

重组 hFGF-10 腺病毒对 HaCat 细胞影响的蛋白质组学研究

吴晓萍, 曾耀英*

(暨南大学组织移植与免疫实验中心, 广东 广州 510632)

摘要: 研究重组腺病毒导入人成纤维细胞生长因子 10 (hFGF-10) 对 HaCat 细胞蛋白质组的影响, 由鉴定的差异蛋白质推测 hFGF-10 对 HaCat 细胞作用的可能机制。采用双向凝胶电泳结合串联飞行时间质谱技术, 对空载体腺病毒 Ad 感染细胞和重组腺病毒 rAd-hFGF-10 感染细胞的总蛋白图谱上的差异蛋白点进行鉴定, 并通过半定量 RT-PCR 和 Western blotting 在转录和翻译水平对差异蛋白进行确证。结果显示, 获得了蛋白质分离效果较好的双向凝胶电泳图谱, 鉴定了 4 种与细胞凋亡、细胞骨架调控、蛋白质降解等相关的差异蛋白质, 并在转录和翻译水平确证了差异蛋白质 VDAC2 在导入目的基因 hFGF-10 的 HaCat 细胞中表达上调, 提示 VDAC2 可能在 hFGF-10 的生物学功能中发挥作用。

关键词: 人成纤维细胞生长因子 10; 腺病毒; 蛋白质组学; 细胞凋亡

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 01-0055-05

Proteomic study of the effect of recombinant hFGF-10 adenovirus on HaCat cells

WU Xiao-ping, ZENG Yao-ying*

(Institute of Tissue Transplantation and Immunology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: This study is to investigate the effect of recombinant hFGF-10 adenovirus on the proteome of HaCat cells, and to speculate further the possible mechanism of the effect of hFGF-10 on HaCat cells via differentially expressed proteins identified. Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) combined with tandem time-of-flight mass spectrometry was applied to identify the differentially expressed protein spots on the 2-DE maps of the whole-cell proteins from Ad infected and rAd-hFGF-10 infected HaCat cells. The mRNA and protein levels of the differentially expressed proteins were confirmed with semi-quantitative RT-PCR and Western blotting. The results showed that the 2-DE maps with high resolution were obtained, and four selected differentially expressed proteins involved in cell apoptosis, cytoskeleton regulation and protein degradation were identified with MALDI-TOF/TOF. The mRNA and protein levels of one of the differentially expressed proteins, VDAC2, were up-regulated in HaCat cells infected with the recombinant hFGF-10 adenovirus. The differentially expressed protein, VDAC2, may be related to the bioactivities of hFGF-10.

Key words: human fibroblast growth factor 10; adenovirus; proteomics; apoptosis

角质形成细胞 (keratinocyte, KC) 是表皮的主要组成细胞, 与表皮正常功能的发挥息息相关。KC

的细胞行为受到一些细胞因子的影响, 其中人成纤维细胞生长因子 10 (hFGF-10) 是影响 KC 细胞行为的主要细胞因子之一。FGF-10 与 FGF-7 属于 FGFs 家族的同亚家族^[1]。FGF-10 通过结合并激活细胞表面的受体 FGFR2IIIb 及 FGFR1b, 促进上皮细胞的增殖、分化和迁移, 加速创伤和移植皮肤的愈合, 具有潜在的临床应用前景。

收稿日期: 2009-08-19.

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 资助项目 (2007AA02Z110); 生物化学与分子生物学广东省重点学科资助项目。

*通讯作者 Tel: 86-20-85226219, Fax: 86-20-85221337,

E-mail: tzengyy@jnu.edu.cn

尽管一些实验室已对 hFGF-10 的蛋白质结构、生物学功能、作用机制和临床应用等方面进行了一系列的研究,但尚未发现从 hFGF-10 引起角质形成细胞蛋白质组变化这一角度进行的研究。蛋白质组学方法是一种整体性、高通量和系统性的技术方法,因此应用蛋白质组学方法,可获得对药物作用机制较完整的认识^[2]。在前期研究工作中,作者通过在大肠杆菌内同源重组的方法构建了分泌表达重组 hFGF-10 的腺病毒表达载体,包装获得的重组 hFGF-10 腺病毒感染角质形成细胞 (HaCat) 后可分泌表达重组 hFGF-10^[3]。本研究进一步通过重组 hFGF-10 腺病毒感染 HaCat 细胞,结合双向凝胶电泳和串联飞行时间质谱分析,研究 hFGF-10 对角质形成细胞蛋白质组的影响,从筛选鉴定的差异表达蛋白质,探讨 hFGF-10 影响 KC 细胞行为的可能机制。

