技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)03-0385-04

人表皮光老化相关蛋白的蛋白质组分析与鉴定

李文静,李 惠,黄 欣,陈爱军,龙 亭
(重庆医科大学附属第一医院皮肤科 重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心,重庆 400016)

【摘 要】目的:以老年人正常皮肤为研究对象,分析曝光部位及非曝光部位的表皮差异蛋白,筛选出表皮细胞中与皮肤光化相关的蛋白。方法:从分离所得的不同部位老年人表皮中提取蛋白质,并进行 2-DE 分离,PDQUEST 软件分析凝胶上差异蛋白点,进一步采用 MALDI-TOF 质谱分析及数据库查询,鉴定差异表达蛋白;并在蛋白质水平进行 Western-blotting 验证差异候选蛋白。结果:通过分析比较两组表皮双向电泳图谱,确定了 15 个差异蛋白点,经 MALDI-TOF 分析及数据库查询,成功鉴定了其中 5 个差异表达蛋白,发现热休克蛋白 B1(Heat shock protein B1,HSPB1)、膜联蛋白 A2(Annexin A2,ANXA2)、角蛋白 80(Keratin, type Ⅱ cytoskeletal 80,K2C80)、丝裂原激活的蛋白激酶 3(Mitogen- activated protein kinase 3,MK03)在老年人曝光部位的表皮中高表达,而谷胱甘肽 S 转移酶 A2(Glutathione S-transferase A2,GSTA2)在非曝光部位表皮中高表达。结论:老年人正常皮肤曝光部位和非曝光部位的表皮存在差异蛋白,经分析和鉴定的 5 种蛋白质与皮肤的光老化有密切的关系,为进一步研究表皮细胞在光老化过程中的作用及分子机制奠定基础。

【关键词】光老化;表皮;蛋白质组
【中国图书分类法分类号】R758.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-10-27

Analysis and identification of human epidermal proteins associated with photoaging

LI Wen-jing, et al
(*Department of Dermatology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: This study is to analyze the differential proteins expressed in the normal elderly exposed epidermis and the non-exposed epidermis. *Methods*: The proteins were extracted from the exposed and non-exposed elderly separated epidermis, and were submitted to two-dimensional gel electrophoresis. Then their electrophoretic patterns were analyzed by the PDQUEST software and identified by MALDI-TOF MS. The following steps were database query and probation using Western-blotting. *Results*: By comparison the two groups of two-dimensional electrophoresis patterns, 15 differential protein spots were determined, in which 5 differential protein spots were successfully identified by MALDI-TOF analysis and database queries, and 4 proteins, Heat shock protein B1 (HSPB1), Annexin A2 (ANXA2), Keratin, type Ⅱ cytoskeletal 80 (K2C80), Mitogen- activated protein kinase 3 (MK03), were highly expressed in exposed group while Glutathione S-transferase A2 (GSTA2) was highly expressed in non-exposed group. *Conclusion*: The changes in expression of 5 identified proteins may have a close relationship with photoaging, that helps revealing molecular mechanism of epidermal cells in photoaging.

【Key words】Photoaging; Epidermis; Proteome

作者介绍:李文静(1983-),女,硕士,
研究方向:皮肤老化。
通讯作者:陈爱军,男,副教授,E-mail:cajhx@yahoo.com.cn。

基金项目:中华医学会-欧莱雅中国人健康皮肤/毛发研究项目(编号:S 2008050627);重庆医科大学优秀博士生学位论文科研资助;重庆医科大学校级课题资助(编号:0200101008)。

245-247.

[2] Hwang S J, Chung J P, Kim Y G, et al. Usefulness of urinary trypsinogen-2 dipstick test for diagnosis of acute pancreatitis[J]. Korean J Gastroenterol, 2004, 43(6): 364.

[3] Sankaralingam S, Wesen C, Barawi M, et al Use of the urinary trypsinogen-2 dip stick test in early diagnosis of pancreatitis after endoscopic retrograde cholangiopancreatography[J]. Surgical Endoscopy, 2007, 21(8): 1312-1315.

[4] 周铁成,杨小云,秦 庆,等. 尿胰蛋白酶原-2 对诊断急性胰腺炎的临床应用[J]. 现代检验医学杂志,2009,24(2):119-121.

[5] 赵福兵,杨晓玲. 尿胰蛋白酶原-2 快速检测在急性胰腺炎诊断中的临床应用[J]. 现代医药卫生,2007,23(20):3106-3106.

