

·基础研究·

低浓度三氯乙烯诱发 L-02 肝细胞蛋白质组异常表达

黄海燕, 庄志雄, 刘建军, 李习艺, 卫秦芝, 杨晓华
(中山大学公共卫生学院预防医学系, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】研究低剂量三氯乙烯对人 L-02 肝细胞蛋白质表达谱的影响, 以助于阐明三氯乙烯引起细胞早期应答反应的分子机制。【方法】L-02 肝细胞暴露于低剂量(3 $\mu\text{mol/L}$)三氯乙烯 24 h 后, 提取细胞总蛋白, 双向电泳分离蛋白质, 软件分析凝胶图像, 基质辅助激光解吸电离飞行时间串联质谱(MALDI-TOF-TOF-MS)对相关异常变化斑点进行鉴定。【结果】和对照组比较, 低剂量三氯乙烯处理后 L-02 肝细胞蛋白质表达发生改变, 初步鉴定出 7 个差异蛋白。低剂量三氯乙烯刺激后, 上调的蛋白有核糖体样蛋白(similar to ribosomal protein)和 SET protein, 下调的蛋白有异柠檬酸脱氢酶(isocitrate dehydrogenase, NADP)和腺苷二磷酸-核糖基化因子鸟苷酸因子 6 (ADP-ribosylation factor guanine nucleotide factor 6), 微管-肌动蛋白交叉连接因子 1 (microtubule-actin crosslinking factor 1) 特异表达, 肽基脯氨酰顺-反异构酶 PPI (peptidyl prolyl cis/trans isomerase) 缺失。【结论】低剂量的三氯乙烯处理后, L-02 肝细胞中的蛋白表达谱发生明显变化, 这为三氯乙烯毒作用机制的进一步研究提供了线索。

关键词: 三氯乙烯; 双向凝胶电泳; 蛋白质组

中图分类号: R136.3*2

文献标识符: A

文章编号: 1672-3554(2005)05-0488-05

Abnormal Expression of Proteome in L-02 Liver Cells Treated with Low Concentration of Trichloroethylene

HUANG Hai-yan, ZHUANG Zhi-xiong, LIU Jian-jun, LI Xi-yi, WEI Qin-zhi, YANG Xiao-hua
(School of Public Health of SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the effects of low concentration of trichloroethylene (TCE) on the expression of proteins in L-02 cells, and to study the possible molecular mechanisms of early cellular response induced by TCE. 【Methods】 After L-02 liver cells treated with 3 $\mu\text{mol/L}$ TCE for 24 h, the proteomic expression of L-02 liver cells were analyzed by 2-D electrophoresis and the differentially expressed protein spots were identified by matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-TOF-MS). 【Result】 Seven changed proteins in L-02 liver cells treated with low TCE were identified by MALDI-TOF-TOF-MS. Among these 7 proteins, the expression of similar to ribosomal protein and SET protein was upregulated, while, isocitrate dehydrogenase [NADP] and ADP-ribosylation factor guanine nucleotide factor 6 were downregulated; microtubule-actin crosslinking factor 1 was expressed specifically, peptidyl prolyl cis/trans isomerase disappeared. 【Conclusion】 The proteome expression appeared to be significantly changed in L-02 liver cells treated with low concentration of TCE, which would be a hint for further study of toxic mechanism of TCE.

Key words: trichloroethylene (TCE); two-dimensional electrophoresis; proteome

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2005, 26 (5):488- 492]

近年, Science 杂志上发表了多篇关于“兴奋性效应”的文章, 使低剂量生物效应成为 2003 年颇受关注的事件。而现实生活中机体接触环境污染物(ECPs)的方式多是长时间、低水平的接触, 这

种接触方式可能产生与高剂量接触不同的生物效应。研究低剂量环境污染物作用下机体的毒物兴奋效应, 有助于全面深入了解毒物与机体之间的相互作用, 从而评价更接近实际条件下的暴露剂

收稿日期: 2005-03-29

基金项目: 国家“973”计划基金资助项目(2002CB512904); 广东省自然科学基金资助项目(34970)

作者简介: 黄海燕(1978-), 女, 安徽安庆人, 硕士生, 020-87331817. 庄志雄, 教授, 通讯作者. E-mail: zxhuang@hotmail.com

