DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.24.001
第25卷第24期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 24
2003年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2003

文章编号:1000-5404(2003)24-2157-04

论著

γ射线照射前后IEC-6细胞蛋白质组的差异分析

章 波,粟永萍,艾国平,刘晓宏,魏永江,王锋超,程天民 (第三军医大学预防医学院防原医学教研室、全军复合伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 分析γ射线照射后肠上皮细胞系(IEC-6)细胞蛋白质组的改变。方法 分别提取正常IEC-6细胞和经过25 Gy照射后细胞的蛋白样品,采用固相pH梯度双向凝胶电泳技术进行分离,考马斯亮蓝染色后经PDQuest软件分析双向电泳图谱,对部分差异的蛋白点进行胶内酶切、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)测定其肽质量指纹图谱,在网上检索数据库鉴定差异蛋白,并采用RT-PCR间接证实其变化。结果 获得了较好的双向电泳图谱。图像分析显示:在正常IEC-6细胞中检测到(608±39)个蛋白质点,细胞照射后的样品中检测到(595±31)个蛋白质点,其中匹配的蛋白点为396个。对表达差异的16个蛋白质点进行肽质量指纹图谱分析,经数据库检索后初步鉴定为一些与代谢、自由基清除、细胞骨架相关的蛋白。RT-PCR证实了ERP29基因在照射后增强。结论 电离辐射可以诱导IEC-6细胞蛋白质组发生改变。

关键词:电离辐射;肠上皮细胞;双向电泳;肽质量指纹图谱分析
中图法分类号:R394.3;Q345 文献标识码:A

Differential proteomic analysis of intestinal epithelium cell line before and after irradiation by gamma-ray

ZHANG Bo, SU Yong-ping, AI Guo-ping, LIU Xiao-hong, WEI Yong-jiang, WANG Feng-chao, CHENG Tian-min (Research Institute of Combined Injury of PLA, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To identify the proteins associated with ionizing irradiation of intestinal epithelium cell line (IEC-6), and to elucidate the molecular mechanism of reconstruction of intestinal epithelium damaged by ionizing irradiation. Methods Protein samples extracted from normal IEC-6 cells and ICE-6 cells irradiated by γ-ray at the dose of 25 Gy were separated by immobilized pH gradient two-dimensional (2-D) gel electrophoresis. After Coomasie blue staining, the 2-D electrophoretogram was analyzed using PDQuest software. The differential proteins were cut off from the Coomasie-blue stained gel and digested in gel with trypsin, and then identified by peptide mass fingerprinting based on matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and database searching. Total RNA of IEC-6 cells was isolated and RT-PCR analysis was performed using primers of ERP29 and GAPDH. Results After Coomasie blue staining, the 2-DE image analysis by PDQuest software detected (608±39) spots in normal IEC-6 cell sample and (595±31) spots in irradiated cells, of which 396 spots were matched. Sixteen differential spots were cut off from the Coomasie blue stained gel, and 11 spots were preliminarily identified. These proteins were associated with cell metabolism, cytoskeleton, and free radical elimination, *etc*. Ionizing radiation induced mRNA of ERP29 in a time-dependent manner over a 48-h period. Conclusion γ-ray irradiation can induce changes of the protein expression pattern of intestinal epithelium cell line. This helps to understand the molecular mechanisms of ionizing radiation on intestinal epithelium cells.

Key words: ionizing irradiation; intestinal epithelial cells; 2-D electrophoresis; peptide mass fingerprinting analysis

随着人类基因组计划研究重点由结构基因组转向功能基因组,生命科学开始走向后基因组时代。蛋白质组学在此背景下产生,它大规模研究蛋白质在表达水平、翻译后修饰和蛋白质与蛋白质相互作用[1]。比较不同生理、病理条件下细胞蛋白质组表达水平的差异,可以寻找疾病相关的分子标志,进而可以分析其发

基金项目:国家自然科学基金资助重点项目(30230360,39970232)
Supported by the Key Program of the National Natural Science Foundation of China(30230360, 39970232)
作者简介:章 波(1972-),男,重庆市人,博士研究生,助教,主要从事放射医学与防护方面的研究。电话:(023)68753670
通信作者:粟永萍,电话:(023)68752009
收稿日期:2003-02-24;修回日期:2003-05-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

