论著

文章编号:1000-5404(2009)21-2078-03

免疫共沉淀-蛋白测序技术验证 Periostin 和 SFRP2 之间的相互作用

陶 熹[1],王珍祥[1],袁顺忠[2],李世荣[1],吴 军[2] (第三军医大学西南医院:[1]整形外科,[2]全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

摘 要:目的 验证凋亡相关蛋白基因 SFRP2(secreted frizzled-related protein 2)和骨母细胞特异性因子-2 Periostin(osteoblast-specific factor 2)间的相互作用。**方法** 分别构建重组载体 pCMV-Myc-SFRP2 和 pCMV-HA-Periostin 经双酶切鉴定正确,共转染 HEK293 细胞,抗 Myc 单克隆抗体沉淀 Myc-SFRP2 相互作用蛋白复合物后,进行 SDS-PAGE、考马斯亮蓝染色,切下目的条带,利用 HPLC-Chip /MS 纳流液质联用技术进行肽序列分析,经 Spectrum Mill 搜索 Swissport 数据库后鉴定蛋白质。**结果** 经 HPLC-Chip /MS 纳流液质联用技术分析,免疫沉淀复合物内可检测出 Periostin 的表达。**结论** Periostin 与 SFRP2 间存在相互作用。

关键词: 免疫共沉淀;相互作用;SFRP2;Periostin;瘢痕疙瘩

中图法分类号: R341; R394-33; R394.2 **文献标识码:** A

Interaction between periostin and SFRP2 by co-immunoprecipitation and protein sequencing

TAO Xi[1], WANG Zhen-xiang[1], YUAN Shun-zhong[2], LI Shi-rong[1], WU Jun[2] ([1]Department of Plastic Surgery and Cometic Surgery, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To confirm the interaction between periostin (osteoblast-specific factor 2) and secreted frizzled-related protein 2 (SFRP2) by co-immunoprecipitation and HPLC-Chip/MS techniques. **Methods** Expression vector encoding HA-tagged fusion protein HA-Periostin was constructed, identified and transfected into human embryo kidney 293 (HEK293) cells alone or with the expression vector pMCV-Myc-SFRP2 containing Myc-tagged fusion protein Myc-SFRP2. The interaction between SFRP2 and periostin was detected by co-immunoprecipitation with the aid of anti-Myc antibody first. Then SDS-PAGE was perform, and the blots of the protein complexes were analyzed by HPLC-Chip/MS techniques. Spectrum Mill was employed to identify the protein complexes by searching Swissport database. **Results** From the Myc-SFRP2 immunoprecipitation complex, periostin was identified by protein sequencing. **Conclusion** There is an interaction between SFRP2 and periostin.

Key words: co-immunoprecipitation; protein-protein interaction; periostin; secreted frizzled-related protein 2; HPLC-Chip/MS

我们曾对同体瘢痕疙瘩和正常皮肤内差异表达的基因进行了基因芯片筛选,确定了显著高表达基因 SFRP2(Ratio=7.9352)[1]。进一步对从瘢痕疙瘩分离的成纤维细胞在体外培养经氢化可的松处理前后,表达变化同样存在着明显差异[2];原代培养的瘢痕疙瘩成纤维细胞(keloid fibroblasts,KFs)和正常成纤维细胞(normal fibroblasts ,NFs)利用 QRT-PCR 技术从基因水平上证实 SFRP2 基因在前者中的表达要显著高于后者。本实验在分别构建 SFRP2 的融合蛋白 Myc-SFRP2 和 Periostin 的融合蛋白 HA-Periostin 的表达载体 pCMV-HA-SFRP2 和 pCMV-HA-Periostin 的基础上,经共转染 HEK293 细胞后,利用免疫共沉淀结合纳流液质联用技术(HPLC-Chip/MS techniques)验证在活体细胞内 SFRP2 与 Periostin 间是否存在相互作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒 含 SFRP2 基因序列的重组载体 pCMV-HA-SFRP2 和 pCMV-HA-Periostin 均为本研究小组保存。

基金项目: 国家自然科学基金(39700185)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (39700185)

作者简介: 陶 熹,男,四川省资中县人,硕士研究生,医师,主要从事纤维化相关调解机制方面的研究。E-mail:dcthrflier@hotmail.com

通信作者: 李世荣,电话:(023)65410724
吴 军,E-mail:junwupro@public.cta.cq

收稿日期: 2009-03-12;**修回日期:** 2009-06-28

1.1.2　主要试剂　　细胞裂解液 RIPA 购自 Santa Cruz 公司,质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自 Omega 公司,胰蛋白胨、酵母提取物购自 Oxford 公司,DMEM 购自 Gibco 公司,转染剂 Lipofetamine2000 购自 Invitrogen 公司;SFRP2 单克隆抗体购自博士德公司;蛋白 A + G 购自碧云天公司;蛋白预染 Marker 购自博大泰克公司;乙腈、甲酸、DDT、碘乙酰胺、碳酸氢铵购自安捷伦公司。

