



# 蛋白质组学技术筛选和鉴定白化黑线仓鼠 皮肤白化相关差异蛋白质

定明<sup>1\*</sup>, 何允刚<sup>2\*</sup>, 张小飞<sup>1</sup>, 张广州<sup>1</sup>, 赵爽<sup>1</sup>, 王红艳<sup>3</sup>, 曾林<sup>1</sup>, 白杰英<sup>1</sup>

(1. 军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071; 2. 军事医学科学院科技部, 北京 100850;  
3. 国家生物医学分析中心, 北京 100850)

**【摘要】 目的** 比较黑线仓鼠及其白化突变系背部皮肤蛋白表达的差异, 寻找差异蛋白质, 从蛋白质水平探讨白化病的发生机制。**方法** 应用双向凝胶电泳技术分离出差异常蛋白质, 用质谱法分析其结构与组成, 通过蛋白质数据库确定差异蛋白的功能。**结果** 从64个表达差异蛋白斑点中发现33个显著差异的蛋白点, 其中又有14个差异点匹配到了有意义的蛋白质。14个差异点共鉴定出11个差异蛋白质, 这些差异蛋白质按功能可分为4类: (1) 糖代谢相关蛋白; (2) 运输蛋白; (3) 细胞骨架蛋白; (4) 其他蛋白。**结论** 黑线仓鼠与其白化突变系背部皮肤蛋白表达存在明显差异, 其中一些蛋白与白化病发生相关, 并可能成为白化病致病机理研究的分子标志物和药物治疗靶向位点。

**【关键词】** 白化病; 白化黑线仓鼠; 蛋白质组学; 双向凝胶电泳; 质谱

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 01-0079-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.01.016

## Proteomic screening of the differentially expressed proteins related with albinism in the skin of albino Chinese hamsters (*Cricetulus griseus*)

DING Ming<sup>1</sup>, HE Yun-gang<sup>2</sup>, ZHANG Xiao-fei<sup>1</sup>, ZHANG Guang-zhou<sup>1</sup>, ZHAO Shuang<sup>1</sup>,  
WANG Hong-yan<sup>3</sup>, ZENG Lin<sup>1</sup>, BAI Jie-ying<sup>1\*</sup>

(1. Laboratory Animal Center, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China;  
2. Department of Science and Technology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850;  
3. National Center of Biomedical Analysis, Beijing 100850)

**【Abstract】 Objective** To study the differentially expressed proteins in the skin of Chinese hamster, and explore the mechanism of albinism. **Method** Two-dimensional gel electrophoresis was performed to separate the differentially expressed proteins, and subsequently they were identified by mass spectrometry. **Results** Totally 2700 – 3000 spots were detected in the samples. Sixty-four differentially expressed spots were detected. Among them 33 significant differential protein spots were observed. There were 14 spots matched with real proteins in the 33 spots, and only 11 differential proteins were found. These identified proteins could be divided into 4 categories according to their functions: (1) glycometabolism proteins; (2) transport proteins; (3) cytoskeletal proteins; (4) other proteins. **Conclusions** There are significant differences between the Chinese hamster and albino ones. Some proteins are involved in the pathogenesis mechanism of albinism, which may be helpful in the study of albinism and may become therapeutic target sites.

**【基金项目】** 军事医学科学院实验动物中心青年基金(QN2012003), “十二五”专项课题(2011ZXJ09201-031)。

**【作者简介】** 定明, 男, 助理研究员, 主要从事实验动物学研究, E-mail: 303631434@qq.com

何允刚, 男, 助理研究员, 主要从事实验动物福利伦理研究, E-mail: helan430@163.com

#两作者对于本研究具有同等贡献, 为共同第一作者。

**【通讯作者】** 白杰英, 男, 副研究员, 主要从事人兽共患感染病动物模型研究, E-mail: baijieying@126.com

曾林, 男, 研究员, 主要从事实验动物学研究, E-mail: zenglin1965@126.com

**【Key words】** Albinism; Albino Chinese hamster (*Cricetulus griseus*); Proteomics; Two-dimensional gel electrophoresis; Mass spectrometry

白化病 (albinism) 是由基因突变引起的遗传病,临床上表现为眼、皮肤或毛发的色素缺乏,目前已知有 12 种类型基因的突变与白化有关<sup>[1]</sup>。白化病因其临床症状明显而易于被观察到,从而给患者生活带来极大的不便<sup>[2]</sup>。当前,白化病的治疗尚达不到标本兼治的效果,因此,开展白化机理研究,选择相应的治疗靶点,是一项亟待加强且具有重要意义的工作。