[6] Jordanov P M D, Grigorov G M D, Todorova S M D, et al. Application of an express urinary trypsinogen-2 test for the diagnosis of Acute pancreatitis [J]. Point of care: the journal of near-patient testing & technology, 2009, 8 (1): 21-24.

[7] Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspension[J]. Nature Phy Sci, 1973, 241: 20-22.

(责任编辑:冉明会)

现代医学不仅要防病治病,而且越来越重视衰老问题的研究。皮肤的衰老不仅影响皮肤的美观,而且带来各种皮肤疾患如各种皮肤良、恶性肿瘤等。

皮肤老化包括以年龄为主引起的自然老化及紫外光照射为主导致的光老化。表皮是皮肤的最外层,作为皮肤的屏障,承受着各种物理性损伤及化学性刺激,抵御微生物的入侵,保护着营养物质、电解质、水分的丢失,老化的皮肤含水量降低,脱屑、色素沉着、基底细胞癌等各种皮肤肿瘤均是角质形成细胞受损的表现。Chouinard 等[1]发现紫外线照射导致角质形成细胞结构的不稳定,中间丝的聚集,桥粒结构的断裂以及基底层中线粒体的肿大,并使细胞的分化、增殖能力降低。本文将通过比较老年人曝光部位与非曝光部位皮肤表皮细胞在自然成长过程中的差异表达蛋白,筛选出表皮细胞中与皮肤光老化相关蛋白,为进一步研究皮肤光老化的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究材料 2007 年 1 月至 2008 年 12 月期间收集来自重庆医科大学附属第一医院皮肤科、骨外科、整形外科、泌尿外科手术切除的老年人的正常皮肤标本, 年龄 >65 岁,曝光部位(面部、手背部)及非曝光部位(臀部、会阴部)各 34 例,液氮保存。

1.1.2 主要试剂和仪器 试剂 30%聚丙烯酰胺溶液、两性电解质(40%Bio-Lyte)、尿素、甘氨酸(Glycine)、17 cm pH 3 ~ 10 固相 pH 梯度(Immobiline pH gradient, IPG) 胶条、3-[3-(胆酰胺基丙基) 二甲氨基] 丙磺酸盐 (3-[(3-cholamidopropyl) dimethylamonio]-1-propane sulphonate,CHARPS)、二硫苏糖醇(Dithiothreitol,DTT)、甲叉双丙烯酰胺均购自 Bio- Rad 公司。Dispase Ⅱ、蛋白酶抑制剂、蛋白浓度测定试剂盒均购自 Roche 公司,胰酶、乙腈、三氟乙酸购自生工公司,ECL 显色试剂盒购自碧云天公司,anti-HSPB1,anti-ANXA2,anti-actin,羊 anti-rabbitIgG 购自博奥森公司。

仪器 超速低温冷冻离心机为日本日立公司产品、一向等电聚焦仪 Ettan IPGphor Ⅲ 购自通用公司,二向 DYY-12 型垂直电泳仪为北京六一仪器厂产品, GS800 密度扫描仪、PDQUEST 7.4 图像分析软件均购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 表皮和真皮的分离,蛋白质的提取及蛋白浓度测定 取液氮保存的皮肤标本,37℃水浴 30 min 快速复温, 尽量剪去脂肪组织,PBS 洗 3 次后将皮肤剪成 5 mm × 5 mm 大小皮片, 按 1:4 体积置入 0.125%的 Dispase Ⅱ 中 37℃消化 1 h,分离表皮。将分离好的表皮用去离子水洗 3 次后切成肉蓉状,加 1 ml 裂解液冰上匀浆 1 h 至溶液成半透明。4℃离心(12 000 g,45 min),吸取上清液,采用 Bradford 法测定蛋白浓度,-80℃保存。

1.2.2 双向凝胶电泳

1.2.2.1 等电聚焦 取 -20℃保存的 IPG 预制胶条, 室温放置 10 min 后线性加入 350 μl 样品,矿物油覆盖。被动水化 12 ~ 16 h,聚焦:除盐 250 V 30 min;1 000 V 1 h,升压 10 000 V 5 h,聚焦 10 000 V,总电压时间为 60 000 (V·h)。

