

荧光双向电泳检测雌雄小鼠肝组织蛋白组学的差异

戎卓娜, 李慧玲*, 董鹏辉, 樊婷婷, 李娟, 赵毅, 王福金, 王爱国, 王靖宇*

(大连医科大学实验动物中心, 大连 116044)

【摘要】 目的 检测雌雄小鼠肝组织蛋白质组表达差异,探讨肝病发生的性别差异机制。方法 采用双向荧光差异凝胶电泳(two dimension difference gel electrophoresis, 2D-DIGE)和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)技术检测 C57BL/6J 雌雄小鼠肝组织的蛋白质组差异表达谱,分离并鉴定差异表达蛋白,应用 Western blot 进行验证,并对差异表达蛋白进行生物信息学分析,包括蛋白功能注释、分类分析、京都基因与基因组百科全书通路分析。结果 经双向荧光差异凝胶电泳-图像分析得到 1767 个蛋白点,其中差异倍数 ≥ 1.5 ($P < 0.05$)的蛋白点 325 个。从中选择 78 个差异蛋白点进行 MALDI-TOF-MS 鉴定,得到 48 种差异性表达的蛋白质。其中,与雌鼠相比,雄鼠肝组织中高表达的蛋白有 14 种,低表达的蛋白有 34 种。选取 6 个差异蛋白点进行 Western blot 验证,证明了 2D-DIGE 结果的可靠性。GO 分析结果显示,涉及雌雄鼠肝组织中的差异蛋白在细胞组分、分子功能、生物学过程中的分布广泛。KEGG 通路分析发现差异蛋白涉及 6 条信号通路。结论 C57BL/6J 雌雄小鼠肝组织的差异性蛋白表达的检测结果为研究性别差异性肝病发生的分子机制提供了基础生物学信息和有益的线索。

【关键词】 肝;性别差异;蛋白质组学;生物信息学;双向荧光差异凝胶电泳

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 10-0016-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.10.004

Differential proteomic analysis of liver tissues between male and female C57BL/6J mice by 2D-DIGE

RONG Zhuo-na, LI Hui-ling*, DONG Peng-hui, FAN Ting-ting, LI Juan, ZHAO Yi, WANG Fu-jin, WANG Ai-guo, WANG Jing-yu*
(Laboratory Animal Center, Dalian Medical University, Dalian 116044, China)

【Abstract】 Objective To identify the differential proteomic expressions between the liver tissues of male and female mice, and investigate the mechanisms underlying gender differences in liver diseases. **Methods** Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis (2D-DIGE) and matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) were used to identify the differentially expressed proteins in the liver tissues of male and female C57BL/6J mice. The differentially expressed proteins were validated by Western blot and further analyzed by bioinformatics, including Gene Ontology (GO) analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). **Results** Among the auto-detected 1767 protein spots by 2D-DIGE, 325 protein spots were differentially expressed ($|\text{ratio}| \geq 1.5$, $P < 0.05$) between the liver tissues of male and female mice, in which 78 spots were randomly selected for MALDI-TOF-MS identification and finally 48 distinct proteins were obtained. Compared with females, 14 and 34 proteins were up- or down-regulated in males, respectively. Among them, 6 differentially expressed proteins were validated by Western blot which

[基金项目] 辽宁省教育厅科学规划课题(L2014341);国家自然科学基金(30872950)。

[作者简介] 戎卓娜,女,硕士,研究方向:肝肿瘤发生分子机制的研究。E-mail: rongzhuona@163.com

[通讯作者] 李慧玲,女,硕士,讲师,研究方向:肝肿瘤发生分子机制的研究。E-mail: 5421992@qq.com。

王靖宇,男,教授,博士生导师,研究方向:动物行为学和分子生物学。E-mail: wangjingyus@163.com。* 共同通讯

confirmed the reliability of 2D-DIGE results. GO analysis showed that the differentially expressed proteins in the liver tissues of male and female mice are associated to various cellular component, molecular function and biological process. 6 pathways were significantly different between the liver tissues of males and females depending on KEGG analysis.

Conclusions The proteomic data and related analysis of the liver tissues of C57BL/6J mice offer crucial clues for elucidating the underlying mechanisms of different gender effects on liver diseases.

