

晕船适应与不适应大鼠脑干蛋白质双向电泳图谱的比较与鉴定

苏波¹, 张建鹏², 冯伟华², 杜鹏¹, 任绪义², 郭俊生^{1*}

(1. 第二军医大学海军医学系军队卫生学教研室, 上海 200433; 2. 基础医学部生物化学与分子生物学教研室)

[摘要] **目的:**建立晕船适应及不适应大鼠脑干总蛋白质的双向电泳图谱, 鉴定差异表达蛋白, 探讨晕船适应的可能机制。

方法:30 只大鼠根据模拟晕船刺激后异嗜高岭土量的增减分为不晕组 ($n=10$)、晕船适应组 ($n=12$) 和不适应组 ($n=8$), 另设未接受模拟晕船刺激的正常大鼠作为空白对照组 ($n=10$)。应用双向电泳技术, 分离晕船适应组和不适应组大鼠脑干蛋白 ($n=6$), 肽指纹图谱鉴定两组间差异表达蛋白质。**结果:**模拟晕船刺激 21 d 后, 与空白对照组相比, 晕船适应组大鼠异嗜高岭土量经历了一个由少到多又逐渐回落的过程, 不适应组大鼠异嗜高岭土量则始终维持在一个较高的水平 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。获得了 9 个晕船适应相关蛋白质: 硫氧还蛋白过氧化物酶 I、硫氧还蛋白过氧化物酶 II、低分子量神经丝蛋白、泛素羧基末端水解酶 PGP9.5 和谷氨酰胺合成酶上调; 碳酸酐酶 II、磷酸丙糖异构酶 I、磷酸甘油酸变位酶 B 和线粒体电压依赖型阴离子通道下调。**结论:**大鼠对晕船适应后可诱导脑干蛋白质组表达的改变, 主要与能量代谢、神经递质调节和氧化应激有关。

[关键词] 晕动病; 脑干; 蛋白质组; 双向电泳

[中图分类号] R 835.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)04-0382-04

Two-dimensional electrophoresis in proteomic comparison and identification of brain stem proteins in seasickness adaptive and non-adaptive rats

SU Bo¹, ZHANG Jian-peng², FENG Wei-hua², DU Peng¹, REN Xu-yi², GUO Jun-sheng^{1*} (1. Department of Military Hygiene, Faculty of Navy Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University)

[ABSTRACT] **Objective:** To establish a two-dimensional electrophoresis system for total brain stem proteins of seasickness adaptive and non-adaptive rats and to identify the differentially expressed proteins for investigation of the possible mechanism of seasickness adaptation. **Methods:** According to the kaolin intakes after seasickness stimulation, 30 rats were divided into non-seasickness group ($n=10$), seasickness adaptive group ($n=12$) and seasickness non-adaptive group ($n=8$). Another 10 normal rats not receiving stimulation were taken as blank control. The brain stem proteins of seasickness adaptive and seasickness non-adaptive rats ($n=6$) were isolated by two-dimensional electrophoresis; the differentially expressed proteins were identified by peptide mass fingerprint (PMF). **Results:** During a 21-day stimulation, the amount of kaolin consumption in seasickness adaptive rats experienced an increasing phase and a subsequent decreasing phase; seasickness non-adaptive rats consumed significantly more kaolin during the whole 21-day stimulation than the blank control rats did ($P<0.01$ or $P<0.05$). Nine seasickness adaptive proteins were identified by PMF; peroxiredoxin I, peroxiredoxin II, light molecular-weight neurofilament, ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase PGP9.5, and glutamine synthetase were highly expressed; carbonic anhydrase II, triosephosphate isomerase I, phosphoglycerate mutase isozyme B and mitochondrial voltage dependent anion channel were lowly expressed. **Conclusion:** Adaptation to seasickness can induce changes in the protein expression pattern of brain stem in the seasickness adaptive rats, which may be associated with energy metabolism, neurotransmitter adjustment and oxidative stress.

