

· 论 著 ·

环靶明对肝再生影响的蛋白组学研究

刘智文¹, 陈 雯², 袁分钱², 游小龙² (1. 江西省儿童医院新生儿外科, 江西 南昌 330006; 2. 江西省肿瘤医院头颈外科, 江西 南昌 330029)

[摘要] **目的** 研究环靶明对肝再生的影响, 并探讨其可能的分子作用机制。**方法** 应用 8 标同位素标记相对和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantification, iTRAQ)技术, 结合二维液相色谱串联质谱(two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry, 2D LC-MS/MS)系统, 以部分肝切除的大鼠为模型, 全面分析了再生早期(12 h)环靶明干预组, 肝脏蛋白质的表达差异。**结果** 共鉴定 1625 种蛋白质, 其中肝再生组有 367 种蛋白质的表达量与对照组(手术切下的正常肝组织)有显著差异, 差异蛋白通路分析基因本体(gene ontology, GO)显示 hedgehog (HH)信号通路激活, 在肝再生过程中作用显著, 其中的 SHH、Gli2 蛋白可能通过影响细胞凋亡和能量供给等方式参与肝再生调控, 而环靶明干预组中这一通路未被激活, 关键蛋白 SHH、Gli2 蛋白表达量下调。**结论** 环靶明通过抑制 HH 信号通路中关键蛋白的表达影响肝再生, HH 信号通路在肝细胞再生过程中具有重要作用。

[关键词] 环靶明; 肝损伤与肝再生; Hedgehog (HH)信号通路; iTRAQ

[中图分类号] R966 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2018)04-0318-06

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.04.007

Proteomic analysis of cyclopamine effect on liver regeneration

LIU Zhiwen, CHEN Wen, YUAN Fenqian, YOU Xiaolong (1. Neonatal Surgery Department of Jiangxi Children's Hospital, Nanchang 330006, China; 2. Department of Head and Neck Surgery, Jiangxi Oncology Hospital, Nanchang 330029, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of cyclopamine on liver regeneration, and to explore its possible molecular mechanism. **Methods** iTRAQ-based quantitative proteomics combined with 2D liquid chromatography-tandem mass spectrometry were applied to study the protein expression of liver regeneration in rats with partial hepatectomy. **Results** A total of 1625 proteins were identified. 367 proteins were significantly different in the control group, cyclopamine-treated group and the partial hepatectomy group. The pathway analysis suggested that Hedgehog (HH) signaling pathway was activated in the partial hepatectomy group, and SHH, Gli2 in this pathway may participate in the regulation of liver regeneration by affecting apoptosis and energy supply. While SHH and Gli2 were down regulated in the cyclopamine group. **Conclusion** Cyclopamine inhibited by Hedgehog (HH) key protein signaling affects the expression of liver regeneration; Hedgehog (HH) signal pathway in the process of liver regeneration has an important role.

[Key words] cyclopamine; liver injury and liver regeneration; hedgehog (HH) signal pathway; iTRAQ

肝再生是指因手术、创伤、中毒、感染、坏死等致部分肝细胞功能丧失后, 肝细胞重新修复的过程。肝再生是多条通路、多种因素共同参与的一种复杂的生理过程。其中 hedgehog (HH)信号通路在干细胞增殖^[1], 骨损伤修复^[2], 肌肉及心肌细胞损伤修复^[3,4], 胃损伤修复^[5], 肠损伤修复^[6]等均已报道, 可见 HH 信号通路在组织修复中有重要地位。HH 通路是一个进化保守的信号通路, 从低等动物到高

等动物(人类)都普遍存在。在哺乳动物体内具有 indian hedgehog (IHH)、sonic hedgehog (SHH) 和 desert hedgehog (DHH) 3 种形式的配体。环靶明(cyclopamine)是从藜芦属植物内分离得到的一种甾体类生物碱, 能特异性对抗 Smo 来抑制 HH 信号通路, 使细胞分裂停止于 G0/G1 期, 从而抑制细胞增殖^[7]。

本实验通过建立大鼠大肝部分切除模型, 对比 A 组(假手术组)、B 组(手术组)、C 组(环靶明干预组)三组中, 肝功能、肝再生及 hedgehog 信号通路相关蛋白表达情况, 探讨 hedgehog 信号通路在肝细胞再生过程中的作用, 为临床肝细胞再生治疗提供理论依据, 同时, 揭示环靶明类药物肝再生的抑制