1.2　方法

1.2.1　细胞转染　　按 2×10^5/孔接种 HEK293 细胞至六孔板中,待细胞长至 90% 融合时共转染 pCMV-Myc-SFRP2 和 pCMV-HA-Periostin,以 pCMV-Myc-SFRP2 和 pCMV-HA-Periostin 的分别转染为对照组。具体方法:①将 10 DNA 用 250 μl 不含抗生素的无菌无血清 DMEM 稀释并混匀后,室温孵育 5 min。②用 240 μl 不含抗生素的无菌无血清 DMEM 稀释 10 μl Lipofetamine 2000 并混匀后,室温孵育 5 min。③将①和②中混合液进行混合即成转混合液,室温孵育 15 min。④将六孔板中培养基换用 1 ml 不含抗生素的无菌无血清 DMEM,加入转染混合液,轻柔混匀,置于 CO_2 培养箱中(37 ℃、5% CO_2)孵育。⑤4 h 后,弃去培养基,换用含 10% 小牛血清的 DMEM 继续培养。

1.2.2　免疫沉淀反应　　转染 48 h 后,弃去培养基,在冰上进行后续操作。刮下细胞,用冷 PBS 液冲洗 2 遍,离心,弃上清,加入 100 μl RIPA,冰浴 30 min,加入 1 μl 小鼠抗 Myc 单克隆抗体,旋转混合 2 h,加入 20 μl 蛋白 A,继续混合 12 h,离心,去上清后,用 RIPA 洗沉淀 3 遍,加入 20 μl × 2 Tricine SDS-PAGE 上样缓冲液,煮沸 5 min,稍离心后,立即进行电泳。

1.2.3　蛋白电泳　　用 10% SDS-PAGE 胶对样品进行电泳,每孔上样量 20 μl,蛋白标准品上样量为 10 μl,电泳结束后,利用考马斯亮蓝进行染色,通过 GS800 Calibrated Densitometer 扫描仪、Quantity One 4.5.0 扫描软件(Bio-Rad 公司)进行扫描获取图像。

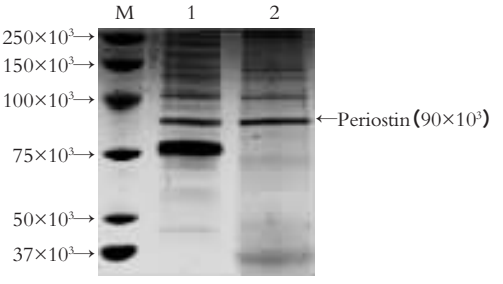
1.2.4　胶内酶解　　选择凝胶上目的蛋白斑点,切下后放入 1.5 ml 的样品管中。用 25 mmol/L 碳酸氢铵溶解乙腈配成 50% 乙腈溶液,取 100 μl 脱至无色,用 speed Vac 真空干燥后,向每只样品管中加入 25 μl 10 mmol/L DTT 溶液。于 56 ℃中反应 60 min,弃上清,向每只 EP 管中分别加入 25 μl 用 25 mmol/L 碳酸氢铵溶液配的 55 mmol/L 碘乙酰胺,室温黑暗中反应 45 min,使蛋白烷基化。弃上清后用 100 μl 25 mmol/L 碳酸氢铵溶液清洗胶条。弃去清洗液后,speed Vac 真空干燥后加入 30 μl 32.5 ng/μl 的胰蛋白酶溶液。4 ℃保持 5 min 后 37 ℃震摇 8 h。抽取上清 20 μl,以 20 000 r/min 离心 10 min 后取上清 16 μl 置于新的样品管中,加入 1 μl 10% 的甲酸溶液,振荡混匀后取 10 μl 上样分析。

1.2.5　质谱分析及质谱数据库搜寻　　HPLC-Chip-ESI/MS/MS 条件(Agilent 公司):①纳流泵:流速:0.3 μl/min,流动相:A 为 98.9% 的水 +0.1% 甲酸 +1% 乙腈,B 为 99.9% 的乙腈水 +0.1% 甲酸,梯度洗脱。②毛细管泵:流速:4 μl/min,流动相:99% 的水 +1% 乙腈。③进样量:8 μl。④质谱采集参数:Mass Range Mode:200 ~ 2 200;CapV:1 800;Ion Source Type:ESI(+);Dry Temp(set):250 ℃;DryGas(set):4.00 L/min。质谱数据用 Spectrum Mill 处理后搜索 SwissProt 数据库进行鉴定。检索物种选择 Human,消化酶选 Tryp sin,仪器选择 Agilent ESI ion trap,最大允许漏切点设为 2,母离子质量误差为 ±2.5,子离子质量误差为 ±0.7。

