

· 论 著 ·

自然流产患者蜕膜组织疾病特异蛋白的初步筛选与鉴定*

陈 倩, 谭 彬, 王应雄, 黎刚, 胡建刚, 余秋波[△]

(重庆医科大学生殖生物学研究室 400016)

摘要:目的 建立早期自然流产蜕膜组织和早期正常蜕膜组织双向电泳图谱,并观察两者之间蛋白表达的差异。方法 采用双向电泳技术分离蜕膜组织蛋白,利用专用软件分析所得差异明显蛋白并使用免疫组化和 Western blotting 验证双向电泳结果。结果 成功建立了早期自然流产蜕膜组织和早期正常蜕膜组织双向电泳图谱,并鉴定出 9 个差异显著的蛋白。结论 9 个差异显著的蛋白的功能主要涉及绒毛外滋养细胞的侵袭、自然流产蜕膜组织血管的重建以及蜕膜细胞的凋亡等方面,为进一步研究自然流产发病机制和治疗手段奠定了基础。

关键词:自然流产;蜕膜;蛋白质组学

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.21.006

中图分类号:R714.21;TQ937

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)21-2861-03

Preliminary screening and identification of spontaneous abortion decidual tissue special protein*

CHEN Qian, TAN Bin, WANG Ying-xiong, et al.

(Laboratory of Reproductive Biology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the differential proteomic expressions between the early spontaneous abortion decidual tissue and its normal control. **Methods** Samples of decidual protein were separated by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE). The screened differentially protein expressed protein spots were identified by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS), and key of which was verified by Western blotting and immunohistochemical staining. **Results** The two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis profiles of decidual tissue protein were successfully established by 2-DE. According to MALDI-TOF-MS, 9 proteins were significant. **Conclusion** These differential expression proteins mainly refer to invasion of the blastocyst, blood vessel remodeling and cell apoptosis. This can be an experimental basis for further research of the pathogenesis and treatment of spontaneous abortion.

Key words: spontaneous abortion; decidua; proteomics

正常蜕膜组织是母-胎界面间一个非常复杂而又高度协调的微环境,它由多种细胞构成。这些细胞与母体和胎儿所分泌到蜕膜的细胞因子共同形成了母-胎间信息交流的平台,并对胚胎滋养细胞“有控性”侵袭、子宫内膜的免疫耐受性、蜕膜化和胎盘的形进行精细调控。近年来,子宫内膜耐受性、蜕膜组织的病理学研究表明,胚胎滋养细胞有控性侵袭子宫内膜是胚胎正常发育的基础,而这种机制的形成正是以子宫内膜正常蜕膜化为前提。作者借助于蛋白质组学研究技术,分析了自然流产蜕膜组织基因转录后蛋白质的表达变化,获得了自然流产蜕膜组织细胞的蛋白表达谱,为探索自然流产的分子基础和可能的发生机制以及自然流产的病因诊断预防和治疗奠定了重要的实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 流产蜕膜组织取自重庆医科大学附属第一医院妇产科门诊患者,24~30 岁的孕妇 10 例,B 超显示胚胎发育停止,孕期 8~12 周,排除相关致病、致畸因素;正常对照蜕膜选取同龄健康孕妇人工流产蜕膜 10 例,孕期 8~12 周,B 超显示胚胎发育正常。标本采集均征得相关伦理委员会允许及本人知情同意。

1.1.2 仪器与试剂 固相 pH 梯度干胶条 (IPG) 购自 Bio-Rad,膜联蛋白 A5 多克隆抗体、 β -actin 抗体均购自 Abcom,免疫组化试剂盒购自中杉金桥公司,IPGphor IEF System 和 PROTEAN II XL Cell 电泳系统均购自 Bio-Rad 公司,MALDI-TOF-MS 质谱分析仪购自 ABI 公司。

1.2 方法

1.2.1 蜕膜组织的获取 收集新鲜蜕膜组织,用无菌生理盐水清洗干净,分为 2 份,一份冻存在液氮中用于双向电泳和 Western blot 检测,另一份予多聚甲醛固定后用于免疫组化。

1.2.2 蛋白样品的制备 在蜕膜组织中加入适量裂解液,冰浴匀浆。加入适量 Dnase 和 Rnase 在 4℃ 放置 15 min。4℃、12 000 r/min 离心 30 min,收集上清液,保存于一 80℃ 冰箱。用 Bradford 法测定蛋白浓度。

