

大鼠减体积肝移植术后肝脏细胞骨架差异蛋白的表达变化

刘 静, 李 立, 冉江华, 张升宁, 李来邦, 陈奕明

(昆明医科大学附属甘美医院, 昆明市第一人民医院肝胆胰外科, 云南 昆明 650011)

[摘要] **目的** 利用蛋白质组学及相关技术研究大鼠减体积肝移植术后肝脏参与细胞骨架差异蛋白的表达变化。 **方法** 实验首先用改良法建立 Lewis-Wistar 大鼠减体积肝移植模型, 然后在术后 1, 3 和 7 d 获取移植术后肝脏组织, 最后应用蛋白质组学技术与预先获取的供、受体原肝脏组织建立双向凝胶电泳图谱, 再利用串联质谱 (MS-MS) 分析及数据库对胶上差异表达的蛋白质点进行鉴定。 **结果** 本次实验中所有蛋白质点采用变化倍数大于 10 倍为标准进行差异蛋白点的选择, 结果总共发现了 72 个差异点, 应用串联质谱分析和数据库等对差异质点进行分析和鉴定, 发现有 32 个蛋白的功能比较明确, 其中有 3 个差异表达的蛋白在减体积移植术后肝脏参与细胞骨架的过程, 表达变化比较明显, 差异蛋白质点总数占所有差异表达质点的 7%。 **结论** 应用蛋白质组学的技术研究大鼠减体积肝移植术后肝脏病理生理过程中细胞骨架差异蛋白的变化, 对于进一步研究细胞骨架蛋白在肝移植术后肝脏病理生理过程中的作用及作用机理有重要的意义。

[关键词] 大鼠; 减体积肝移植; 细胞骨架; 差异蛋白

[中图分类号] R617 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2015) 03-0026-04

The Expression of Hepatic Cytoskeletal Differential Protein Following Reduce-size Liver Transplantation in Rats

LIU Jing, LI Li, RAN Jiang-hua, ZHANG Sheng-ning, LI Lai-bang, CHEN Yi-ming

(Dept. of Hepato-biliary-pancreatic Surgery, The 1st People's Hospital of Kunming and the Ganmei Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650011, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the changes of the expression of hepatic cytoskeletal differential proteins by proteomics after reduce-size liver transplantation (RSLT) in rats. **Methods** The graft specimens were procured by 1d, 3d and 7d following RSLT when the improved model of RSLT with Lewis-Wistar was finished. Then, the post-operative liver tissues, normal donor and recipient liver tissues harvested at the beginning were performed two-dimensional electrophoresis (2-DE) for differential protein stains. At the last, these differential proteins stains were analyzed and identified by MS-MS spectrometry and data bases analysis. **Results** In proteomics experiment, the selection criterion of differential protein was at least 10 times changes for protein stains, and there were 72 differential protein stains selected. The thirty-two of which were relatively clear functional protein. There were 3 differential protein taking part in pathway of cytoskeletal process, expression of proteins in the total proteins ratio was 7%. **Conclusions** The expression variation of cytoskeletal protein following RSLT in rat has been gained by proteomics. It may play an important role and has significance in further studying the action and inherent mechanism of cytoskeletal protein within hepatic pathophysiological process after RSLT.

[Key words] Rats; Reduce-size liver transplantation; Cytoskeletal protein; Differential proteins

[基金项目] 云南省科技厅-昆明医科大学联合专项基金资助项目 (2012FB010)

[基金项目] 刘静 (1977~), 男, 四川眉山市人, 医学博士, 主治医师, 主要从事肝胆胰外科及器官移植工作。

[通讯作者] 李立. E-mail: ynkmlili@yahoo.com.cn

肝移植是一种应用比较广泛、技术比较成熟的器官移植手术^[1], 但是, 肝移植仍然存在很多的问题需要我们去解决^[2-4]. 蛋白质组学及其相关技术已经应用到器官移植的临床和基础研究领域中, 发现了一些与临床相关的有意义的问题^[5]. 笔者应用蛋白质组学的技术研究大鼠减体积肝移植术后肝脏差异表达蛋白, 进一步分析其中参与细胞骨架过程的蛋白.

