

①

## 胚胎干细胞蛋白质组学

刘芙君, 李建远, 王海燕

(青岛大学附属烟台毓璜顶医院, 山东省干细胞工程技术研究中心, 山东烟台 264000)

**[摘要]** 胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES 细胞)具有自我复制和无限增殖的潜能,在发育生物学和再生医学中具有重要的研究价值,ES 细胞蛋白质组学研究对揭示 ES 细胞增殖、分化的机制具有重大意义。

**[关键词]** 胚胎干细胞; 蛋白质组; 蛋白质组学

**[中图分类号]** Q254 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-2588(2007)04-0340-03

### Proteomics of embryonic stem cells

LIU Fu-jun, LI Jian-yuan, WANG Hai-yan

(Affiliated Yuhuangding Hospital of Qingdao University, Shandong Stem Cell Engineering Research Center, Yantai Shandong 264000, China)

**[Abstract]** Embryonic stem (ES) cells have the ability to self-renew and differentiate into all kinds of cells, and it is important to study ES cells in developmental biology and regenerative medicine. The recent studies of mouse and human embryonic stem cell proteomics provide us the idea and clue to study proliferation and differentiation of ES cells.

**[Key words]** embryonic stem cells; proteome; proteomics

[Int J Pathol Clin Med, 2007, 27(4):0340-03]

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES 细胞)主要来源于动物胚胎发育早期囊胚中的内细胞团,具有自我复制和多潜能分化的特征,1981年,Evans 和 Kaufman 等<sup>[1-2]</sup>从小鼠胚泡内细胞团中成功分离出 ES 细胞,建立了哺乳动物 ES 细胞系。1995年, Thomson 等<sup>[3]</sup>从恒河猴胚泡获得第一个灵长类的 ES 细胞系<sup>[3]</sup>,并于 1998 年从人胚泡内细胞团成功分离出 5 个 ES 细胞系<sup>[4]</sup>。人类 ES 细胞系的建立是生命科学史上的重要里程碑,其潜在的医学应用价值成为世界研究的热点。

小鼠胚胎干细胞(mES 细胞)是研究人类胚胎干细胞(hES 细胞)较好的模型,但其与 hES 细胞也有明显的差异,例如,体外培养时,小鼠 ES 细胞的倍增时间是 12 h,而人类 ES 细胞倍增的时间大约为 36 h<sup>[5]</sup>;mES 细胞需白血病抑制因子(LIF)存在以保持其未分化状态<sup>[6]</sup>;而 hES 细胞除需 LIF 外,还需要饲养层细胞或者血清的存在,或者含有 bFGF 的无

血清培养基等条件<sup>[5]</sup>。人类 ES 细胞的表面抗原与 mES 细胞不同<sup>[7]</sup>。

目前,对 ES 细胞生物学特征的研究主要是以芯片技术等<sup>[8]</sup>作为高通量研究技术的转录组水平的分析,以及一些常规的蛋白质分析如 Western 印迹,流式细胞仪检测细胞表面标记等,然而 mRNA 水平并不能完全代表蛋白质水平,而且胚胎干细胞的一些生物学性状也不仅由特定蛋白的丰度决定。蛋白质是细胞的功能单位,蛋白质表达反映了细胞的生理状态,蛋白表达水平在 mRNA 水平受到调节(转录、剪接等),蛋白的表达量和活性则由翻译、翻译后修饰和降解等过程决定,因此,为了获得对 ES 细胞增殖、稳定和分化等通路的了解,蛋白质组水平研究显得尤为重要。通过质谱鉴定为基础的蛋白质组学分析和高通量的芯片技术进行的转录组水平研究可更好地从基因和蛋白水平研究 ES 细胞的行为。

