

doi:10.3969/j.issn.0253-9896.2011.07.014

实验研究

双向电泳分析叶酸对神经干细胞蛋白表达的影响*

刘欢 黄国伟[△] 何冰 杨阳 赵琳

摘要 **目的:**探讨叶酸缺乏对胚胎大鼠神经干细胞(NSCs)蛋白质表达的影响。**方法:**采用无血清体外细胞培养方法,培养胚胎大鼠NSCs并进行鉴定,采用叶酸缺乏培养基培养NSCs,根据叶酸添加终浓度将细胞分为对照(Control)组、叶酸缺乏(Folate-D)组、叶酸补充(Folate-L)组,各组叶酸终浓度分别为4、0.6、8 mg/L。应用双向电泳(2-DE)技术分析各组蛋白质表达的差异。**结果:**建立了稳定可重复的NSCs 2-DE图谱,与Control组相比,Folate-D组2个蛋白点表达量降低,4个蛋白点表达量升高;Folate-L组2个蛋白点表达量降低,1个蛋白点表达量升高。**结论:**叶酸缺乏或补充叶酸影响NSCs蛋白表达,差异蛋白分离为进一步研究叶酸对NSCs增殖分化调控机制奠定了基础。

关键词 电泳,凝胶,双向 叶酸 干细胞 蛋白质组学 大鼠,Sprague-Dawley

Effect of Folate on Protein Expression in Neural Stem Cells Analyzed by Two-Dimensional Gel Electrophoresis

LIU Huan, HUANG Guowei, HE Bing, YANG Yang, ZHAO Lin

School of Public Health, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract **Objective:** To analyze the effect of folate deficiency on protein expression of embryonic rat neural stem cells (NSCs). **Methods:** Embryonic rat NSCs were cultured in serum-free suspension culture and were identified. Individual cultures were assigned to one of 3 treatment groups according to the concentration of folate in the medium: control group, folate deficiency group (Folate-D) and folate supplementation group (Folate-L). The final folate concentrations were 4, 0.6 and 8 mg/L respectively. Protein expressions were detected by two-dimensional electrophoresis (2-DE) in 3 groups. **Results:** The stable and repeatable 2-DE maps of NSCs were successfully established. Compared with control group, 2 spots of proteins were lowly expressed, 4 spot of proteins were highly expressed in Folate-D group. And 2 spots of proteins were lowly expressed, 1 spot of proteins was highly expressed in Folate-L group. **Conclusion:** Folate deficiency or supplement may impact NSCs protein expression. The isolation of differentially expressed proteins is useful for exploring the mechanism of folate on proliferation and differentiation of NSCs.

Key words electrophoresis, gel, two-dimensional folic acid stem cells proteomics rats, Sprague-Dawley

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)是一种具有自我更新能力和多向分化潜能的未分化细胞^[1]。叶酸对于细胞分裂和组织生长具有极其重要的作用。研究证实在胚胎发育早期,补充叶酸能够有效预防神经管畸形(neural tube defects, NTDs),其作用机制可能是叶酸激活神经系统的生长和分化^[2]。NSCs是当今研究热点之一,在蛋白质组学中,神经蛋白质组学也被认为是最具潜力的研究热点^[3-4]。双向凝胶电泳是根据等电点和分子质量对蛋白质进行分离的方法^[5],是蛋白质组学研究中应用最为广泛的蛋白质分离技术。本研究旨在通过双向电泳(2-DE)方法深入研究叶酸对NSCs增殖分化的作用机制,为探讨叶酸防治神经退行性疾病提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级孕 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 14~16 d, 购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心。

1.1.2 试剂与仪器 DMEM2429无叶酸培养液、F12培养液、神经细胞培养添加剂 B₂₇ 购于 Invitrogen 公司; 固相 pH 梯度干胶条 (IPG DryStrip, Ph3-10NL)、尿素、硫脲、十二烷基磺酸钠 (SDS)、二硫苏糖醇 (DTT)、氨基丁三醇 (Tris)、3-[3-(胆固醇氨丙基)二甲基氨基]-1-丙磺酸 (CHAPS)、甲叉双丙烯酰胺、碘乙酰胺、四甲基二乙胺 (TEMED)、溴酚蓝、过硫酸胺 (APS)、甘氨酸 (Glycine)、丙烯酰胺、两性电解质 (Bio-