1 材料与方法

1.1 实验动物

在此次实验中 Lewis 和 Wistar 大鼠均购至北京维通利华公司. 术前及术后均饲养于昆明医科大学动物实验中心的清洁级动物房中, 自由进食和水. 动物实验的所有操作过程均严格参照《实验动物和操作管理规程》进行.

1.2 模型构建及术后处理

实验模型采用改良法大鼠减体积肝移植模型, 供体是健康近交系的雌性 Lewis 大鼠, 质量约为 200 ~ 230 g; 受体是健康封闭群的 Wistar 雄性大鼠, 质量约为 220 ~ 250 g; 供体肝脏在切取的过程中即减掉左外侧叶、盘状叶和三角叶, 供体比受体大鼠质量轻约 20 g 左右 (受体体重大于供体); 移植肝重 / 受体肝重 \approx 50%, 过程详见实验模型构建的参考文献^[6]. 移植术后的大鼠自由进食和水, 同时口服抗免疫排斥用药 - 他克莫司胶囊 (FK506 药品注册号为 BH20060123, 药品分装批准文号为国药准字 J20060047) .

1.3 标本来源

实验标本主要有三大部分: 供体肝脏组织标本是在供体切取的过程中获取标本组织; 受体肝脏组织标本的获取是在受体肝脏驱血完成切除后获取标本组织; 移植术后肝脏组织标本是在肝移植术后 1 d, 3 d 和 7 d 按照实验动物和操作管理规程处死移植术后大鼠后获取的标本组织. 所有的标本组织都

是随机获取相应部分的肝脏组织, 标本约 1×0.5 cm 大小 3 块组织, 获取后放入 -70°C 冰箱内保存.

1.4 蛋白质组学技术检测组织标本中差异蛋白表达

实验试剂、设备准备好后, 即可取出预先 -70°C 冰箱内冻存的供体、受体和移植术后肝脏组织标本, 然后按照事先准备好的实验计划依次进行组织标本蛋白质提取和定量, 等点聚焦, 胶条平衡及 SDS-PAGE 电泳, 凝胶染色, 凝胶扫描和图像分析.

图像分析采用 ImageMaster 5.0 软件, 分别将 1 d、3 d 和 7 d 的移植术后肝脏组织标本的双向电泳图谱与供体和受体肝脏组织的双向电泳图片进行比较, 以质点变化倍数大于 10 倍或小于 0.1 倍为标准选择差异蛋白点用于质谱分析. 然后通过网站和数据库获得所有差异蛋白点的详细信息. 最后按照功能对所有差异蛋白进行功能分类和鉴定.

1.5 统计学分析

实验中采用 SPSS 软件包处理, 统计学分析采用总体率可信区估计, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

从每张双向电泳胶上可以检测到大约 1 000 个左右的可能蛋白点, 实验中选择差异蛋白质点的标准是以变化倍数大于 10 倍或小于 0.1 倍为标准进行选择, 结果有 72 个差异点被发现. 然后用 MS-MS 串联质谱分析和数据库鉴定, 最终有 32 个功能比较明确的蛋白质得到最终的鉴定, 其中初步鉴定到大鼠减体积肝移植术后肝脏参与细胞骨架的差异蛋白质 (以人工蛋白质功能分类为标准) 主要有 3 种, 这些差异蛋白主要差异表达分布在术后第 3d 和 7d, 差异表达的质点占所以差异点的 7%, 95%CI 为 5.6% ~ 8.8%, 见图 1 及表 1.

表 1 大鼠减体积肝移植术后肝脏参与细胞骨架差异蛋白质点名称、功能和基因等分布表

Tab. 1 The name, function and gene distribution of the hepatic cytoskeletal differential proteins after reduce-size liver transplantation(RSLT) in ras

自编号	蛋白名称	基因	功能	Accession No.	蛋白质 PI
29	白蛋白	Alb	细胞骨架蛋白	Gil158138568	6.09
30	α -2u 微球蛋白	LOC259246	细胞骨架蛋白	Gil204261	5.43
31	β -肌动蛋白	Null	细胞骨架蛋白	Gil4501885	5.29
32	纤维蛋白衍生多肽 β 连	Fgb	细胞骨架蛋白	Gil158186678	7.9

