

网络出版时间:2013-09-22 17:04

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20130922.1704.012.html>

成年克隆猪与正常繁殖猪心脏的比较蛋白质组学研究

张树山,戴建军,吴彩凤,张廷宇,张德福

(上海市农业科学院 畜牧兽医研究所,上海市农业遗传育种重点实验室动物遗传工程研究室,上海 201106)

[摘要] **【目的】**探讨体细胞核移植(即克隆)操作对克隆猪心脏发育的影响。**【方法】**分别对 3 头正常繁殖猪和 3 头成年克隆猪的心脏进行解剖学观察和组织切片分析。提取心脏蛋白样品,利用基于双向电泳-质谱体系的比较蛋白质组学技术对心脏蛋白进行分析。**【结果】**解剖学观察和组织切片分析证实,克隆猪心脏发育异常;与正常繁殖猪相比,克隆猪心脏蛋白共有 6 种差异表达蛋白,分别为组织蛋白酶-D、骨骼肌型 α -肌动蛋白、心肌肌球蛋白重链、热休克蛋白-27、Telethonin 和骨骼肌型 α -肌动蛋白,其中前 5 种蛋白表达上调,后 1 种蛋白表达下调。**【结论】**一些重要的心脏蛋白表达异常可能导致了克隆猪的心脏发育缺陷,比较蛋白质组学手段可以作为探索体细胞核移植机制的重要方法。

[关键词] 猪;克隆;体细胞核移植;心脏;比较蛋白质组学

[中图分类号] S828.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2013)10-0027-05

Comparative proteomics of differentially expressed proteins from hearts of cloned and normal reproductive adult pigs

ZHANG Shu-shan, DAI Jian-jun, WU Cai-feng, ZHANG Ting-yu, ZHANG De-fu

(Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Division of Animal Genetic Engineering, Shanghai Key Laboratory of Agri-Genetics and Breeding, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China)

Abstract: **【Objective】** The aim of this study was to explore the influence of somatic cell nuclear transfer (namely clone) operation on cardiac development. **【Method】** The anatomical structure and histological section of hearts from three cloned adult pigs and three normal reproductive pigs were investigated. The proteins from those pigs were analyzed using comparative proteomics containing two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) and mass spectrometry (MS). **【Result】** There were 6 differentially expressed proteins (5 up-regulated and 1 down-regulated) between the cloned and normal reproductive pigs. Abnormal expression of proteins including Cathepsin D protein (CTSD), Actin, α -skeletal muscle, Myosin heavy chain, cardiac (MHC), Heat shock protein-27 and Telethonin were found in cloned pigs. **【Conclusion】** Abnormal expression of some important proteins could result in abnormal development of hearts in cloned pigs, and comparative proteomics might be an important method to explore the mechanism of somatic cell nuclear transfer (SCNT).

Key words: pig; clone; somatic cell nuclear transfer; heart; comparative proteomics

体细胞核移植技术(Somatic cell nuclear transfer, SCNT)在猪上获得成功以来,尤其是与转基因

技术结合后,在猪新品种培育和人类医学等多个领域均产生了深远的影响,并成为生命科学领域的重

[收稿日期] 2012-11-26

[基金项目] 国家转基因生物新品种培育科技重大专项(2008ZX08006-005, 2009ZX08006-014B);上海市科委农业科技成果转化项目(103919N1800);上海市农业科学院青年科技项目(2011(07))