白化黑线仓鼠 (A:CHA) 是上世纪八十年代由作者所在单位选育出的一种自发突变黑线仓鼠<sup>[3,4]</sup>。经过几十年的培育,已完成了其生长发育特点、生物学特性、遗传特点及相关生理生化指标的研究<sup>[5,6]</sup>。对其白化机理进行了初步研究,发现其白化与酪氨酸酶基因的突变具有一定的相关性<sup>[7,8]</sup>。另外,研究过程中发现,白化黑线仓鼠在寄生虫感染<sup>[5]</sup>、放射与辐射及肿瘤移植<sup>[9]</sup>等研究方面是良好的模型动物。

蛋白质组学技术的应用为疾病发病机制及生物标志物研究提供了新的手段。其经典技术双向电泳 (two-dimensional electrophoresis, 2DE) 与质谱 (mass spectrometry, MS) 相结合,在寻找疾病特异标志物、研究发病机制、治疗和新药研制等方面得到了广泛应用<sup>[10,11]</sup>。白化病蛋白质水平的研究报道较少,本研究利用白化黑线仓鼠为模型,应用蛋白质组学技术 (2-DE 及质谱) 筛选并鉴定白化相关蛋白质,获得了重要的蛋白信息,为接下来利用反向遗传学技术开展白化病相关研究奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

黑线仓鼠及其白化突变系 (A:CHA) 由军事医学科学院实验动物中心自主研发并繁育 [SCXK-(军)2012-004], 并在军事医学科学院实验动物中心进行实验操作 [SYXK-(军)2012-0021]。

#### 1.1.2 其他试剂和仪器

双向电泳实验所用的十二烷基硫酸钠、丙烯酰胺、二硫苏糖醇、甘氨酸、IPG 缓冲液等试剂均为 Amersham 公司产品;蛋白酶抑制剂购自罗氏生物;考马斯亮蓝 R350 为 Amresco 公司产品;其他国产试剂也均为分析纯标准。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 背部皮肤蛋白提取及定量

6 月龄雄性黑线仓鼠及其白化突变系各 6 只。剔除背部毛发,断椎处死,剪取背部皮肤,每只剪取皮肤大小 1~2 cm<sup>2</sup> (约 20 g),用生理盐水清洗后,同种类 6 只实验动物的样品混在一起,加入裂解液裂解,并在液氮中反复冻融多次,再使用超声波破碎提取出所有蛋白,在 13 000 r/min 下离心 50 min 后,小心吸取上清液,保存在 -70℃ 冰箱中。最后取部分溶液测定蛋白浓度 (Bradford 法)。

#### 1.2.2 双向凝胶电泳

按照 Thiede 在《Electrophoresis》<sup>[12]</sup> 中创立的方法和 IPGphor (Amersham Pharmacia Biotech 生产) 等电聚焦系统说明,进行双向凝胶 SDS-PAGE 电泳 (实验所用胶条为 PH3-10NLIPG, 18 cm),最后以考马斯亮蓝 R-350 (0.025%) 染色。

#### 1.2.3 凝胶图像分析

对所获凝胶使用图像扫描仪 (Amersham Pharmacia Biotech 生产) 进行透射扫描,用 ImageMaster 5.0 软件对扫描得到的图谱结果进行图像分析。通过比较两组图像一致的差异性,找出存在差异的蛋白斑点。

#### 1.2.4 肽质量指纹谱测定

对凝胶中存在差异的蛋白斑点区域进行切割,脱色后胶内酶切,用 MALDI I-TOF-MS (REFLEX III, Bruker 生产) 对肽混合物质量进行测定。

#### 1.2.5 数据库检索鉴定蛋白质

将所获得的肽质量指纹图谱数据及其他参数在 Mascot 数据库 (<http://matrixscience.com>) 中进行检索,查寻与结果相匹配的蛋白质,初步获得白化相关差异表达蛋白质。

## 2 结果

### 2.1 双向电泳图谱及凝胶图像分析

凝胶图谱可辨识蛋白点约 2700~3000 个,并表现出良好的重复性与稳定性。白化组和正常组背部皮肤蛋白双向电泳图谱经 ImageMaster 2D Platinum 5.0 软件分析,两组间表达存在统计学差异 ( $P < 0.05$ ) 的蛋白点共 64 个,其中表达上调或仅出现在白化组中的蛋白点有 21 个,表达下调或仅出现在正常组中的蛋白点有 43 个。

将得到的 64 个表达差异蛋白点放入个体样品比对验证。相对正常个体,当差异蛋白点在白化个体中变化为 1.5 倍及以上或是出现新增和消失的情况时,确认其为显著差异蛋白点。共获得 33 个显著差异蛋白点,其中,白化组的背部皮肤中表达量呈显著上调的有 12 个蛋白点,显著下调的有 19 个蛋白点,1 个蛋白点只在正常组中有表达,另有 1 个蛋白点只在白化中表达(图 1,见彩插 15)。