①收稿日期:2007-01-05 修回日期:2007-03-02

作者简介:刘芙君(1978-),男,山东滕州人,硕士研究生,主要从事医学遗传学方面的研究。

## 1 小鼠胚胎干细胞蛋白质组学

2001年 Guo 等<sup>[10]</sup>成功建立了体外维甲酸(RA)诱导 ES 细胞定向分化神经细胞的模型,为了检测 RA 诱导神经细胞分化的分子机制,Guo 等应用 2-DE 技术分离了未分化 ES 细胞和经诱导的已分化神经细胞的蛋白,建立了 ES 细胞和不同分化时期神经细胞的蛋白质表达图谱,并选择了 24 个差异表达的蛋白质胶点进行质谱鉴定,经 Peptident 软件分析表明,其中 9 个蛋白与已知蛋白高度匹配,3 个蛋白有多个候选者,不能确定,剩余的 12 个蛋白质中包括 5 个上调和 7 个下调蛋白,未从数据库中得到结果,需要进一步实验验证。该实验通过 2D 分离结合质谱鉴定的方法初步确定了几种与神经细胞分化及增殖相关的蛋白,证明了利用蛋白质组学分析研究体外分化模型的可行性。2004 年, Elliott 等<sup>[11]</sup>获得了一个更全面的 mES(R1)细胞蛋白表达图谱,通过 3 个不同 pH 梯度的电泳胶条(pH3-10,4-7,6-11)和不同的丙烯酰胺浓度,利用肽指纹图谱(PMF)和串联质谱共分析了 700 个蛋白胶点,鉴定了 218 个蛋白,其中一些未知功能的蛋白可能为小鼠 ES(R1)细胞的特异蛋白。Naganok 等<sup>[12]</sup>通过全自动微量多维色谱和高分辨 MS 获得了包括 1 700 个小鼠 ES(E14-1)细胞表达蛋白的更全面的数据,其中包括了 365 个核蛋白和 260 个膜蛋白,除了一些看家蛋白外,还包括一些转录因子如 OCT4,UTF1,SOX 等,获得的这些蛋白质数据与 Ramalho-Santos 等通过芯片技术获得的转录组数据比较,发现 60 个 ES 细胞特异蛋白,并且鉴定了一些 ES 细胞的翻译后修饰位点。

Prudhomme 等<sup>[13]</sup>利用纤维结合素、层粘连蛋白、白血病抑制因子和成纤维细胞生长因子 4 的不同组合组成了刺激培养 ES 细胞的 16 种组合,同时分别在细胞培养的第 2,3,5 天测定 31 种主要细胞内信号通路蛋白的磷酸化状态,研究表明其中的 7 个信号通路(stat3, raf1, MEK, ERK, Src, PKC 和 PK-Ba)与胚胎干细胞的增殖和分化显著相关。

2005 年 Wang 等<sup>[14]</sup>为了研究胚胎干细胞向神经细胞分化过程中蛋白表达变化情况,通过 2DE 结合 LC/MS/MS 建立了小鼠 ES(E14)细胞和其分化多巴胺能神经元细胞的蛋白表达谱,鉴定了 23 个差异表达蛋白,并通过 Western 印迹等方法进一步验证了下调蛋白 TCTP 和上调蛋白 alpha-tubulin,发现在 ES 细胞分化过程中 TCTP 蛋白的表达水平不依赖于胞内  $Ca^{2+}$  的浓度,而且 TCTP 的表达水平在运

动神经元中的表达较多多巴胺能神经元更低,说明蛋白质组学可作为研究干细胞及其分子机制的有力工具。

## 2 人胚胎干细胞蛋白质组学

hES 细胞与 mES 细胞有不同的细胞行为,存在着不同的信号通路,因此研究 hES 细胞在再生医学中有广阔的应用前景,迄今,以质谱鉴定为主的干细胞蛋白质组学分析多局限于 CD34<sup>+</sup> 干细胞<sup>[15]</sup>,骨髓间充质干细胞<sup>[16]</sup>,神经干细胞<sup>[17]</sup>,脐血来源的干细胞<sup>[18]</sup>,脂肪组织来源的干细胞<sup>[19]</sup>和造血干细胞<sup>[20]</sup>,但对 hES 细胞的全面蛋白质组学研究较少。

Van Hoof 等<sup>[21]</sup>首先利用蛋白质组学技术分析 hES 细胞和 mES 细胞以及其分化细胞的差异表达蛋白,结果共获得 1 775 个非冗余 hES 细胞蛋白和 1 532 个分化的 hES 细胞蛋白,1 871 个非冗余的 mES 细胞蛋白和 1 552 个分化的 mES 细胞蛋白,其中 191 个蛋白在 hES 和 mES 细胞中共表达,但在分化细胞中表达,除了一些已知的 ES 细胞特异蛋白外,还包括许多未知的蛋白,可能为一些新的 ES 细胞特异蛋白。为了验证质谱方法鉴定的结果,选择了部分蛋白通过 Western 印迹、免疫荧光共聚焦显微镜、流式细胞仪等方法进行分子水平的验证,同时选择另外两个独立的 hES 细胞系作为研究候选差异蛋白的材料<sup>[21]</sup>。

该研究首次较全面的从蛋白水平分析了 hES 细胞和 mES 细胞及其分化细胞的差异蛋白表达,通过差异比较的方法可以从获得的 hES 细胞蛋白数据中去除 hES 细胞和分化细胞的一些共有表达蛋白,得到一些可认为是 hES 细胞的特异性蛋白,这些蛋白可能参与 ES 细胞未分化状态的维持和促进其自我更新。同时通过相同的策略鉴定 mES 细胞特异性蛋白,并比较 hES 细胞和 mES 细胞中特异表达的蛋白,为研究 hES 细胞和 mES 细胞的不同信号通路提供了材料。