[基金项目] 江西省卫生计生委科技计划(20165394)

[作者简介] 刘智文, 硕士, 主治医师, Email: 360420731@qq.com

[通讯作者] 陈 雯, 硕士, 主治医师, 研究方向: 普通外科, Email: thinkerlzw@126.com

作用。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

环靶明标准品(浓度>98%,中国食品药品检定研究院);尿素、硫脲、二硫苏糖醇(DTT)、3-[3-(胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐(CHAPS)、碘乙酰胺(IAA)、两性电解质(IPG Buffer)、甲酸(FA)、甲酸铵均购自GE公司;十二烷基磺酸钠(SDS)、三羧基氨基甲烷(Tris)、甘氨酸、三氯乙酸(TCA)、过硫酸铵(APS)、碳酸钠、N,N,N',N'-四甲基二乙胺(TEMED)均购自Amresco公司;三乙基碳酸氢铵缓冲液(Triethylammonium bicarbonate buffer, TEAB)、蛋白酶抑制剂(PMSF)购自Sigma公司;胰蛋白酶(Trypsin Gold)购自Promega公司;乙腈(Acetonitrile, ACN)、色谱水等购自Thermo fish; iTRAQ 8 plex 试剂盒(AB SCIEX)、Tris-HCl(pH 6.8、pH 8.5、pH 8.8)、考马斯亮蓝G-250、溴酚蓝、丙酮、甲醇、乙醇、Bradford 蛋白浓度测定试剂盒。其他试剂均为分析纯。

1.2 实验仪器

冷冻离心机(Eppendorf);ImageScanner 扫描仪(GE Healthcare);真空冷冻干燥机(Thermo savant);eksigentnano LC-UltraTM system 与 AB SCIEX TripleTOFTM 5600 质谱仪联用,Protein Pilot 4.5 软件(AB SCIEX, Foster City, CA, USA), 真空冷冻干燥机、超声波细胞粉碎机、水浴锅,天平、振荡器、紫外分光光度计。

1.3 实验方法

1.3.1 大鼠肝再生模型的建立

实验动物为雄性SD大鼠,体重约250g。共9只大鼠,分为3组,A组、B组、C组各3只。大鼠肝部分切除手术参照文献^[8]建立的大鼠70%肝脏部分切除法;假手术法与部分切除术采用相同方法对大鼠进行麻醉、消毒、剖开腹腔、挤出肝脏,随后将整个肝脏还纳腹腔,不进行切除术,再以同样方法进行缝合。

1.3.2 肝蛋白质提取

将冷冻肝组织1g/只取出,剪碎后合并各组3只大鼠的肝组织,直接加入适量裂解液,加入蛋白酶抑制剂(PMSF或Cocktail)使其终浓度为1mmol/L,用移液器吹打至分散状态。冰上超声破碎,功率80W,超声0.8s,关闭0.8s,共3min。加入5倍体积的预冷丙酮震荡混合,-20℃沉淀2h或过夜,4℃,12 000×g离心10min,收集沉淀。加

入适量体积的预冷丙酮震荡混合,4℃,12 000×g离心15min,收集沉淀,重复该步骤一次。常温下干燥后,溶解于样品裂解液中,充分溶解蛋白。将溶液在室温下12 000×g离心15min,取上清液,并再次离心取上清液,充分去除不溶性杂质。上清液即为组织的总蛋白溶液,分装后储存于-80℃备用。本样品蛋白浓度测定参考BCA^[9]的方法。

1.3.3 iTRAQ 标记

将6只标记试剂经50μl异丙醇稀释后与对应样品混合(标记试剂113、114、115、116、117、118分别对应sham1、sham2、手术组1、手术组2、环靶明1、环靶明2),室温放置1h,各管中加入100μl去离子水使标记物失活,混合6组样品,冻干。

1.3.4 肽段分离及鉴定

第一维强阳离子柱分离:将干燥后的混合样品用100μl流动相A(20mmol/L甲酸胺,pH10)复溶后,对样品采用梯度洗脱。色谱柱:Ultremex SCX column(4.6mm×250mm,5μm);流动相A:20mmol/L甲酸胺,pH=10;流动相B:20% 20mmol/L甲酸胺,80%乙腈,pH=10。梯度条件:0~5min,5%B;5~30min,5%~15%B;30~45min,15%~38%B;45~46min,38%~90%B;46~54.5min,90%B;54.5~55min,90%~5%B;55~65min,5%B,流速为0.8ml/min。从第5分钟开始,依次收集每分钟流分,并采集色谱图,真空冷冻离心干燥;根据各个流分的色谱图复杂程度进行组合,然后用60μl 2%乙腈,0.1%甲酸(FA)对各个组分进行复溶,混合。最后合并成10个组分。

