

## 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 胁迫相关小鼠肝脏线粒体蛋白的初步研究

庄振宏, 郑传琦, 汪世华

(福建农林大学生物农药与化学生物学教育部重点实验室/生命科学学院, 福州 350002)

**摘要:** 为了加强经黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 感染后肝脏线粒体差异表达蛋白的检测, 以助于预防中毒的爆发和扩散, 以黄曲霉毒素感染小白鼠, 10 周后提取小白鼠的线粒体蛋白, 通过蛋白质双向电泳技术研究黄曲霉毒素对小鼠线粒体蛋白组差异表达的影响。双向电泳结果发现有 31 个蛋白质点发生显著变化, 其中有新出现或明显上调的 7 个蛋白质点以及缺失的或明显下调的 6 个蛋白质点。这些点大多处于 5.2~9.0 pI 值范围内, 分子量处于 8~165 ku 之间。据此推测, 毒素可能通过改变这些蛋白表达量, 从而影响线粒体的功能, 进而对小鼠产生毒性作用。

**关键词:** 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>; 肝脏; 线粒体; 双向电泳

中图分类号: Q593.1

文献标志码: A

论文编号: 2009-2331

### The Elementary Study on the Effect of Aflatoxin B<sub>1</sub> on the Mouse Liver Mitochondrial Proteins

Zhuang Zhenhong, Zheng Chuanqi, Wang Shihua

(Key Laboratory of Biopesticide and Chemical Biology, Ministry of Education,  
and College of Life Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002)

**Abstract:** In order to strengthen the detection on the liver mitochondrial proteins which differentially expressed when infected by aflatoxin B<sub>1</sub>, to prevent the outbreak and spread of poisoning. The toxin production by *Aspergillus flavus* were optimized and were extraced to infect mice. After 10 weeks, we extraced the mitochondrial proteins of the mice and researched the effect of the Aflatoxin on the mitochondrial proteins of the mice liver by two-dimensional electrophoresis. The results of analysis of two-dimensional electrophoresis revealed that there were obviously 31 differential proteins spots, among which 7 protein spots were new or upregulated and 6 protein spots were disappeared or downregulated. These spots were mostly in the range of 5.2~9.0 pI and 8~165 ku. We speculated that aflatoxin may affect mitochondrial function of liver by the influence on these proteins, which induce the toxicity on mice.

**Key words:** aflatoxin B<sub>1</sub>; liver; mitochondria; two-dimensional electrophoresis

### 0 引言

黄曲霉毒素(aflatoxins)为分子真菌毒素,是迄今发现的各种真菌毒素中最稳定的一种。1993年黄曲霉毒素被世界卫生组织(WHO)的癌症研究机构划定为一类致癌物。现已确定的黄曲霉毒素有20余种,但是污染粮食的黄曲霉毒素主要有黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、

G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>和M<sub>1</sub>等。在天然污染的粮食中以黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>)毒性最大,量也最多<sup>[1]</sup>,致癌性也最强<sup>[2]</sup>,黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>的毒害作用主要是损害肝脏,引发肝炎,肝硬化,肝坏死等。临床表现有胃部不适,食欲减退,恶心,呕吐,皮肤粘膜黄染<sup>[1]</sup>。

线粒体是真核细胞中最复杂和最重要的细胞

**基金项目:** 国家 863 计划项目(2007AA10Z430); 霍英东教育基金会第十一届高等院校青年教师基金项目(111032); 福建省重点引智项目(SZ2008039); 福建省教育厅科技计划项目(JB08068); 福建省高校新世纪优秀人才支持计划。

**第一作者简介:** 庄振宏,男,1976年出生,广东普宁人,讲师,博士,研究方向:生物化学与分子生物学。通信地址:350002 福建农林大学生命科学学院, E-mail: xzhzhenhong@163.com。

**通讯作者:** 汪世华,男,1976年出生,陕西镇巴人,教授,博士,研究方向:生物化学与分子生物学。通信地址:350002 福建农林大学生命科学学院, Tel: 0591-83789352, E-mail: wshyyl@sina.com。

