

# 先天性马蹄内翻足胎鼠脊髓组织的蛋白质组学分析

纪虹 李增刚 富伟能 孙开来

**【摘要】** 目的 在构建动物模型的基础上,运用蛋白质组学实验方法,寻找马蹄内翻足畸形相关蛋白。方法 提取单纯性马蹄内翻足畸形胎鼠及正常对照胎鼠脊髓总蛋白,进行双向电泳,经 PDQuest 软件分析,选择差异点进行质谱鉴定,采用生物信息学方法分析结果。结果 经双向电泳分离后,畸形胎鼠与正常对照组相比,脊髓组织的烯醇化酶没有表达,微管蛋白表达下调,载脂蛋白表达上调,ATP 合酶 F1 复合体组装因子 2 (Atp12p) 额外表达。结论 畸形胎鼠脊髓组织与正常对照组比较,存在蛋白质组差异,畸形胎鼠微管蛋白、Atp12p 表达改变,可能与马蹄内翻足畸形相关。

**【关键词】** 马蹄内翻足; 蛋白质组; 模型; 动物; 脊髓

**Proteomic Analysis of Spinal Cord in Rat Fetus with Talipes Equinovarus** Ji Hong, Li Zeng-gang, Fu Wei-neng, Sun Kai-lai. (Department of Medical Genetics, China Medical University, Shenyang 110001, P. R. China) Corresponding author: SUN Kai-lai. E-mail: klsun@vip.sina.com

**【Abstract】 Objective** By establishing rat fetuses talipes equinovarus model induced by all-trans-retinoic acid and the proteome technique, to identify the particular proteins in the pathogenesis of talipes equinovarus (clubfoot)-like deformities. **Methods** Pregnant rats were given all-trans-retinoic acid  $135\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  at 10th of gestation by a single intragastric infusion. Spinal cord were removed from rat fetus at 21st of gestation. Proteins were extracted with lysis solution ( $5\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  urea,  $2\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  thiourea, 2% CHAPS, 2% SB3-10,  $40\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris, 0.2% Bio-Lyte 3-10),  $20\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$  tissue. For two dimensional electrophoresis, immobilized pH gradient gel (IPG, pH 3-10 and pH 5-8) isoelectric focusing was set as the first dimension, while 12% SDS polyacrylamide gel electrophoresis as the second dimension. Loaded sample sizes were  $1.0\text{mg}$  ( $350\mu\text{L}$ ) for each pH 3-10 IPG strip and pH 5-8 IPG strip. Following electrophoresis, gels were stained with Coomassie brilliant blue. The images were analyzed with a PDQuest 7.1.0 software package. Spots with significant differences were subjected to mass spectrometry analysis. The peptide mass fingerprints were identified with protein databases by using bioinformatics. **Results** Compared with those of the normal controls, a total of six protein spots among the samples of model rat fetus showed significant differences. And peptide mass fingerprints were acquired for five among them. As follows: the model rat fetus losing the spot of enolase has the extra expression of ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 2 (Atp12p); the expression of tubulin increasing and apolipoprotein decreasing. **Conclusion** Proteomic difference between model and normal rat fetus can be well presented with 2D electrophoresis. Expression change of tubulin and Atp12p may be related to the pathogenetic mechanisms of talipes equinovarus.

**【Key words】** Talipes equinovarus; Proteome; Model, animal; Spinal cord

先天性马蹄内翻足 (congenital talipes equinovarus, congenital clubfoot, CCF) 是儿童常见的一种严重影响足功能的先天畸形, 发病率约为  $0.064\% \sim 0.8\%$ , 男女之比约为  $2.0 \sim 2.5:1$ <sup>[1]</sup>, 在活产胎儿中发生率约为  $1\%$ , 双侧同时发病占  $50\%$ , 右足多于左

足。其发病机制存在多种学说, 在神经、肌肉、骨骼、软骨及软组织方面均有病理改变。

由于患儿标本难以取材, 并且存在加重足部损伤的风险; 而全反式维甲酸 (all trans-retinoic acid, ATRA) 可以诱发包括马蹄内翻足样畸形在内的多种畸形<sup>[2]</sup>。因此本研究在 ATRA 诱导动物模型的基础上, 采用双向电泳和质谱测定及生物信息学鉴定分析, 探讨与马蹄内翻足畸形相关的蛋白质。