Nano LC-ESI-MS/MS分析:使用eksigentnano LC-UltraTM system 与 AB SCIEX TripleTOFTM 5600 质谱仪进行分析。trap柱:ChromXP C₁₈(350μm×0.5mm,3μm,120Å),流速为3μl/min,上样时间15min;分析柱:C₁₈反相色谱柱(0.075mm×150mm,3μm,120Å)。流动相A:水,含0.1%甲酸,流动相B:98%乙腈(ACN),2%水,含0.1%甲酸(FA),流速为300nl/min,洗脱梯度:0~0.1min,5%~10%B;0.1~60min,10%~28%B;60~75min,28%~50%B;75~75.5min,50%~80%B;75.5~80min,80%B;80~80.5min,80%~5%B;80.5~90min,5%B。质谱主要参数:采用ESI正离子模式,MS1采集范围设为350~1250m/z,扫描时间为0.25s;选择性的采集m/z范围内强度大于40且带电荷数为+2到+5母粒子进行打碎,二级质谱采集范围为100~1500m/z。按照上述LC-MS条件对10个组分分别进行数据采集,每个组分重复采集一次。

质谱鉴定:运用 ProteinPilot 4.5 软件 (AB SCIEX, Foster City, CA, USA)对采集到的数据进行分析,该软件主要采用 Paragon 算法 (4.5.0.0.1654)作为搜索引擎。将下载于 Uniprot 的蛋白质数据库导入该软件中,采用 ProGroup 算法来对样品采集的数据进行蛋白定性鉴别,Paragon 算法 (4.5.0.0.1654)对蛋白进行定量分析。搜索的参数设定为:二级 MS/MS 容忍度为 0.1Da,样本类型:八标试剂盒 iTRAQ 8plex;Cys. Alkylation: MMTS;消化方式:胰蛋白酶酶解;仪器平台:TripleTOFTM5600 system;物种:大鼠;搜索方式:从头到尾;是否做 FDR 分析:是;是否设矫正参数文件:否。该软件分析数据所采用的大鼠总蛋白数据库下载于 Uniprot。在 $FDR < 1\%$ 的基础上,将鉴别到至少 2 条唯一的肽段且置信度 $> 99\%$ 的蛋白视为可信的。组间比较中我们将实验组和重复组两次实验的 P 值 < 0.05 且组间差异变化倍数为至少 1.3 倍的

视为差异蛋白。

1.3.5 生物信息学分析

将所得到的差异蛋白质进行相互作用分析,从 biological process, molecular function, cellular component 和 KEGG 四个层面对差异蛋白进行生物学过程、分子功能、细胞所在位置及所在通路的富集分析。

2 实验结果

通过 8 标 iTRAQ 结合 2D LC-MS/MS 的分析,在 3 组样品中共鉴定到蛋白质 1625 种,共有 140 种蛋白质在肝再生组中出现显著的表达上调,91 种蛋白质在肝再生组中出现显著的表达下调,共有 145 种蛋白质在环靶明干预组较肝再生组显著上调,共有 80 种蛋白质在环靶明干预组较肝再生组显著下调,主要涉及组织损伤,肝系统疾病、再生系统疾病(图 1、2)。差异蛋白互作网络整合分析显示,



图 1 肝再生组对比假手术组差异蛋白以及通路富集分析



图2 环靶明干预组/肝再生组差异蛋白以及通路富集分析

肝再生组较假手术组,细胞凋亡信号通路受到抑制,肝细胞再生通路处于激活状态,相关的蛋白 SHH, Gli 显著上调,如图3红色标识所示。而在环靶明干预组和肝再生组中,细胞凋亡信号通路激活,肝再生通路受到抑制,相关蛋白 SHH、Gli 显著下调,如图4绿色标识所示。