2　结果

2.1　免疫共沉淀结果

pCMV-Myc-SFRP2 和 pCMV-HA-Periostin 共转染 HEK293 细胞 48 h 后,提取蛋白,沉淀 SFRP2 及与其相互作用的蛋白复合物。从图 1 可以看出,利用 Myc 抗体进行免疫沉淀后可在 90×10^3 处出现 1 条明显的蛋白条带,初步判断该条带为 HA-Periostin。实验重复 3 次,结果均一致。



M:标准;1:HEK293 细胞上清液;2:SFRP2 的免疫沉淀复合物

图 1　SFRP2 免疫共沉淀复合物检测 SARP1 与 Periostin 间相互作用的 SDS-PAGE 结果

2.2　蛋白质鉴定

对图 1 中检测出的 90×10^3 处目的条带经凝胶电泳图进行扫描后,进行切割,利用 HPLC-Chip /MS 纳流液质联用技术测定酶解后的肽段的 MS/MS,原始数据经 Spectrum Mill 搜索 SwissProt 数据库,结果表明 90×10^3 处条带为 Periostin(表 1)。其蛋白测序结果报告为:蛋白匹配肽段覆盖率:9%,蛋白名称:Periostin,osteoblast specific factor,检索种类:human,检索数据库:SiwssProt,等电点:7.27,相对分子质量:90 424.9,氨基酸组成成分:A37 C11 D39 E65 F28 G66 H18 I80 K69 L87 M17 N44 P31 Q31 R35 S38 T63 V54 W3 Y20。

表 1　已鉴定肽段列表

肽段编号	电荷	得分	离子强度	覆盖率(%)	肽段序列	匹配的相对分子质量
1	3	19.73	3.37e+7	94.8	(K)VGLNELYNGQILETIGGK(Q)	1 918.028
2	2	17.00	2.51e+7	87.2	(K)LLYPADTPVGNDQLLEILNK(L)	2 226.202
3	2	15.65	8.63e+7	93.1	(K)VGLNELYNGQILETIGGK(Q)	1 918.028
4	3	14.56	2.33e+7	84.2	(K)ELLTQPGDWTLFVPTNDAFK(G)	2 292.155
5	2	13.57	1.67e+7	88.3	(K)ELLTQPGDWTLFVPTNDAFK(G)	2 292.155
6	3	12.57	4.94e+7	80.7	(K)GCPAVLPIDHVYGTLGIVGATTTQR(Y)	2 597.339

Periostin 氨基酸序列(方框代表测序后比对时匹配的氨基酸,点线、曲线、下划线为匹配程度较低的)见图 2。

3　讨论

SFRP2 在瘢痕疙瘩中高表达,其主要作用在于抑制细胞凋亡。众所周知,凋亡在创伤愈合中也具有重要作用,生理情况下细胞的增殖和凋亡保持着平衡,而

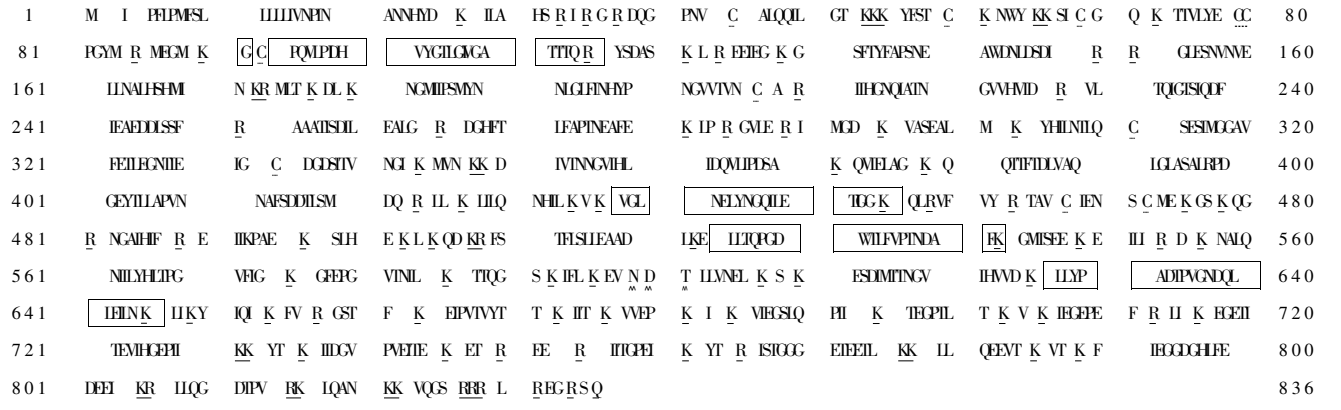


图2 Periostin 氨基酸序列图

瘢痕疙瘩中成纤维细胞的凋亡和增殖则发生了改变[3]。因此,创伤愈合过程中成纤维细胞的活化、增殖、凋亡抑制以及其分泌的胶原引起细胞外基质的大量沉积是引起瘢痕疙瘩的主要病理机制[4]。但是对于 SFRP2 如何参与瘢痕疙瘩成纤维细胞凋亡调控的信号途径,有待进一步研究。