基金项目: 国家重点基础研究发展规划资助项目 (No. 2001CB510301)

作者单位: 110001 沈阳, 中国医科大学医学遗传学研究室

通讯作者: 孙开来 (E-mail: klsun@vip.sina.com)

## 1 材料与方法

### 1.1 材料:

1.1.1 动物 Wistar 大鼠, 鼠龄 70 ~ 90d, 体重 220 ~ 230g, 雌雄比例 3:1, 清洁级, 由中国医科大学实验动物部提供。

1.1.2 试剂 全反式维甲酸、超纯尿素、低熔点琼脂糖均购自 Sigma 公司, 双向电泳所需试剂均购自 BioRad 公司。低相对分子质量标准蛋白质购自中科院上海生化所。

1.1.3 仪器 PROTEAN IEF Cell 等电聚焦仪、PROTEAN plus Dodeca™ Cell 垂直电泳槽、Power PAC 200 电泳仪、PDQuest7.1.0 分析软件均系 BioRad 公司产品, PowerLook III 扫描仪系 Umax 公司产品。

1.1.4 溶液 平衡液: 母液为  $0.375\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris · HCl (pH 8.8), 20% (V/V) 甘油,  $6\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  尿素, 2% SDS, 每瓶 10mL 分装,  $-20^\circ\text{C}$  保存。用前每瓶加 DTT 0.2g 作为平衡液 I, 加碘乙酰胺 0.25g 作为平衡液 II。水化上样缓冲液:  $3\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  尿素, 4% CHAPS, 每瓶 1mL 分装,  $-20^\circ\text{C}$  保存。用前每瓶加 DTT 0.01g, Bio-Lyte 3 ~ 10  $5\mu\text{L}$ 。

### 1.2 方法:

1.2.1 马蹄内翻足模型大鼠的建立及样品制备 模型大鼠的建立方法参照文献 [3], 样品制备方法参照文献 [4], 用 Bradford 法对蛋白质定量, 留做下一步使用, 或放入  $-20^\circ\text{C}$  保存。

1.2.2 等电聚焦与 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 每根 IPG 胶条上样量为 1.0mg,  $350\mu\text{L}$ 。体积不足补加水化上样缓冲液。使用 PROTEAN IEF 等电聚焦仪, 主动水化模式。等电聚焦后的胶条要经过两次平衡。平衡液 I 和 II 在使用前由母液新鲜配制。胶条以 5mL 平衡液 I 平衡 15min, 水洗 1 次, 5mL 平衡液 II 平衡 15min, 再用电泳缓冲液冲洗 1 次后转移到胶板上, 使其下缘紧贴胶面。胶条一侧放入低相对分子质量标准蛋白, 低熔点热琼脂糖封胶, 待琼脂糖完全凝固后放入电泳槽中电泳, 30V, 30min 后加电压到 120V, 待溴酚蓝指示剂达到玻璃板边缘时即可停止电泳。

1.2.3 染色、图像采集及分析 固定 4h, 染色<sup>[5]</sup>, 脱色至背景清亮, 20% 乙醇中保存。为保证研究的准确性, 每个样品的双向电泳过程至少重复 3 次。扫描凝胶并进行图像分析。

1.2.4 质谱鉴定和生物信息学分析 手工切取差

异点, 差异点选取原则为斑点清楚, 具有重复性, 肉眼可见, 差异明显。质谱测定及数据分析由北京华大基因组研究所完成。

## 2 结果

2.1 胎鼠脊髓双向电泳结果: 对模型胎鼠和正常对照胎鼠脊髓组织的总蛋白质样品分别用 pH3 ~ 10 和 pH5 ~ 8 两种胶条进行双向电泳(2D)(见图 1)。经 pH3 ~ 10 分离的 2D 图谱, 可识别斑点数为  $367 \pm 38$ 。经 pH5 ~ 8 分离的 2D 图谱, 可识别斑点数为  $300 \pm 25$ 。从 pH3 ~ 10 图上可以看出蛋白质主要分布在 pH5 ~ 8 的范围内, 因此我们用 pH5 ~ 8 胶条进一步分离蛋白质, 所获得的斑点更清晰, 并适合手工切取, 实验中用于质谱分析的蛋白点均取自 pH5 ~ 8 电泳胶。