3 讨论

正常情况下,成熟肝细胞的平均寿命为 200~300 d^[10,11],肝细胞更新和肝再生表现不明显。当肝脏受损伤时,肝脏表现出明显的再生能力。通过肝细胞自身代偿性增生的典型模型是部分肝切除术 (partial hepatectomy, PHx) 模型。在 1931 年, Higgins 首先建立了经典的大鼠 2/3 肝切除模型^[12,13],描述了包括左叶和右叶在内的 70% 肝切除的大鼠

在大约 3 d 时间内恢复到原有的肝重。在这个肝再生模型中,剩余肝脏和其他的肝细胞没有损伤,通常认为再生过程是由剩余细胞通过简单增殖完成,不同细胞表现出不同的增殖动力学^[12]。本实验采用肝部分切除手术来构建肝再生模型,并利用 iTRAQ 技术来研究肝再生过程中关键蛋白的表达差异,同时考察环靶明对于肝再生的影响。

在本实验中,我们发现在肝再生组中 HH 信号通路中的 SHH、Gli 等蛋白质在肝再生进程中显著升高,HH 信号通路在肝再生组被激活。HH 信号通路在胚胎发育以及器官形成以及发育过程中具有十分重要的作用,近年来在肝脏疾病的研究中发现 HH 信号通路在受到损伤因素作用后可被激活,该信号通路活化后可以参与包括促进肝祖细胞的增殖,肝内炎症细胞的聚集,肝纤维化以及血管形成等