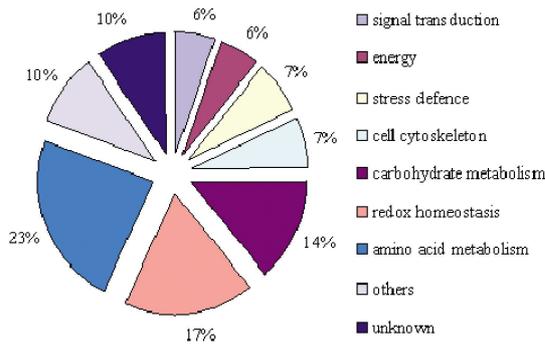


图 1 质谱分析鉴定出的差异蛋白点人工功能分类图

Fig. 1 The function classification of the differential proteins identified by MS-MS spectrometry

3 讨论

蛋白质组学技术是基础和医学器官移植有关蛋白质中的一个非常重要的方法^[7]。通过蛋白质组学及相关技术的应用,我们得到了大鼠减体积肝移植术后肝脏参与细胞骨架过程的差异蛋白质主要有白蛋白、 $\alpha 2u$ -微球蛋白、 β -肌动蛋白和纤维蛋白衍生多肽 β 连等。白蛋白具有维持血浆胶体渗透压,物质运输和氧化提供能量等功能^[8]。大鼠减体积肝移植术后第 3 天的表达显著下降,可能是因为术后第 3 天肝脏的再生最明显,需要的物质的能量较多,导致了白蛋白的明显减少。

$\alpha 2u$ -微球蛋白是一种可以在一定程度上反应肝脏一定的蛋白质合成功能的特殊蛋白质,它是由成年雄性大鼠肝脏细胞合成并分泌入血并通过尿液排出的蛋白质^[9,10]。而雌性大鼠的肝脏和雄性大鼠的其它脏器并不合成此蛋白。本次实验中检测到术后雌性移植肝脏中有低度的 $\alpha 2u$ -微球蛋白表达,但是与受体正常雄性肝脏相比较低,但是这已经说明了受体骨髓干细胞在移植供体肝脏内跨细胞分化成有功能的肝细胞,说明了受体因素参与了移植供体肝脏的再生过程,具体的机制有待进一步的研究。

肌动蛋白家族^[11]是一类高度保守的细胞骨架蛋白,它几乎在所有真核细胞中承担最基本细胞功能。在脊椎动物中,有 6 种肌动蛋白亚型,分别由不同的基因编码^[12]。肌动蛋白在生物体内广泛分布并且对于维持细胞的功能以及存活都是必不可少的^[13,14]。肌动蛋白使机体各种细胞之所以能够具有分化、迁移、具有收缩力以及维持正常的形态的功能^[15]。在本次实验的术后第 3 天的移植肝脏组织中发现了高度表达的肌动蛋白,这时候也是移植肝脏组织细胞生长最快的时候,肌动蛋白的高表达更加有利于肝细胞的分化、迁移等作用,更加有利

于维持肝细胞的形态功能。

纤维蛋白衍生多肽 β 链是一种由纤维蛋白 β 链及其 N 末端所连接的 28 个氨基酸残基所构成,它具有蛋白衍生物促进及加重炎症反应的作用,在体外的实验中观察到了它可以使白细胞趋化和聚集的作用^[16,17]。纤维蛋白衍生物 β 链的 N 末端一方面可以与血管内膜上皮细胞表面的钙粘蛋白 (Cadherin) 相结合^[18],而 α 链的 N 末端则可以与 CD11c 相互作用,因此,由 α 、 β 链构成的纤维蛋白衍生物 E1 成为了连接上皮细胞与炎症细胞的桥梁。另一方面,纤维蛋白衍生物 β 链的 N 末端能够与钙粘蛋白结合点 (B β 15-24) 特异性结合的肽链,阻断上皮细胞与炎症细胞之间的联系,在体外实验中能够观察到它能够减少白细胞的聚集,在体内观察中,则可以减少心肌细胞的缺血-再灌注损伤并且减小梗死灶的面积^[18]。纤维蛋白衍生多肽 B β 15-24 除了能够通过竞争性的与纤维蛋白 E1 配体结合和降低局部微环境内的 TNF- α 从而发挥其减轻炎症反应的作用。纤维蛋白衍生物 B β 15-24 还可以降低局部组织微环境中的 TNF- α 的水平,从而减轻局部组织缺血再灌注损伤后的炎症反应程度^[18]。笔者在本次实验的大鼠减体积肝移植术后第 7 天的移植肝脏组织中检测到 2 个差异表达的点,它的表达增强一方面说明了肝脏组织抗缺血再灌注损伤的能力增强,移植肝脏组织对抗损伤的能力逐渐得到提高;另一方面反映了肝脏的再生仍然在继续之中,通过对抗组织细胞的损伤作用而达到维护组织细胞的再生作用。但是,这些机理需要作进一步的实验研究。