1.2.2.2 SDS-PAGE 聚焦好的 IPG 胶条置平衡液中于摇床上平衡好后进行第二向垂直电泳。12%胶浓度,5 mA/gel 电泳 1 h,30 mA/gel 电泳 6 h,至溴酚蓝线接近凝胶底线。

1.2.2.3 染色 凝胶于固定液中固定过夜,经水洗、敏化、水洗后,银染 30 min,去离子水洗 3 次,每次 5 min,显色至蛋白点清晰后立即终止。1%的醋酸溶液 4℃保存。

1.2.2.4 图像分析 染色后凝胶由 GS800 扫描图像,分离所得蛋白质点由 PDQUEST 软件进行分析。

1.2.3 差异候选蛋白的 MALDI-TOF 鉴定

1.2.3.1 胶内原位酶切及质谱分析 方法参照文献[2]:切取凝胶上的差异蛋白点, 水洗后用 50 μl 30 mmol/L K3Fe(CN) 6/100 mmol/L 硫代硫酸钠脱色。经吸胀、脱水、冷冻真空干燥后,每个蛋白质点中加胰酶工作液 20 μl,4℃冰浴中吸胀 1 h。弃去多余的酶工作液并加覆盖液,37℃水浴中酶解过夜。萃取 2 次,用 ZipTipC18 枪头纯化后送交质谱室。

1.2.3.2 数据库查询 用蛋白质数据库 MASCOT Peptide Mass Fingerprint 进行查询。查询条件:Database:SWISSPORT; Toxonpmy:Homo sapiens(human);Enzyme:Trypsin;Fixed modifications:Carbamidomethyl (C); Variable modifications:Oxidation(M); Peptide Tolerance:1.2Da。

1.2.4 蛋白质水平的验证 蛋白质免疫印迹技术(Western-blotting) 验证差异候选蛋白。将两组表皮蛋白样品取等量加入上样孔,以 β-actin 作为内参,经电泳、转膜、抗原抗体结合反应、发光等步骤验证 HSPB1、ANXA2 的表达。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 16.0 统计分析软件,两组比较采用 t 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 2 组表皮蛋白质 2-DE 分离结果

经计算机分析后,2 组双向电泳图谱重复率高, 重复性分别达到 84.5%(曝光组)和 83.4%(非曝光组)。如图 1、图 2 所示, 蛋白质斑点分子量在 10 ~ 100 kD,pI3 ~ 10,经 PDQUEST 7.4 软件分析后, 曝光组表皮蛋白质点数为 365 ± 17,非曝光组表皮蛋白质点数为 359 ± 15,比较两组图谱共确定差异点 15 个,其中 9 个蛋白点在曝光组中高表达,6 个蛋白点在非曝光组中高表达。取其中差异明显的 10 个点进行质谱分析。

2.2 MALDI-TOF/MS 分析及数据库查询

见图 1。

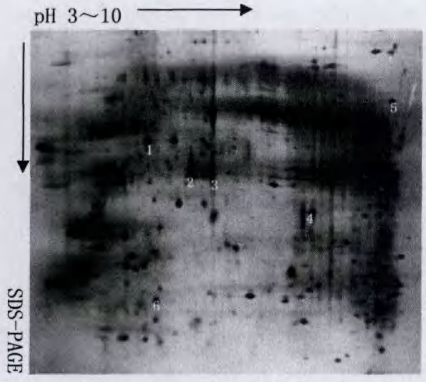


图 1 曝光组表皮双向电泳图谱

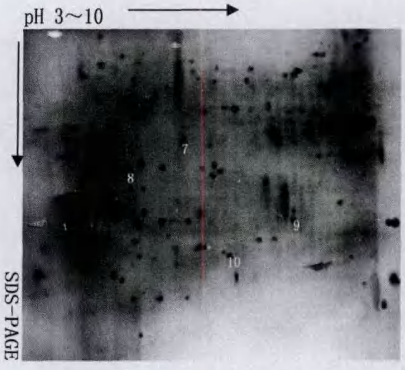


图 2 非曝光组表皮双向电泳图谱

表 1 差异候选蛋白 MALDI-TOF 质谱分析后数据库查询结果

Spot	得分	覆盖率	登录号	简称	蛋白名称	pI	分子量
1	161	0.39	Q6KB66	K2C80	Keratin, type Ⅱ cytoskeletal 80	5.58	51 007
2	75	0.18	P27361	MK03	Mitogen-activated protein kinase 3	6.28	43 450
4	162	0.49	-	ANXA2	Annexin A2	7.57	38 808
6	105	0.33	P04792	HSPB1	Heat shock protein beta-1	5.98	22 826
9	21	0.15	-	GSTA2	Glutathione S-transferase A2	8.51	25 648