量对机体的毒性效应,减少从高剂量向低剂量外推时不肯定性带来的误差。三氯乙烯(trichloroethylene, TCE)是工业上广泛应用的一种有机溶剂,主要作为金属表面脱脂剂、冷冻剂等,可经呼吸道、消化道和皮肤吸收。TCE具有三致(致癌、致畸、致突变)作用及免疫毒性,对肝脏、心脏及肾脏等实质脏器产生损害,并能引起严重的职业性药疹样皮炎^[1]。本研究拟以三氯乙烯为研究对象,利用蛋白质组学核心技术双向电泳(2-DE)和质谱技术分析及鉴定低剂量三氯乙烯作用后的差异蛋白,探讨三氯乙烯作为一种环境毒物在低剂量刺激时的作用,为建立正确的环境污染物的危险度评价体系提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料及仪器

L-02 肝细胞,购自中国科学院上海细胞生物学研究所;三氯乙烯(trichloroethylene, TCE),Sigma公司,纯度 99.5%;RPMI-1640 培养基(GIBCO),胎牛血清(杭州四季青),胰酶、TEMED(美国 BBI 公司),缓冲液、IPG 干胶条(pH4~7L, 13 cm)、蛋白质相对分子质量 $M_r=(97.0\sim 14.4)\times 10^3$ (瑞典安玛西亚),其它试剂均为国产分析纯;Nu-425-300E 型生物安全柜(美国 TIL NJAJRE 公司),Model3550 型全自动酶标仪(美国伯乐公司),5415R 型台式高速冷冻离心机(德国艾本德公司),IPG phor 等电聚焦仪、SHE600 垂直电泳仪、高精度扫描仪、Image Master 2D 4.10 凝胶分析软件均为瑞典安玛西亚公司产品,蛋白质组全自动分析系统为美国 ABI 公司产品)。

1.2 细胞培养及处理

L-02 肝细胞在含有体积分数 15%的胎牛血清、1000 U/mL 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 RPMI-1640 完全培养基(CM)中传代培养,待其融合度至约 80%时,进行 TCE 染毒。用二甲基亚砜(DMSO)溶解 TCE,其中 DMSO 体积分数为 0.5%。

1.3 细胞总蛋白制备

细胞培养至融合度为 70%~80%时,进行 TCE 处理,剂量为 3 $\mu\text{mol/L}$,该剂量参照本实验室前期工作,主要通过 MTT 法观察细胞增殖来确定,同时采用溶剂 DMSO 作为对照。染毒时将受试物加至新鲜无血清培养基混合均匀后,替换细胞瓶内的旧培养基,继续培养 24 h 后,弃去培养基,醋酸镁缓冲液(100 mmol/L Tris, 5 mmol/L 醋酸镁)洗涤 3~4 次。加入 0.5 mL 细胞裂解液(7 mol/L 尿素, 2

mol/L 硫脲, 4 g/L CHAPS, 10 mmol/L Tris),冰上裂解 30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$,离心 1 h 后取上清,用适量丙酮沉淀蛋白,加入少量的去离子纯水及适量重悬液(7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 2 g/L CHAPS)重悬,并用 2-D Quant Kit 蛋白质定量试剂盒进行蛋白定量。样品于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.4 双向凝胶电泳

参照刘建军等人的方法^[2]及 IPGphorTM 等电聚焦系统程序指南,将两组蛋白双向电泳,总蛋白上样量为 90 μg ,对照组和染毒组细胞蛋白平行进行双向电泳,各重复 4 次。

1.5 双向电泳的图像采集与分析

采用改进的与质谱兼容的银染方案进行银染^[3]。染色后凝胶扫描仪透射扫描,ImageMaster 2D 4.10 软件分析,对蛋白质点进行检测包括量化、背景扣除、量的归一化及点的匹配(match)。

1.6 MALDI-TOF-TOF-MS 串联质谱分析及数据库检索

切取不同批次胶上重复性较好的差异表达蛋白点,去离子水清洗,50 mmol 碳酸氢铵(NH_4HCO_3) + 体积分数 50%乙腈脱色,纯乙腈(CAN)干胶,测序级胰酶 37 $^{\circ}\text{C}$ 酶解过夜,体积分数 0.1%三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA) + 体积分数 50%乙腈提取肽段,氮气吹干,点样,取 0.8 μL 5 mg/ml 基质溶液(溶于体积分数 10%TFA + 体积分数 50%乙腈)覆盖样品,空气中自然干燥后分别进行肽质量指纹图谱(PMF)及 MALDI-TOF-TOF-MS 串联质谱分析鉴定,以基质峰和胰酶自切峰做内标进行校正。所得的图谱使用 ABI 公司的 GPS 软件检索,以 MASCOT 为搜索引擎, IPI human 数据库搜索。