**收稿日期:** 2009-11-10, **修回日期:** 2009-11-13。

器之一,线粒体在脂肪酸代谢、嘧啶生物合成、体内钙平衡,以及细胞信号传导中起着主要作用。许多细胞进程,如凋亡、老化以及多种疾病病理学机制(包括癌、肌病、糖尿病、肥胖、老化、特别是神经退行性疾病等)都与线粒体功能障碍或突变有关。近年来线粒体相关因素介导细胞凋亡调节的研究结果显示线粒体不仅在正常细胞存活而且在细胞凋亡中具有重要作用<sup>[3-5]</sup>。而亚细胞蛋白质组学的研究不仅可以降低蛋白质组的复杂程度,而且能够提示蛋白质的定位和功能的相关信息,蛋白质组在亚细胞水平的研究已取得了较大进展,其中热点之一就是线粒体的研究。因此,利用亚细胞蛋白质组学进一步加强经黄曲霉毒素B<sub>1</sub>感染后肝脏线粒体差异表达蛋白的检测,以识别动物受黄曲霉毒素B<sub>1</sub>胁迫后早期的发病情况,有助于预防中毒爆发和扩散<sup>[6]</sup>,并对后续研究黄曲霉毒素B<sub>1</sub>对人类肝脏线粒体蛋白组的影响打下坚实的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌种 黄曲霉菌标准菌株133(*Aspergillus flavus* 133),购自中科院菌种保藏中心。点植接种于PDA试管的大米斜面培养基,在100%湿度条件下,35℃培养16~17天备用。

1.1.2 昆明种小白鼠 12只雄性昆明种小白鼠购自福建医科大学实验动物中心,鼠龄4周,体重18~20g,随机分为A和B两组,分别为对照组(生理盐水)和黄曲霉毒素B<sub>1</sub>组(50 μg/mL)。每组6只,分笼喂养。

### 1.2 方法

1.2.1 小白鼠的感染 待小白鼠适应环境后进行灌胃处理。将提取的黄曲霉毒素B<sub>1</sub>溶液用生理盐水稀释成所需浓度,试验组分别按50 μg/mL剂量经口灌胃黄曲霉毒素B<sub>1</sub>,对照组灌胃同等体积的生理盐水。每次灌胃容量0.5 mL<sup>[7]</sup>,每天1次,连续灌胃10周。将标准小白鼠饲料用于小白鼠的饲养,饮用水为城市自来水,隔日换水1次。每日密切观察小白鼠的情况。

1.2.2 线粒体的提取<sup>[8]</sup> 具体提取方法请见《细胞生物学实验》(第2版)。

#### 1.2.3 线粒体的验证

(1)线粒体的显微摄影观察<sup>[8]</sup> 取线粒体沉淀涂片,不待干即滴加1%詹纳斯绿B染液染色20 min,稀释100倍后覆上盖玻片,显微镜下观察并摄影。在显微镜下经詹纳斯绿B染液染色的线粒体呈蓝绿色,小棒状或哑铃状。

#### (2)线粒体的PCR验证

#### ①小白鼠肝脏线粒体DNA的提取方法:

在提取的线粒体中加入150 μL TEN和300 μL SDS,冰浴10 min;然后再加入225 μL冷KAc溶液,冰浴25 min;然后于4℃,10000×g,离心10 min;在上清中加入100 μL水饱和酚,室温震荡15 min;接着加入100 μL氯仿-异戊醇(24:1),混匀后4℃,10000×g离心10 min;小心吸取下层的水溶液,并加入200 μL异丙醇,冰浴30 min;然后4℃,10000×g离心10 min,用70%冷乙醇洗涤沉淀,经4℃,10000×g离心2 min后真空干燥,最后加入200 μL TE溶解。

#### ②Atp8基因引物序列:

上游引物:

5'-CGGGCTAGCATGCCACAACACTAGATACA-3';

下游引物:

5'-TTAGCGGCCGCCTATTATTGTTGGGG-3'。

PCR热循环条件分别为:94℃预变性5 min;94℃变性45 s,48℃退火45 s,72℃延伸30 s,30个循环;72℃延伸5 min。

#### 1.2.4 线粒体蛋白的制备

(1)线粒体的清洗<sup>[9]</sup> 取小白鼠肝脏线粒体放入1.5 mL离心管中,用1.5 mL 10%丙酮-TCA溶液-20℃沉淀4 h,以4℃,10000×g高速离心10 min,随后分离沉淀。用-20℃冷丙酮清洗沉淀3~4次,去除TCA<sup>[9]</sup>。