材料与方法

细胞株 人皮肤角质形成细胞株 HaCat 购自中国典型培养物保藏中心。

仪器与试剂 PROTEAN IEF 等电聚焦仪、垂直电泳系统、GS-800 透射扫描仪和 PDQuest 图像分析软件 (Bio-Rad); Milli-Q 超纯水系统 (Millipore); 串联飞行时间质谱仪 (ABI 4700 TOF-TOF, ABI)。

IPG 预制胶条 (pH 3~10, 17 cm, NL)、尿素、硫脲、3-[3-(胆酰胺基丙基)二甲氨基]丙磺酸盐 (CHAPS)、二硫苏糖醇 (DTT)、碘乙酰胺、丙烯酰胺、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、甘氨酸 (Bio-Rad); 苯甲基磺酰氟 (PMSF)、DNase I、RNase A、考马斯亮蓝 R-250、胰酶 (Sigma); Trizol (Gibco)。一步法 RT-PCR 试剂盒 (Qiagen); 山羊抗人 VDAC2 多克隆抗体 (Abcam); 辣根过氧化物酶标记的兔抗山羊 IgG 抗体 (Dako)。

重组腺病毒感染角质形成细胞的总蛋白提取 HaCat 细胞按细胞数 2×10^6 /瓶接种于 75 cm^2 的细胞培养瓶中,待细胞生长至 80% 融合时,用空载体腺病毒 Ad 和重组腺病毒 rAd-hFGF-10 分别感染 HaCat 细胞;培养 48 h 后,收集细胞,按 1:3 (v/v) 的比例加入裂解缓冲液 ($7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素, $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫脲, 4% CHAPS, $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris, $65 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT, 0.5% IPG buffer, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PMSF, $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ DNase I, $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ RNase A), 超声破碎细胞,离心取上清液。Bradford 法测定上清液中的总蛋白浓度。

双向电泳及凝胶图像分析 双向电泳主要参考 Gorg 等^[4]报道的方法和 Bio-Rad 双向电泳实验指南进

行。选取 17 cm 非线性 IPG 胶条,将一定体积的总蛋白提取液与水化液混匀上样,总体积为 $350 \mu\text{L}$ 。 20°C 被动水化 18 h 后,按设置的聚焦程序 (150 V 慢速升压 1 h; 250 V 慢速升压 1.5 h; 500 V 慢速升压 1 h; 1 000 V 慢速升压 2 h; 5 000 V 快速升压 3 h; 10 000 V 快速升压聚焦 70 000 Vh) 进行等电聚焦。待聚焦结束后取出胶条,依次在平衡液 I ($6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素, 2% SDS, $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 8.8 Tris-Cl, 20% 甘油, $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT) 和平衡液 II ($6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素, 2% SDS, $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 8.8 Tris-Cl, 20% 甘油, $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 碘乙酰胺) 中振荡平衡 15 min。将平衡后的 IPG 胶条置于配制好的 12% SDS-PAGE 凝胶上,用低熔点琼脂糖封闭胶条。电泳起始时采用低电流 (12 mA/gel , 16°C),待样品完全走出 IPG 胶条、浓缩成一条线后,再加大电流 (25 mA/gel , 16°C)。待溴酚蓝指示剂到达底部边缘时停止电泳。将凝胶取出置于考马斯亮蓝染色液中染色过夜,换考染脱色液进行脱色,直至背景清楚为止。

用 Bio-Rad GS-800 扫描仪进行透射扫描,获得脱色后的双向凝胶电泳图谱,再用 PDQuest 软件对样品的双向凝胶电泳图谱进行分析比较,找出差异蛋白质点。

串联飞行时间质谱鉴定差异蛋白点 在考染凝胶上,将选取的差异蛋白质点切下,胰蛋白酶水解后得到该蛋白质的多肽片段混合物,再采用串联飞行时间质谱仪 ABI 4700 TOF-TOF 进行质谱分析 (激光源波长为 355 nm, 重复速率为 200 Hz, 加速电压为 20 000 V, 扫描质量范围为 700~3 200 Da, 最优质量分辨率为 1 200 Da。以胰蛋白酶消化的肌红蛋白作为内标校正质谱仪)。最后通过 MASCOT 在线检索工具 (<http://www.matrixscience.com>), 将质谱检测得到的数据在 NCBI 数据库进行检索,寻找匹配的相关蛋白质。主要检索条件: 肽质量控制 800~4 000 Da; 肽片段分子质量最大容许误差控制在 $\pm 0.5 \text{ Da}$; 物种来源为人类; 最小匹配肽片段数为 4; 固定修饰为半胱氨酸碘乙酰胺化,可变修饰为蛋氨酸氧化。质谱鉴定由复旦大学蛋白质组学研究中心 (上海) 完成。

