技术与方法 文章编号：0253-3626（2011）09-1087-04

2,3,7,8- 四氯二苯二噁英诱导腭裂发生的差异蛋白筛选

刘丽玲，傅跃先，蒲亚兰，甘立强
（重庆医科大学儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室，重庆 400014）

【摘 要】目的：以蛋白质组学方法筛选 2,3,7,8-四氯二苯二噁英（2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin，TCDD）致先天性腭裂发生的差异表达蛋白。方法：以 TCDD 诱导建立胎鼠先天性腭裂模型，行腭部的大体解剖及组织学检查。取实验组和对照组胎鼠的腭组织，分别提取组织总蛋白。通过双向电泳和质谱分析，筛选出实验组和对照组腭组织的差异表达蛋白，并用免疫组化对鉴定出的相关蛋白质进行验证。结果：成功诱导胎鼠腭裂模型。筛选出 10 种差异表达的蛋白，其中 7 个蛋白点在试验组上调，3 个蛋白点在实验组下调。过氧化物还原酶 1（Peroxiredoxin 1，Prx 1）与鸟嘌呤核苷酸解离抑制剂（GDP-dissociation inhibitor，GDI）在实验组表达明显增强。结论：Prx 1、GDI 表达的明显增强可能与 TCDD 所致胎鼠先天性腭裂有关。

【关键词】2,3,7,8-四氯二苯二噁英；腭裂；蛋白质组学
【中国图书分类法分类号】R726.2 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-04-24

Screening differentially expressed proteins of cleft palates induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in mice

LIU Li-ling, FU Yue-xian, PU Ya-lan, GAN Li-qiang
(*Key Laboratory of Developmental Diseases in Childhood, Ministry of Education, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To identify the differentially expressed proteins of 2,3,7,8- tetrachloro- dibenzo-p- dioxin (2,3,7,8-TCDD) induced cleft palate by using two-dimensional gel electrophoresis(2-DE) and mass spectrometry. *Methods*: On E12, 2,3,7,8-TCDD (64 μg/kg) and corn oil(control group) were administered to time-pregnant C57BL/6J mice. Anatomical and histological changes of palates in mouse fetuses were studied on E18. Total proteins were extracted from palate tissue of fetuses from both groups. The total proteins were separated by two-dimensional gel electrophoresis. The differentially expressed proteins between the two groups were compared using image analysis software. The peptide mass fingerprintings (PMF) was acquired after matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and the proteins were identified by data searching in the Mascot database. The expression of the differential protein was confirmed by immunohistochemistry. *Results*: Incidence of cleft palate in the experimental group was 100%. Comparative analysis of 2-DE maps revealed 34 differentially expressed proteins between the two groups. Ten differential proteins were further identified by mass spectrometry, of which 7 showed significantly higher volumes in experimental group than in control group and 3 showed significantly higher volumes in control group than in experimental group. Peroxiredoxin 1 protein and guanine nucleotide dissociation inhibitors were up-regulated in experimental group. *Conclusion*: Up-regulated peroxiredoxin 1 protein and guanine nucleotide dissociation inhibitors may be associated with cleft palate in mice induced by 2,3,7,8-TCDD.

【Key words】2,3,7,8- tetrachloro- dibenzo-p-dioxin; cleft palate; proteomics

唇腭裂是儿童头面部的首发先天性畸形。目前认为，其形成是遗传与环境共同作用的结果，但其确切的原因和发病机制仍不清楚。研究发现，环境污染物 2,3,7,8-四氯二苯二噁英（2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin，TCDD）可以稳定地诱导胎鼠发生腭裂[1]。故本研究以 TCDD 诱导形成胎鼠腭裂；运用双向电泳技术，通过比较实验组与对照组胎鼠腭组织蛋白质组双向电泳图谱的差异，筛选致胎鼠先天性腭裂发生的差异表达蛋白，进而从蛋白质层面揭示 TCDD 引起腭裂发生的相关机制，为临床上建立全新的诊断、检测、治疗腭裂及其疗效评估指标体系奠定实验基础。

作者介绍：刘丽玲（1984-），女，硕士，
研究方向：腭裂的发病机制。
通信作者：傅跃先，男，教授，Email：yuexianfu@163.com。
基金项目：重庆市自然科学基金重点资助项目（编号：CSTC,20106BB5299）。

白质机制的深入研究鲜有报道。

本研究利用蛋白质组学技术筛选了 TCDD 诱导的腭裂与正常腭组织中 10 种差异蛋白质。

Prx 1 是 Prxs 家族的成员，Prxs 是一类抗氧化物。Prx 1 除具有抗氧化作用以外，还有刺激上皮细胞增殖、抑制细胞凋亡、参与细胞信号传导等[5]多种功能。急性毒性实验证明，二噁英能引起实验动物氧化应急变化[6]。也有研究[7]发现，TCDD 的胚胎毒性与其引起的氧化应急有关。在 TCDD 诱导胎鼠先天性肾积水的研究中发现[8]，TCDD 引起胎鼠氧化应急，使 Prx 1 反应性增高以对抗氧化应急，同时刺激输尿管黏膜上皮增值，使输尿管不完全梗阻导致肾盂积水。TCDD 通过对腭中嵴上皮细胞的毒性影响，导致腭裂发生[9,10]。本实验发现，Prx 1 在实验组的表达较对照组明显增强。因 Prx 1 具有抗氧化及抑制细胞凋亡的作用，故推测，TCDD 通过诱导胎鼠的氧化应急，使 Prx 1 过度表达以对抗氧化应急反应，促使腭突中线上皮细胞（Medial edge epithelia，MEE）的凋亡被抑制，导致侧腭突的正常发育及相互融合障碍，最终导致胎鼠腭裂的发生。

