

· 综 述 ·

蛋白质组学在缝隙连接中的研究进展*

宋湖平, 陈红伟 综述, 洪 涛[△] 审校

(南昌大学第一附属医院神经外科, 南昌 330000)

关键词: 蛋白质组学; 缝隙连接; 血管收缩功能

中图分类号: Q51

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2009)22-2896-03

蛋白质组学是近年来新兴的一门对组织或细胞中全部蛋白质的表达和功能模式进行研究, 通过应用各种蛋白质组学方法来研究蛋白质的改变进而探讨疾病发生机制的学科。缝隙连接是存在于相邻细胞间的膜通道结构, 对血管收缩功能调节具有重要作用。通过对蛋白质组学在缝隙连接领域的研究, 有助于对缝隙连接机制研究的深入, 进而探讨缝隙连接相关疾病发生机制以及药物靶点。现就近年来蛋白质组学研究技术在缝隙连接研究中的应用进行综述。

1 蛋白质组学的定义及其常用的研究技术

1.1 蛋白质组及蛋白质组学的定义 蛋白质组(proteome), 指由一个细胞或一个组织的基因组所表达的全部相应的蛋白质; 而蛋白质组学(proteomics)是一门以细胞内全部蛋白质的存在及其活动方式为研究对象的新兴学科, 最早由澳大利亚学者 Wilkins 和 Williams 在 1994 年提出。它能在整体、动态、网络的水平上研究细胞或机体的所有蛋白质的表达改变, 从而进一步探索功能机制、调节调控, 以及蛋白质相互作用, 为临床诊断、病理研究、药物筛选、新药开发、新陈代谢途径研究等提供理论依据和基础, 目前已经广泛应用于对疾病的机制研究^[1]。蛋白质是生命活动的执行者, 应用蛋白质组学研究技术, 定性、定量研究不同病理状态下蛋白质组的差异表达并深入认识其功能, 将有助于对疾病发生机制以及药物靶点的探讨。

1.2 常用的蛋白质组学研究技术

1.2.1 蛋白质组分离技术 双向电泳(2-DE)技术凭借其分辨率高、可重复性好、结果直观、实验成本较低等特点, 是一种方便、灵敏的蛋白质分离方法, 已成为蛋白质组研究中最常用的分离技术。目前最常用的是双向聚丙烯酰胺凝胶电泳(2D-PAGE), 双向电泳的第一向是等电聚焦, 根据蛋白质等电点不同将其分离; 双向电泳的第二向是 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 根据蛋白质分子质量不同进一步分离等电点相同的蛋白质。

1.2.2 蛋白质组鉴定技术 蛋白质组学研究中最为关键的一步就是对分离的蛋白质样品进行鉴定。质谱技术的引入是蛋白质组学发展中最重要技术突破, 通过上述蛋白质组分离技术找到蛋白质差异点, 再通过质谱技术鉴定蛋白质的种类。质谱技术(mass spectra technical)是带电原子、分子或分子碎片按质荷比(或质量)的大小顺序排列的图谱^[2]。通过质谱分析, 获得分析样品中分子量、分子式、分子中同位素构成和分子结构等多方面信息。蛋白质组学研究中常用的质谱技术有: (1) 电喷雾质谱, 是喷射过程中以连续离子化方式使多肽样品电离。(2) 基质辅助激光解吸质谱^[3], 是利用基质吸收激光的能量使得固相的多肽样品离子化。它常与飞行时间质谱联用, 称

为基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱^[4]。另外还有快原子轰击质谱和同位素质谱等^[5]。(3) 表面加强激光解析电离飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS), 是一种新的蛋白质检测技术, 操作简单, 灵敏度高, 检测所需样品量少。

1.2.3 鉴定蛋白质相互作用技术 随着科学的发展, 蛋白质组学的研究范围不断扩大, 蛋白质组功能模式的研究不断深入, 蛋白质翻译后修饰和蛋白-蛋白互相作用的研究已成为蛋白质组学的重要部分。目前, 蛋白质功能模式研究技术主要有免疫共沉淀、酵母双杂交系统、生物传感芯片质谱、基因工程和蛋白质工程中的突变表达分析、蛋白质芯片技术等。