一步法 RT-PCR 确证差异蛋白质 参照 Trizol 产品说明书,分别提取空载体腺病毒 Ad 和重组腺病毒 rAd-hFGF-10 感染的 HaCat 细胞的总 RNA。根据质谱鉴定的差异蛋白质 VDAC2 基因序列,设计合成引物 (正向引物: 5'-CTACCTTCTCACCAAACACAG-3', 反向引物: 5'-CCAGAGCAGAGAGTGTAAGC-3'), 内参为 GAPDH 基因 (正向引物: 5'-GTCTTCAC CACCATGGAGAAGGCTG-3', 反向引物: 5'-TGAGG

TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3')。冰浴条件下准备反应体系 (5×Buffer 5 μL , 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP 1 μL , 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 正反向引物各 1 μL , RT-PCR 酶混合液 1 μL , 总 RNA 0.5 μg , 加 DEPC 水至总体积 25 μL)。RT-PCR 的反应条件: 50 $^{\circ}\text{C}$ 30 min - 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 min - (94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s - 58 $^{\circ}\text{C}$ 40 s - 72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s) $\times$ 35 - 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

Western blotting 确证差异蛋白质 以空载体腺病毒 Ad 和重组腺病毒 rAd-hFGF-10 感染 HaCat 细胞, 培养 48 h 后, 收集细胞, 加入 RIPA buffer, 混匀后于冰上放置 30 min, 离心收集上清液进行 SDS-PAGE 电泳和转膜; 转膜完成后, 在两张膜中分别加入山羊抗人 VDAC2 多克隆抗体 (1:1 000 PBS 稀释) 和兔抗人 β -actin 多克隆抗体 (1:300 PBS 稀释), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; PBS 洗膜 3 次, 分别加入相应的二抗孵育 1.5 h, PBS 洗膜 5 次后 ECL 显色。

结果

1 重组腺病毒感染 HaCat 细胞的双向凝胶电泳图谱模式

感染的 Ad 感染组和重组腺病毒 rAd-hFGF-10 感染组细胞总蛋白质的双向凝胶电泳图谱 (图 1) 可见,

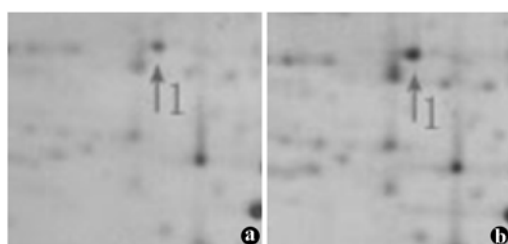


Figure 2 Partial magnification of differentially expressed protein spot 1 on 2-DE maps. a: HaCat cells infected with Ad; b: HaCat cells infected with rAd-hFGF-10

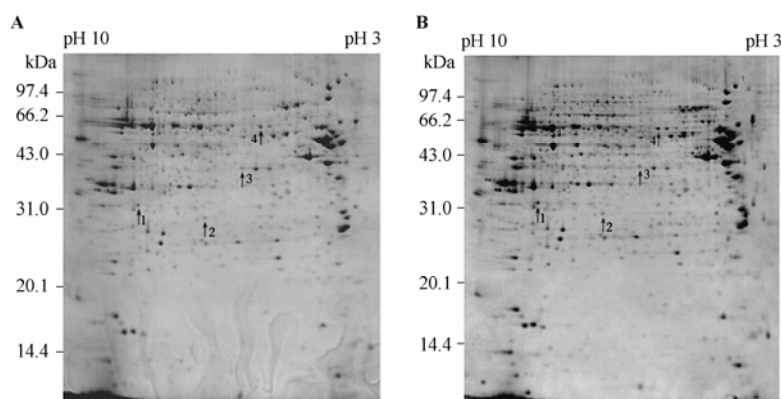


Figure 1 Comparison of the protein expression patterns between HaCat cells infected with Ad (panel A), and HaCat cells infected with rAd-hFGF-10 (panel B). The proteins were separated with 2-dimensional gel electrophoresis and stained with coomassie brilliant blue. Identified protein spots are indicated by numbers