2.2 模型胎鼠与正常对照组胎鼠脊髓蛋白质差异分析: 模型胎鼠与正常对照胎鼠的蛋白点可分为匹配点(两者都存在的蛋白点)和未匹配点(仅出现在模型或者对照中的蛋白点)。pH3 ~ 10 的 2D 图谱中有 315 ~ 337 个蛋白点匹配, 其中模型胎鼠比正常胎鼠上调 5 倍以上的有 13 ~ 15 个; 下调 5 倍以上的有 15 ~ 17 个。仅存在于正常胎鼠的有 9 ~ 11 个点, 仅存在模型胎鼠的有 7 ~ 9 个点, pH5 ~ 8 的 2D 图谱有 298 ~ 319 个蛋白点匹配, 其中模型胎鼠比正常胎鼠上调 5 倍以上的有 8 ~ 10 个; 下调 5 倍以上的有 10 ~ 12 个。仅存在于正常胎鼠的有 9 ~ 11 个, 仅存在模型胎鼠的有 7 ~ 9 个。

2.3 差异蛋白质谱鉴定及分析结果: 最后选得界限清楚差异点 6 个(见图 2, 3)。S: 脊髓; C: 正常对照; O: 仅存在于模型或对照组; D: 模型; U: 上调 5 倍以上; SC03: 仅见于正常胎鼠; SD05、SD06: 仅见于模型胎鼠; SCU7、SCU8: 模型胎鼠下调 5 倍以上; SDU11: 模型胎鼠上调 5 倍以上。

经质谱检测, 获得了除 SD05 以外的 5 个点的肽质量指纹谱图。将质谱数据进行网络检索并综合分析后, 初步鉴定的差异点见表 1。

表 1 肽指纹图谱查询结果

Tab 1 Peptide mass-fingerprints search result

编号	数据库查询结果
SC03	烯醇酶
SD06	线粒体 ATP 合酶 F1 复合体组装因子 2, Atp12p
SCU7 SCU8	微管蛋白 $\beta$ 链
SDU11	载脂蛋白 A-I