【Key words】 Liver; Gender difference; Proteomic; Bioinformatics; Two dimension difference gel electrophoresis, 2D-DIGE

肝病的雄性倾向性是哺乳动物的显著特征^[1-5],说明哺乳动物具有相似的性别差异性肝病发生机制,但其分子机制尚不清楚。近年,蛋白质组学技术和生物信息学分析的飞速发展,为从整体、动态、定量水平研究疾病发生发展的机制提供了关键性技术方法和重要信息^[6]。本研究采用双向荧光差异凝胶电泳分析法,首次对 C57BL/6J 品系雌雄小鼠肝组织进行了差异蛋白质组学检测和相应的生物信息学分析,为以小鼠为动物模型的肝病的性别差异性发生机制研究提供基础生物学信息。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠 3 只,9 月龄,体重 24 ~ 27 g,雌性小鼠 3 只,15 月龄,体重 24 ~ 27 g,小鼠的繁育饲养和实验均在大连医科大学实验动物中心 SPF 区进行[SCXK(辽)2013-0003][SYXK(辽)2013-0006]。实验动物使用与管理委员会(ICUC)批准号:L20130326。

1.2 主要试剂与仪器

Cy2, Cy3, 和 Cy5 购自英国 GE Healthcare Bio-Sciences 公司;二甲基甲酰胺购自美国 Aldrich 公司;尿素、琼脂糖、甘油、溴酚蓝、CHAPS、SDS、碘乙酰胺、过硫酸铵、TEMED、IPG 凝胶(24 cm, pH3 ~ 10)购自美国 Bio-Rad;蛋白酶抑制剂混合物购自瑞士 Roche Applied Science;胰蛋白酶(测序级)购自普洛麦格(北京)生物技术有限公司;GelDocTMEZ 成像仪(美国 Bio-RAD);质谱仪(AutoFlex, 德国 Bruker 公司);紫外分光光度计(Nanodrop 2000)、xMark 酶标仪等。

1.3 实验方法

1.3.1 组织样本的采集和蛋白质提取

宏观解剖分别采集 C57BL/6J 雄性和雌性小鼠的肝组织,剪成约 1 cm³ 大小的组织块,置于冷冻管中液氮冻存。组织块液氮研磨,加入 1 mL 裂解液(7 mol/L 尿素,2 mol/L 硫脲,4% CHAPS,30 mmol/L

Tris-Cl pH 8.5, 磷酸酶抑制剂),超声破碎 10 s, 14 000 r/min 离心 30 min。用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒对蛋白浓度进行定量,并用 SDS-PAGE 确认。

1.3.2 DIGE 实验设计和荧光染料标记

在 3 只雌性或 3 只雄性小鼠的肝组织蛋白样本中各取 50 μg 进行等量混合,分别获得雄性(M)和雌性(F)肝组织混合蛋白样本。雌雄肝组织混合样本分别以 Cy3 和 Cy5 进行荧光标记,两者再进行等量混合为内标,以 Cy2 进行荧光标记。

1.3.3 双向电泳

IPG 胶条(24 cm, pH 3 ~ 10)置于 IPGphor 水平电泳仪(Bio-Rad)上进行水化和聚焦,取 1.3.2 中样本的等量混合液进行 2D-DIGE,电泳条件 280 kVh (30 min 内达到 250 V,1000 V 稳定 1 h,5 h 内达到 10000 V,10000 V 维持到 60 kVh)。等电聚焦结束后,IPG 胶条先后在十二烷基磺酸钠平衡液(0.5% DTT)和平衡液 II(4.5% 碘乙酰胺)中各平衡 15 min;将平衡好的 IPG 胶条转移至 12% 的十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶上端,设置功率,避光条件下进行垂直电泳,直至溴酚蓝达胶底线,然后用 Typhoon 9410 激光共聚焦扫描仪对电泳结果进行成像,各个荧光染料激发/吸收特异波长设置分别为 Cy2(488/520 nm),Cy3(532/580 nm)和 Cy5(633/670 nm)。同时取未标记的蛋白内标样品 1 mg 进行双向电泳,具体操作同荧光染色样本。电泳结束后,先用超敏考马斯亮蓝染色液染色,再扫描成像,用于质谱分析。

1.3.4 图像分析

双向荧光差异凝胶电泳图谱用 SameSpots 软件分析,观察蛋白的变化趋势。同时,将一张分析过的图像用于切胶图像(SpotPicking),与 1 mg 内标样品的制备胶的染色点进行匹配。选择倍数 ≥ 1.5 ($P < 0.05$)的斑点为差异蛋白点。

1.3.5 差异蛋白的胶内酶切和质谱鉴定

采集差异蛋白点,经过清洗和脱色,脱水干燥,37℃酶解 15 h。收集上清,提取蛋白并冻干。将蛋

白样本复溶,点靶于 MALDI 金属盘上,4700 MALDI-TOF-MS 串联飞行质谱仪进行鉴定。

1.3.6 数据库检索差异蛋白名称

应用 MASCOT 软件对上述质谱鉴定数据在 NCBI 非冗余数据库进行检索。检索参数:种类为 *Mus musculus*;酶为胰蛋白酶,允许 1 个漏切位点;肽质量容忍差异为 0.2;MS/MS 容忍差异为 0.3。