2 缝隙连接、缝隙连接蛋白及其对血管收缩功能的调节

2.1 缝隙连接及缝隙连接蛋白 缝隙连接(gap junction, GJ)是相邻细胞间离子及小分子物质交换的直接通道, 是细胞间信息传递的重要途径。GJ 通道的功能受到多种因素的调节, 如: pH 值、胞内 Ca^{2+} 浓度、ATP 浓度、连接蛋白(connexin, Cx)的磷酸化状态、跨膜电压和一些神经体液因子等。Cx 是构成 GJ 通道的基本结构和功能蛋白, 缝隙连接是相邻平滑肌细胞的侧面通过连接蛋白, 形成直径为 0.2~0.5 μ m 的通道, 使两侧的胞质能够直接沟通。此通道为一六边形的颗粒, 含 12 个 Cx 亚基, 6 个亚基位于一个细胞跨膜部位, 另 6 个位于另一个相邻细胞。血管平滑肌细胞的 Cx 亚基主要有 4 种类型, 根据其分子量分为 Cx37、Cx40、Cx43、Cx45。多种离子和第二信使分子等如 K^+ 、 Ca^{2+} 、NO、cAMP、cGMP 可以自由通过缝隙连接^[6], 快速地在相邻细胞产生同类物质的生物学效应。人体中存在大量缝隙连接, GJ 参与多种心血管及神经系统疾病的发生发展过程, Poelzing 等^[7]研究表明 Cx43 的重构是心力衰竭患者发生心律失常的重要基质, Kostin 等^[8]报道在主动脉狭窄伴左心室压力负荷过重的患者中, 心室肌 Cx43 的表达量在代偿期增加, 而在失代偿期降低, 且发现了重新分布蛋白质组学在缝隙连接研究中的应用。Derouette 等^[9]报道 Cx37 在动脉粥样硬化症中扮演重要角色, Sargiannidou 等^[10]报道 Cx32 突变致施万(氏)细胞和少突胶质细胞功能缺失, 从而导致神经系统肿瘤相关病症。Hong 等^[11]首创缝隙连接同脑血管痉挛之间的关系。除了上述心血管和神经系统外, GJ 还参与其他疾病, Jiang 等^[12]报道在人自身免疫性甲状腺病中存在 Cx43 的差异表达。

2.2 缝隙连接对血管收缩功能的调节 内皮细胞(AFB)和平滑肌细胞(SMC)是血管壁上的两种主要细胞, 内皮细胞间、平滑肌细胞间、内皮细胞与平滑肌细胞间都存在着大量的缝隙连接, 洪涛等^[13]应用三维共培养时发现, 内皮细胞(AFB)与 AFB 之间(AFB-AFB)、AFB 与平滑肌细胞(SMC)之间(AFB-SMC)

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30660188)。 [△] 通讯作者。

存在由 Cx43 组成的 GJ,并在三维共培养模型中通过染料传输等实验证实了其通道功能的存在。该发现将过去已知的 3 种血管壁 GJ 类型 EC-EC、EC-SMC、SMC-SMC 增加至 5 种类型,由缝隙连接介导的电和化学信号交流,这就使得血管壁能够在纵向上和横向上保持电活动、机械活动的同步性,使整个血管成为统一的功能单位,对兴奋性或非兴奋性物质作出统一的反应,维持了血管功能的稳定和一致。Hong 等^[11,14]利用游离血管环试验,在 OxyHb 或 ET-1 引起的基底动脉环持续收缩达高峰后加入不同浓度的 GJ 阻断剂 heptanol 或甘珀酸 (CBX)能显著抑制血管的持续收缩,并呈剂量依赖关系,表明缝隙连接在脑血管收缩功能调节中扮演重要的角色。