## 3 展望

ES 细胞不仅是发育生物学研究的有力工具,也是基因治疗的理想靶细胞,其最有意义的用途在于可能成为细胞替代治疗和组织器官移植的“种子细胞”,用于治疗各种退行性病、遗传病、肿瘤等,但 ES 细胞的临床应用也面临着一些技术和理论的问题,如 ES 细胞是如何维持体外无限非分化增殖的;ES 细胞体外诱导分化的机制是什么;如何控制 ES 细胞的分化条件,提高定向分化的效率等。近年来发展

的蛋白质组学从蛋白质组学角度研究 ES 细胞及其体外定向分化模型,可对不同来源,不同分化阶段的调控因子作分析比较,有利于全面研究 ES 细胞的生物学特性以及与增殖、分化相关的分子事件。

#### 参 考 文 献

- [1] Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos[J]. *Nature*,1981,292(5819):154-156.
- [2] Martin G R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,1981,78(12):7634-7638.
- [3] Thomson J A, Kalishman J, Golos T G, et al. Isolation of a primate embryonic stem cell line[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995,92(17):7844-7848.
- [4] Thomson J A, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S S, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts[J]. *Science*,1998,282(5391):1145-1147.
- [5] Amit M, Carpenter M K, Inokuma M S, et al. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture[J]. *Dev Biol*,2000,227(2):271-278.
- [6] Shambloot M J, Axelman J, Wang S, et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998,95(23):13726-13731.
- [7] Thomson J A, Marshall V S. Primate embryonic stem cells[J]. *Curr Top Dev Biol*, 1998,38:133-165.
- [8] Sekkai D, Gruel G, Herry M, et al. Microarray analysis of LIF/Stat3 transcriptional targets in embryonic stem cells [J]. *Stem Cells*,2005,23(10):1634-1642.
- [9] Anisimov S V, Tarasov K V, Tweedie D, et al. SAGE identification of gene transcripts with profiles unique to pluripotent mouse R1 embryonic stem cells[J]. *Genomics*,2002,79(2):169-176.
- [10] Guo X, Ying W, Wan J, et al. Proteomic characterization of early-stage differentiation of mouse embryonic stem cells into neural cells induced by all-trans retinoic acid in vitro [J]. *Electrophoresis*, 2001,22(14):3067-3075.
- [11] Elliott S T, Crider D G, Garnham C P, et al. Two-dimensional gel electrophoresis database of murine R1 embryonic stem cells[J]. *Proteomics*,2004,4(12):3813-3832.
- [12] Nagano K, Taoka M, Yamauchi Y, et al. Large-scale identification of proteins expressed in mouse embryonic stem cells[J]. *Proteomics*,2005,5(5):1346-1361.
- [13] Prudhomme W, Daley G Q, Zandstra P, et al. Multivariate proteomic analysis of murine embryonic stem cell self-renewal versus differentiation signaling[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2004,101(9):2900-2905.
- [14] Wang D, Gao L. Proteomic analysis of neural differentiation of mouse embryonic stem cells[J]. *Proteomics*,2005,5(17):4414-4426.
- [15] Tao W, Wang M, Voss E D, et al. Comparative proteomic analysis of human CD34<sup>+</sup> stem/progenitor cells and mature CD15<sup>+</sup> myeloid cells[J]. *Stem Cells*,2004,22(6):1003-1014.
- [16] Wang D, Park J S, Chu J S, et al. Proteomic profiling of bone marrow mesenchymal stem cells upon transforming growth factor beta stimulation[J]. *J Biol Chem*,2004,279(42):43725-43734.
- [17] Maurer M H, Feldmann R E Jr, Bromme J O, et al. Comparison of statistical approaches for the analysis of proteome expression data of differentiating neural stem cells[J]. *J Proteome Res*,2005,4(1):96-100.
- [18] Zenzmaier C, Gesslbauer B, Grobuschek N, et al. Proteomic profiling of human stem cells derived from umbilical cord blood[J]. *Biochem Biophys Res Comm*,2005,328(4):968-972.
- [19] DeLany J P, Floyd Z E, Zvonic S, et al. Proteomic analysis of primary cultures of human adipose-derived stem cells: modulation by adipogenesis[J]. *Mol Cell Proteomics*,2005,4(6):731-740.
- [20] Unwin R D, Smith D L, Blinco D, et al. Quantitative proteomics reveals post-translational control as a regulatory factor in primary hematopoietic stem cells[J]. *Blood*,2006,107(12):4687-4694.
- [21] Van Hoof D, Passier R, Ward-VanOostwaard D, et al. A quest for human and mouse embryonic stem cell-specific proteins[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2006,5(7):1261-1273.