2 结果

2.1 比较对照组和低剂量 TCE 染毒组 L-02 肝细胞蛋白双向电泳

对照组和 TCE 染毒组的 L-02 肝细胞蛋白质双向电泳图谱中差异蛋白点,见图 1、2。

在相同条件下, DMSO 和 TCE 处理的 L-02 肝细胞总蛋白样品分别进行 4 次双向电泳对分辨率较高的区域进行分析,结果发现:对照组检测到(600 \pm 66)个蛋白点,平均匹配的蛋白点为 493 个,平均匹配率为 82.12%; TCE 染毒组检测到(630 \pm 77)个蛋白点,平均匹配的蛋白点为 506 个,平均匹配率为 80.35%。上述结果显示蛋白质双向电泳具有较好的重现性。细胞蛋白质等电点和相对分

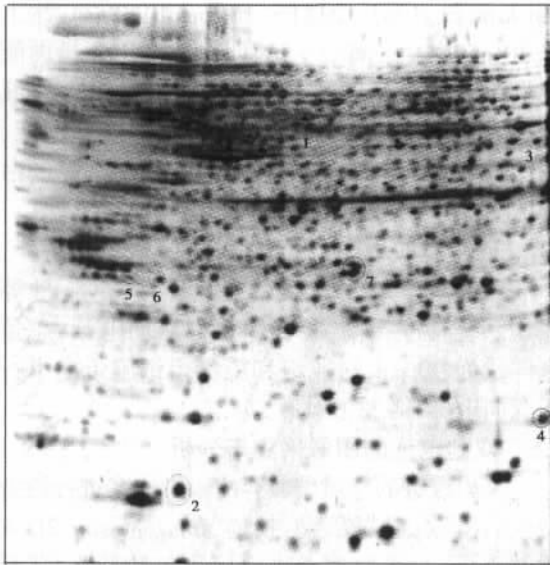


图 1 对照组 L-02 肝细胞总蛋白双向电泳图谱及其差异蛋白

“1、2、3、4、5、6、7”标示差异表达蛋白斑点

Fig.1 The map of protein expression and the changed proteins in L-02 cells in the control

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 : the labels of the differentiated protein spots

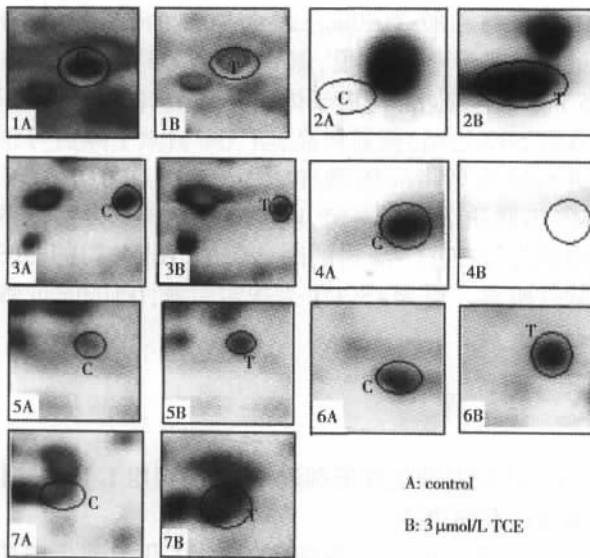


图 2 质谱鉴定的差异蛋白在两组之间的比较
Fig.2 The changed proteins identified by MALDI-TOF-TOF-MS in the two groups

子质量分布范围很广, 但多数集中于等电点为 4.5~6.6, M_r 为 97 000~25 000 的区域。

2.2 TCE 染毒 L-02 肝细胞蛋白质表达变化及质谱鉴定

通过 ImageMaster 2D 5.10 凝胶分析软件, 对

两组图谱进行比较, 挑取明显差异蛋白点(图表)进行质谱鉴定, 鉴定出其中 7 种蛋白, 得出的肽质量指纹图谱(PMF)图 3(仅列出 ADP-ribosylation factor guanine nucleotide factor 6)。