* 国家自然科学基金资助项目(项目编号:81072289,30771797)

作者单位:300070 天津医科大学公共卫生学院(刘欢,黄国伟,杨阳,赵琳);武警医学院天津市职业与环境危害生物标志物重点实验室(何冰)

[△]通讯作者 E-mail: guowei Huang@yahoo.com.cn

lyte3-10)、矿物油、等电聚焦仪(Protein IEF cell)、垂直电泳系统(Protein II xi Cell)、CHemiDOC XRS 凝胶成像系统及 PD-Quest8.0D 凝胶图像分析软件均为 Bio-Rad 公司产品; Benz-nase 核酸酶、Cocktail 蛋白酶抑制剂购于 Merck 公司; 5'-溴脱氧尿嘧啶(BrdU)、L-谷氨酰胺、青霉素、链霉素、甘油、溴酚蓝、低熔点琼脂糖均为 Sigma 公司产品; 人重组碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)为 Perotech 公司产品; 兔抗大鼠巢蛋白(nestin)一抗、小鼠抗大鼠 BrdU 一抗为 Santa Crus 公司产品; 羊抗兔 TRITC 荧光二抗、山羊抗小鼠 FITC 荧光二抗购于北京中杉金桥生物技术公司; 银染试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 NSCs 的培养和分组

(1)按照文献[6]方法进行 NSCs 原代培养,取胎鼠脑皮质,剥除脑膜和血管,用培养液冲洗3次,将其剪碎成 0.5 mm³,移入 DMEM 培养液中,吹打数次,制成单细胞悬液,过 200 目尼龙筛网,1 000 r/min 离心 10 min,去上清,加入 NSCs 培养液,即 DMEM 2429 无叶酸培养液(叶酸浓度为 0.6 mg/L)与 F12 培养液按 1:1 混合,含 B₂₇ 添加剂 2%,上皮生长因子(EGF)20 μg/L, bFGF 20 μg/L, L-谷氨酰胺 2 mmol/L,青霉素和链霉素 100 U/mL,将细胞接种于培养瓶。置 37℃、5% CO₂ 培养箱,隔天换液。(2)细胞共分为 3 组:对照(Control)组叶酸终浓度为 4 mg/L;叶酸缺乏(Folate-D)组叶酸浓度为 0.6 mg/L;叶酸补充(Folate-L)组叶酸终浓度为 8 mg/L。

1.2.2 NSCs 的鉴定

增殖第 4 天,加入终浓度 10 mg/L BrdU 继续培养 24 h,再将 NSCs 种植于预先置有多聚赖氨酸涂布盖玻片的 24 孔培养板,并加入含有血清的培养基(DMEM, 10% 胎牛血清),添加 B₂₇ 2%, EGF 20 μg/L, bFGF 20 μg/L, L-谷氨酰胺 2 mmol/L,青霉素和链霉素 100 U/mL。培养 4 h 后, Nestin 和 BrdU 抗体进行细胞免疫组织化学染色^[9],共聚焦显微镜下观察 NSCs 免疫荧光双标记表达情况。

1.2.3 细胞全蛋白的提取和定量

培养 6 d 后,收集细胞,加入 PBS, 1 500 r/min 离心 10 min,弃上清。重复 3 次。加入 4~5 倍体积裂解液,混匀(裂解液成分:7 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、4% CHAPS、1% DTT、0.2% Bio-Lyte3-10、200 U/mL Benz-nase 核酸酶、Cocktail 蛋白酶抑制剂)。液氮中反复冻融 3 次,每次 3 min。加入 200 U 核酸酶抑制剂,4℃放置 15 min。15 000 r/min, 4℃离心 40 min,收集上清,Bradford 法对裂解后 NSCs 蛋白质样品进行定量。