两者的蛋白质组模式相似, 蛋白质点的等电点和分子质量分布范围广泛, 且等电点多数集中在中性区附近, 分子质量集中在 20~100 kDa 的区域范围。采用 PDQuest 图像分析软件, 对凝胶电泳图谱进行匹配和分析, 结果表明, Ad 感染组和 rAd-hFGF-10 感染组的蛋白质斑点数分别为 535 和 587, 匹配率分别为 70.0% 和 76.8%。

2 重组腺病毒感染 HaCat 细胞的差异蛋白质点的质谱鉴定和分析

采用 PDQuest 软件对图 1 中两组细胞总蛋白质的双向凝胶电泳图谱进行差异蛋白质点分析, 采用串联飞行时间质谱对选取的 4 个差异蛋白质点 (见图 1 箭头所示) 进行质谱分析, 获得了相应的肽质量指纹图谱 (PMF)。图 2 为差异蛋白质点 1 的局部放大图, 图 3 为其肽质量指纹图。利用 MASCOT 在线检索工具, 将质谱检测得到的数据在 NCBI 数据库进行检索, 根据检索结果鉴定的差异蛋白质点的相关数据见表 1。

3 RT-PCR 确证差异蛋白质 VDAC2

分别提取两组细胞的总 RNA, 定量后通过一步

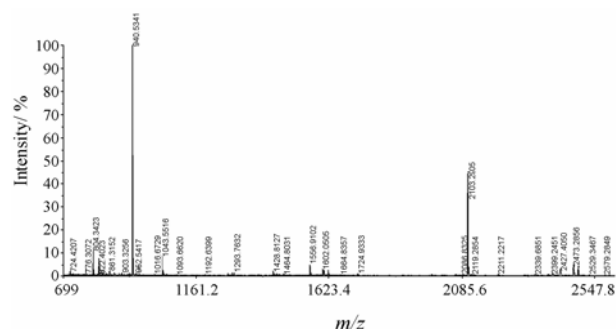
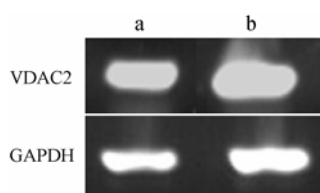


Table 1 The database inquiry results of the differentially expressed proteins between Ad infected and rAd-hFGF-10 infected HaCat cells

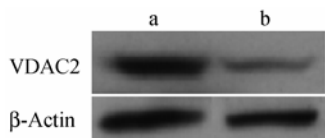
Rank	Protein name	Accession No.	Protein M_w /Da	Protein pI	Protein score
1	VDAC2	gi 48146045	30 393	6.81	216
2	Proteasome alpha 1 subunit, isoform 2	gi 13543551	29 578.9	6.15	225
3	Gelsolin-like capping protein	gi 63252913	38 474.5	5.82	163
4	Protein disulfide isomerase-associated 3 precursor	gi 21361657	56 746.8	5.98	397

法 RT-PCR 检测质谱鉴定的差异蛋白质 VDAC2 在两组细胞中的 mRNA 水平, 以 GAPDH 作为内参 (图 4)。结果显示, 与空载体腺病毒 Ad 感染组相比, 重组腺病毒 rAd-hFGF-10 感染 HaCat 细胞后, 使 VDAC2 的基因转录水平增强, 表明在角质形成细胞中导入 hFGF-10, 可使 VDAC2 在基因转录水平发生改变。

**Figure 4** The mRNA levels of VDAC2 in HaCat cells infected with the recombinant adenovirus. Total RNA was extracted with Trizol and subjected to one-step RT-PCR, which was performed as follows: 50 °C for 30 min – 95 °C for 15 min – (94 °C for 45 s – 58 °C for 40 s – 72 °C for 40 s) × 35 cycles – 72 °C for 10 min. a: HaCat cells infected with Ad; b: HaCat cells infected with rAd-hFGF-10