1.3.7 蛋白质印迹法验证 2D-DIGE 检测结果

RIPA 裂解液提取 C57BL/6J 雌雄小鼠肝脏组织的总蛋白(4 只/组),Bradford 试剂盒测定样本蛋白浓度。将 30 μg 的蛋白样品在 12% 的 SDS-PAGE 上进行分离、转膜、封闭后,分别用 EPHX2、CA3、FBP1、ARHGDI(Abcam)和 SCP2、Albumin(Bioworld)一抗以及 HRP 标记山羊抗兔(ABclonal)二抗孵育后,用 ECL 化学发光试剂盒(Advansta,USA)显影。实验重复 3 次,Bradford 染色作为上样内参。

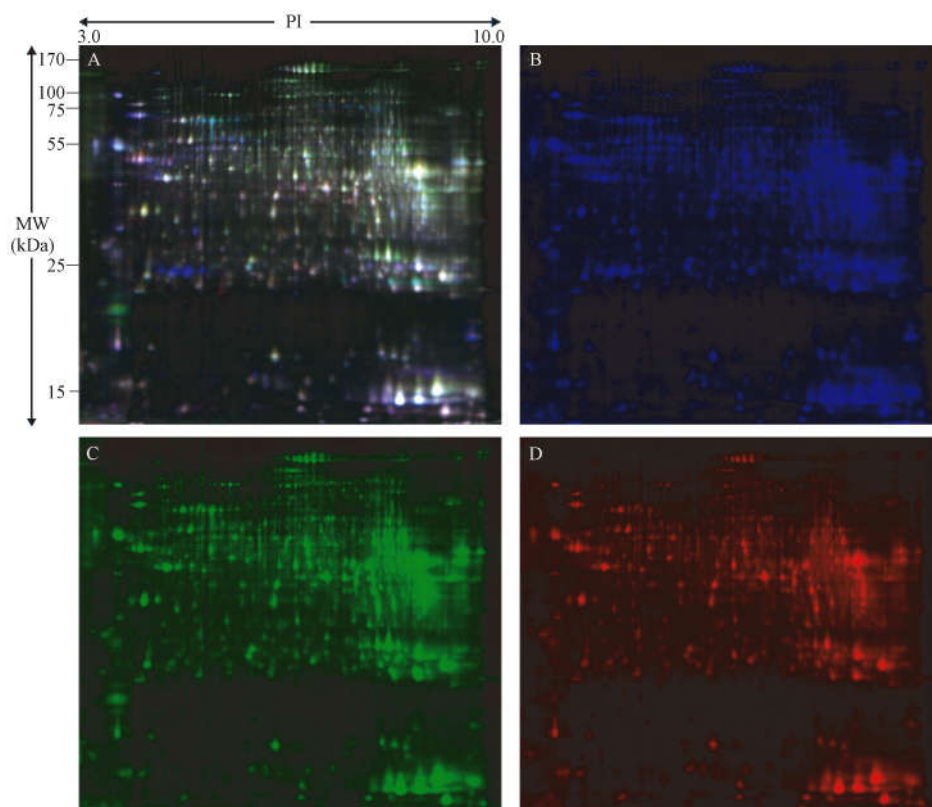
1.4 生物信息学分析

用 DAVID 软件(<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>)对鉴定的差异蛋白质进行 Gene Ontology(GO)分析,对差异蛋白进行功能注释和分类,包括 Cellular component(CC)、Molecular function(MF)和 Biological Process(BP)分析;以及对差异蛋白进行 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG)的通路富集分析。

2 结果

2.1 2D-DIGE 图谱和分析结果

将雌鼠和雄鼠的肝组织蛋白样本进行荧光标记和电泳后,分别经 488、532、633 nm 波长的激光进行扫描,即获得内标图谱、雌鼠肝组织蛋白图谱、雄鼠肝组织蛋白图谱共 3 张,然后用 SameSpots 分析软件进行分析,并将图谱叠加(图 1)。雌雄小鼠肝组织蛋白样本中共检测到蛋白质斑点 1767 个。



注:A:3 个不同荧光标记样品的叠加图像;B: Cy2 标记的混合蛋白样本内标;C: Cy3 标记的雄鼠肝组织蛋白样本;D: Cy5 标记的雌鼠肝组织蛋白样本。

图 1 C57BL/6J 雄鼠和雌鼠肝组织蛋白表达的双向荧光差异凝胶电泳图谱

Note. A: The merged images of different fluorescent labeled samples; B: Cy2 labeled mixed protein samples; C: Cy3 labeled liver tissue protein samples of male mice; D: Cy5 labeled liver tissue protein samples of female mice.