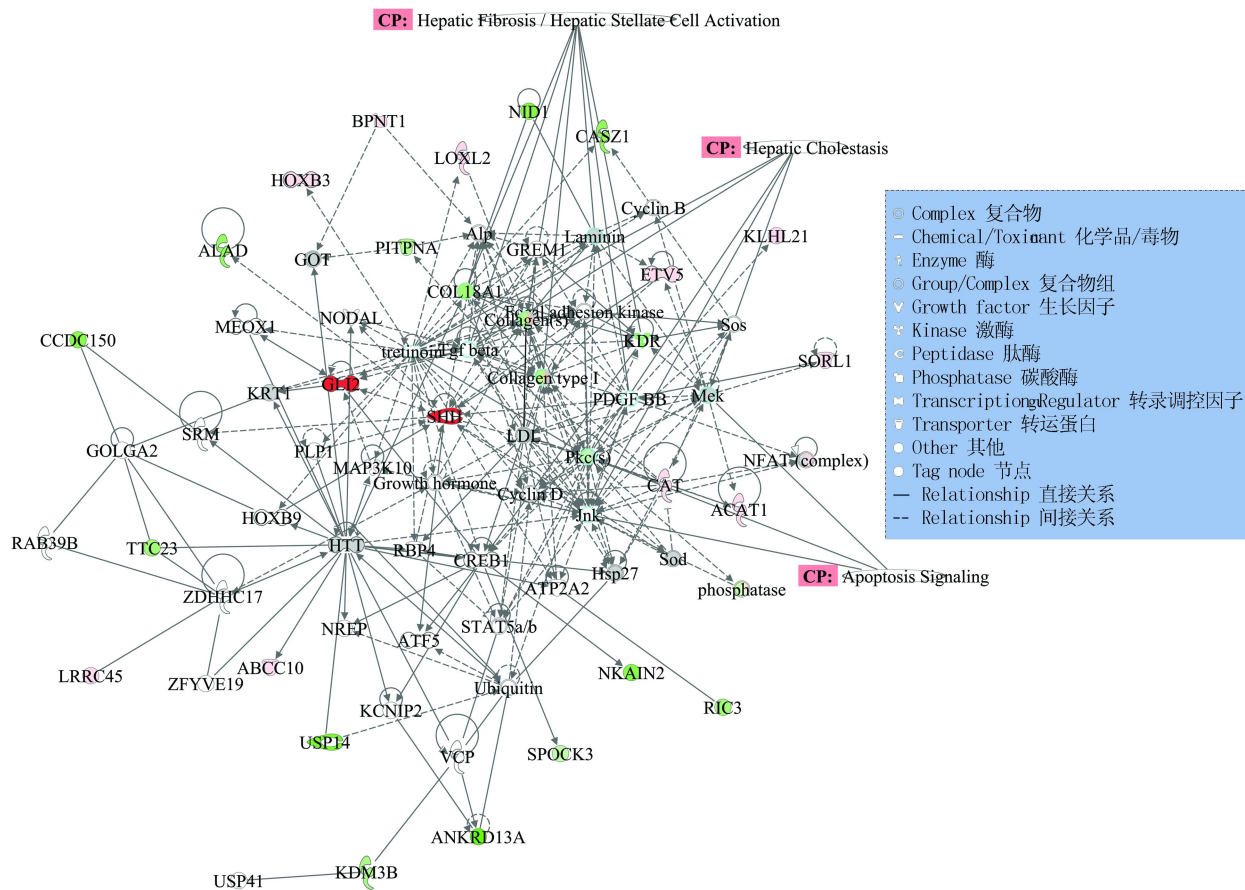


图3 肝再生/假手术组的差异蛋白互作网络(红色标识代表蛋白上调,绿色代表下调)

多个过程。HH 信号通路包含 patched (Ptch)、smoothed(Smo)及通路下游类运动蛋白(Cos2)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(Fu)、Fu 抑制剂蛋白激酶 A(PKA), hedgehog 相互作用蛋白(Hhip)在哺乳动物中 Gli1、Gli2、Gli3 等多种蛋白^[14]。在正常成人肝组织中 HH 信号通路的活性原本是被抑制的,当肝脏损伤后 HH 表达明显升高,该实验表明,肝切除造成的损伤可诱导 HH 配体大量表达并且激活 HH 信号通路。环靶明又称去氧芥芬胺,是从藜芦属植物内分离得到的一种异甾体类生物碱。它是一种有效的 hedgehog (HH)通路抑制剂。而本实验中环靶明干预组 SHH、Gli 显著下调,进而可能影响细胞凋亡调控和能量供给,环靶明通过抑制 hedgehog (HH)信号通路中关键蛋白的表达影响肝再生。

综上所述,上述这些变化都提示 HH 信号通路与肝脏疾病的发生、发展有重要关系,研究 HH 信号通路在肝脏疾病中的作用机制,有望为临床提供治疗肝脏疾病的有力证据,同时环靶明作为一类生物碱通过抑制 HH 信号通路,提示这类药物具有潜在的肝再生抑制作用。

【参考文献】

- [1] HUANG J, KALDERON D. Coupling of hedgehog and hippo pathways promotes stem cell maintenance by stimulating proliferation[J]. *J Cell Biol*, 2014, 205(3): 325-338.
- [2] BAHT GS, SILKSTONE D, NADESAN P, et al. Activation of hedgehog signaling during fracture repair enhances osteoblastic-dependent matrix formation[J]. *J Orthop Res*, 2014, 32(4): 581-586.
- [3] RENAULT MA, ROBBESYN F, CHAPOULY C, et al. Hedgehog-dependent regulation of angiogenesis and myogenesis is impaired in aged mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(12): 2858-2866.
- [4] JOHNSON NR, WANG Y. Controlled delivery of sonic hedgehog morphogen and its potential for cardiac repair[J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(5): e63075.
- [5] ENGEVIK AC, FENG R, YANG L, et al. The acid-secreting parietal cell as an endocrine source of sonic hedgehog during gastric repair[J]. *Endocrinology*, 2013, 154(12): 4627-4639.
- [6] LIANG R, MORRIS P, CHO SS, et al. Hedgehog signaling displays a biphasic expression pattern during intestinal injury and repair[J]. *J Pediatr Surg*, 2012, 47(12): 2251-2263.
- [7] TAIPALE J, CHEN JK, COOPER MK, et al. Effects of oncogenic mutations in smoothed and patched can be reversed

