: 广东省自然科学基金(5001781)
Supported by the National Natural Science Foundation of Guangdong (5001781)

作者简介: 方 圣,男,安徽省池州市人,博士研究生,主要从事免疫性皮肤病方面的研究。电话:(020)81332090

通信作者: 郭 庆,E-mail:guoqingzxy@163.com

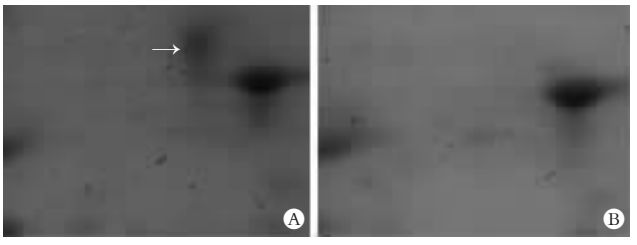
收稿日期: 2008-03-06;**修回日期:** 2008-04-25

个,其中 16 个在皮损高表达,2 个在皮损组低表达,有 6 个点仅在病例组表达,2 个点仅在正常对照组表达(图 1 ~4)。



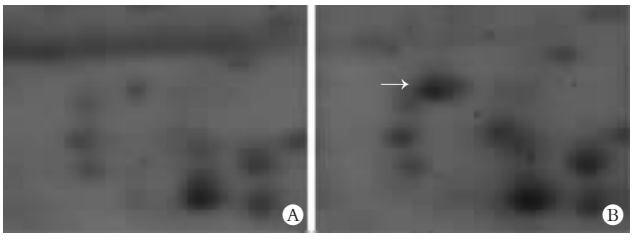
A:皮损;B:正常皮肤

图 1　SCLE 皮损中表达增高的蛋白点与正常皮肤对照观察　(箭头示)



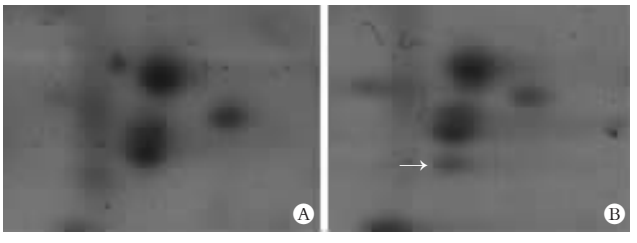
A:皮损;B:正常皮肤

图 2　SCLE 皮损中新增的蛋白点与正常皮肤对照观察　(箭头示)



A:皮损;B:正常皮肤

图 3　SCLE 皮损中表达减弱的蛋白点与正常皮肤对照观察　(箭头示)



A:皮损;B:正常皮肤

图 4　SCLE 皮损中表达缺失的蛋白点与正常皮肤对照观察　(箭头示)

3　讨论

SCLE 是一种慢性自身免疫性疾病,属于红斑狼疮特殊亚型。皮损是最常见、最早出现的症状之一,并伴随疾病的变化而加重或减轻。长期以来学者把皮损作为研究的热点,希望从中研究红斑狼疮的发病机制和早期诊断、分型标准和治疗方案的选择[1]。

近期研究表明角质形成细胞对 SCLE 皮损的发病有着重要的影响。Casciola 等[3]研究发现,角质细胞受到外界刺激启动凋亡程序,释放大量核酸片段,且细胞内的核抗原转位膜表面被免疫系统识别,诱导自身免疫性抗体产生。Heckmann 等[4]证实,角质细胞上调 IL-1α 和 TNF-α 等的分泌和 ICAM-1 和 VCAM-1 的膜表达,促进炎症细胞定位迁移,参与皮损形成。

本研究应用双向凝胶电泳技术分离人 SCLE 患者皮损及正常皮肤角质细胞总蛋白质,从蛋白质整体水平探索致病因素。获得清晰度和分离效果较为理想的双向电泳图谱,平均分离蛋白点 1 300 个点以上,匹配率 80% 左右。我们发现,33 个蛋白质点重复出现表达异常,18 个在皮损组高表达,3 个在皮损组低表达,10 个点仅在病例组表达,2 个点仅在正常组表达。无论是高表达或低表达的蛋白点,都可能存有重要的意义。SCLE 皮损表达增强的蛋白可能于诱导皮损形成等有关,为潜在致病蛋白;表达减弱的蛋白,则可能是一些保护或是某些起调节作用的蛋白质;重复表达异常的蛋白则可能是 SCLE 诊断的潜在性靶分子。研究提示角质细胞在 SCLE 和正常皮肤中确实存在着异常表达的蛋白,这些蛋白的结构、功能、定位变化很可能参与了疾病的过程。引起变化的原因可以是外界因素诱导基因激活、抑制,也可以是氨基酸突变[5]。无论是那一种因素引起,对这些差异点进一步的功能性研究和氨基酸测定,不仅对筛选疾病分子标记和明确红斑狼疮皮损的发病机制提供了有益的线索,更对探索新的致病相关蛋白开创了研究方向。

参考文献:

[1] Franz B, Fritzsching B, Riehl A, *et al*. Low number of regulatory T cells in skin lesions of patients with cutaneous lupus erythematosus [J]. Arthritis Rheum, 2007, 56(6): 1910 – 1920.

[2] Corbett J M, Dunn M J, Posch A, *et al*. Positional reproducibility of protein spots in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis using immobilised pH gradient isoelectric focusing in the first dimension: an interlaboratory comparison[J]. Electrophoresis, 1994, 15(8 – 9): 1205 – 1211.

[3] Casciola-Rosen L A, Anhalt G J, Rosen A. DNA-dependent protein kinase is one of a subset of autoantigens specifically cleaved early during apoptosis[J]. J Exp Med, 1995, 182(6): 1625 – 1634.

[4] Heckmann M, Eberlein-Konig B, Wollenberg A, *et al*. Ultraviolet-A radiation induces adhesion molecule expression on human dermal microvascular endothelial cells[J]. Br J Dermatol, 1994, 131(3): 311 – 318.

[5] Cleaver J E, Crowley E. UV damage, DNA repair and skin carcinogenesis[J]. Front Biosci, 2002, 7: d1024 – d1043.

(编辑　龙　亮)