(2)线粒体蛋白的制备 在真空干燥器中干燥上一个步骤得到的样品,取干燥后的样品于1.5 mL离心管中,加入500 μL裂解液(7 mol/L尿素,4% CHAPS,2 mol/L硫脲,60 mmol/L DTT,10 mmol/L Tris-base,1 mmol/L EDTA,1 mmol/L PMSF)和10 μL Ampholine(pH 3.5~10),超声溶解30 min,温度不超过28℃。超声结束后,样品以15000×g离心45 min,取上清即为小白鼠肝脏线粒体蛋白样品,分装,-20℃保存备用。

#### 1.2.5 双向凝胶电泳

(1)第一向等电聚焦(IFE)电泳 试验采用Bradford法测定肝脏线粒体蛋白浓度,然后选用17 cm长pH 3~10的线性IPG干胶条进行第一向等电聚焦,胶条的再水化和等电聚焦的参数见表1。再水化及等电聚焦条件均设置为20℃,50 uA/strip。

2)第二向SDS-PAGE电泳 采用分离胶浓度为11%的SDS-PAGE垂直平板电泳,将制备好的凝胶板插入Ettan™ DALTI的缓冲液柜中。在垂直电泳槽的上、下槽倒入电极缓冲液,插上正负电极,先每板胶电流恒流10 mA,1 h,然后20 mA,8 h,温度保持在18℃进行恒流电泳,待溴酚蓝离底部1 cm即可停止电泳。经银染方法显色后用扫描仪进行扫描。

表1 IPG 胶条等电聚焦参数设置

| Step | Voltage/V | Model     | Max/uA | Time/h |
|------|-----------|-----------|--------|--------|
| 0    | 50        |           | 50     | 12     |
| 1    | 250       | 线性 Linear | 50     | 0.75   |
| 2    | 500       | 线性 Linear | 50     | 1      |
| 3    | 1000      | 线性 Linear | 50     | 1.5    |
| 4    | 4000      | 线性 Linear | 50     | 4      |
| 5    | 4000      | 快速 Fast   | 50     | 6      |
| 6    | 500       | 快速 Fast   | 50     | (hold) |

1.2.6 肝脏线粒体差异蛋白点查找 借助PDQuest软件分析蛋白质表达图谱,利用Image菜单中的剪切(crop)和旋转(rotate)功能匹配不同的凝胶所需要的相同尺寸大小和形状的图像。在“Transform”命令中通过自动或手动最大限度地消减背景,以避免这些背景对二维电泳图像分析和试验结果分析的影响<sup>[10]</sup>。当蛋白质差异点之间的差量值大于1.5时,认为具有显著性差异<sup>[11]</sup>,或是用肉眼寻找蛋白质表达图谱中明显的差异蛋白点。

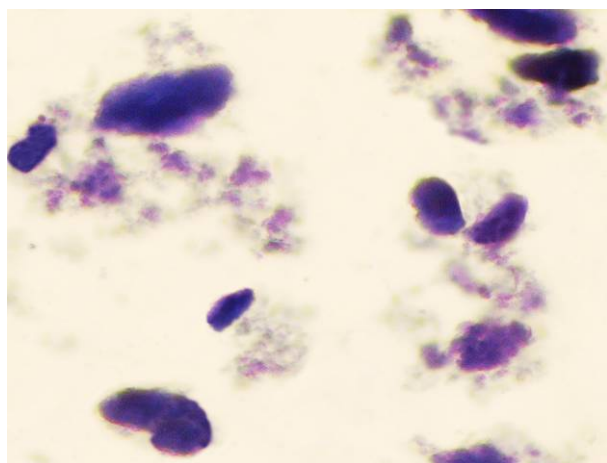


图1 ×100显微镜下线粒体

## 2 结果与分析

### 2.1 小白鼠肝脏线粒体的验证

2.1.1 线粒体的显微摄影观察 在对小白鼠肝脏线粒体的显微摄影观察时发现,有染有詹纳斯绿B染液的碎片,由于詹纳斯绿B只能对活体线粒体进行染色,所以产生这种现象的原因可能是用詹纳斯绿B染液对活线粒体染色完成后,在稀释观察的过程中线粒体裂解产生碎片。图1和图2箭头所指的地方为试验提取的线粒体。