3 蛋白质组学在缝隙连接研究中的应用

蛋白质组学技术现已广泛应用于疾病机制研究中,Martin 等^[15]应用双向电泳及质谱分析等方法通过对蛛网膜下腔出血后致痉挛的基底动脉同未痉挛的基底动脉比较蛋白质谱的变化,从而探讨脑血管痉挛的蛋白质质控因子进而寻求脑血管痉挛的治疗靶点。缝隙连接在生物体内不仅是传递电和化学信号的通道,由于不同类型的缝隙连接通道具有不同的通透性和物质选择性,当机体受到外部或内部刺激后,缝隙连接可以通过改变连接蛋白的表达类型使机体适应这种变化。缝隙连接蛋白是构成缝隙连接的基本单位,所以研究缝隙连接蛋白的控制因素对于了解缝隙连接的控制因素并找到相应的分子靶点具有重要作用。新近的一些研究表明,GJ 通道功能改变与之前所讲的调控因素改变存在不一致的现象^[16],说明缝隙连接蛋白的调控因素除了上述因素以外,还应该存在其他的调控因素。随着蛋白质组学技术的发展使得越来越多与缝隙连接蛋白有交互作用的蛋白质被发现,研究缝隙连接蛋白的蛋白质影响因素有助于对缝隙连接机制研究的深入,进而探讨缝隙连接相关疾病发生机制以及药物靶点。Bruce 等^[17]通过免疫共沉淀等蛋白质组学技术研究认为,ZO-1 与 Cx43 相互作用增多使得心脏缝隙连接重构参与心力衰竭的发生,Liang 等^[18]在细胞水平通过免疫共沉淀及 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳等蛋白质组学技术研究认为,在成骨细胞中有 ZO-1 能使 Cx43 在成骨细胞膜的位置和功能发生改变,并通过染料传输试验反应缝隙连接功能改变。近年来研究表明多种激酶可以通过各种不同的激酶途径使得缝隙连接蛋白磷酸化,从而致缝隙连接功能发生改变,参与各种疾病的发生发展,Sirnes 等^[19]则通过应用二维电泳等蛋白质组学方法报道了 PKC 和 MAP 激酶途径使得 Cx43 磷酸化,从而抑制缝隙连接细胞间通讯系统。而 Axelsen 等^[20]在明确局部缺血所导致的室性心动过速中 Cx43 的去磷酸化同缝隙连接通讯的去偶联关系密切的基础上进一步通过质谱等蛋白质组学方法比较全心缺血时 Cx43 磷酸化的变化,进一步明确 Cx43 在缺血性心肌病中所扮演的角色。随着蛋白质组学技术的广泛应用,越来越多的缝隙连接蛋白质质控因子被证实,这对于探讨缝隙连接相关疾病的发生机制和治疗措施有重要意义。本研究拟在前期的研究基础上进一步探讨影响缝隙连接蛋白重构的因素,应用蛋白质组学方法和蛋白质分离技术,如二维电泳和蛋白质鉴定技术(质谱分析)等方法比较正常脑基底动脉和痉挛的基底动脉之间的差异蛋白,进而应用鉴定蛋白质相互作用技术(免疫共沉淀、酵母双杂交系统和蛋白质芯片技术等)找到同缝隙连接蛋白相互作用的蛋白质质控因子,并通过染料传输等方法来验证这些蛋白质质控因子在缝隙连接功能改变中所扮演的重要角色,为进一步对脑血管痉挛发生机制以及药物靶点的探讨提供理论依据。

4 存在的问题与展望

随着后基因组时代的到来,更强调从整体水平上研究生物功能,从而催生了蛋白质组学。蛋白质组学方法的应用为各种疾病的早期诊断、进展监测、治疗靶点的确定提供了重要依据。随着蛋白质组学研究迅速发展,已鉴定出许多具有诊断和治疗作用的蛋白质分子靶点,在疾病蛋白质组学上取得了一些成绩,但该领域仍处于探索期,仍有许多关键性的困难需要克服,如:样品的制备、分离和鉴定都需要发展及改进,相对基因组研究,它目前还处于初级阶段,还难以实现鉴定细胞和组织的每一个蛋白质;对于在人体实验中的组织或细胞的差异分析,也往往缺少适合的正常组织和细胞作为对照。而且以上在证明缝隙连接蛋白中蛋白质-蛋白质交互作用的研究中涉及到的多种技术,如酵母双杂交、免疫沉淀、亲和层析、免疫荧光、Western Blot 等,不同方法各有其优缺点,如果某一种蛋白质-蛋白质交互作用能被多种技术方法相互印证,则更能说明问题。体内各种蛋白质之间可以交互作用发挥其功能,但体内众多的蛋白质之间的相互作用是一个非常复杂的问题,一直都是医学研究的难点之一,还有大量的工作要做。随着蛋白质组学在缝隙连接中应用的越来越广泛,蛋白质组学在缝隙连接中的应用已经从之前应用蛋白质分离技术单纯分析差异蛋白^[15]到目前通过应用分析蛋白质相互作用技术来探讨差异蛋白同缝隙连接蛋白之间的作用,和它在缝隙连接蛋白重构中所扮演的角色进而探讨缝隙连接的功能变化及其蛋白质质控因子^[17]。相信通过蛋白质组学技术的进展以及与基因组学及其他技术的结合,将进一步加深对整个疾病的理解并探寻疾病的蛋白质分子治疗靶点,相信不久的将来最终可将其研究成果应用于临床,使之成为临床诊疗中的重要支柱之一。