[KEY WORDS] seasickness; brain stem; proteome; two-dimensional electrophoresis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(4): 382-385]

晕船是常见的运动病, 发病率高。适应性训练是一种实用而有效的方法, 但适应性获得时间上的差异和脱离刺激后适应性的消减严重影响适应性锻炼的效果。因此, 探讨晕船适应产生的机制对于有效提高晕船适应能力具有重要的理论和实践意义。本研究拟运用双向电泳 (two-dimensional electrophoresis, 2-DE) 技术, 通过比较晕船适应与不适应大鼠脑干蛋白质 2-DE 图谱, 从蛋白质水平探讨晕

船适应产生的机制, 为进一步提高晕船适应能力奠定理论基础。

[基金项目] 军事医学专项基金 (2001J-4)。Supported by Military Medicine Foundation (2001J-4)。

[作者简介] 苏波, 博士生。E-mail: qingling1_1@yahoo.com.cn

* Corresponding author. E-mail: guojs@smmu.edu.cn

1 材料和方法

1.1 材料和试剂 高岭土购自中国高岭土公司, N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、3-[(3-胆酰胺醛)-二乙胺]-丙磺酸(CHAPS)、十二烷基磺酸钠(SDS)、二硫苏糖醇(DTT)、苯甲基磺酰氟(PMSF)、低熔点琼脂糖、乙酸钠、碳酸钠、甘氨酸、MgCl₂购自上海华舜公司,两性电解质 Bio-lyte、低相对分子质量蛋白标准、线性固相 pH 梯度预制胶条(pH3-10, 17 cm, 线性)购自 Bio-Rad 公司, DNase I、RNase A、超纯尿素购自 Sigma 公司,其余常用试剂为国产分析纯市售商品。主要仪器包括晕船模拟装置、RW20 型组织匀浆仪(德国 IKA 公司)、Himic CR21 低温高速离心机(日立公司)、Voyager DE Pro 质谱仪(ABI)、PROTEAN IEF CELL IEF 电泳仪(Bio-Rad)、PROTEANR II Multi-Cell 垂直电泳系统(Bio-Rad)、凝胶图像扫描仪(Microtek ScanMaker8700, Bio-Rad)、图像分析软件(PDQUEST7.0.1, Bio-Rad)。

1.2 方法

1.2.1 动物准备 健康雄性 SD 大鼠 40 只,购自第二军医大学实验动物中心,体质量(150±10) g,适应性饲养 1 周后,其中 30 只按 Crampton 等^[1]报道仿制改装的晕船模拟器进行模拟晕船刺激,即顺时针方向以加速度 16°/s² 加速至 120°/s,然后以 45°/s² 减速至 0,逆时针再以加速度 16°/s² 加速至 120°/s,然后以 45°/s² 减速至 0。如此反复 21 d,每日定时刺激大鼠 2 h,记录大鼠高岭土摄入量,根据模拟晕船刺激后异嗜高岭土量的增减筛选出不晕组、晕船适应组和不适应组。另 10 只未受刺激正常大鼠为空白对照组。

1.2.2 样品制备 晕船适应和不适应组各取 6 只大鼠断头处死后迅速分离脑干组织,去除脑膜,预冷三蒸水洗去血渍,冰浴条件下加入 5 倍体积预冷三蒸水匀浆,-20℃ 反复冻融 3 次后,分别加入 1 mg/ml DNase I、250 mg/ml RNase A 和 10 mmol/L MgCl₂,4℃ 冰箱静置 4 h,加入裂解液(7 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、4% CHAPS、65 mmol/L DTT、0.2% Bio-lyte),16 000 r/min 4℃ 离心 60 min,上清液蛋白质浓度用 Bradford 法定量,-80℃ 冻存备用。

1.2.3 双向电泳(2-DE) 2 组蛋白质上样量均为 150 μg,双向电泳操作参见 Bio-Rad 公司 2-DE 手册。部分改进措施:为避免双向 SDS-PAGE 电泳及染色时间差异,保证实验的平行性,本研究在进行双

向电泳时,将一向已聚焦好的 IPG 胶条自正中截开,然后分别将两组的碱性端和酸性端在同一聚丙烯酰胺凝胶上进行双向电泳,余相同。银染参见伯乐公司操作步骤。

1.2.4 图像分析 银染显色的凝胶通过扫描仪获取图像,PDQuest7.0.1 分析软件对图像进行背景消减、取点检测和匹配后,获取差异蛋白质点。

1.2.5 肽质量指纹分析 加大蛋白质上样量行考染,用灭菌的手术刀片将已选取的差异蛋白点沿凝胶边缘切下,置 1.5 ml Eppendorf 管中,送交上海基康公司作肽质量指纹分析。