Fig. 1 Images of gender differentially expressed proteins in C57BL/6J mouse liver tissues detected by two dimensional fluorescence difference gel electrophoresis

表 1 雄鼠肝组织高表达差异蛋白的质谱鉴定结果

Tab. 1 Up-regulated proteins identified in the liver of male mice by LC MS/MS analysis

Uniprot 编号 Accession No.	相对分子量 MW	等电点 pI	蛋白质名称 Protein names
P07724	68647.7	5.75	血清白蛋白 (serum albumin, Alb)
P11588	20763.3	4.96	主要尿蛋白 1 (major urinary protein 1, MUP-1)
P16015	29347.6	6.89	碳酸酐酶 3 (carbonic anhydrase 3, Ca3)
P24270	59757.6	7.72	过氧化氢酶 (catalase, Cat)
P27773	56642.7	5.88	蛋白二硫键异构酶 A3 (protein disulfide-isomerase A3, PDIA3)
P32020	59087.8	7.16	固醇载体蛋白 2 (sterol carrier protein 2, SCP2)
P34914	62474.6	5.85	双功能环氧化物水解酶 2 (bifunctional epoxidehydrolase 2, Ephx2)
P63017	70827.2	5.37	热休克蛋白 8 (heat shock protein 8, Hsp 8)
Q03265	59715.6	9.22	ATP 合酶亚基 α (ATP synthase subunit alpha, ATP5A1)
Q63880	57821.5	5.43	羧酸酯酶 3A 羧酸酯酶 3A (carboxylesterase 3A, Ces3a)
Q8C196	164513.7	6.48	氨甲酰磷酸合酶 (carbamoyl-phosphate synthase, CPS1)
Q8R0Y6	98646.5	5.64	醛脱氢酶家族 1 成员 L1 (aldehyde dehydrogenase family1 member L1, ALDH1L1)
Q92111	76673.7	6.94	血清铁蛋白 (sero transferrin, Tf)
Q9R0N0	42268.4	5.17	半乳糖激酶 (galactokinase, Galk1)

表 2 雄鼠肝组织低表达差异蛋白的质谱鉴定结果

Tab. 2 Down-regulated proteins identified in the liver of male mice by LC MS/MS analysis

Uniprot 编号 Accession No.	相对分子量 MW	等电点 pI	蛋白质名称 Protein names
E9PY03	14319	8.66	蛋白 TSTD1 (TSTD1 protein)
P02088	15738.2	7.14	血红蛋白亚基 β -1 (hemoglobin subunit beta-1, Hbb-b1)
P05784	47509.2	5.22	细胞角蛋白 18 (cytokeratin-18, CK-18)
P08113	92418.2	4.74	热休克蛋白 90b1 (heat shock protein 90 kDa beta member 1, Hsp90- β 1)
P11352	22268.3	6.74	谷胱甘肽过氧化物酶 1 (glutathione peroxidase 1, GPX1)
P11725	39340.4	8.77	鸟氨酸氨甲酰转移酶 (ornithine carbamoyl transferase, OTC)
P12710	14236.5	8.59	肝型脂肪酸结合蛋白 (fatty acid-binding protein, liver, FABP1)
P12787	16091.3	6.08	细胞色素 c (cytochrome c, Cox5a)
P14206	32817.4	4.80	40S 核糖体蛋白 SA (40S ribosomal protein SA, Rpsa)
P14211	47964.9	4.33	钙网蛋白 (calreticulin, Calr)
P19157	23594.1	7.68	谷胱甘肽 S-转移酶 P1 (glutathione S-transferase P1, Gstp1)
P20029	72377.5	5.07	热休克蛋白 5 (heat shock 70 kDa protein 5, Hsp5)
P22752	32193.5	6.36	组蛋白 H2A1 型 (histone H2A type 1, Hist1h2ab)
P24369	23698.6	9.56	肽基脯氨酰顺反异构酶 B (peptidyl-prolylcis-transisomerase B, Ppib)
P56395	11135.5	5.13	细胞色素 b5 (cytochrome b5, CYB5A)
P56480	56265.5	5.19	ATP 合酶亚基 β (ATP synthase subunit beta, ATP5b)
P58771	28679	4.75	原肌球蛋白 α -1 链 (tropomyosin alpha-1 chain, Tpm1)
P62204	16826.8	4.09	钙调蛋白 (calmodulin, CALML1)
P62806	11360.4	11.36	组蛋白 H4 (histone H4, Hist1H4a)
P62962	14947.5	8.46	前纤维蛋白 1 (profilin-1, Pfn1)
Q00623	30596.6	5.51	载脂蛋白 A1 (apolipoprotein A-1, ApoA1)
Q00915	15835.8	5.10	视黄醇结合蛋白 1 (retinol-binding protein 1, RBP1)
Q05816	15127.4	6.14	表皮型脂肪酸结合蛋白 (fatty acid-binding protein, epidermal, FABP5)
Q64433	10955.9	7.93	10 kDa 伴侣蛋白 (chaperonin10, Cpn 10/Hsp 10)
Q6P9P0	143880.7	9.34	SMC5-SMC6 复合物定位因子蛋白 2 (SMC5-SMC6 complex localization factor protein2, SLF2)
Q8R317	58640.6	4.85	核小体表面蛋白 1 (ubiquilin-1, UBQLN1)
Q922R8	48658.6	5.05	蛋白二硫键异构酶 A6 (protein disulfide-isomerase A6, PDIA6)
Q99PT1	23392.8	5.12	RhoGDP-解离抑制剂 1 (Rho GDP-dissociation inhibitor 1, ARHGDI1)
Q9CPT4	17971.0	6.30	骨髓衍生长因子 (myeloid-derived growth factor, MYDGF)
Q9DBD9	17589.1	5.03	ATP 合酶亚基 δ (ATP synthase subunit delta, ATP5D)
Q9DB19	32646.2	5.37	无机焦磷酸酶 (inorganic pyrophosphatase 1, PPA1)
Q9DBB8	36277.7	6.03	反-1,2-二氢苯-1,2-二醇脱氢酶 (trans-1,2-dihydrobenzene-1,2-diol dehydrogenase, DHDH)
Q9QXD6	36888.8	6.15	果糖-1,6-二磷酸酶 1 (fructose-1,6-bisphosphatase 1, FBP1)
O08709	24855	5.71	过氧化物酶-6 (peroxidoxin-6, Prdx6)