其他蛋白由于无法得到好的肽指纹图谱或数据库搜索时无法得到可信度较高的结果而未能鉴定。鉴定结果见表 1。

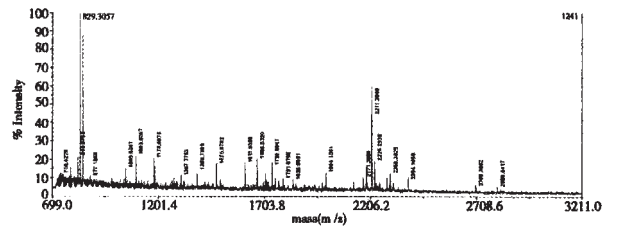


图 3 ADP-ribosylation factor guanine nucleotide factor 6 的肽质量指纹图谱

横轴: 蛋白斑点电离出的各肽段的质/荷比

纵轴: 左-峰值的相对强度, 最高峰为 100; 右-最高峰的绝对值

Fig.3 The PMF map of ADP-ribosylation factor guanine nucleotide factor 6

X axis: the m/z of ionized peptide; Y axis: left-relative intensity of the highest peak; right-absolute value of the highest peak

表 1 肽指纹谱和 MALDI-TOF-TOF-MS 串联质谱鉴定的蛋白质

Table 1 The identified proteins by PMF and MALDI-TOF-TOF-MS

Spot ID	Control (DMSO)	TCE-treated ¹⁾	protein name	Sequence cover (%)
1	1.00	-5.367	ADP-ribosylation factor Guanine nucleotide factor 6	22
2	-	new	Microtubule-actin crosslinking factor 1	9
3	1.00	-3.214	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	47
4	1.00	-	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (PPI)	42
5	1.00	2.605	Hypothetical protein XP_376765	22
6	1.00	2.585	Similar to ribosomal protein	38
7	1.00	4.501	Q01105 SET protein	31

1) relative quantity of change

3 讨论

蛋白质组学是后基因时代的一个热点领域, 它从全局的角度研究蛋白质表达水平的改变, 翻译后的修饰及相互作用, 为阐明基因功能和生物体的生命活动规律提供了强有力的工具。以双向凝胶电泳作为分离技术和质谱作为鉴定技术的蛋白质组学的方法是目前用于研究蛋白表达水平改变的最有效手段。如何确定化学物在低剂量下的

生物学效应, 毒物的效应如何从高剂量向低剂量外推, 是长期以来困扰毒理学自身的难题之一。2003 年, Calabrese 等^[4]提出双向或多向的曲线剂量反应模型 (hormetic dose-response model) 才是毒理学中更接近真理的基本原理, 立即在毒理界引起了广泛重视。细胞兴奋效应是确实存在的一种生物学现象, 表现为在最初的抑制性反应之后, 对动态平衡破坏后的一种适度补偿。早在 19 世纪就在动物实验中发现了毒物兴奋效应, 毒物兴奋效应对低剂量条件下的剂量-反应关系的一种更科学、更精确的描述^[5], 该效应的剂量-反应关系应被广泛应用于毒理学的危险度评价, 并会对毒理学和风险评定产生深远影响^[6,7], 在危险度评价中如何评定低剂量暴露的影响是最近研究的热点。

本研究采用 3 $\mu\text{mol/L}$ TCE 作为该研究的剂量, 主要是参照前期 MTT 法试验结果。与溶剂对照组相比, 3 $\mu\text{mol/L}$ TCE 作用 L-02 肝细胞 24 h 未见明显的细胞增殖改变, 细胞形态变化不大, 故选用 3 $\mu\text{mol/L}$ TCE 作用 L-02 肝细胞 24 h 进行研究, 探讨低剂量三氯乙烯的作用机制, 推测其对在细胞损伤和保护中的可能作用。本试验利用蛋白质组学方法对低剂量三氯乙烯处理后的 L-02 肝细胞总蛋白进行分析, 并初步鉴定了 7 个表达异常的蛋白 (表 1), 主要有微管-肌动蛋白交叉连接因子 (microtubule-actin crosslinking factor-1, MACF1)、异柠檬酸脱氢酶 (isocitrate dehydrogenase, NADP)、肽基脯氨酰顺-反异构酶 (peptidyl prolyl cis/trans isomerase, PPI) 等。