1.3 统计学处理 实验数据采用 SPSS 12.0 统计软件进行方差分析,组间比较应用 LSD 法。

2 结果

2.1 分组结果 从图 1 可以看出,适应性饲养 1 周中,4 组大鼠不食或仅食少量高岭土,无显著差异;除 10 只空白对照外,第 8 天开始其余 30 只大鼠均接受模拟晕船刺激,刺激 21 d 后,8 只大鼠异嗜高岭土量始终维持在一个较高的水平,和空白对照组比较差异显著($P<0.05$ 或 $P<0.01$),为晕船不适应大鼠组;12 只大鼠异嗜高岭土量经历了一个由少到多又逐渐回落的过程,在刺激的前期与空白对照组比较差异显著($P<0.05$ 或 $P<0.01$),到刺激的后期无显著差异,为晕船适应大鼠组;10 只大鼠在模拟晕船刺激过程中异嗜高岭土量与空白对照组比较差异不显著,为不晕大鼠组。

2.2 晕船适应与不适应大鼠脑干组织双向电泳结果 从图 2 可以看出,2 组大鼠脑干中性和碱性蛋白偏多,酸性蛋白偏少,相对分子质量主要集中在 30 000~100 000。晕船适应组和不适应组大鼠脑干蛋白斑点数目分别为(1 096±12)个和(1 147±16)个。以晕船不适应组图谱为参考胶发现,晕船适应组大鼠脑干部分蛋白质表达上调,部分下调,两组图谱中未见明显增加或缺失的蛋白点。

2.3 质谱分析结果 获得了 13 个差异表达蛋白质点,成功检测 10 个,其中晕船适应大鼠 6 个蛋白质点高表达,4 个低表达,spot3 和 spot4 均为 peroxiredoxin II。9 个差异表达蛋白分别是硫氧还蛋白过氧化物酶 I、硫氧还蛋白过氧化物酶 II、低相对分子质量神经丝蛋白、泛素羧基末端水解酶 PGP9.5 和谷氨酰胺合成酶上调;碳酸酐酶 II、磷酸丙糖异构酶 I、磷酸甘油酸变位酶 B 和线粒体电压依赖型阴离子通道下调。结果详见表 1 和表 2。

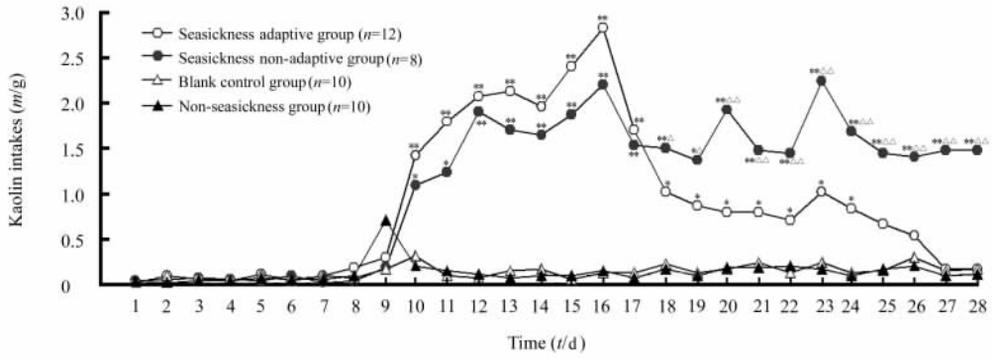


图 1 4组大鼠高岭土摄入量比较

Fig 1 Comparison of kaolin intakes between rats of 4 groups

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs blank control group; $\triangle P < 0.05$, $\triangle\triangle P < 0.01$ vs seaisickness adaptive rats