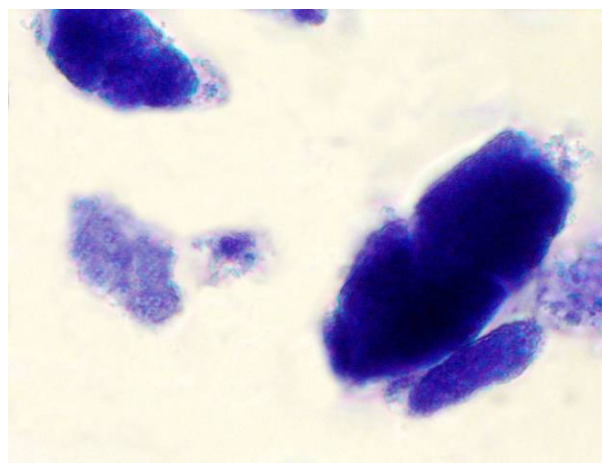


图2 ×400显微镜下线粒体

2.1.2 PCR 验证 为进一步验证已经成功获得小白鼠肝脏线粒体,试验提取了小白鼠肝脏线粒体DNA,然后通过PCR扩增线粒体DNA的保守基因-*Atp8*,扩增结果如图3所示,在200 bp的位置扩增得到一条特异条带(图3泳道1箭头所指处),其大小和*Atp8*一致,因此试验中用于蛋白质提取的样品为小白鼠肝脏线粒体。

### 2.2 线粒体蛋白双向电泳分析

根据杨汉民<sup>[8]</sup>的试验记录,提取的线粒体即为纯化的线粒体(可能掺杂少许细胞核及胞质碎片)。为防止细胞核及胞质碎片干扰,在提取线粒体蛋白前,对线粒体进行清洗<sup>[9]</sup>,笔者做出的改进,除去了可能掺杂的