生、发展的可能机制。因而,这种差异比较方法对于众多的疾病研究来说有重要意义。目前,蛋白质组学的主要技术包括:双向电泳、质谱技术、蛋白质芯片技术和酵母双杂交技术等。而双向电泳技术是目前蛋白质组学中进行定量和定性分析的重要技术。对双向电泳凝胶上蛋白点的鉴定是蛋白质组研究的主要限制,鉴定的方法有氨基酸序列测定、组成分析、肽序列标签测定和肽质量指纹谱分析等[2]。目前,肽质量指纹谱是主要采用的鉴定方法,它的主要特点是价格便宜、方法简便。

肠上皮细胞对辐射敏感,是腹腔恶性肿瘤进行放疗的主要效应细胞之一。在大剂量照射所引起的肠型放射病中,肠上皮广泛脱落坏死,形成放射性肠道综合征。在一定的剂量范围照射下,小肠上皮具有较强的再生能力[3]。我们以往的研究在基因水平证实:电离辐射可以诱导肠上皮细胞的基因表达改变[4]。IEC-6细胞系来源大鼠胎儿空肠的上皮细胞[5],可以用此细胞系模拟动物受到电离辐射的肠道损伤。本研究采用双向电泳技术比较了IEC-6细胞在照射后蛋白质组表达的改变,并对部分差异的蛋白点进行了鉴定。这为辐射相关蛋白和分子标记物的研究提供依据,为进一步研究辐射损伤机制奠定了分子生物学基础。

1 材料与方法

1.1 材料

IEC-6细胞系来源于大鼠空肠上皮细胞,本室引自美国ATCC并成功传代培养、保存。小牛血清、DMEM培养基为Gibico BRL产品;IPG strip(pH 3~10,18 cm)、IPG buffer为Amersham Pharmacia产品;DTT、碘乙酰胺、PMSF、考马斯亮蓝R-250为Acros产品;CHAPS、尿素、三氟乙酸、丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、Tris、胰蛋白酶(测序级)为Sigma产品;RT-PCR试剂盒为Takara公司产品。

1.2 细胞培养及照射条件

培养液组成:DMEM、10%小牛血清、100 U/ml青霉素、50 μg/ml链霉素,3.7 g/L $NaHCO_3$,于37℃、10% CO_2条件下培养。取对数生长的细胞,采用^{60}Co-γ射线照射,照射剂量为25 Gy,剂量率2.08 Gy/min。照射至一半剂量时,将培养瓶旋转180°,继续照射。照射后换液,继续培养24 h。以未照射的正常细胞为对照。

1.3 蛋白质样品的制备

用胰酶消化处于对数生长期的未照射细胞和照射后24 h细胞,生理盐水洗涤3次(1 000 r/min离心5 min)。收集的细胞加入适量的裂解液(7 mol/L尿素,2 mol/L硫尿,2% CHAPS,65 mmol/L DTT,0.5% IPG buffer,蛋白酶抑制剂),超声破碎,14 000 r/min离心20 min。Bradford法测定上清液蛋白浓度,分装,-70℃保存备用。

1.4 双向电泳及图像分析

采用安发玛西亚公司的2-DE电泳系统,参照文献[6]和安发玛西亚公司的操作指南进行。上样量为1 mg蛋白,等电聚焦的总电压时间积为45 000 Vh;第二向聚丙烯酰胺凝电泳胶浓度为13%。采用Gel Doc 2000(Bio-Rad公司)成像系统,所得图像采用PD Quest分析软件(Bio-Rad公司)进行处理并比较差异蛋白质点。

1.5 肽质量指纹谱鉴定差异蛋白质点

选取差异的蛋白点,在图谱上做好标记,并从凝胶上准确切割下蛋白点。质谱样品的制备参照文献[7],样品送至国家生物医学分析中心测定肽质量指纹图,并进行数据库检索。检索程序为PepIdent(HTTP://www.expasy.ch/tools/peptident.html)和MS-Fit(HTTP://prospector.ucsf.edu/htmlucsf3.0/msfit.html)。查询条件:肽片段质量控制范围:800~4 000,表观等电点误差范围pH±1.0,肽片段分子量最大误差控制为±0.2相对分子质量,酶解不完全数目选择1个,物种选择为大鼠。

1.6 RT-PCR证实ERP29表达的变化

参照公司试剂说明书进行RNA提取,并经过电泳确定RNA质量。ERP29上游引物为5′-CCATCTCCCGCTCCCACAAT-3′,下游引物为5′-CCCGCCCTCAGCAAACCCT-3′。产物大小为846 bp。以β-actin为内参照,其引物为:5′-TAAAGACCTCTAT-GCCAACACAGT-3′和5′-CACGATGGAGGGGCCGGACTCATC-3′,扩增产物为241 bp。逆转录反应:50℃,30 min;PCR反应条件:94℃变性30 s,58℃退火45 s,72℃延伸2 min,共28次循环。在PCR反应中同时加入2对引物,反应完成后1.5%琼脂糖电泳,Gel Doc 2000凝胶成像系统分析。