1.2.4 双向电泳

参考文献[7],每组样品重复 3 次。将样品和水化液(7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 4% CHAPS, 65 mmol/L DTT, 0.2% Bio-Lyte, 痕量溴酚蓝)混合,总体积 400 μL(蛋白上样量 500 μg),常温被动溶胀上样 15 h。等电聚焦程序参数按如下建立:250 V 1 h, 500 V 1 h, 1 000 V 1 h, 5 000 V 3 h, 10 000 V, 至总伏特·小时(V·h)达到 80 000。将聚焦后的胶条在 SDS 平衡液(6 mol/L 尿素, 0.375 mol/L pH 8.8 Tris-HCl, 20% 甘油, 2% SDS)中平衡 2 次,摇床上振荡 15 min, 2 次,其中第 1 次平衡液中加入 20 mmol/L 的 DTT, 第 2 次平衡液中加入 100 mmol/L 碘乙酰胺。将平衡后的 IPG 胶条进行垂直

SDS-PAGE 第 2 相电泳,恒流 12 mA 30 min,之后 30 mA 直至溴酚蓝前沿到达胶底线。所得凝胶参考文献[7]方法进行硝酸银染色。

1.2.5 凝胶图像分析

采用 CHemiDOC XRS 凝胶成像系统对染色后的 2-DE 胶进行扫描,PDQuest8.0 凝胶图像分析软件进行分析,对同一组标本的 3 个凝胶图,选取一张点数最多,条纹最少的作为参考胶,与另外 2 个凝胶图进行匹配,建立该组平均凝胶图,参照平均凝胶图进行蛋白斑点检测,蛋白的相对表达量用扫描积分光密度值表示,2 组间表达量升高或降低 2 倍者定义为差异蛋白点。

2 结果

2.1 NSCs 的鉴定

培养 2~3 d 后,可见大小不等的细胞团,较大的细胞团由数十个细胞组成,细胞边缘发亮,折光性强,呈悬浮状态,即为神经球;随着培养时间的延长,神经球逐渐增大,原代培养至第 7 天,可形成数百个细胞集落,此时细胞排列紧凑,呈桑葚状。培养的细胞经免疫荧光双标记染色后,于荧光显微镜下观察发现细胞球内的细胞显示红色荧光,细胞核绿色荧光表明 BrdU 阳性,见图 1。

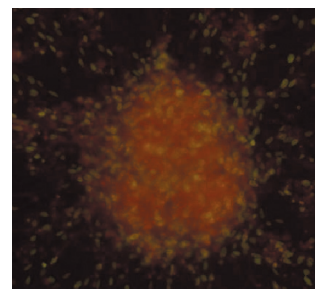


图1 神经球免疫荧光双标记显色(×200)

2.2 双向电泳凝胶分离结果

经图像分析,在 pH 3~10 区域,每块凝胶可分辨 874±21(n=3)个蛋白点,软件分析结果见图 2,各组凝胶蛋白点匹配率达 88.5%,见图 3。



图2 蛋白点计数软件图

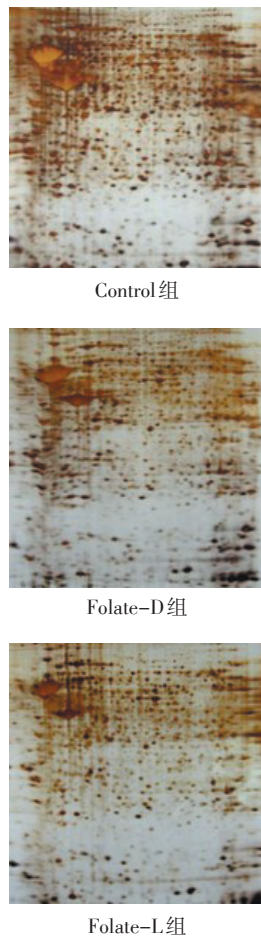


图3 各组 NSC 双向电泳凝胶图谱

2.3 差异蛋白分析结果 在 pH 3~10 的图谱中, Folate-D 组较 Control 组出现差异蛋白点 6 个, 其中 2 个蛋白点表达量降低, 4 个蛋白点表达量升高; Folate-L 组较 Control 组出现差异蛋白点 3 个, 其中 2 个蛋白点表达量降低, 1 个蛋白点表达量升高。