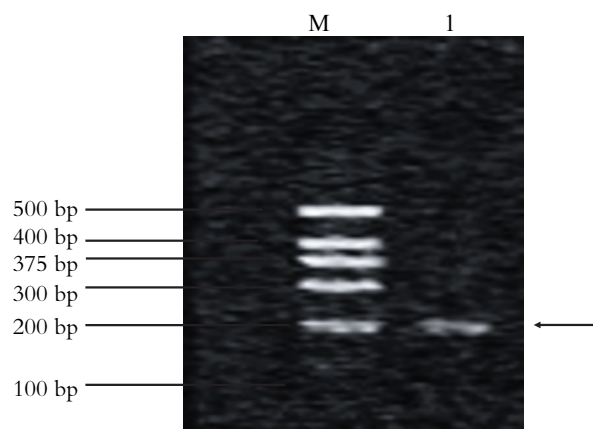
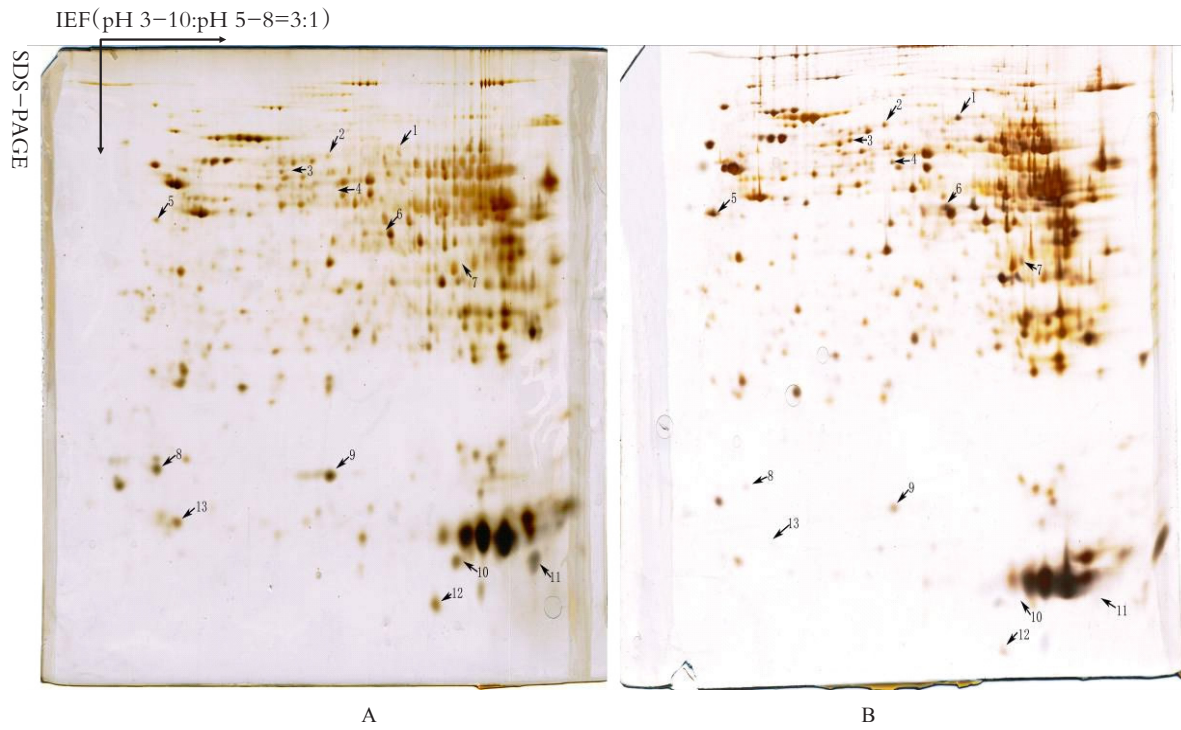
M: DNA marker; 1: 线粒体保守基因 (*Atp8*)

图3 小鼠肝脏线粒体保守基因PCR扩增图

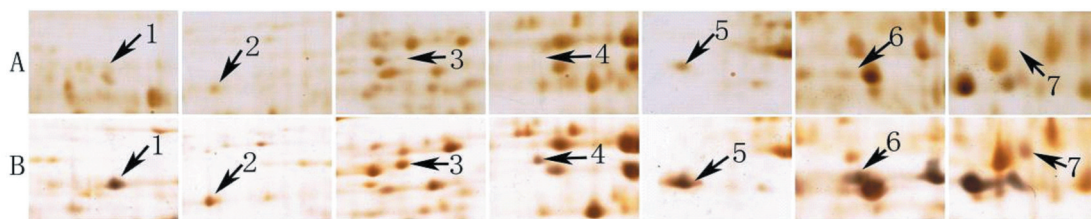
细胞核及胞质碎片,减少了试验误差。然后根据 Bradford 法测定出 A、B 两组小白鼠肝脏线粒体蛋白的浓度分别为 96.76、92.12 mg/mL。

双向电泳后,使用 PDQuest 软件对对照组和毒素组小白鼠肝脏线粒体蛋白的 2-DE 图谱进行比较分析,结果发现二者的主要蛋白质组分非常相似(图 4),分子质量范围主要在 8~165 ku, pI 值主要分布在 5.2~9.0 之

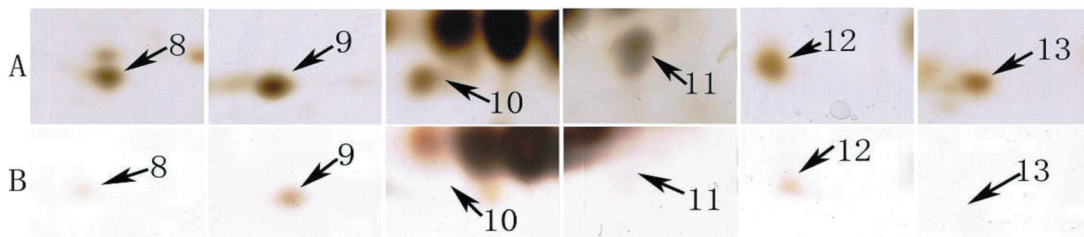
间。局部区域图像放大后显示有 31 个蛋白质点发生明显的差异变化:某些蛋白质在毒素组小鼠肝脏线粒体中表达增加,其中 7 个为新增或明显上调的蛋白质点;另外有一些蛋白质在毒素组中含量降低,其中有 6 个蛋白质点消失或明显下调。图 5 和图 6 分别为新增或明显上调的蛋白质点和消失或明显下调的蛋白质点的局部放大比较图。