1.2.3 双向电泳 将提取的蛋白样品 (500 μ g) 制备 IPG 胶条。等电聚焦,程序如下:50 V 14 h,125 V 1 h,250 V 1 h,500 V 1 h,1 000 V 1 h,1 000 V 5 h,10 000 V 6 h,恒温 17℃,随后 2 次平衡胶条,每次 15 min。SDS-PAGE 电泳完成后,2-DE 胶硝酸银染色,显影,蒸馏水反复洗涤多次,至背景清晰。

1.2.4 图像采集与分析 染色后的凝胶使用凝胶成像系统照相 (Bio-Rad),利用 PDQuest 8.0 软件产生标准凝胶图。对蛋白

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30500054);重庆市自然科学基金重点资助项目(渝科发计字 2004-47)。 [△] 通讯作者,电话:(023)68485778;E-mail:yqb76712@yahoo.com.cn。

斑点标准化,以消除蛋白上样量不一致带来的误差。选取斑点体积差异比值大于 2 的蛋白为质谱分析候选蛋白。

1.2.5 差异表达蛋白的质谱分析 选取目的蛋白质点,切胶,脱色,酶解过夜,萃取后与基质溶液混合点样,进行质谱分析。并用 ABI 公司提供的 Mix1 肽混合物标准品、Angiotensin II 标准品和 ACTH fragment 18-39 标准品为外标校正质谱峰,得到肽质量指纹图(PMF),随后用 Mascot 软件在蛋白质数据库进行检索。

1.2.6 Western blotting 对照组和实验组的蛋白上样量均为 50 μg ,经 12%聚丙烯酰胺凝胶电泳后,转至硝酸纤维素膜,5%脱脂牛奶封闭抗原,加入兔抗人膜联蛋白 A5 多克隆抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。洗膜,随后加入二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 杂交, ECL 系统显色。同时使用 β -actin 抗体为内参照,以检验蛋白量的一致性。用 Bio-Rad 凝胶成像系统照相保存。

1.2.7 免疫组化鉴定 用多聚甲醛固定标本,脱水浸蜡包埋,切片。经二甲苯脱蜡,在梯度乙醇中水化,孵育灭活。在 EDTA 稀释液中水浴修复抗原,正常山羊血清室温封闭,与 1:100 稀释的兔抗人膜联蛋白 A5 多克隆抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,洗片,滴加辣根过氧化物酶标记的二抗, DAB 显色, 封固。用磷酸盐缓冲液替代一抗作阴性对照。

2 结果

2.1 二维电泳图谱分析

2.1.1 蜕膜组织总蛋白 2-DE 图谱 用 PDQuest8.0 软件分析实验组和对照组的蛋白质考染图谱,分别得到蛋白点约为 583 个和 613 个(封 2 图 1)。以对照组蛋白点为参照,实验组的蛋白点与其匹配率为 78%。

表 1 候选差异表达蛋白的鉴定结果

蛋白点	相对分子质量(kD)	等电点	表达变化	蛋白名称
1	53 676	5.06	上调	波形蛋白(Vimentin)
2	53 676	5.06	上调	波形蛋白
3	58 251	8.48	上调	—
4	48 283	4.29	上调	钙网蛋白前体
5	47 178	6.97	上调	—
6	73 186	7.17	下调	—
7	35 971	4.94	上调	膜联蛋白 A5
8	28 619	4.67	下调	原肌球蛋白-4
9	27 899	4.73	下调	—
10	49 381	9.05	下调	—
11	92 696	4.76	下调	葡萄糖调节蛋白 94
12	57 146	5.98	下调	蛋白质二硫键异构酶 A3 前体
13	54 014	5.32	下调	—
14	38 918	6.57	上调	膜联蛋白 A1
15	47 481	7.01	上调	α -烯醇化酶

—:未查到名称的蛋白。

2.1.2 差异候选蛋白的 MALDI-TOF 质谱鉴定 挑选 15 个差异表达显著的蛋白点(封 2 图 1 中箭头所示)进行质谱鉴定。经 Mascot 数据库查询,9 个蛋白点获得了有意义的结果($P < 0.05$),见表 1。其中,1、2、7、14、15 号蛋白表达增加,8、11、12

蛋白表达下降,4 号蛋白仅出现在自然流产的蜕膜组织中。

2.2 膜联蛋白的 Western blotting 检测结果 与对照组相比,实验组中的 β -actin 表达量基本一致,而膜联蛋白 A5 表达量明显上调,见图 2。与双向电泳结果一致。



左:实验组;右:对照组。

图 2 膜联蛋白 Western blotting 结果

2.3 膜联蛋白的免疫组化鉴定 膜联蛋白 A5 主要定位在子宫蜕膜组织的基质细胞中,其他细胞未见染色。通过对比发现,实验组内染色强度明显高于对照组,与双向电泳结果相符合,见封 2 图 3。