Rho GTP 酶家族是 Ras 超家族的成员，其主要功能是调节细胞骨架结构，参与细胞的收缩、运动、增殖、凋亡等过程[11]。Rho GTP 酶的活性主要受鸟嘌呤核苷酸交换因子、GTPase 活化蛋白及 GDI 调节。GDI 负性调节 Rho GTP 酶活性。Rho 蛋白家族参与调节肌动蛋白细胞骨架的聚合、解聚和重新组装，在细胞的运动中起重要作用。本研究实验组 GDI 表达量增加。推测，可能因 GDI 的过表达抑制了 Rho GTP 酶的活性，肌动蛋白细胞骨架的调节作用减弱，进而影响胎鼠上腭细胞的运动及迁移，使双侧腭突生长及融合障碍。

半乳凝素 7（Galectin-7）是 β-半乳糖苷结合蛋白，一个重要生物学作用是调节细胞的凋亡。Kuwabara 等[12]研究认为，通过激活 c-jun N 端激酶位点的半乳凝素 7 也是凋亡信号通路的共同点。因此，半乳凝素 7 高表达，应促使 MEE 凋亡和腭突融合。然本实验中该蛋白的高表达与腭突的发育结果不符合，此现象有待进一步研究。

而磷酸丙糖异构酶、3-磷酸甘油醛脱氢酶及 ATP 合成酶在实验组的高表达，磷酸甘油酸激酶及苹果酸脱氢酶在实验组的低表达，则提示 TCDD 的毒性作用使胎鼠的能量代谢相关酶物质发生了紊乱，这是否也与腭裂的发生有关，尚需进一步研究。

据本研究结果推测，Prx 1 的过度表达抑制了 MEE 的凋亡，GDI 的过表达抑制了 Rho GTP 酶的活性，使肌动蛋白细胞骨架的调节作用减弱，二者的共同作用导致了胎鼠腭裂的发生。此外，TCDD 的毒性作用使胎鼠的能量代谢相关酶物质发生紊乱，是否也与 TCDD 导致腭裂有关，尚需进一步的研究。

参 考 文 献

[1] Fujiwara K, Yamada T, Mishima K, et al. Morphological and immunohisto-chemical studies on cleft palates induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in mice[J]. Congenit Anom (Kyoto), 2008, 48(2): 68-73.

[2] Gan L Q, Fu Y X, Liu X, et al. Transforming growth factor-β3 expression up-regulates on cleft palates induced by 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin in mice[J]. Toxicology and Industrial Health, 2009, 25(7): 473-478.

[3] Dolinoy D C, Jirtle R L. Environmental epigenomics in human health and disease[J]. Environ Mol Mutagen, 2008, 49(1): 4-8.

[4] Takagi T N, Matsui K A, Yamashita K, et al. Pathogenesis of cleft palate in mouse embryos exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin[J]. Teratog Carcinog Mutagen, 2000, 20(2): 73-86.

[5] Immenschuh S, Baumgart-Vogt E. Peroxiredoxins, oxidative stress, and cell proliferation[J]. Antioxid Redox Signal, 2005, 7(5-6): 768-777.

[6] 汤乃军，刘云儒，任大林. 2,3,7,8 一四氯二苯并二恶英对 SD 大鼠肝脏 SOD、GST、MDA 影响的实验研究[J]. 中国工业医学杂志，2003，16(2)：335-337.

[7] Hilscherova K, Blankenship A L, Nie M, et al. Oxidative stress in liver and brain of the hatchling chicken (Gallus domesticus) following in ovo injection with TCDD[J]. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2003, 136(1): 29-45.

[8] 刘明学，魏光辉，刘 靖，等. 2,3,7,8-TCDD 所致胎鼠肾积水发生机制的研究[J]. 中华小儿外科杂志，2009，30(4)：253-256.

[9] Ahmed S, Liu C C, Nawshad A. Mechanisms of palatal epithelial seam disintegration by transforming growth factor (TGF) beta3[J]. Dev Biol, 2007, 309(2): 193-207.

[10] Nogai H, Rosowski M, Grün J, et al. Follistatin antagonizes transforming growth factor-beta3-induced epithelial-mesenchymal transition in vitro: implications for murine palatal development supported by microarray analysis[J]. Differentiation, 2008, 76(4): 404-416.

[11] Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks[J]. Genes Dev, 1997, 11: 2295-2322.

[12] Kuwabara I, Kuwabara Y, Yang R Y, et al. Galectin-7 (PIG1) exhibits proapoptotic function through JNK activation and mitochondrial cytochrome c release[J]. J Biol Chem, 2002, 277(5): 3487-3497.

（责任编辑：冉明会）