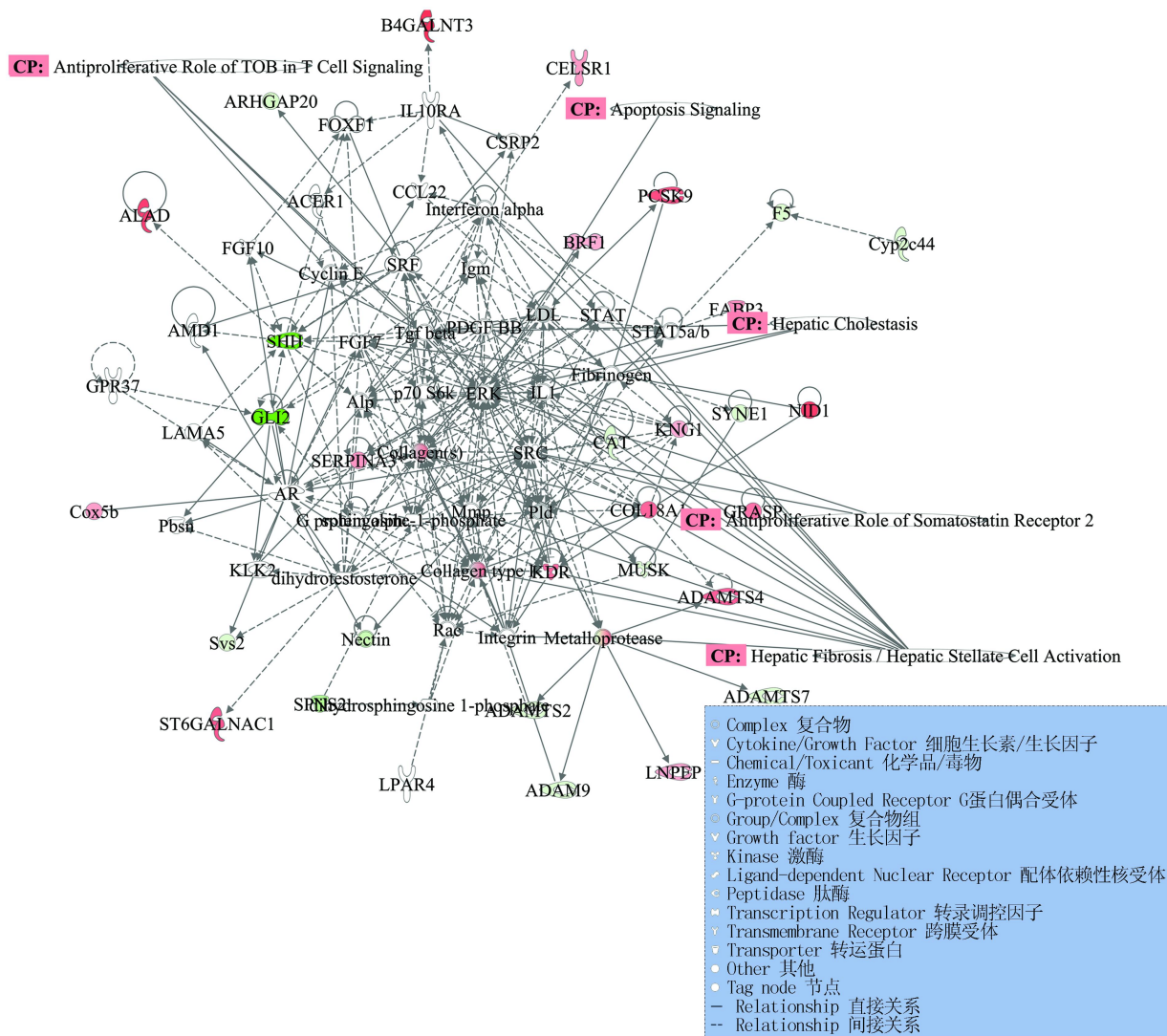


图4 环靶明给药组/肝再生组的差异蛋白互作网络(红色标识代表蛋白上调,绿色代表下调)

by cyclopamine[J]. Nature, 2000, 406(6799):1005-1009.

[8] HIGGINS G M ARM. Experimental pathology of the liver: I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal[J]. Arch Pathol, 1931, 12: 186-202.

[9] SMITH PK, KROHN RI, HERMANSON GT, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid [J]. Anal Biochem, 1985, 150(1):76-85.

[10] 田志刚. 肝脏疾病的前沿研究[M]. 北京:中国协和医科大学出版社, 2012.

[11] 冯仁鑫, 邓星, 张新, 等. 肝再生研究进展[J]. 胃肠病学, 2015;169-173.

[12] ITOH T, MIYAJIMA A. Liver regeneration by stem/progenitor cells[J]. Hepatology, 2014, 59(4):1617-1626.

[13] FAUSTO N, CAMPBELL JS, RIEHLE KJ. Liver regeneration[J]. J Hepatol, 2012, 57(3): 692-694.

[14] JAVELAUD D, PIERRAT MJ, MAUVIEL A. Crosstalk between TGF- β and hedgehog signaling in cancer [J]. FEBS Lett, 2012, 586(14): 2016-2025.

[收稿日期] 2017-08-25 [修回日期] 2018-03-06
[本文编辑] 陈盛新