2.2 雌雄小鼠肝脏组织中差异表达蛋白的筛选和鉴定

采用 SameSpots 软件对差异蛋白点进行分析和筛选。筛选条件: 蛋白质差异在 1.5 倍以上 ($P < 0.05$)。比较后共分析出 325 个差异点。其中, 与雌鼠相比, 雄鼠肝组织中高表达的蛋白点共计 155 个, 低表达的蛋白点共计 170 个。对筛选出来的差异蛋白点, 随机选取 78 个点进行 MALDI-TOF-MS 质谱鉴定。结果显示, 这些鉴定的所有蛋白点均获得了较好的质谱图。将肽质量指纹图谱和 MS/MS 数据提交 MASCOT 进行在线检索, 共成功检索出 48 种蛋白。其中, 与雌鼠相比, 雄鼠肝组织中高表达的蛋白 14 种(表 1), 低表达的蛋白 34 种(表 2)。

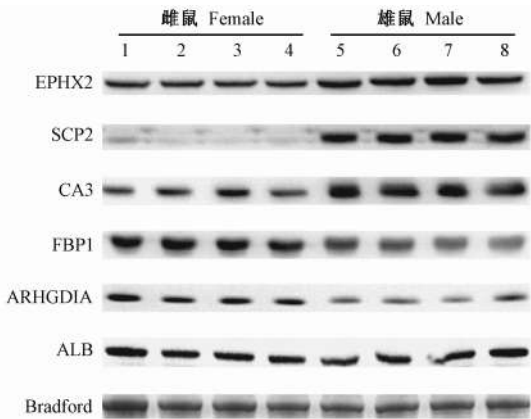
2.3 鉴定结果的蛋白质印迹验证

在鉴定出的雌雄小鼠肝脏组织差异表达蛋白中选取 EPHX2、SCP2、CA3、FBP1、ARHGDIA 和 Albumin 6 个蛋白进行蛋白质印迹验证。结果如图 2 所示, 与雌性小鼠的肝组织相比, EPHX2、SCP2 和 CA3 在雄性小鼠肝组织中的表达明显升高, FBP1 和 ARHGDIA 在雄性小鼠肝组织中的表达明显降低。这些结果与 2D-DIGE 的鉴定结果一致, 说明了 2D-DIGE 结果的可靠性。但是, Albumin 的蛋白表达在雌雄小鼠间未见明显差异, 在 2D-DIGE 鉴定的 78 个蛋白点中, 有 9 个点鉴定为 Albumin。这表明 Albumin 在雌雄小鼠间可能存在转录剪切或翻译后修饰的显著差异。

2.4 差异蛋白的 GO 分析

将所有差异蛋白进行 GO 分析(表 3), 共涉及 26 条分子功能, 其中包含蛋白数量最多的前 10 种分子功能为: poly(A) RNA 结合、酶结合、脂质结合、