3 讨论

本研究采用 IPG 等电聚焦(pH 3~10)结合 SDS-PAGE 的蛋白质分离系统,对正常蜕膜组织及自然流产蜕膜组织进行蛋白质组分析,并对 15 个表达差异显著的候选蛋白点进行 MALDI-TOF 质谱鉴定,其中 9 个蛋白获得了有意义的结果。在这些鉴定出的差异蛋白质中,其功能主要涉及绒毛外滋养细胞侵袭、蜕膜组织血管重建、蜕膜细胞的凋亡以及肿瘤的浸润和转移^[1]等。现结合作者前期的实验基础和报道对几种重要的蛋白质的功能讨论如下。

膜联蛋白 A5(Annexin 5, A5)是一种 Ca^{2+} 依赖的磷脂结合通道蛋白,是膜结合蛋白家族成员之一^[2],主要存在于细胞膜和内质网膜上。胎盘组织中 30%~50%的膜联蛋白 A5 分布在细胞膜上,主要参与胞吞、胞吐、细胞受体的重新分布和受体-配体的内化,对 PKC 的活性具有抑制作用^[3]。膜联蛋白 A5 在早孕、中孕和晚孕胎盘的胎盘绒毛滋养层细胞、绒毛间质细胞、毛细血管内皮细胞的胞浆、胞膜和胞核都有表达^[4]。膜联蛋白 A5 与磷脂酰丝氨酸有高度的亲和性,能与早期凋亡细胞胞膜外翻的磷脂酰丝氨酸结合,通过荧光标记的膜联蛋白 A5 已经被作为体外检测细胞凋亡常规手段^[5]。近期研究还发现,单倍体型膜联蛋白 A5 基因和再发性流产相关^[6-7],提示其可以作为产科并发症危险度预测因子。本研究观察到自然流产蜕膜组织膜联蛋白 A5 表达增加,提示膜联蛋白 A5 可能参与了自然流产蜕膜细胞的凋亡过程,它可能是自然流产发生的一个早期信号分子。深入研究膜联蛋白 A5 与自然流产之间的关系,将有助于揭示自然流产的发生机制。

钙网蛋白前体(calreticulin precursor, CRP55)的产物是钙网蛋白,它是内质网上主要的 Ca^{2+} 结合蛋白,通过协助蛋白质正确折叠和维持细胞 Ca^{2+} 稳态而参与调节细胞凋亡、黏附、类固醇敏感性基因表达和自身免疫反应等,与人类多种疾病的发生、发展和预后相关^[8-10]。

近年来,钙网蛋白在血管生成中的作用开始受到关注^[11]。钙网蛋白的 N-结构域 1~180 位氨基酸片段被称为 Vasostatin,已有许多研究证实 Vasostatin 在抑制血管生成中发挥着重要作用。有研究发现,敲除小鼠的钙网蛋白基因将引起先天性心脏缺陷,从而导致死胎的发生,提示钙网蛋白可能是调节胚胎干细胞心脏发育的关键因子^[12]。同时,心脏后天成长的过程中钙网蛋白的持续过表达会导致心动过缓、完全性心脏传导阻滞和猝死^[13]。本研究发现钙网蛋白前体仅仅出现在自然流产的蜕膜组织中。结合钙网蛋白结构与功能研究的相关报道,

作者推测在自然流产蜕膜组织中,细胞内质网处于应激状态,大量未折叠或误折叠的蛋白堆积于内质网急需折叠,因而对分子伴侣的需求增加,钙网蛋白的合成也相应增加。而钙网蛋白 N-结构域 1~180 位氨基酸片段具有血管生成抑制剂效应,对蜕膜血管的重建可能产生抑制作用,从这一点看,钙网蛋白合成增加不利于蜕膜血管的重建,可能是自然流产发生的重要原因之一,但其作用的分子机制有待进一步研究。

本研究主要对自然流产蜕膜组织和正常妊娠蜕膜组织的蛋白质组进行了比较分析,并对某些差异蛋白进行了质谱鉴定,对建立早期自然流产临床生物标志物奠定了实验基础。这些蛋白分子表达的改变在自然流产中的意义以及它们在生殖过程中的调节作用,将是作者后续工作的研究重点。

参考文献:

- [1] 李良平,魏莲枝,周建荣. 高低分化喉癌组织的二维电泳图谱的建立及质谱分析[J]. 重庆医学,2008,37(2):149.
- [2] Cookson BT, Engelhardt S, Smith C, et al. Organization of the human annexin V (ANX5) gene[J]. Genomics, 1994, 20(3):463.
- [3] Dubois T, Oudinet JP, Mira JP, et al. Annexins and protein kinases C[J]. Biochim Biophys Acta, 1996, 1313(3):290.
- [4] 李淑红,岳亚飞,赵小鸽,等. Human Annexin V 在不同胎盘中的表达的定量分析[J]. 中国优生与遗传杂志,2005,13(10):31.
- [5] 李欣,高福禄,窦志杰,等. 膜联蛋白 A5 过表达对宫颈癌

细胞系 SiHa 细胞凋亡的影响[J]. 解剖学杂志,2008,31(5):668.

- [6] Tiscia G, Colaizzo D, Chinni E, et al. Haplotype M2 in the annexin A5 (ANXA5) gene and the occurrence of obstetric complications[J]. Thromb Haemost, 2009, 102(2):309.
- [7] Bogdanova N, Horst J, Chlystun M, et al. A common haplotype of the annexin A5 (ANXA5) gene promoter is associated with recurrent pregnancy loss[J]. Hum Mol Genet, 2007, 16(5):573.
- [8] 徐菲菲,刘秀华. 钙网蛋白的生理及病理生理学作用[J]. 生理科学进展,2006,37(3):216.
- [9] Liu XH. Calreticulin and cardiovascular diseases[J]. Int J Pathol Clin Med, 2006, 26(5):440.
- [10] Xiao F, Wei Y, Yang L, et al. A gene therapy for cancer based on the angiogenesis inhibitor, vasostatin[J]. Gene Ther, 2002, 9(18):1207.
- [11] 李丹莉,柳长柏. 钙网蛋白在肿瘤基因治疗中的应用[J]. 广东医学,2008,29(5):873.
- [12] Papp S, Dziak E, Opas M. Embryonic stem cell-derived cardiomyogenesis; a novel role for calreticulin as a regulator[J]. Stem Cells, 2009, 27(7):1507.
- [13] Michalak M, Guo L, Robertson M, et al. Calreticulin in the heart[J]. Mol Cell Biochem, 2004, 263(1/2):137.

(收稿日期:2009-12-30 修回日期:2010-04-05)

(上接第 2680 页)

参考文献:

- [1] Bouthier JD, Deluca N, Safar ME, et al. Cardiac hypertrophy and arterial distensibility in essential hypertension[J]. Am Heart J, 1985, 109(6):1345.
- [2] 焦阳,洪小苏. 高血压靶器官的细胞增生与凋亡[J]. 心血管病学进展,2002,23(6):356.
- [3] Taketo MM, Sonoshita M. Phospholipase A₂ and apoptosis[J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1585(2~3):72.
- [4] Yoo MH, Woo CH, You HJ, et al. Role of the cytosolic phospholipase A₂-linked cascade in signaling by an oncogenic, constitutively active Ha-Ras isoform[J]. J Biol Chem, 2001, 276(27):24645.
- [5] 王凡,刘国树. 大动脉顺应性减退的机制研究[J]. 国外医学心血管病分册,2005,32(5):275.
- [6] Hefner Y, Borsch-Haubold AG, Murakami M, et al. Serine 727 phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A₂ by MNK1-related protein kinases[J]. J Biol Chem, 2000, 275(48):37542.
- [7] 王韻,周新,汪炳华,等. 胞浆型磷脂酶 A₂ 介导弱氧化修

饰低密度脂蛋白诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡[J]. 生物化学与生物物理进展,2004,31(4):350.

- [8] Panini SR, Yang L, Rusinol AE, et al. Arachidonate metabolism and the signaling pathway of induction of apoptosis by oxidized LDL/oxysterol[J]. J Lipid Res, 2001, 42(10):1678.
- [9] Yaghini FA, Li F, Malik KU. Expression and mechanism of spleen tyrosine kinase activation by angiotensin II and its implication in protein synthesis in rat vascular smooth muscle cells[J]. J Biol Chem, 2007, 282(23):16878.
- [10] Su H, McClarty G, Dong F, et al. Activation of raf/MEK/ERK/cPLA₂ signaling pathway is essential for chlamydial acquisition of host glycerophospholipids[J]. J Biol Chem, 2004, 279(27):9409.
- [11] Pavicevic Z, Leslie CC, Malik KU. cPLA₂ phosphorylation at serine-515 and serine-505 is required for arachidonic acid release in vascular smooth muscle cells[J]. J Lipid Res A, 2008, 49(4):724.

(收稿日期:2010-06-18)