4 Western blotting 确证差异蛋白质 VDAC2

在半定量 RT-PCR 确证导入 hFGF-10 可上调 VDAC2 mRNA 水平的基础上, 分别提取两组细胞的总蛋白, 定量后通过 Western blotting 检测 VDAC2 的表达在两组细胞中的差异, 以细胞骨架蛋白 β -actin 作为内参 (图 5)。结果显示, 与空载体腺病毒 Ad 感染组相比, 重组腺病毒 rAd-hFGF-10 感染 HaCat 细胞后, 使 VDAC2 的蛋白表达水平增强, 表明在 HaCat 细胞中导入 hFGF-10, 可改变 VDAC2 的蛋白表达水平, 与蛋白质组学方法鉴定的结果相吻合。

**Figure 5** Expression of VDAC2 in HaCat cells infected with the recombinant adenovirus detected by Western blotting. Samples were separated on a 12% SDS-PAGE gel, transferred to a PVDF membrane, and blotted with anti-VDAC2 antibody. Signals were detected by an ECL kit. β -Actin was used as a control. a: HaCat cells infected with rAd-hFGF-10; b: HaCat cells infected with Ad

讨论

本文通过双向凝胶电泳结合串联飞行时间质谱技术, 鉴定了 4 种目的基因 (hFGF-10) 导入 HaCat 细胞后表达上调的差异蛋白质为: VDAC2、Proteasome alpha 1 subunit, isoform 2、Gelsolin-like capping protein 和 Protein disulfide isomerase-associated 3 precursor。这些蛋白质是与细胞凋亡、细胞骨架调控和蛋白质降解等相关的, 除了已通过半定量 RT-PCR 和 Western blotting 在转录和翻译水平确证 VDAC2 在导入目的基因的 HaCat 细胞中表达上调外, 其余 3 种蛋白质的表达水平变化有待进一步确证。

VDAC2 是电压依赖性阴离子通道 (VDAC) 的一种异构体。近年来, 对 VDAC 研究的一个重大进展是认识到 VDAC 参与调控细胞生存和死亡。在哺乳动物中存在 3 种 VDAC 异构体 (VDAC1、VDAC2 和 VDAC3), 它们可能具有各自独特的功能^[5-7]。Cheng 等^[8]曾报道 VDAC2 在体内的一种作用是作为 BAK 依赖的线粒体凋亡的特异抑制子, VDAC2 与 BAK 单体非活性形式结合, 调节 BAK 活性, 过表达 VDAC2 可选择性阻止 BAK 活化, 抑制线粒体凋亡途径。

FGF-10 是上皮细胞特异性的细胞因子, 具有抗凋亡生物学功能, 研究显示, FGF-10 的抗凋亡保护作用可能通过 MAPK/ERK 依赖途径^[9], 但确切机制尚不清楚。从查阅的相关文献资料中, 尚未发现 VDAC2 参与 hFGF-10 的生物学功能调控的报道。本研究结果显示, hFGF-10 可上调 VDAC2 在 HaCat 细胞中的表达, 提示 VDAC2 可能在 hFGF-10 的生物学功能中发挥作用, 而 hFGF-10 是否通过增强 VDAC2 的表达, 选择性阻止促凋亡蛋白 BAK 的活化, 抑制线粒体凋亡途径而发挥抗细胞凋亡作用, 则有待进一步的研究。

References

- [1] Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy [J]. Nat Rev Drug Discov, 2009, 8: 235-253.
- [2] Cai QS, Feng MQ, Huang H, et al. Application of biochip,

- genomics and proteomics in drug research and development [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2003, 38: 795–800.
- [3] Wu XP, Zeng YY. Recombinant hFGF-10 adenovirus promotes proliferation of keratinocytes [J]. *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志), 2007, 23: 213–216.
- [4] Gorg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics [J]. *Proteomics*, 2004, 4: 3665–3685.
- [5] Wu S, Sampson MJ, Decker WK, et al. Each mammalian mitochondrial outer membrane porin protein is dispensable: effects on cellular respiration [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1452: 68–78.
- [6] Sampson MJ, Lovell RS, Craigen WJ. The murine voltage-dependent anion channel gene family. Conserved structure and function [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272: 18966–18973.
- [7] Xu X, Decker W, Sampson MJ, et al. Mouse VDAC isoforms expressed in yeast: channel properties and their roles in mitochondrial outer membrane permeability [J]. *J Membrane Biol*, 1999, 170: 89–102.
- [8] Cheng EH, Sheiko TV, Fisher JK, et al. VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis [J]. *Science*, 2003, 301: 513–517.
- [9] Upadhyay D, Correa-Meyer E, Sznajder JI, et al. FGF-10 prevents mechanical stretch-induced alveolar epithelial cell DNA damage *via* MAPK activation [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003, 284: L350–359.