3 讨论

2-DE 是蛋白质组学研究中的基础技术, 把高分辨率的等电聚焦和 SDS-PAGE 电泳结合在一起, 其分离效果远远高于传统的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳, 成为用于复杂蛋白样品分离的首选方法。

NSCs 研究已经成为神经科学研究的重要领域。神经系统中多能干细胞的分离、培养成功, 不仅对中枢神经系统发育成熟后不可再生理论提出了挑战, 而且对于研究脑的发育、分化和中枢神经系统疾病治疗均具有重要意义。本研究在调整了双向电泳中的几个关键因素后, 获得了分辨率高、重复性好的 NSCs 电泳图^[7]。

脑损伤后神经元再生的机制复杂, 特别是如何控制 NSCs 定向分化和迁移仍是尚未解决的问题。有研究显示, 叶酸缺乏与许多神经系统疾病有关, 如阿尔茨海默病、认知损伤等, 但与神经退行性疾病之间的关系和机制尚不完全清楚^[8]。笔者的前期研究发现, 叶酸可促进 NSCs 的增殖^[6]; 动物实验显示, 叶酸能降低脑缺血大鼠血浆同型半胱氨酸 (Hcy) 水平, 增强脑缺血大鼠学习记忆能力, 改善神经功能^[9]。蛋白质组学有助于进一步发现叶酸通过哪些蛋白促进 NSCs 的增殖分化。由于 NSCs 样本的获得成本较高, 在实验方法上, 笔者对 NSCs 的 2-DE 条件进行了摸索, 在上样量、等电聚焦条件、样品裂解液、上样缓冲液的成分选择等方面进行了优化, 提高了分析的准确性。本研究显示叶酸缺乏和叶酸补充均会影响 NSCs 的蛋白表达, 与 Control 组比较共发现差异蛋白点 9 个, 这些蛋白可能与 NSCs 增殖分化有密切关系, 其分子质量和等电点等信息通过双向电泳图获得了初步确定, 还需要进一步进行质谱鉴定、氨基酸序列分析和数据库的检索以确认为何种蛋白, 而这些蛋白在 NSCs 增殖分化中的具体作用则有待更深入的功能生物学研究。

参考文献

- [1] Kornblum HI. Introduction to neural stem cells[J]. Stroke, 2007, 38(2 Suppl):810-816.
- [2] 裴丽君, 李竹. 还原叶酸载体基因(RFC1)与神经管和颅面畸形病因学关系的研究进展[J]. 遗传, 2004, 26(2):239-243.
- [3] 刘锐, 黄慧玲. 神经系统疾病线粒体蛋白质组学研究进展[J]. 天津医药, 2007, 35(11): 875-878.
- [4] 陈彪, 郑晓立. 蛋白质组学技术在神经变性疾病研究中的应用[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2008, 8(1): 4-7.
- [5] Smejkal GB, Robinson MH. Tris interference in IEF and 2-DE[J]. Electrophoresis, 2007, 28(10):1601-1606.
- [6] Liu H, Huang GW, Zhang XM, et al. Folic Acid supplementation stimulates notch Signaling and cell proliferation in embryonic neural stem cells [J]. J Clin Biochem Nutr, 2010, 47(2): 174-180.
- [7] 刘欢, 黄国伟, 何冰, 等. 胚胎大鼠神经干细胞双向凝胶电泳方法的建立[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(36):6707-6710.
- [8] Luchsinger JA, Tang MX, Miller J, et al. Relation of higher folate intake to lower risk of Alzheimer disease in the elderly [J]. Arch Neurol, 2007, 64(1):86-92.
- [9] 刘欢, 黄国伟, 刘莉, 等. 叶酸、维生素 B6, B12 对局灶性脑缺血大鼠血浆同型半胱氨酸水平和抗氧化作用的研究[J]. 营养学报, 2007, 29(4):344-347.

(2010-12-31 收稿 2011-02-23 修回)

(本文编辑 李鹏)