参考文献:

- [1] 熊小明 综述,邓世雄 审校. 心脏性猝死的法医学研究进展[J]. 重庆医学,2006,35(8):750.
- [2] Kuster B, Mortensen P, Andersen J, et al. Mass spectrometry allows direct identification of proteins in large genomes[J]. Proteomics, 2001, 1(5):641.
- [3] Chalkley RJ, Burlingame AL. Identification of Glc NA cyclationsites of peptides and alpha crystalline using Q TOF mass spectrometry[J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2001, 12(10):1106.
- [4] Mann M, Hendrickson RC, Pandey A. Analysis of proteomes by mass spectrometry[J]. Annu Rev Biochem, 2001, 70:437.
- [5] Zhou H, Ranish JA, Aebersold Retch. Quantitative proteome analysis by solid phase isotope tagging and mass spectrometry[J]. Nat Biotechnol, 2002, 20(5):512.
- [6] Siegel G, Hofer HW. Membrane physiological basis of vascular autorhythmicity; vasomotion and flow modulation in the microcirculation[J]. Prog Appl Microcirc, 2003, 18:167.
- [7] Poelzing S, Rosenbaum DS. Altered connexin43 expression reduces arrhythmia substrate in heart failure[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 287(4):H1762.
- [8] Kostin S, Dammer S, Hein S, et al. Connexin43 expression and distribution in compensated and decompensated cardiac hypertrophy in patients with aortic stenosis[J].

- Cardiovasc Res, 2004, 62(2): 426.
- [9] Derouette JP, Wong C, Burnier L, et al. Molecular role of Cx37 in advanced atherosclerosis: A micro-array study [J]. Atherosclerosis, 2009, 27.
- [10] Sargiannidou I, Vavlitou N, Aristodemou S, et al. Connexin32 mutations cause loss of function in Schwann cells and oligodendrocytes leading to PNS and CNS myelination defects [J]. Neuroscience, 2009, 29(15): 4736.
- [11] Hong T, Wang Y, Wang HT, et al. Inhibitory effect of gap junctional blockers on cerebral vasospasm [J]. J Neurosurg, 2008, 108(3): 551.
- [12] Jiang XY, Feng XH, Li GY, et al. Differential expression of connexin 43 in human autoimmune thyroid disease [J]. Acta Histochem, 2009, 23.
- [13] 洪涛, 段剑, 汪阳, 等. 一种新型细胞模型在研究脑血管痉挛中的应用 [J]. 中华实验外科杂志, 2006, 10: 1265.
- [14] Hong T, Wang H, Wang Y, et al. Effects of gap junctional blockers on cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in rabbits [J]. Neurol Res, 2008: 30.
- [15] Martin HM, Daniel H, Oliver WS, et al. Identification of early markers for symptomatic vasospasm in human cerebral microdialysate after subarachnoid hemorrhage. Preliminary results of a proteome-wide screening [J]. Cereb Blood Flow Metabol, 2007, 27(10): 1675.
- [16] Herve JC, Plaisance I, Loncarek J, et al. Is the junctional uncoupling elicited in rat ventricular myocytes by some dephosphorylation treatments due to changes in the phosphorylation status of Cx43 [J]. Eur Biophys J, 2004, 33(3): 201.
- [17] Bruce AF, Rothery S, Dupont E, et al. Gap junction remodelling in human heart failure is associated with increased interaction of connexin43 with ZO-1 [J]. Cardiovasc Res, 2008, 77(4): 757.
- [18] Laing JG, Chou BC, Steinberg TH. ZO-1 alters the plasma membrane localization and function of Cx43 in osteoblastic cells [J]. J Cell Sci, 2005, 118(Pt10): 2167.
- [19] Sirnes S, Kjenseth A, Leithe E, et al. Interplay between PKC and the MAP kinase pathway in Connexin43 phosphorylation and inhibition of gap junction intercellular communication [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 24, 382(1): 41.
- [20] Axelsen LN, Stahlhut M, Mohammed, et al. Identification of ischemia-regulated phosphorylation sites in connexin43: A possible target for the antiarrhythmic peptide analogue rotigaptide (ZP123) [J]. Mol Cell Cardiol, 2006, 40(6): 790.