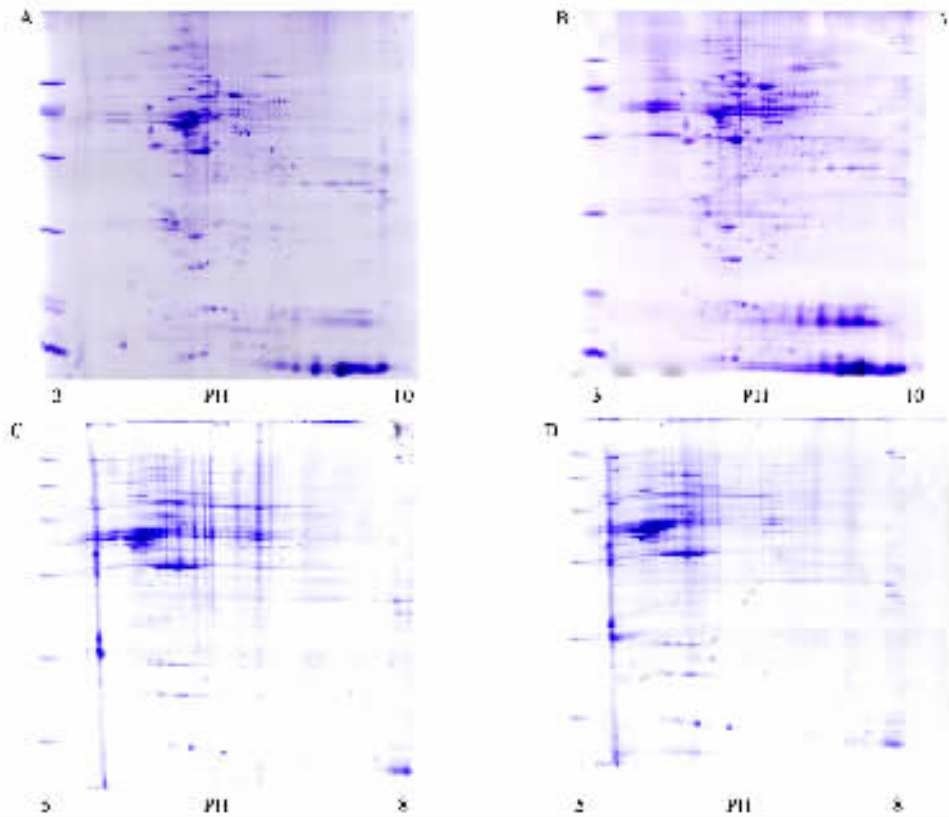


图 1 21天胎鼠脊髓组织蛋白质组的双向电泳图

Fig.1 Two-dimensional gel images of 21d *Wistar* rat fetus spinal cord proteome

一向等电聚焦采用 IPG 胶条 二向 SDS-PAGE 电泳在 12% 的聚丙烯酰胺胶(20cm × 20cm)上进行,考马斯亮兰 R-250 染色。A :IPG pH 3 ~ 10 , 正常对照胎鼠 ;B :IPG pH 3 ~ 10 模型胎鼠 ;C :IPG pH 5 ~ 8 , 正常对照胎鼠 ;D :IPG pH 5 ~ 8 模型胎鼠。

Isoelectric focusing was performed on Immobiline Dry Strip , the second dimension SDS-PAGE was performed on 12% acrylamide gels(20cm × 20cm) . Proteins were visualized by Coomassie brilliant blue R-250 staining. A :Immobiline Dry Strip pH 3 ~ 10 , normal rats ;B :Immobiline Dry Strip pH 3 ~ 10 , model rats ; C : Immobiline Dry Strip pH5 ~ 8 , normal rats ; D : Immobiline Dry Strip pH5 ~ 8 , model rats

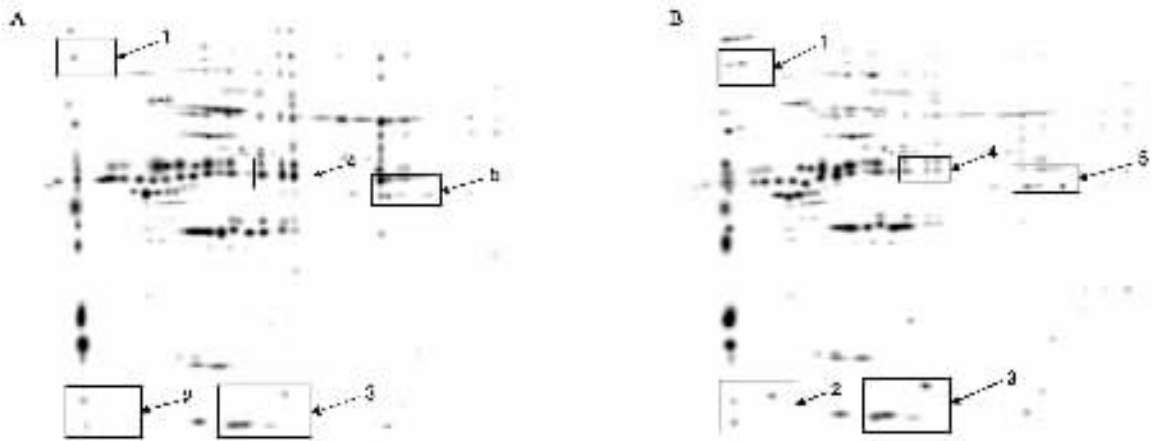


图 2 21天胎鼠脊髓组织蛋白质组的高斯模式图

Fig.2 Gaussian image of 21d *Wistar* rat fetus spinal cord proteome

A :IPG pH 5 ~ 8 , 正常对照组胎鼠 ;B :IPG pH 5 ~ 8 模型胎鼠。

A : Immobiline Dry Strip pH 5 ~ 8 , normal rats ; B : Immobiline Dry Strip pH 5 ~ 8 , model rats.