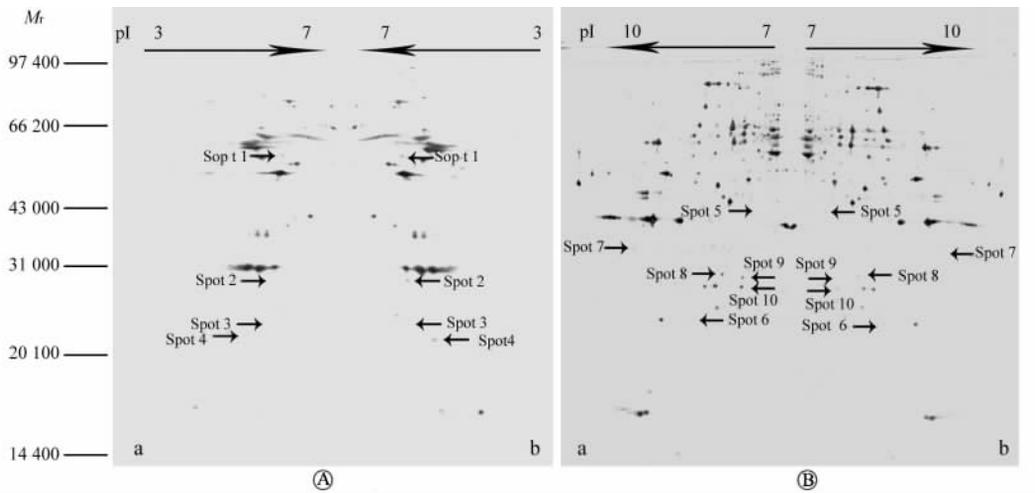


图 2 2组大鼠脑干蛋白 2-DE 酸性端(A)和碱性端(B)图谱

Fig 2 2-DE acidic end (A) and alkaline end (B) results of seaisickness adaptive and seaisickness non-adaptive rats

a; Seaisickness adaptive rats; b; Seaisickness non-adaptive rats; Arrows indicate 9 differentially expressed proteins associated with seaisickness adaptation

表 1 晕船适应组大鼠脑干高表达的蛋白质点

Tab 1 Protein spots of increased expression in brain stem of seaisickness adaptive rats

Spot	MOWSE Score	Masses Matched	M_w/pI	Accession No.	Protein name
1	1.29e+003	10/20(50%)	61 335.6/4.63	13929098	Light molecular-weight neurofilament
2	923	5/20(25%)	24 782.4/5.12	8394506	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase PGP9.5
3	6.1e+003	9/12(75%)	21 797.8/5.34	34849738	Peroxiredoxin II
4	1.52e+003	7/15(46%)	21 797.8/5.34	34849738	Peroxiredoxin II
5	1.8e+003	9/20(45%)	42 268.0/6.64	121376	Glutamine synthetase
6	1.12e+004	8/15(53%)	22 109.5/8.27	16923958	Peroxiredoxin I

表 2 晕船适应组大鼠脑干低表达的蛋白质点

Tab 2 Protein spots of decreased expression in brain stem of seaisickness adaptive rats

Spot	MOWSE Score	Masses Matched	M_w/pI	Accession No.	Protein name
7	1.08e+004	5/15(33%)	30 755.6/8.62	6755963	Mitochondrial voltage dependent anion channel
8	3.36e+004	6/20(30%)	29 114.0/6.89	9506445	Carbonic anhydrase II
9	2.21e+004	6/15(40%)	28 832.1/6.68	8248819	Phosphoglycerate mutase type B subunit
10	6.69e+006	10/15(66%)	26 717.9/7.06	38512111	Tpil protein

3 讨论

大鼠发生运动病后,异嗜高岭土等非营养性物质行为相当于其他非啮齿类动物的呕吐反应,可依据异嗜高岭土的量作为衡量运动病发生程度的可靠指标^[2]。本实验室采用晕船模拟装置诱发大鼠晕船,并根据大鼠异嗜高岭土量的增减来判断晕船发生的严重程度和有无适应的产生。