(收稿日期: 2009-04-22 修回日期: 2009-07-13)

· 综 述 ·

内皮祖细胞与肾脏病

王代红 综述, 袁发焯 审校

(第三军医大学新桥医院肾内科, 重庆 400037)

关键词: 内皮祖细胞; 肾脏病

中图分类号: R692

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2009)22-2898-04

内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是血管内皮细胞的前体细胞,亦称为成血管细胞(angioblast),在生理或病理因素刺激下,可从骨髓动员到外周血参与损伤血管的修复。1997年,Asahara等首次证明循环外周血中存在能分化为血管内皮细胞的前体细胞,并将其命名为血管内皮祖细胞。近年来的研究显示,内皮祖细胞在心脑血管疾病、外周血管疾病、肿瘤血管形成及创伤愈合等方面均发挥重要作用,在肾脏病领域 EPCs 的研究也越来越广泛。本文对内皮祖细胞的生物学特性、功能及其与肾脏病的关系综述如下。

1 EPCs 概述

EPCs 是一种来源于骨髓和循环中的单个核细胞,能自我更新,又能增殖并分化为血管内皮细胞,但尚未表达成熟血管内皮细胞表型,也未形成血管的前体细胞,它能归巢于缺氧、缺血组织并分化成内皮细胞,促进血管再生。另外它还分泌多种促进血管新生的因子,如血管内皮生长因子(VEGF)、表皮生长因子(EGF)、肝细胞生长因子(HGF)、白介素-8(IL-8)等。单从形态学上无法鉴别 EPCs, EPCs 主要依靠细胞表面标记来识别。然而迄今为止, EPCs 尚无统一的鉴定标准。一般将 CD133/CD34/VEGFR-2 的细胞定义为 EPCs^[1]。

2 EPCs 的动员和归巢

EPCs 的动员指 EPCs 从骨髓释放到外周血的过程,归巢指外周血 EPCs 迁移到组织缺血、缺氧或内皮损伤部位,黏附、结合到受损血管的过程。

生理状态下,外周血 EPCs 数量很少;在病理状态下骨髓中的 EPCs 可被动员进入外周血。某些细胞因子、趋化因子如 VEGF、血小板源性生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)等在 EPCs 的动员中发挥重要促进作用。VEGF 通过作用于 EPCs 表面的两种受体^[2]——VEGFR1、VEGFR2,诱导 EPCs 的增殖、调节黏附分子的表达而实现对 EPCs 的动员;同时,VEGF 也可通过诱导造血因子如粒-巨噬细胞集落刺激因子(G-CSF)的释放发挥动员作用。近年来研究还发现,PDGF 可通过作用于 VEGFR1 动员 EPCs,促进缺血肢体的血管新生。此外,血管生成素-1(angiotensin-1)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)和干细胞因子(stem cell factor, SCF)等也有促进 EPCs 动员的作用。另外还有外源性 EPCs 动员剂,如 HMG-CoA 还原酶抑制剂、血管紧张素转换酶抑制剂、血管紧张素 II 受体阻断剂等。

细胞因子和趋化因子如 VEGF、基质细胞衍生因子-1(stromal cell derived factor-1, SDF-1)^[3]等参与 EPCs 归巢。Murayama 等^[4]发现将含有 VEGF 的填充物移植到缺血部位,