1.7 统计学分析

实验结果以$\bar{x}\pm s$表示,电泳图谱的相关系数由PD Quest分析软件完成。

2 结果

2.1 双向电泳

按照1.4中方法进行双向电泳,取得了较为满意的结果,见图1。电泳图像经过PD Quest处理后,结果表明:在正常IEC-6细胞中检测到(608±39)个蛋白点,细胞照射后的样品中检测到(595±31)个蛋白点,其中匹配的蛋白点为396个,电泳图谱的相关系数为0.78。我们选择了一些差异的蛋白点进行肽质量指纹图谱鉴定。

2.2 差异蛋白质点的肽质量指纹分析

在未匹配的蛋白点中选择清晰、较浓的点做好标记,从凝胶上准确切割后进行脱色、酶解、肽片段的提取,并测定肽质量指纹图谱。图2为正常ICE-6细胞的IEC-N1的肽质量指纹图。根据图中的数据检索结果,再结合双向电泳中蛋白点的表观分子量、等电点进行综合分析,结果见表1。我们共对16个蛋白点进行了肽质量指纹图谱分析,其中11个蛋白点得到相应的蛋白质,这包括一些与代谢、自由基清除、细胞骨架相关的蛋白,结果见表1。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

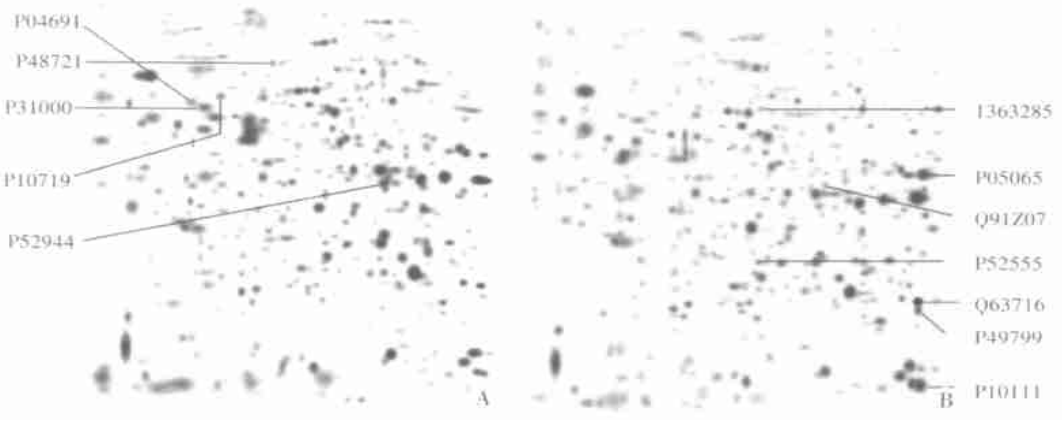


图 1　未照射 IEC-6 细胞(A)和电离辐射后 IEC-6 细胞(B)双向电泳图谱

Fig 1　Two dimensional electrophoretic maps of intestinal epithelial cell line IEC-6 (A) and irradiated IEC-6 cells (B)