## 2.2 差异蛋白质的质谱鉴定

将显著差异蛋白点从凝胶上切下,经质谱分析,获得质量指纹图谱。用 Mascot 搜索数据库并进行分析,33 个显著差异的蛋白点中有 14 个差异表达点匹配到有意义的蛋白质,其中血清白蛋白(serum albumin)的鉴定来自 3 个不同的差异蛋白点,因此共得到 11 个差异表达蛋白。根据功能将这些差异表达蛋白分为 4 类:(1)代谢相关蛋白酶,如 triose

phosphate isomerase(磷酸丙糖异构酶)、enolase-1(烯醇化酶-1)、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(3-磷酸甘油醛脱氢酶)、acetyl-CoA acetyltransferase(乙酰辅酶 A 乙酰基转移酶);(2)运输蛋白,如 serum albumin(血清白蛋白)、serum albumin-analog(血清白蛋白类似物)、parvalbumin alpha(小清蛋白  $\alpha$ );(3)细胞骨架蛋白,如 keratin 1(角蛋白 1)、cytokeratin 9(细胞角蛋白 9)、type II cytoskeletal 2 epidermal(II 型表皮细胞骨架 2);(4)其他蛋白,如 NmrA-like family domain-containing protein 1 及未命名蛋白产物等。

差异蛋白中有 4 种蛋白质(角蛋白 1、细胞角蛋白 9、II 型表皮细胞骨架 2 及乙酰辅酶 A 乙酰基转移酶)在白化组织上表达上调,其余 7 种蛋白质表达下调(表 1)。

表 1 差异蛋白质谱分析

Tab. 1 Differentially expressed proteins identified by mass spectroscopy

No	类型 Description	增加 Accession	分值 Score	Nominal Mass ( $M_r$ )	Calculated pI value	表达 Expression in A:CHA
1	血清白蛋白 Serum albumin	gi 344248792	155	20799	5.98	↓
2	血清白蛋白类似物 Serum albumin-analog	gi 354499898	267	48646	5.69	↓
3	磷酸丙糖异构酶 Triose phosphate isomerase	gi 54855	126	26679	6.90	↓
4	类 NmrA 家族域包含蛋白 1 NmrA-like family domain-containing protein 1	gi 344239812	63	31314	6.10	↓
5	烯醇化酶-1 Enolase-1	gi 6624235	64	42556	4.80	↓
6	角蛋白 1 Keratin 1	gi 11935049	122	66027	8.16	↑
7	细胞角蛋白 9 Cytokeratin 9	gi 435476	99	62092	5.16	↑
8	3-磷酸甘油醛脱氢酶 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	gi 65987	110	35686	6.90	↓
9	小清蛋白 $\alpha$ Parvalbumin alpha	gi 344253886	143	11119	5.34	↓
10	II 型表皮细胞骨架 2 Type II cytoskeletal 2 epidermal	gi 344256909	141	45910	8.37	↑
11	乙酰辅酶 A 乙酰基转移酶 Acetyl-CoA acetyltransferase	gi 354481833	67	40971	6.83	↑

注: ↓:Down-regulated(↓:下调); ↑:up-regulated(↑:上调)

## 3 讨论

当前,借助分子生物学技术开展白化病研究的报道逐渐增多<sup>[13,14]</sup>,但从蛋白质水平开展深入研究的报道并不多见。在此次被鉴定的差异表达蛋白中,我们发现糖代谢系统中关键的三种蛋白酶 Triose phosphate isomerase(磷酸丙糖异构酶)、enolase-1(烯醇化酶-1)、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(3-磷酸甘油醛脱氢酶)在白化组中表达量明显下调。它们是糖酵解的关键酶,推动着葡萄糖向丙酮酸的转化,同时产生大量能量,而且这三步反应均是可逆催化反应,蛋白酶表达量的降低可以直接

导致脂肪酸类中间产物的堆积,间接减少了丙酮酸的生成和能量的产生,同时也预示着可能产生遗传性代谢缺陷。脂类代谢相关蛋白 acetyl-CoA acetyltransferase(乙酰辅酶 A 乙酰基转移酶)的表达量则出现了显著升高。另外,运输蛋白 serum albumin(血清白蛋白)、serum albumin-analog(血清白蛋白类似物)、parvalbumin alpha(小清蛋白  $\alpha$ )的表达量都出现了下调。血清白蛋白是血清中含量最多的蛋白质,它作为脂肪酸的载体参与了体内脂肪酸的运送。同时,它也参与维持了血液正常的渗透压,体内缺乏可能导致机体浮肿。小清蛋白是细胞内一种钙结合蛋白,维持细胞内钙离子交换,同时可能具有轴浆传