图 3 HSPB1 的表达情况

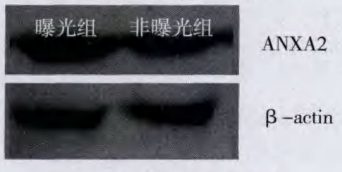


图 4 ANXA2 的表达情况

2.3 差异候选蛋白的验证结果

经 SPSS 16.0 软件分析，两组图谱（如图 3、图 4 所示）条带灰度比值差异均具有统计学意义（$P<0.01$），HSPB1 与 ANXA2 均在曝光组中表达明显升高，与双向电泳图谱分析结果一致。

3 讨 论

经紫外线照射的培养的角质形成细胞和未经紫外线照射的培养的角质形成细胞的双向电泳虽有报道[3]，但紫外线的种类及其照射时间、方式、剂量均与真实紫外线曝露环境有很大的差别，且未涉及到紫外线之外的各种环境因素对表皮的影响，研究表皮的光老化有一定的局限性。本文采用蛋白质组学技术，首次以老年人曝光部位表皮和非曝光部位表皮为光老化的研究模型，进行了比较蛋白质组学的分析，并选择差异较大的 10 个蛋白点进行质谱分析并经数据库查询以及免疫印迹技术验证后，成功鉴定了 5 个候选蛋白。其中，热休克蛋白 B1（HSPB1）、膜联蛋白 A2（ANXA2）、角蛋白 80（K2C80）、丝裂原激活的蛋白激酶 3（MK03）在老年人曝光部位的表皮中高表达，而谷胱甘肽 S 转移酶 A2（GSTA2）在非曝光部位表皮中高表达。并通过 Western-blotting 验证了 HSPB1 与 ANXA2 表达结果与双向电泳图谱结果的一致性，除新检测出的 K2C80 外，其余 4 种蛋白表达的变化根据文献报道均与紫外线照射有直接或间接的关系。

热休克蛋白表达的增加能抑制紫外线诱导的细胞凋亡和皮肤炎症反应。紫外线辐射通过多条信号传导途径和热休克转录因子诱导皮肤热休克蛋白基因的表达，也可通过热休克蛋白磷酸化、转位以发挥其适应性保护功能。热休克蛋白 B1，又名热休克蛋白 27（Heat shock protein 27，HSP27），其在曝光部位表皮中的高表达与其在紫外线照射环境中的适应性保护过程有关。Bayerl 等[4]把紫外线照射过的人皮肤与正常皮肤作对比，发现 HSP27 在紫外线照射过的人表皮中表达明显升高。Boxman 等[5]的研究证实紫外线照射后细胞核内 HSP27 重新装配，因此 HSP27 可以作为表皮应激损伤的敏感指标。Becker 等[6]用 cDNA 芯片结合 Northern 印迹检测到角质形成细胞经 UVB 辐射后，HSP27mRNA 表达增加，在 UVB 诱导的角质形成细胞凋亡中起重要保护作用。以上研究均证明，紫外线照射引起的应激导致了 HSP27 的过量表达，与我们的研究结果一致。因此，这一过程作为表皮细胞的自我保护机制，与皮肤光老化有着密切的关系。

GSTA2 在曝光部位皮肤的表达量较低，可能与老化的表皮自我保护能力的降低、氧化和抗氧化的失衡密切相关。导致皮肤老化的一个重要原因是活性氧的作用，UVB 照射可导致角质形成细胞产生大量的活性氧及自由基，损伤细胞的多

种成分,引起细胞的凋亡、皮肤肿瘤的产生。有较多研究资料表明,GST(Glutathione S-transferase)可以抑制皮肤炎性反应、减少多种皮肤肿瘤的产生。在氧化应激和衰老相关的病理条件下,谷胱甘肽转移酶通过降低脂质过氧化过程中 4-羟基烃烯醛的生成抑制细胞的凋亡[7,8]。UVB 照射在导致角质形成细胞产生大量的活性氧及自由基的同时,谷胱甘肽过氧化物酶、血红素加氧酶,GST 等抗氧化物的 mRNA 表达增加,GSTA1-2mRNA 在未分化的角质形成细胞中更为显著[9]。总之,GSTA2 表达的降低与以紫外线为主的光老化的关系有待进一步研究。