图 3 差异蛋白点放大图

Fig. 3 Differential protein spots under magnification

### 3 讨论

3.1 模型胎鼠与正常对照组胎鼠脊髓组织蛋白质组的比较分析:表达蛋白质组学是现今应用最为广泛的蛋白质组学研究模式。该策略的技术路线主要是通过双向凝胶电泳建立蛋白质组图谱、用专业图像扫描分析软件进行图像分析、通过质谱及蛋白质组学数据信息处理技术进行蛋白质的鉴定与分析。作者在本实验中采用 2DE-MS 的经典方法,开展模型胎鼠和正常对照胎鼠脊髓组织的蛋白质组学分析。从 2-D 图谱分析可以看出,许多蛋白点具有多倍上调或下调现象,另外有多个点仅在模型胎鼠或正常对照胎鼠出现,说明马蹄内翻足畸形的分子基础涉及脊髓组织多个蛋白质的变化。以往的研究发现 CCF 患者小腿肌肉各肌群运动终板和神经纤维存在着退变和再生,运动终板存在功能障碍,与一些神经源性疾病中的病理变化相一致。吉士俊等<sup>[6]</sup>通过对 23 例 CCF 患者足研究推测,CCF 患者小腿神经功能异常的可能性,结果导致足部肌群肌力不平衡。Handelsman 等<sup>[7]</sup>的研究也发现 CCF 患者小腿肌群肌纤维发育异常与神经系统有关。Delgado 等<sup>[8]</sup>通过胃管灌入维甲酸诱导胎鼠马蹄内翻足实验中发现除畸形诱导率达 86.5% 外,尚合并颅面骨发育障碍、神经管畸形、手畸形等其他畸形,同时脊髓胸腰段前角神经元减少,有较多前角细胞凋亡等病理变化,提示 CCF 畸形的产生与神经和脊髓发育有关。

3.2 差异蛋白质的分析:参照文献,我们成功构建了马蹄内翻足胎鼠动物模型。经过 2D 分离和质谱鉴定,有 4 个蛋白点在模型胎鼠和正常对照胎鼠中存在明显差异。下面我们将这 4 个蛋白分别叙述。鉴定的差异点之一 SCO3 为烯醇酶。该蛋白点仅见于正常对照胎鼠,模型胎鼠该蛋白点缺失。烯醇酶是参与糖酵解的关键酶,由  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  3 种亚基以二聚体形式组成,有 5 种同工酶。脑组织中有  $\alpha\alpha$ 、 $\alpha\gamma$ 、 $\gamma\gamma$  3 种同工酶, $\gamma\gamma$  型(NSE)特异地存在于神经元和神经内分泌细胞中,是脑组织病理改变过程中的标志蛋白<sup>[9]</sup>。NSE 是一种神经特异性蛋白,正常血液中

含量甚微。在颅脑损伤时,神经细胞损失及血脑屏障被破坏,被损失的神经细胞释放出 NSE,血液中 NSE 水平与颅脑损伤程度呈正比。

差异点之二 SDO6 为 Atp12p,即 ATP 合酶  $F_1$  复合体组装因子 2。该蛋白点仅在模型胎鼠中表达,而正常对照组胎鼠未见该蛋白。ATP 合酶即 ATP 酶是能量合成中的关键酶,由膜内的  $F_0$  亚基和膜外的  $F_1$  亚基两个部分组成,不同种系的  $F_0$  亚基有不同构成, $F_1$  亚基却在进化过程中高度保守<sup>[10]</sup>。 $F_1$  亚基由 5 种亚单位按比例结合而成  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ 。HSP60 和 HSP10 推动  $F_1$  的折叠,形成完整功能  $F_1$  的最后步骤中需要 Atp11p 和 Atp12p 这两个分子伴侣<sup>[11]</sup>。Atp11p 和 Atp12p 在真核生物中广泛保守,在很多组织中都有表达,据推测它们很可能是管家蛋白。Atp11p 与  $F_1$  亚基的  $\beta$  亚单位结合,Atp12p 与  $F_1$  亚基的  $\alpha$  亚单位结合,从而阻止在 ATP 酶组装过程中形成无功能的  $(\alpha_n\beta_n)$  复合体<sup>[12]</sup>。Atp12p 似乎只选择性的与未组装的  $\alpha$  亚单位结合,不与已组装到  $F_1$  亚基上的  $\alpha$  结合,有研究发现线粒体中的 Atp12p 的浓度与  $F_1$  中自由  $\alpha$  亚单位浓度一致。