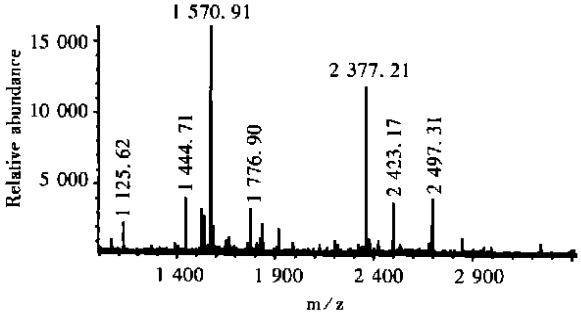


图 2　蛋白质点 IEC-N1 的肽质量指纹图

Fig 2　Peptide mass fingerprinting map of protein spot IEC-N1

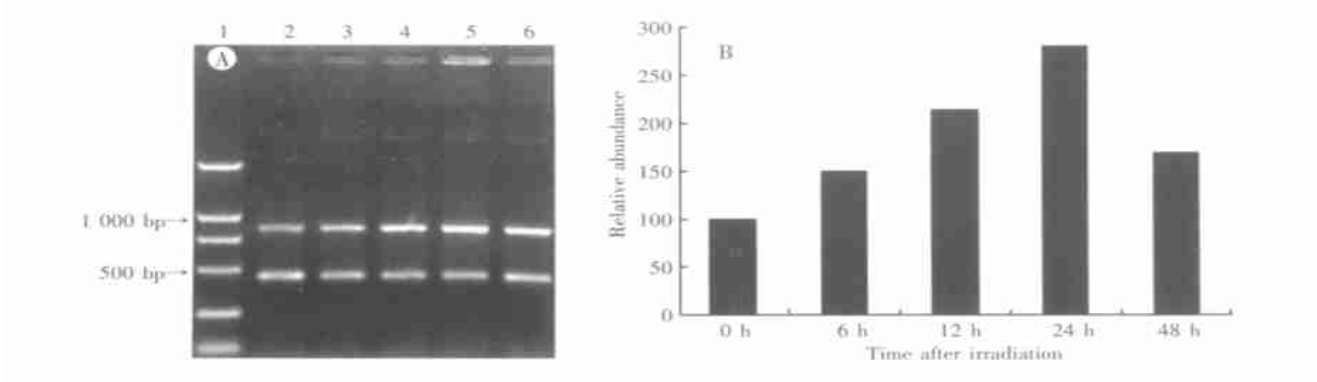
表 1　经肽质量指纹谱初步鉴定的差异蛋白质

Tab 1　Differential protein spots preliminarily identified by peptide mass fingerprinting

Spot ID	Acc No.	Peptides matched	Theoretical pI/MW	Sequence covered(%)	Protein name
IEC-N1	P31000	11/18	5.06/53 601	41.9	Vimentin
IEC-N2	P10719	8/18	4.95/51 710	26.5	CHAIN 1: ATP SYNTHASE BETA CHAIN
IEC-N3	P48721	8/12	5.51/68 846	19.1	CHAIN 1: STRESS-70 PROTEIN
IEC-N4	P04691	16/60	4.78/49 760	32.9	Class I beta tubulin. Tubulin beta-5 chain
IEC-N5	P52944	7/33	5.65/35 525	29.0	PDZ and LIM domain protein 1
IEC-R1	P10111	8/13	8.37/17 743	68.1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
IEC-R2	P05065	8/28	8.40/38 220	40.0	Fructose-bisphosphate aldolase A
IEC-R3	Q63716	5/26	8.27/22 109	25.6	Peroxiredoxin 1
IEC-R4	P52555	6/12	6.08/25 609	34.6	CHAIN 1: ENDOPLASMIC RETICULUM PROTEIN ERP29
IEC-R5	P49799	6/46	8.69/23 248	35.6	Regulator of G-protein signaling 4 (RGS4)
IEC-R6	Q9ZD7	5/23	6.60/56 489	16.0	Aldehyde dehydrogenase mitochondrial precursor

2.3　RT-PCR

从琼脂糖凝胶电泳图上可见 ERP29 在照射后表达升高, 在 24 h 时到达最高值, 为对照组的 2.8 倍, 见图 3。这说明电离辐射可以诱导 ERP29 的表达。



A: Electrophoretic map; 1: Marker; 2: Normal IEC-6; 3: IEC-6 (25 Gy, 6 h); 4: IEC-6 (25 Gy, 12 h); 5: IEC-6 (25 Gy, 24 h); 6: IEC-6 (25 Gy, 48 h); B: Images guantitatively processed by Quantity One program

图 3　RT-PCR 方法分析 ERP29 mRNA 表达变化

Fig 3　Analysis of ERP29 mRNA of ICE-6 cells (RT-PCR)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3 讨论

我们使用的 IEC-6 细胞购自美国,经过多次实验我们已经掌握了 IEC-6 细胞的培养条件,并对其最适条件进行了优化[9]。该细胞株来源于正常细胞,而非肿瘤细胞,因而它是研究肠上皮细胞生物学的理想离体模型。