[参考文献]

- [1] MERION R M. Current status and future of liver transplantation[J]. *Semin Liver Dis*, 2010, 30(4): 411 - 421.
- [2] NEMES B, GAMAN G, DOROS A. Biliary complications after liver transplantation [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2014, 10(21): 1 - 20.
- [3] MUIESAN P, FISHER S. The bile duct in donation after cardiac death donor liver transplant [J]. *Curr Opin Organ Transplant*, 2014, 19(4): 447 - 452.
- [4] CHEN J, WEINSTEIN J, BLACK S, et al. Surgical and endovascular treatment of hepatic arterial complications following liver transplant [J]. *Clin Transplant*, 2014, 28(12): 1305 - 1312.
- [5] KIM S C, PAQE E K, KNECHTLE S J. Urine proteomics in kidney transplantation [J]. *Transplant Rev (Orlando)*, 2014, 28(1): 15 - 20.

- [6] 刘静, 李江, 张升宁, 等. 改良法构建大鼠减体积肝移植模型的建立[J]. 中国组织工程研究与临床康复杂志, 2010, 14(18): 3 252 - 3 257.
- [7] BREWIS IA, BRENNAN P. Proteomics technologies for the global identification and quantification of proteins[J]. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2010, 80(15): 1 - 44.
- [8] SOKOLOWSKA M, PAWLAS K, BAL W. Effect of common buffers and heterocyclic ligands on the binding of Cu () at the multimetal binding site in human serum albumin[J]. *Bioinorg Chem Appl*, 2010, 1(20): 725 153.
- [9] HAI A, KIZILBASH N A. A (2)- μ -Globulin fragment (α 2-f) from kidneys of male rats [J]. *Bioinformation*, 2013, 9(3): 145 - 149.
- [10] RONALD D, UNTERMAN, KEVIN R, et al. Cloning and sequence of several α 2u-globulin cDNAs [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78(6): 3 478 - 3 482
- [11] DUGINA V, ZWAENEPOEL I, GABBIANI G, et al. Beta and gamma-cytoplasmic actins display distinct distribution and functional diversity [J]. *J Cell Sci*, 2009, 122(Pt 16): 2 980 - 2 988.
- [12] VANDEKERCKHOVE J, WEBER K. At least six different actins are expressed in a Higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide[J]. *J Mol Biol*, 1978, 126(4): 783 - 802.
- [13] HARBORTH J, ELBASHIR S M, BECHERT K, et al. Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs[J]. *J Cell Sci*, 2001, 114(Pt 24): 4 557 - 4 565.
- [14] ZHNG H, GHAI P, WU H, et al. Mammalian adenylyl cyclase-associated protein1 (CAP1) regulates cofilin function, the actin cytoskeleton, and cell adhesion [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(29): 20 966 - 20 977.
- [15] SCHAEFER A, TE RIET J, RITZ K, et al. Actin-binding proteins differentially Regulate endothelial cell stiffness, ICAM-1 function and neutrophil transmigration[J]. *J Cell Sci*, 2014, 127(22): 4 985.
- [16] LIU A, FANG H, YANG Y, et al. The fibrin-derived peptide b β 15-42 attenuates liver damage in a rat model of liver ischemia/reperfusion injury[J]. *Shock*, 2013, 39(4): 397 - 403.
- [17] WIEDEMANN D, SCHNEEBERGER S, FRIEDL P, et al. The fibrin-derived peptide Bbeta (15-42) significantly attenuates ischemia-reperfusion injury in a cardiac transplant model [J]. *Transplantation*, 2010, 89 (7): 842 - 849.
- [18] AHRENS I, PETER K. FX-06, a fibrin-derived Bbeta15 - 42 peptide for the potential treatment of reperfusion injury following myocardial infarction [J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2009, 10(9): 997 - 1 003.

(2015 - 02 - 07 收稿)