研究发现维甲酸可以升高活性氧浓度,起到前氧化剂的作用。线粒体是活性氧(ROS)发挥作用的重要途径,当线粒体内产生大量 ROS 时,使线粒体膜孔道打开,导致 ROS 膜电位的破坏<sup>[13]</sup>,引起线粒体释放细胞凋亡起始因子和细胞凋亡蛋白酶激活因子-1(Apaf-1)激活半胱氨酰天冬氨酸酶(caspase)诱导凋亡。作者在研究中也发现模型胎鼠脊髓组织凋亡程度明显高于正常对照组<sup>[14]</sup>。

鉴定的差异点之三 SCU7 和 SCU8 都是微管蛋白  $\beta$  链。微管是细胞骨架中最粗的一种,呈中空的管状,主要成分是  $\alpha$  和  $\beta$  微管蛋白。细胞内的微管由 13 条原纤维按行定向排列组成中空的管状。 $\alpha$ 、 $\beta$  微管蛋白亚基横向形成非常规则的螺旋状结构。微管作为真核细胞的细胞骨架成分之一,在细胞分裂、运动、信号转导等方面起着重要作用<sup>[15]</sup>。正常细胞生长所必需的形态变化取决于细胞骨架通过黏附受

体与细胞外基质的物理作用。由微管蛋白聚集而成的微管是组成纺锤体的主要部分,抑制其聚集将导致细胞有丝分裂终止。微管正常聚合/解聚,装配/去装配的形态变化和平衡是细胞运动及细胞分裂周期的重要调控因素。

差异点之四 SDU11 为载脂蛋白。Reza 等<sup>[16]</sup>发现过量的维甲酸会升高大鼠 ApoA-I 的水平,因此该蛋白在模型胎鼠中的高表达可能与维甲酸有关。

综上所述,畸形胎鼠脊髓蛋白质组与正常对照胎鼠存在多种蛋白差异。在今后的工作中作者将进一步探讨 Atp12p 及微管蛋白与马蹄内翻足的关系。

### 参 考 文 献

- 1 Medzybrodzka Z. Congenital talipes equinovarus (club-foot): a disorder of the foot but not the hand. *J Anat*, 2003, 202: 37-42.
- 2 Collins FS, Mao GE. Teratology of retinoids. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1999, 39: 399-430.
- 3 Zhou HT, Sun KL, Li ZG, et al. Study on rat fetuses talipes equinovarus model induced by all trans-retinoic acid. *Chin J Public Health*, 2004, 20: 413-415.  
[周海涛,孙开来,李增刚,等.全反式维甲酸诱导大鼠胚胎马蹄内翻足模型.中国公共卫生,2004,20:413-415.]
- 4 Zhou HT, Sun KL, Fu WN, et al. Proteomic analysis of tibia-fibulae musculature in rat fetus with talipes equinovarus. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2005, 19: 289-295.  
[周海涛,孙开来,富伟能,等.马蹄内翻足胎大鼠胫骨后肌组织的蛋白质组学分析.中国药理学与毒理学杂志,2005,19:289-295.]
- 5 Neuhoff V, Arold N, Taube D, et al. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie brilliant blue G250 and R250. *Electrophoresis*, 1988, 9: 255-262.