电离辐射可以诱导细胞基因水平表达的改变。我们以往的研究发现,小鼠受到电离辐射后,肠上皮细胞的基因表达发生了改变。mRNA 由于自身存在贮存、转运、降解、翻译调控及产物的翻译后加工,难以准确地反映基因的产物-蛋白质的质与量。蛋白质是基因表达的产物,也是生物功能的执行者,从蛋白质水平对基因表达进行研究显得更为直接。因而,本研究采用双向电泳技术,从蛋白质水平研究了电离辐射对 IEC-6 细胞的作用。从本实验结果上看,电离辐射后肠上皮细胞总蛋白在 SDS-PAGE 即可表现出差别。然而,我们还不能直接对差别的蛋白带进行鉴定,因此采用了双向电泳进行细致的分离。根据双向电泳结果可以看到电离辐射后,肠上皮细胞蛋白质组发生了较大的改变。这与我们以前从 RNA 水平研究的结果一致。这些差别的蛋白点与辐射损伤后肠上皮细胞的生化过程密切相关,是放射损伤和修复的主要的蛋白质分子基础。

在我们所鉴定的 11 种蛋白质中,Vimentin(IEC-N1)在辐射后蛋白量显著降低。而在正常个体中,它表达于绒毛上皮细胞[10]。它的降低反映了损伤后上皮的重建(Restitution)能力降低,这与辐射损伤后变化一致。电离辐射可引起细胞内产生大量的自由基,过氧化物含量大量增加,因而细胞会代偿性增加过氧化物酶,这与 Peroxiredoxin Ⅰ(IEC-R3)含量增加一致。Park 等[11]发现,Peroxiredoxin Ⅱ反义 RNA 能增强辐射所诱导的细胞死亡,增强辐射敏感性。Peroxiredoxin Ⅰ与Ⅱ高度同源,功能类似。最近的研究表明,电离辐射可以上调 Peroxiredoxin Ⅰ与Ⅱ的表达[12]。这说明该蛋白质是电离辐射的重要效应蛋白,与我们的结果一致。ERP29 定位于内质网,可能是一种分子伴侣[13]。然而,它在辐射中的作用还有待进一步的研究。

我们所鉴定的差异点只是少数的、含量相对丰富的蛋白质。还需要进一步扩大鉴定蛋白质的数量,并采用序列分析或组成分析进行验证。本实验为进一步研究放射损伤与修复的分子及其机制提供了实验基础。

参考文献:

[1] Humphery-Smith I, Cordwell S J, Blackstock W P. Proteome research: complementarity and limitations with respect to the RNA and DNA worlds[J]. Electrophoresis, 1997, 18(8): 1217-1242.

[2] Lee K H. Proteomics: a technology-driven and technology-limited discovery science[J]. Trends Biotechnol, 2001, 19(6): 217-222.

[3] 粟永萍,程天民,刘贤华. 放射损伤及放伤复合伤对小肠上皮损害的量效研究[J]. 第三军医大学学报, 1994, 16(5): 313-315.

[4] 王军平,胡川闽,粟永萍,等. 用 mRNA 差异显示法进行小鼠肠上皮细胞辐射损伤相关基因的克隆[J]. 中华放射医学与防护杂志, 1999, 19(6): 372-374.

[5] Quaroni A, Wands J, Trelstad R L, *et al*. Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria[J]. J Cell Biol, 1979, 80(2): 248-265.

[6] Gorg A, Obermaier C, Boguth G, *et al*. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis. 2000, 21(6): 1037-1053.

[7] 王京兰,万晶宏,罗 凌,等. 蛋白质组研究中肽质量指纹谱鉴定方法的建立及应用[J]. 生物化学与生物物理学报, 2000, 32(4): 373-378.

[8] 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E, 等. 颜子颖, 王海林, 编译. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 366-373.

[9] 冉新泽,粟永萍,程天民,等. 大鼠小肠上皮细胞培养体系的建立及其影响因素的探讨[J]. 中国现代医学杂志, 1997, 7(5): 8-11.

[10] Iwatsuki H, Ogawa C, Suda M. Vimentin-positive cells in the villus epithelium of the rabbit small intestine[J]. Histochem Cell Biol, 2002, 117(4): 363-370.

[11] Park S H, Chung Y M, Lee Y S, *et al*. Antisense of human peroxiredoxin Ⅱ enhances radiation-induced cell death[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(12): 4915-4920.

[12] Lee K, Park J S, Kim Y J, *et al*. Differential expression of Prx Ⅰ and Ⅱ in mouse testis and their up-regulation by radiation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 296(2): 337-342.

[13] Hubbard M J, McHugh N J, Carne D L. Isolation of ERp29, a novel endoplasmic reticulum protein, from rat enamel cells evidence for a unique role in secretory-protein synthesis[J]. Eur J Biochem, 2000, 267(7): 1945-1957.

(编辑 陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net