A: 对照组; B: 毒素组  
图 4 小白鼠肝脏线粒体蛋白双向电泳图



A: 对照组; B: 毒素组  
图 5 新增或明显上调的蛋白图谱



A: 对照组; B: 毒素组  
图 6 消失或明显下调的蛋白图谱

### 3 讨论

试验通过詹纳斯绿B染液对所提取的小白鼠肝脏线粒体进行染色,然后在100倍和400倍光学显微镜下摄影观察,结果发现所提取的物质呈蓝绿色,小棒状或哑铃状,与线粒体的形态相符,因此初步确定为线粒体。此外,还通过对线粒体DNA的保守基因-*Atp8*的PCR扩增(图3),进一步证实用于蛋白质提取的样品为小白鼠肝脏线粒体,确保了后续试验结果的可靠性。试验接着通过2-DE电泳进一步探讨了黄曲霉毒素B<sub>1</sub>对小白鼠肝脏线粒体蛋白质组的影响。由于黄曲霉毒素B<sub>1</sub>是一种肝脏毒素,能导致小鼠肝脏发生病变,而试验通过2-DE电泳发现了31个黄曲霉毒素胁迫下差异表达的蛋白,其中有13个蛋白差异较大(图5、图6):包括新出现或明显上调的7个蛋白质点以及缺失的或明显下调的6个蛋白质点。因此推测黄曲霉毒素B<sub>1</sub>可能通过作用于小鼠肝脏线粒体中的这些差异蛋白,从而导致小鼠肝脏发生病变甚至是癌变。而进一步通过质谱鉴定这些蛋白的性质将有助于阐明在黄曲霉毒素B<sub>1</sub>胁迫下,动物肝脏病变的机理,并可能为肝癌的治疗提供新的方案,以及为治疗肝癌新药的设计提供新的靶点。

### 参考文献

- [1] 肖传英,冯广鹏,魏金涛,等.饲料中黄曲霉毒素研究进展[J].畜牧业,2007,5(21):4-6.
- [2] 柳洁,何碧英,孙俊红.粮油食品中黄曲霉毒素B<sub>1</sub>测定[J].中国公共卫生,2006,22(1):122-123.
- [3] 涂文斌,彭彦,彭国光.线粒体相关疾病蛋白质组学研究进展[J].第四军医大学学报,2007,28(5):474-475.
- [4] McDonald T G, Van Eyk J E. Mitochondrial proteomics. Undercover in the lipid bilayer[J]. Basic Res Cardiol, 2003, 98(4): 219-227.
- [5] Lopez M F, Melov S. Applied proteomics: Mitochondrial proteins and effect on functions[J]. Circ Res, 2002, 90(4):380-389.
- [6] Julia RB.肝癌与黄曲霉毒素[J].抗癌,2006,5(3):9-10.
- [7] 中海涛,张祥宏,黄向华,等.黄曲霉毒素G<sub>1</sub>长期灌胃对NIH小鼠肺泡上皮细胞SP-C和PCNA表达的影响[J].肿瘤防治研究,2007,3(45):325-327.
- [8] 杨汉民.细胞生物学实验(第2版)[M].北京:高等教育出版社,2004:64.
- [9] 李志丹,包晓东,黄慧英,等.优化海兔肝蛋白质组提取与分离技术[J].厦门大学学报(自然科学版),2006,45(5):194-197.
- [10] 张慧珍,范清堂,吴逸明.肺癌组织中蛋白质组双向电泳图谱分析方法建立[J].郑州大学学报(医学版),2005,40(3):416-418.
- [11] 李佰良.功能蛋白质组学[J].生命的化学,1998,18(6):1-3.