低剂量 TCE 仍表现部分毒性, 可解释 TCE 中毒的部分临床表现与 TCE 的接触剂量无关。三氯乙烯刺激后, MACF1 表达, 其主要参与微管和肌动蛋白的连接, 推测 TCE 通过引起微管和肌动蛋白的异常连接, 导致细胞骨架破坏, 改变细胞形态, 使其具有侵蚀组织及向周围及远处转移的能力^[8], 从而与其致癌相关。PPI 广泛分布于各种生物体及组织中, 它是一种折叠酶, 调节细胞内蛋白质的折叠和聚集平衡, 并在体外促进蛋白质的折叠复性^[9]。三氯乙烯作用后, 肽酰-脯氨酰顺-反异构酶消失, 蛋白产物的折叠异常, 不能实现正常的转位、转运或分泌, 使某些蛋白不能到达生理位置执行正常的功能, 表现异常。低剂量三氯乙烯作用后, NADP 表达下调。文镜, 金宗濂等^[10]推测引起恶性肿瘤细胞强烈糖酵解作用的原因之一是其三羧酸循环受到抑制, 可能与其致癌作用相关; 异柠檬酸脱氢酶表达降低也可引起 NADH 的减少, 降低肝脏解毒功能, 产生毒性。

本研究发现低剂量三氯乙烯诱导异常表达的蛋白中, 部分参与机体保护。SET protein, 磷酸酶 2A 抑制剂, 涉及细胞凋亡、转录、核小体组装, 而磷酸酶 2A 与神经变性疾病和肿瘤有关^[11]。低剂量三氯乙烯诱导该蛋白表达上调, 这说明较小剂量的三氯乙烯可能通过促进转录及受损细胞凋亡维持机体稳定。Neumann^[12]研究显示, 类核糖体样蛋白 (similar to ribosomal protein) 表达可使细胞停滞在 G1 期诱导细胞凋亡, Ruggero 等^[13]发现核糖体功能失调能导致肿瘤形成。低剂量 TCE 增加该蛋白表达, 使得变异细胞凋亡, 参与机体保护。日本 Shimizu 等^[14]报道, 肝细胞癌 (HCC) 组织中多聚二磷酸腺苷 (ADP) 核糖基化和多聚 (ADP 核糖) 聚合酶 (PARP) 表达增加。并有研究表明人 HCC 组织中有数种蛋白质发生 ADP 核糖基化, 低剂量三氯乙烯刺激后 ADP-ribosylation factor guanine nucleotide factor 6 (ADP-核糖基化因子), 表达降低, ADP 核糖基化减少, 推测三氯乙烯诱发肝癌与其剂量有关, 低剂量 TCE 还可能通过减少 ADP 核糖基化, 抑制其致癌。

应用蛋白质组研究技术不仅可以高通量发现外源性物质引起变化的蛋白质, 为阐明其毒性机理奠定基础, 而且可以通过特异性蛋白作为毒性预测和安全评价的生物标志物。本研究鉴定这些蛋白为认识 TCE 中毒机理提供线索, 也可能作为疾病诊断的分子标志, 为早期发现和防治 TCE 中毒提供依据, 同时也为三氯乙烯的危险度评价提供参考。

参考文献:

- [1] 胡明霞. 三氯乙烯的毒理学研究新进展 [J]. 国外医学卫生学分册, 2001, 28(3): 155-8.
- [2] 刘建军, 房树松, 李习艺, 等. 蛋白质组研究技术平台的建立-双向电泳条件的建立和优化 [J]. 卫生研究, 2004, 33(3): 327-30.
- [3] Gharahdaghi F, Weinberg C, Meagher D. Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity [J]. Electrophoresis, 1999, 20(3): 601-5.
- [4] Calabrese E J, Baldwin L A. Toxicology rethinks its central belief [J]. Nature, 2003(6924): 691-2.
- [5] 戴宇飞, 郑玉新. 毒理学中心法则的重新审视——毒物兴奋性剂量-反应关系及其对毒理学发展的影响 [J]. 国外医学卫生学分册, 2003, 30(4): 246-9.
- [6] Calabrese E J. Toxicological awakenings: the rebirth of hormesis as a central pillar of toxicology [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2005, 204(1): 1-8.

- [7] Calabrese EJ. Hormesis--basic, generalizable, central to toxicology and a method to improve the risk-assessment process [J]. *Int J Occup Environ Health*, 2004, 10(4): 466-7.
- [8] 宋今丹. 医学细胞分子生物学[M]. 人民卫生出版社, 北京: 2003. 265-6.
- [9] Thomas JG, Ayling A, Baneyx F. Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. Coli*: to fold or refold [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 1997, 66(3): 197-238.
- [10] 文 镜, 金宗濂. 肝癌细胞能量代谢中三种酶活力的比较研究[J]. 北京联合大学学报, 1996, 10(2): 19-22.
- [11] Liu WJ, Shen Y, Ding J. Protein phosphatase 2A: its structure, function and activity regulation [J]. *Acta Biochim Poloni*, 2001, 44(4): 921-33.
- [12] Neumann F. Constitutive expression of human ribosomal protein L7 arrests the cell cycle in G1 and induces apoptosis in Jurkat T-lymphoma cells [J]. *Exp Cell Res*, 1997, 230(2): 252-61.
- [13] Ruggero D, Grisendi S, Piazza F, et al. Dyskeratosis congenita and cancer in mice deficient in ribosomal RNA modification [J]. *Science*, 2003, 299(5604): 259-62.
- [14] Shimizu S, Nomura F, Tomonaga T et al. Expression of poly (ADP-ribose) polymerase in human hepatocellular carcinoma and analysis of biopsy specimens obtained under sonographic guidance [J]. *Oncol Rep*, 2004, 12(4): 821-5.