受体结合、催化活性、解折叠蛋白结合、ATPase 活性、钙粘蛋白结合参与细胞间粘附、泛素蛋白连接酶结合和蛋白复合物结合。共涉及 28 条细胞组分, 其中包含蛋白数量最多的前十种细胞组分为: 胞外体、细胞质、细胞核、胞质溶胶、线粒体、细胞外空间、内质网、蛋白复合物、胞外区和髓鞘。共涉及 40 条生物学功能, 其中包含蛋白数量最多的前十种生物学功能为: 运输、凋亡过程的负调控、代谢过程、蛋白质折叠、脂代谢过程、氧化还原过程、对药物的反应、响应活性氧、ATP 代谢过程和受体介导的内吞作用。以上结果表明, 雌雄小鼠肝脏差异蛋白在分子功能、细胞组分和生物学功能中都存在广泛而显著的差异。



注: 1~8 数字分别代表不同个体的 C57BL/6J 小鼠。
图 2 蛋白质印迹法验证雌雄小鼠肝脏组织差异表达蛋白
Note. 1~8 numbers indicate the different individuals of C57BL/6J mice.
Fig. 2 Validation of the differentially expressed proteins between females and males by Western blot assay

表 3 雌雄小鼠肝组织差异蛋白 GO 富集分析结果
Tab. 3 GO analysis for the gender differentially expressed proteins in mouse liver tissues

GO 号 Go No.	GO 注释 GO Term	基因数量/% Gene content	校正后 P 值 Corrected P value	基因 Gene
G.O:0070062	Extracellular exosome	37/48(77.1)	5.0 E-23	Krt18/Hsp90b1/Cyb5a/Hspa8/Mydgf 等
G.O:0005737	Cytoplasm	30/48(62.5)	4.5 E-05	Krt18/Otc/Cyb5a/Tpm1/Hspa8 等
G.O:0005634	Nucleus	24/48(50.0)	4.6 E-03	Mup1/Gstp1/Hspa5/Atp5b/Hspa8 等
G.O:0005829	Cytosol	19/48(39.58)	3.8 E-08	Hsp90b1/Mup1/Gstp1/Ephx2/Hspa8 等
G.O:0005739	Mitochondria	17/48(35.42)	8.7 E-07	Cox5a/Gstp1/Hspa5/Atp5b/Aldh1l1 等
G.O:0005615	Extracellular space	14/48(29.2)	2.7 E-05	Mup1/Gstp1/Hspa8/Ces3a/Mydgf 等
G.O:0005783	Endoplasmic reticulum	12/48(25.0)	1.8 E-04	Alb/Calr/Hspa5/PpiB/Pdia3 等
G.O:0006810	Transport	11/48(22.9)	1.3 E-02	Alb/Scp2/Atp5b/Atp5a1/Trf 等
G.O:0043234	Protein complex	11/48(22.9)	1.5 E-06	Alb/Calr/Gstp1/Cps1/Aldh1l1 等
G.O:0044822	Poly(A) RNA binding	10/48(20.8)	1.9 E-03	Calr/PpiB/Pdia3/Pfn1/Atp5a1 等

表 4 雌雄小鼠肝组织差异蛋白的 KEGG 通路数据库富集分析结果
Tab. 4 KEGG analysis for the gender differentially expressed proteins in the mouse liver tissues

KEGG 通路 KEGG pathway	基因数量/% Gene content	校正后 P 值 Corrected P value	基因 Gene
Protein processing in endoplasmic reticulum	7/48 (14.6)	1.1E-04	Hsp90b1/Calr/Hspa5/Pdia3/Hspa8/Ubqln1/Pdia6
Oxidative phosphorylation	5/48 (10.4)	3.8E-03	Cox5a/Atp5b/Atp5a1/Atp5d/Ppa1
Alzheimer's disease	5/48 (10.4)	8.9E-03	Cox5a/Atp5b/Calml/Atp5a1/Atp5d
PPAR signaling pathway	4/48 (8.3)	6.0E-03	Fabp1/Scp2/Apoa1/Fabp5
Parkinson's disease	4/48 (8.3)	3.2E-02	Cox5a/Atp5b/Atp5a1/Atp5d
Thyroid hormone synthesis	3/48 (6.3)	4.2E-02	Hsp90b1/Gpx1/Hspa5

2.5 差异蛋白的 KEGG 分析

对所有差异蛋白进行 KEGG 通路分析,共发现了 6 个有统计学意义的代谢通路(表 4),包括内质网中的蛋白质加工、氧化磷酸化、阿尔茨海默病、PPAR 信号通路、帕金森病和甲状腺激素合成。