Periostin,又名骨母细胞特异性因子 2(Osteoblast-specific factor 2,OSF-2),位于人染色体 13q13.3,全长约 3 kb,编码一个大小为 90×10^3 左右的可溶性胞浆蛋白质。该蛋白可分泌至细胞外基质中发挥作用。既往研究表明,Periostin 能够促进Ⅰ型胶原的生成,在以瘢痕疙瘩为代表的纤维化疾病中可能具有非常关键的功能,其主要原因在于:①瘢痕疙瘩与正常皮肤组织的基因芯片筛选结果中有较多数据表明基因水平上 periostin 在瘢痕疙瘩中高表达[5,6],甚至有文献表明其为瘢痕疙瘩中最显著高表达的基因(Ratio = 131.41)[7];②蛋白水平上,与正常组织相比,瘢痕疙瘩组织中 Periostin 在蛋白水平上的表达同样表现为增高[6,8];③Periostin与Ⅰ型胶原蛋白间存在相互作用,调控真皮结缔组织中胶原纤维的形成[9]。故有研究者提出periostin 在瘢痕疙瘩组织中表达增高,是瘢痕相关基因;Periostin 蛋白在瘢痕疙瘩形成中可能发挥重要作用[10]。

免疫共沉淀技术是蛋白-蛋白相互作用的重要检测方法,既往使用时往往与 Western blot 技术结合,对目的蛋白进行抗原-抗体反应检测,而结合质谱测序直接获取目的蛋白条带信息的报道则较少。本实验中对目的蛋白用 HPLC-Chip/MS 液质联用技术对酶解后的肽段的 MS/MS 进行分析,原始数据经 Spectrum Mill 搜索 SwissProt 数据库进行鉴定。我们所使用的 HPLC-Chip/MS 液质联用技术的灵敏性是正常的 LC/MS 系统的 3 500 倍,是传统的纳流 LC/MS 灵敏度的 5 倍,保证了蛋白鉴定的准确性。结果说明 SFRP2 和 Periostin 之间存在着相互作用,不过,对于免疫共沉淀和蛋白测序技术来探讨蛋白-蛋白之间的相互作用的实验体系,我们也正在做进一步优化;同时对 SFRP2 和 Periostin 之间的相互作用,以及该作用在瘢痕疙瘩发病机制中的功能,也尚需深入探索。

参考文献:

[1] Wu J, Ma B, Yi S, *et al*. Gene expression of early hypertrophic scar tissue screened by means of cDNA microarrays[J]. J Trauma, 2004, 57(6): 1276-1286.

[2] Smith J C, Boone B E, Opalenik S R, *et al*. Gene profiling of keloid fibroblasts shows altered expression in multiple fibrosis-associated pathways[J]. J Invest Dermatol, 2008, 128(5): 1298-1310.

[3] Butler P D, Longaker M T, Yang G P. Current progress in keloid research and treatment[J]. J Am Coll Surg, 2008, 206(4): 731-741.

[4] Chen W, Fu X, Sun X, *et al*. Analysis of differentially expressed genes in keloids and normal skin with cDNA microarray[J]. J Surg Res, 2003, 113(2): 208-216.

[5] Seifert O, Bayat A, Geffers R, *et al*. Identification of unique gene expression patterns within different lesional sites of keloids[J]. Wound Repair Regen, 2008, 16(2): 254-265.

[6] Naitoh M, Kubota H, Ikeda M, *et al*. Gene expression in human keloids is altered from dermal to chondrocytic and osteogenic lineage[J]. Genes Cells, 2005, 10(11): 1081-1091.

[7] 胡振富,高建华,李 薇,等. 瘢痕疙瘩的差异表达基因谱研究[J]. 南方医科大学学报, 2006, 26(3): 308-312.

[8] 王 齐,聂芳菲,赵 霞,等. periostin 在过度增生性瘢痕的表达及其与 TGF-β1 和受体的相关性[J]. 中华整形外科杂志, 2007, 23(3): 229-232.

[9] Shimazaki M, Nakamura K, Kii I, *et al*. Periostin is essential for cardiac healing after acute myocardial infarction[J]. J Exp Med, 2008, 205(2): 295-303.

[10] Norris R A, Damon B, Mironov V, *et al*. Periostin regulates collagen fibrillogenesis and the biomechanical properties of connective tissues[J]. J Cell Biochem, 2007, 101(3): 695-711.

(编辑 邓强庭)