前期研究^[3]证实,大鼠对晕船适应后,脑干基因表达发生了一系列改变。本研究采用2-DE技术,对晕船适应和不适应大鼠脑干蛋白表达差异进行了研究。在检测的10个蛋白质点中,包括了细胞骨架蛋白、离子通道蛋白以及与氧化应激、神经递质和能量代谢等有关的起重要作用的酶。其中,谷氨酰胺合成酶(GS)作为谷氨酸-谷氨酰胺循环的重要成分,能将兴奋性神经递质谷氨酸(Glu)转化为谷氨酰胺(Gln),从而解除对神经元的兴奋毒性作用^[4]。研究表明,Glu是前庭神经系统信息传入和快速突触传递所必需的兴奋性递质^[5]。金淑仪等^[6]对模拟运动病大鼠脑干内Glu含量进行了测定,发现运动病组大鼠脑干内Glu水平显著下降,预先给予脑异噁处理可防止其下降,认为大鼠遭受异常前庭刺激时,前庭系统兴奋性传入信息增强,Glu-Ca²⁺依赖性释放增加,Glu在重摄取后经GS作用被降解为Gln,导致脑干Glu含量降低。本实验结果发现,晕船适应大鼠较不适应大鼠脑干GS表达量增加,提示其变化可能与晕船适应产生有关,具体机制尚有待进一步的研究。

研究结果还显示,晕船适应大鼠脑干泛素羧基末端水解酶(UCH-L1)表达上调,与前期研究在基因水平上得到的结果一致^[3]。UCH-L1是一类去泛素化酶,与泛素、泛素活化酶、泛素偶联酶、泛素-蛋白连接酶、26S蛋白酶体共同组成泛素系统,是已知最重要的、有高度选择性的蛋白质降解途径。该酶能特异性识别泛素C末端区域,水解泛素分子和其他蛋白质之间的肽键,促进泛素再循环,对于提供单体泛素分子以供标记目标蛋白使其被水解有重要作

用^[7]。目前,还未见到有关泛素系统与运动病发生的相关报道,但在运动病发生过程中,脑内组织胺、乙酰胆碱等神经递质水平异常升高,施用外源性不可逆抑制剂消耗脑内组织胺成分可抑制运动病的发生,临床上抗组胺药和抗胆碱药是目前用于治疗运动病的有效药物,其作用机制就是有效地抑制了脑内组胺能和胆碱能递质系统的活动。因此,可以推测在晕船适应过程中,UCH-L1可能通过促进泛素单体的提供以增强脑干泛素系统功能,有选择性地降解脑干神经元内由于异常运动刺激导致异常升高的组织胺等神经递质,从而有效地抑制相关系统的过度兴奋,起到减轻运动病症状的作用。

综上所述,大鼠对晕船适应后,能够诱导脑干蛋白质组发生一系列的改变,进一步了解有关蛋白在晕船适应产生过程中的作用将是后继主要工作。

[参考文献]

- [1] Crampton GH, Lucot JB. A stimulator for laboratory studies of motion sickness in cats[J]. *Aviat Space Environ Med*,1985, 56:462-465.
- [2] Nakagawa A, Uno A, Horii A, et al. Fos induction in the amygdala by vestibular information during hypergravity stimulation[J]. *Brain Res*,2003,986:114-123.
- [3] 吉雁鸿,郭俊生,李敏,等. 晕船适应大鼠脑干差异表达基因的克隆[J]. *中华劳动卫生职业病杂志*,2004,22:484-486.
- [4] Eid T, Thomas MJ, Spencer DD, et al. Loss of glutamine synthetase in the human epileptogenic hippocampus: possible mechanism for raised extracellular glutamate in mesial temporal lobe epilepsy[J]. *Lancet*,2004,363:28-37.
- [5] Sasa M, Takeshita S, Amano T, et al. Primary neurotransmitters and regulatory substances onto vestibular nucleus neurons[J]. *Biol Sci Space*,2001,15:371-374.
- [6] 金淑仪,张卫列,王贵怀,等. 模拟运动病大鼠中枢NE、5-HT、GABA和Glu含量的变化[J]. *中华航海医学杂志*,1994,1:17-19.
- [7] Chung CH, Baek SH. Deubiquitinating enzymes: their diversity and emerging roles[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999,266:633-640.

[收稿日期] 2005-09-20

[修回日期] 2006-03-10

[本文编辑] 贾泽军,邓晓群