3 讨论

我们的前期研究结果表明,在 Ras 癌基因诱导的,以 C57BL/6J 为遗传背景的肝癌小鼠动物模型中^[3],肝肿瘤的发生主要集中在雄鼠的中年阶段和雌鼠的老年阶段,并存在显著的差异(肝肿瘤发生率:9 月龄雄鼠为 100%,15 月龄雌鼠为 34.62%)。由此,本研究选择 9 月龄雄鼠和 15 月龄雌鼠作为研究对象。通过 2D-DIGE 分析,与雌鼠相比,雄鼠肝组织中下调的蛋白 34 个,上调蛋白 14 个,涉及广泛的细胞生物学功能和代谢通路。

适当的 ROS 水平对正常细胞的生理过程具有重要的调节作用,但过量的 ROS 又是参与细胞病变过程的重要因素^[7]。本研究发现,三种参与 ROS 代谢的关键酶(GPX1,Prdx6,CAT)在雌雄小鼠肝组织中的表达具有显著的差异。其中,GPX1 和 Prdx6 在雄性 C57BL/6J 小鼠肝组织内的表达较雌性小鼠显著降低(GPX1 下降 5.31 倍,Prdx6 下降 2.7 倍)。GPX1 是线粒体中重要的抗氧化酶,主要负责消除线粒体内 H₂O₂ 的水平,从而抵抗或阻止 ROS 蓄积所导致的细胞损伤^[8]。Prdx6 是抗氧化蛋白超家族成员之一,是具有 GPX 和 Ca²⁺ 非依赖性磷脂酶 A2 双重酶活性的蛋白。体外研究表明,小鼠表皮细胞过表达 Prdx6 具有抵抗氧化应激损伤的作用^[9]。GPX1 和 Prdx6 的显著降低可能会导致雄性小鼠肝细胞中的 ROS 水平偏高,肝细胞易受损伤,进而有利于肝病的发生发展。另外,KEGG 富集分析结果显示,线粒体中氧化磷酸化通路发生了显著变化,其中的相关蛋白在雄性小鼠肝细胞中普遍降低,这

可能会进一步提升雄性小鼠肝细胞中的 ROS 水平。有趣的是,CAT 在雄性 C57BL/6J 小鼠肝组织内的表达较雌性小鼠显著升高(1.6 倍)。CAT 主要功能是分解 H₂O₂ 为 H₂O 和 O₂,与 SOD、POD 共同组成抗氧化酶系统,降低细胞内 ROS 水平^[10]。CAT 的显著升高可能是低水平 GPX1 和 Prdx6 的代偿性补充,以维持雄性肝细胞的正常 ROS 水平和生理功能,但具体机制尚需进一步研究。

肝脏是生物体脂质代谢的中枢器官,而脂质代谢紊乱又是诱发或影响肝病发生发展的重要因素之一^[11]。本研究的 KEGG 通路富集分析数据表明,调节脂质代谢的 PPAR 信号通路在雌雄小鼠的肝组织中具有显著的差异,其中检测到的差异蛋白为 Scp2、ApoA1、FABP1 和 FABP5,与雌性小鼠相比,Scp2 在雄性小鼠中上调,其他蛋白均下调。Scp2 是胆固醇代谢的重要调节因子,不仅参与胆固醇的生物合成和转化,还是胆固醇的重要转运蛋白。Liu 等研究表明,中草药当归可显著下调肝组织 Scp2 的表达进而抑制脂肪肝的发生^[12]。因而,Scp2 在雄性小鼠肝组织中的显著升高可能会导致胆固醇在雄性肝细胞中的蓄积,进而影响肝病的进展。ApoA1 作为卵磷脂胆固醇酰基转移酶的载脂蛋白,主要参与胆固醇由外周组织向肝脏的逆向转运^[13]。而 FABP1 和 FABP5 均为脂肪酸结合蛋白家族的成员,其中 FABP5 不仅可以转运脂肪酸为细胞生长提供能量及原材料,而且可以结合和转运各种配体,参与肿瘤生长相关的信号转导^[14]。这些脂质代谢相关蛋白在脂肪肝及肝肿瘤中都具有重要的作用,然而,它们的显著下降对雄性倾向性肝病病变过程的影响尚有待进一步探究。

综上所述,本研究应用双向荧光差异凝胶电泳技术首次检测了 C57BL/6J 雌雄小鼠肝脏组织的差异性蛋白表达,为研究性别差异性肝病发生的分子机制提供了基础生物学信息和有益的线索。

参考文献:

- [1] Bianco T, Gillo U, Amodio P, et al. Gender differences in the quality of life of patients with liver cirrhosis related to hepatitis C after liver transplantation [J]. *Blood Purif*, 2013, 36(3-4): 231-236.
- [2] Pan JJ, Fallon MB. Gender and racial differences in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *World J Hepatol*, 2014, 6(5): 274-283.
- [3] Wang AG, Moon HB, Lee MR, et al. Gender-dependent hepatic alterations in H-ras12V transgenic mice [J]. *J Hepatol*, 2005, 43(5): 836-844.
- [4] 定明, 何允刚, 张小飞, 等. 蛋白质组学技术筛选和鉴定白化黑线仓鼠皮肤白化相关差异蛋白质 [J]. *中国实验动物学报*, 2014, 22(1): 79-82.
- [5] 李顺, 陈丽香, 彭秀华, 等. 小鼠肝癌模型研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2016, 24(2): 213-216.
- [6] Boguski MS, McIntosh MW. Biomedical informatics for proteomics [J]. *Nature*, 2003, 422(6928): 233-237.
- [7] Holbrook NJ, Ikeyama S. Age-related decline in cellular response to oxidative stress: links to growth factor signaling pathways with common defects [J]. *Biochem Pharmacol*, 2002, 64(5-6): 999-1005.
- [8] Thu VT, Kim HK, Ha SH, et al. Glutathione peroxidase 1 protects mitochondria against hypoxia/reoxygenation damage in mouse hearts [J]. *Pflügers Arch*, 2010, 460(1): 55-68.
- [9] Shibata S, Shibata N, Shibata T, et al. The role of Pdx6 in the protection of cells of the crystalline lens from oxidative stress induced by UV exposure [J]. *Jpn J Ophthalmol*, 2016, 60(5): 408-418.
- [10] Jadeja RN, Urunaga NH, Ahmad D, et al. Data regarding M1 muscarinic receptor-mediated modulation of hepatic catalase activity in response to oxidative stress [J]. *Data Brief*, 2016, 6: 405-409.
- [11] Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights [J]. *Science*, 2011, 332(6037): 1519-1523.
- [12] Lu X, Yuan ZY, Yan XJ, et al. Effects of *Angelica dahurica* on obesity and fatty liver in mice [J]. *Chin J Nat Med*, 2016, 14(9): 641-652.
- [13] Fernandez-Miranda C, Perez-Carreras M, Colina F, et al. A pilot trial of fenofibrate for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Dig Liver Dis*, 2008, 40(3): 200-205.
- [14] 周玲丽, 曹骥, 李薇, 等. RNA 干扰 FABP5 基因对人肝癌 HepG2 细胞裸鼠移植瘤生长的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2015, 31(4): 603-608.

[收稿日期] 2017-02-19

(上接第 15 页)

- [3] 桑明, 代明, 周立, 等. 恒河猴外周血单核巨噬细胞体外培养方法的建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(1): 18-24.
- [4] Xue J, Fu C, Cong Z, et al. Galectin-3 promotes caspase-independent cell death of HIV-1-infected macrophages [J]. *FEBS J*, 2016, 284(1): 97-113.
- [5] 彭卓颖, 丛喆, 李想, 等. 不同方法诱导 THP-1 细胞分化效果比较 [J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27(9): 1-7.
- [6] 吴芳新, 王卫, 丛喆, 等. 艾滋病猴特异性细胞免疫的胞内细胞因子检测方法优化与应用 [J]. *中国实验动物学报*, 2012, 20(1): 18-23.
- [7] Martínez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment [J]. *F1000Prime Rep*, 2014, 6: 13.
- [8] Mantovani A, Sica A, Sozzani S, et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization [J]. *Trends Immunol*, 2004, 25(12): 677-686.
- [9] 张苗苗, 梁雪, 杨荣存. LPS 刺激下 miR-17 和 miR-20a 对小鼠巨噬细胞 CD80、CD86 表达的影响 [J]. *南开大学学报自然科学版*, 2012(6): 12-16.
- [10] 任建敏, 张彦洁, 王俊青, 等. DC-SIGN 固有免疫调节及其表达调控机制研究进展 [J]. *生命科学*, 2012(10): 9-15.
- [11] De Libero G, Mori L. How the immune system detects lipid antigens [J]. *Prog Lipid Res*, 2010, 49(2): 120-127.
- [12] 徐魁, 周云. HLA-DR、CD40 和 CD1a 在桥本甲状腺炎甲状腺滤泡上皮中的表达 [J]. *湖北科技学报(医学版)*, 2011, 25(6): 480-482.
- [13] Homell TMI, Beresford GW, Bushey A, et al. Regulation of the class II MHC pathway in primary human monocytes by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor [J]. *J Immunol*, 2003, 171(5): 2374-2383.

[收稿日期] 2017-04-12