(编辑 张敏瑞)

(上接 487 页 from page 487)

- [30] 张 敏, 宗永生, 何洁华, 等. EB 病毒感染及 30 bp 缺失潜伏膜蛋白 1 基因在鼻咽部癌不同组织学类型中的比较 [J]. *中华病理学杂志*, 2003, 32(4): 342-6.
- [31] 林素暇, 宗永生, 张 敏, 等. 广州地区鼻咽非角化性癌中 EB 病毒 LMP1 基因的突变热点 [J]. *中华病理学杂志*.. (已投寄).
- [32] 韩安家, 宗永生, 张 敏, 等. 鼻咽癌中 EB 病毒 BamH1“f”变异和潜伏膜蛋白 1 基因 Xho1 缺失型的分析 [J]. *中华病理学杂志*, 2003, 32(6): 534-8.
- [33] Lin SX, Zong YS, Wu QL, et al. Loss of an Xho1-site within N-terminal region of Epstein-Barr virus LMP1 gene in nasopharyngeal carcinoma (Article in English) [J]. *癌症*, 2003, 22(11): 1147-51.
- [34] Lung ML, Lam WP, Sham J, et al. Detection of prevalence of the “f” variant of Epstein-Barr virus in Southern China [J]. *Virology*, 1991, 185(1): 67-71.
- [35] 宗永生, 张汝逢, 陈灼怀, 等. 鼻咽癌治疗前 EB 病毒 EA-IgG 滴度测定 [J]. *中华医学杂志*, 1980, 66(8): 488-9.
- [36] 张昌卿, 宗永生, 黄宝珍, 等. 提高 EB 病毒血清学在诊断鼻咽癌中的效益 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2002, 24(4): 356-9.
- [37] 张昌卿, 宗永生, 孙 韵, 等. 联合检测 EBNA1-IgA 和 EA-IgG 在鼻咽癌血清学诊断中的价值 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2004, 26(8): 482-4.
- [38] 张 玉, 张昌卿, 宗永生, 等. 酶联免疫吸附法检测血清 VCA-IgA 和 EA-IgA 诊断鼻咽癌 [J]. *广东医学*, 2003, 24(4): 371-3.
- [39] Mai SJ, Zong YS, Zhang M, et al. Detection of Epstein-Barr virus DNA in plasma/serum: a useful serological indicator for diagnosis of nasopharyngeal carcinoma [J]. *Chin Med J Engl*. 2002, 115(12): 1895-7.
- [40] 买世娟, 宗永生, 张 敏, 等. 血浆/血清 EB 病毒 DNA 检测在鼻咽癌血清学诊断中的价值 [J]. *中华国际医学杂志*, 2002, 2(3): 189-92.
- [41] Hu WW, Zong YS, Li FP, et al. Comparison of six antibody assays against Epstein-Barr virus for serodiagnosis of nasopharyngeal carcinoma [J]. *Chin Med J Engl* (Submitted).
- [42] 李锦添, 宗永生. 鼻咽癌的病理改变与血清中 EB 病毒 VCA-IgA 抗体滴度的关系 [J]. *中华病理学杂志*, 1986, 15(2): 122-5.
- [43] Gu YL, Zhang CQ, Ng SP, et al. Study on sero-diagnosis of nasopharyngeal carcinoma using a dual antibody test against recombinant Epstein-Barr virus antigens [J]. *癌症*, 2003, 22(9): 903-6.
- [44] 宗永生. 鼻咽癌病理学研究. *中华病理学杂志* [J], 2003, 32(1): 65-8.
- [45] Chan KH, Gu YL, Ng F, et al. EBV specific antibody-based and DNA-based assays in serologic diagnosis of nasopharyngeal carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2003, 105(5): 706-9.

(编辑 黄小延)