- 6 Ji SJ, Chen Q, Zhang CP, et al. An etiological study on congenital clubfoot. *Chin J Pediatr Surg*, 1996, 17: 108-111.  
[吉士俊,陈秋,张成普,等.先天性马蹄内翻足病因学研究.中华小儿外科杂志,1996,17:108-111.]
- 7 Handelsman JE, Badalamente MA. Club foot: a neuromuscular disease. *Dev Med Child Neurol*, 1982, 24: 3-12.
- 8 Delgado-Baeza E, Santos-Alvarez I, Martos-Rodriguez A. Retinoic acid-induced clubfoot-like deformity: pathoanatomy in rat fetuses. *J Pediatr Orthop B*, 1999, 8: 12-18.
- 9 Ogata M, Tsuganezawa O. Neuron-specific enolase as an effective immunohistochemical marker for injured axons after fatal brain injury. *Int J Legal Med*, 1999, 113: 19-25.
- 10 Ackerman SH. Atp11p and Atp12p are chaperones for F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase biogenesis in mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1555: 101-105.
- 11 Hinton A, Gatti DL, Ackerman SH. The molecular chaperone, Atp12p, from *Homo sapiens*. In vitro studies with purified wild type and mutant (E240K) proteins. *J Biol Chem*, 2004, 279: 9016-9022.
- 12 Wang ZG, White PS, Ackerman SH. Atp11p and Atp12p are assembly factors for the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase in human mitochondria. *J Biol Chem*, 2001, 276: 30773-30778.
- 13 Asumendi A, Morales MC, Alvarez A, et al. Implication of mitochondria-derived ROS and cardiolipin peroxidation in N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced apoptosis. *Br J Cancer*, 2002, 86: 1951-1956.
- 14 Li ZG, Ji H, Fu WN, et al. Apoptosis in rat fetus with talipes equinovarus and the expression of XIAP. (in process)  
[李增刚,纪虹,富伟能,等.先天性马蹄内翻足模型大鼠细胞凋亡及相关基因 XIAP 表达研究.(已投稿)]
- 15 Christos DK, Mary MH. Class III  $\beta$ -Tubulin in Human Development and Cancer. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 2003, 55: 77-96.
- 16 Zolfaghari R, Ross AC. Effect of vitamin A deficiency and retinoic acid repletion on intestinal and hepatic apolipoprotein A-I mRNA levels of adult rats. *J Lipid Res*, 1994, 35: 1985-1992.

(收稿日期 2006-01-05)

(本文编辑:高巍)

## “中国遗传学会功能基因组学研讨会”征文通知

“中国遗传学会功能基因组学研讨会”定于 2006 年 10 月 13~18 日在成都召开。会议将邀请贺林、薛勇彪、杨焕明、Jurg Ott(美国)等国内外知名专家围绕基因组学各领域的新进展作专题学术报告。大会组委会诚挚邀请国内外广大基因组学工作者以及研发人员参加本次盛会。

1. 会议主题:①基因组学最新研究进展;②基因组学与药物研发;③基因组学与系统生物学;④基因组学与人类重大疾病的分子诊断和分子病理;⑤动植物基因组学;⑥基因组学与生物芯片;⑦生物信息学;⑧蛋白质组学及转录组学。

2. 会议征文:本次会议以“大会专题报告”和“分组学术交流”两种方式进行。征文格式按《遗传学报》或《遗传》(www.Chinagene.cn)的格式撰稿,全文 6 000~10 000 字(含摘要、图表、文献)。审查通过的稿件在 2006 年第 10 期《遗传学报》(英文)或《遗传》(中文)集中优先发表,从录用征文中遴选大会及分组会报告人。征文请通过电子邮件发送至《遗传学报》编辑部,注明“会议征文”,E-mail:ycxb@genetics.ac.cn,免收审稿费,征文截稿日期:2006 年 6 月 30 日。

3. 会议注册:正式代表注册费 700 元,学生代表 500 元。住宿费:标准间 80~100 元/日。

4. 报名与参展联系人:成都市建设北路二段四号:电子科技大学生命科技学院 杨足君老师,邮政编码:610054, E-mail: yangzujun@uestc.edu.cn,电话:028-83206556,传真:028-83206124

大会组委会  
2006 年 3 月 20 日