目前关于 K2C80 的报道罕见。表皮细胞不同的分化阶段表达不同的角蛋白[10,11],可以作为 KC 细胞分化的标志。Sano 等[12]用低剂量紫外线照射小鼠,发现角蛋白 K6、K16 在长期的紫外线照射中呈持续高表达,使角蛋白的组成及超微结构发生变化,可能参与了皮肤皱纹的形成,与皮肤的光老化有关。这一研究充分表明紫外线照射可以起角蛋白组成的变化。我们检测到的 K2C80 又称角蛋白 Kb20、K80 或 KRT80,极有可能与皮肤在长期的以紫外线照射为主要刺激因素的外界环境或与自然老化的相互作用而导致基因的激活、蛋白的特异性表达有关,有待进一步证实。

本文检测出来的 4 种表皮差异蛋白 HSPB1、GSTA2、MAPK、Annexin Ⅱ, 据文献报道均通过各种途径维持细胞的正常功能,抑制炎症反应及细胞的凋亡,与皮肤光老化有着直接或间接的关系。K2C80 作为本研究新检测出来的差异表达蛋白,可能在光老化过程中起重要作用。这 5 种蛋白均有可能成为皮肤老化的关键蛋白,但其在多大程度上参与了皮肤光老化过程仍需进一步研究。本课题首次建立了人表皮组织的双向电泳技术,获得了清晰、重复性高的双向电泳图谱,并鉴定出了 5 种可能成为皮肤光老化的标志性蛋白,从蛋白质整体水平上探讨了表皮光老化的分子机制,为寻找与皮肤光老化相关的特异性生物效应指标提供了线索,为指导皮肤美容奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Chouinard N, Therrien J P, Mitchell D L, et al. Repeated exposures of human skin equivalent to low doses of ultraviolet-B radiation lead to changes in cellular functions and accumulation of cyclobutane pyrimidine dimers[J]. Biochem Cell Biol, 2001, 79(4): 507-515.

[2] 李 杰,唐 伟,唐亚雄.双向电泳分析精索静脉曲张不育患者精浆蛋白质的表达差异[J].重庆医科大学学报,2009,34(4):442-446.

[3] 陈 斌,毕志刚.中波紫外线辐射前后角质形成细胞蛋白质组双向电泳图谱的差异分析[J].临床皮肤科杂志,2006,35(4):199-202.

[4] C Bayerl, J Lauk, I Moll, et al. Immunohistochemical characterization of HSP, alpha-MSH, Merkel cells and neuronal markers in acute UV dermatitis and acute contact dermatitis in vivo[J]. Inflammation Research, 1997, 46(10): 409-411.

[5] Boxman IL, Kempenaar J, de Haas E, et al. Induction of HSP27 nuclear immunoreactivity during stress is modulated by vitamin C[J]. Exp Dermatol, 2002, 11(6): 509-517.

[6] Becker B, Vogt T, Landthaler M. Detection of differentially regulated genes in keratinocytes by cDNA array hybridization: Hsp27 and other novel players in response to artificial ultraviolet radiation[J]. J Invest Dermatol, 2001, 116(6): 983 - 988.

[7] Yang Y, Sharma R, Sharma A, et al. Lipid peroxidation and cell cycle signaling: 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress mediated signaling [J]. Acta Biochim Pol, 2003, 50(2): 319-336.

[8] Engle M R, Singh S P, Czernik P J, et al. Physiological role of mGSTA4-4, a glutathione S-transferase metabolizing 4-hydroxynonenal: generation and analysis of mGsta4 null mouse[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2004, 194(3): 296-308.

[9] Black A T, Gray J P, Shakarjian M P, et al. Distinct effects of ultraviolet B light on antioxidant expression in undifferentiated and differentiated mouse keratinocytes[J]. Carcinogenesis, 2008, 29(1): 219-225.

[10] Michel M, Torok N, Godbout MJ, et al. Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: Keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage[J]. Cell Sci, 1996, 109(5): 1017-1028.

[11] Michel M, L'Heureux N, Auger FA, et al. From newborn to adult: phenotypic and functional properties of skin equivalent and human skin as a function of donor age[J]. J Cellular Physiol, 1997, 171(1): 179-189.

[12] Sano T, Kume T, Fujimura T, et al. Long-term alteration in the expression of keratins 6 and 16 in the epidermis of mice after chronic UVB exposure[J]. Arch Dermatol Res, 2009, 301(3): 227-237.

(责任编辑:关蕴良)

欢迎投稿,欢迎订阅

《重庆医科大学学报》

邮发代号 78-132