送的功能。它的表达有助于维持  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)在神经元网络的稳定性。

作为细胞骨架的各种角蛋白 keratin 1(角蛋白 1)、cytokeratin 9(细胞角蛋白 9)、type II cytoskeletal 2 epidermal(II 型表皮细胞骨架 2) 表达量也升高了。角蛋白属于 I 型和 II 型中间纤维,是上皮细胞中间纤维的主要组成蛋白。角蛋白对上皮细胞及组织的稳定性和完整性具有重要的功能。角蛋白对上皮细胞及组织的稳定性和完整性具有重要的功能。同时其参与调解了黑色素体的运输和定位,影响了可调解黑色素的 AP-3 复合物及该复合物囊泡与马达蛋白的相互作用,从而最终影响了黑色素体在细胞膜内的运输<sup>[15]</sup>。

本研究运用 2D 电泳和质谱技术分离并鉴定了黑线仓鼠及其白化突变系背部皮肤中的差异表达蛋白。成功筛选并鉴定出 11 个显著差异表达蛋白,相比正常黑线仓鼠,白化系中有 4 个上调表达,7 个下调表达,为研究其白化性状发生机制和发病机理奠定了基础。

(本文图 1 见彩插 15。)

#### 参 考 文 献

- [ 1 ] Huizing M, Boissy R E, Gahl W A. Hermansky-Pudlak syndrome; vesicle formation from yeast to man [J]. *Pigment Cell Res*, 2002, 15(6): 405 - 419.
- [ 2 ] 李洪义,魏海云,吴维青,等. 眼皮皮肤白化病的表现与危害 [J]. *中国全科医学*, 2006, 9(14):1211 - 1212.
- [ 3 ] 徐植岚,王建,李玉琴. 白化黑线仓鼠性状初步观察 [J]. *上海实验动物科学*, 1987, 7(1):30 - 33.
- [ 4 ] 徐植岚,王建. 白化黑线仓鼠实验室驯育,实验动物科学 [J]. 1987, 4(3):79 - 83.
- [ 5 ] 遇秀玲,郑振峰. 白化黑线仓鼠解剖学与组织学特性的比较研究 [J]. *中国实验动物学杂志*, 1991, 1(3,4):191 - 193.
- [ 6 ] 遇秀玲,郑振峰. 白化黑线仓鼠解剖学与组织学特性的比较研究 [J]. *中国实验动物学杂志*, 1991, 1(3,4):191 - 193.
- [ 7 ] 赵爽,王冬平,刘晓,等. 黑线仓鼠及其白化突变系血液生理生化值的测定与分析 [J]. *中国比较医学杂志*, 2011, 21(7):17 - 21.
- [ 8 ] 赵彦斌,孙兆增,白杰英,等. 黑线仓鼠及其白化突变系 TYR, TYRP1 的基因表达水平比较分析 [J]. *中国比较医学杂志*, 2012, 22(7):1 - 4.
- [ 9 ] BAI JY, LI X, LI C, et al. Anticancer effects of fusion protein CATin on DMBA-induced carcinogenesis in buccal pouch of Chinese hamster, *Chem Res Chin Univ*, 2012, 28(2), 269—275.
- [ 10 ] 孙志岭,高觉民,许志洋,等. 蛋白质组学技术筛选与鉴定癫痫疾病的差异蛋白质 [J]. *高等学校化学学报*, 2010, 31(10):1970 - 1975.
- [ 11 ] 赵慧辉,杨帆,王伟,等. 无标记定量法研究冠心病不稳定心性绞痛血瘀证的差异蛋白质组 [J]. *高等学校化学学报*, 2010, 31(2):285 - 292.
- [ 12 ] Thiede B, Szejak F, Dimmler C, et al. A two dimensional electrophoresis database of a human Jurkat T-cell line [J]. *Electrophoresis*, 2000, 21(13):2713 - 2720.
- [ 13 ] Wei A, Yang X, Lian S, et al. Implementation of an optimized strategy for genetic testing of the Chinese patients with oculocutaneous albinism [J]. *J Dermatol Sci*, 2011, 62:124 - 127.
- [ 14 ] Grønskov K, Ek J, Sand A, et al. Birth prevalence and mutation spectrum in Danish patients with autosomal recessive albinism [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50:1058 - 1064.
- [ 15 ] Magin TM, Vijayaraj P, Leube RE. Structural and regulatory functions of keratins [J]. *Exp Cell Res*, 2007, 313(10):2021 - 2032.

[ 收稿日期 ] 2013-09-12