[作者简介] 张树山(1976—),男,山西天镇人,助理研究员,博士,主要从事猪繁殖生物技术研究。

E-mail: smalltreej@nwsuaf.edu.cn

[通信作者] 张德福(1963—),男,上海奉贤人,研究员,博士,主要从事转基因猪研究。E-mail: zhangdefu10@yahoo.com.cn

要研究热点之一。然而,有研究发现,成活克隆猪常伴有表型异常和不同程度的器官发育缺陷,这在一定程度上制约了猪体细胞克隆技术研究的应用^[1-3]。故核移植操作对克隆猪发育影响机制的研究显得尤为紧迫。目前,此方面的研究主要从分子水平和蛋白质组学水平 2 个层面展开。在分子水平上,许多研究者从 DNA 甲基化和乙酰化等表观遗传学角度在牛和猪上做了较多的研究工作,认为克隆动物常伴有不同程度的发育缺陷,其原因主要是核移植克隆中供体细胞不能进行正确的表观遗传修饰^[1,3-5];在蛋白质组学水平, Kim 等^[6-7]利用蛋白质组学手段对克隆牛胎盘、Lee 等^[8]对克隆猪胎盘蛋白、Park 等^[9]对死亡克隆猪脐带上皮细胞蛋白以及 Chae 等^[2]和 Choi 等^[10]先后对成年克隆猪的胰腺蛋白进行了研究,均为准确阐明克隆动物的器官发育异常的形成机制提供了新的线索。然而,关于克隆猪心脏蛋白的相关研究尚未见报道。

本研究采用基于双向电泳(Two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE)和质谱(Mass spectrometry, MS)技术的比较蛋白质组学(Comparative proteomics)技术体系,以上海市农业科学院畜牧兽医研究所胚胎工程实验室前期获得的成年克隆猪和正常繁殖猪为研究对象,对二者的心脏差异表达蛋白进行鉴定与功能分析,旨在为阐明核移植操作对克隆猪发育的影响机制提供理论和实践基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 3 头成年体细胞克隆猪(7 月龄雄性巴马小型猪)和 3 头正常繁殖的同品种、同性别、年龄相近的对照猪,体细胞克隆猪由上海市农业科学院畜牧兽医研究所胚胎工程实验室提供,对照猪购自上海市农业科学院实验用小型猪场(庄行基地)。

1.1.2 试剂与设备 丙烯酰胺、甲叉-双丙烯酰胺、甘氨酸、TRIS 等购自 Sigma 公司,乙醇、乙酸和甲醛等为国产分析纯。protein assay reagent 试剂盒、pH 3~10 干胶条购自伯乐公司(Bio-Rad, 美国),切片石蜡(58~60 °C, 阿拉丁)。

主要设备有 IPG-Phor II (GE)、GE Ruby SE600、PDQUEST 7.4 图像分析软件(Bio-Rad, 美国)、Dounce's 匀浆器(Wheaton, 美国)、日立 U-2800 紫外分光光度计(Hitachi 公司, 日本)和轮转式切片机(Leica-2135, 德国)等。

1.2 心脏样品的采集

采集试猪的心脏,进行解剖学观察,心肌样品一部分用生理盐水冲洗干净后切成小块置于冻存管,运回实验室移入液氮(-196 °C)中冷冻保存;另一部分用中性福尔马林(体积分数 10%)固定,备用。

1.3 心脏的解剖观察与组织切片观察

取中性福尔马林(体积分数 10%)固定心脏样品,常规方法制备石蜡病理组织切片,显微镜下进行病理学观察。

1.4 心脏蛋白质样品的制备

取大约 300 mg 解冻心脏组织样品,用 PBS 清洗,切成 1 mm³ 小块移至 Dounce's 匀浆器中,加 DIGE 裂解液(DIGE 裂解液与酶抑制剂体积比为 50:1)约 1 mL,在冰上匀浆处理 20 次。将匀浆液经超声破碎处理后离心(12 000 g, 45 min),取上清,用 protein assay reagent 试剂盒测定蛋白质浓度后,置-80 °C 保存备用。

1.5 心脏差异表达蛋白质的检测

双向电泳参照 Park 等^[9]的方法并稍作调整。取 100 μg 心脏蛋白质样品与水化上样缓冲液(尿素 8 mol/L, 体积分数 2% CHAPS, 体积分数 0.5% IPG 缓冲液, DTT 18 mmol/L, 并加体积分数 0.001% 溴酚蓝)充分混合。样品先使用 pH 3~10 干胶条进行等电聚焦(IPG)电泳,电泳条件:30 V 12 h, 500 V 1 h, 1 000 V 1 h, 8 000 V 8 h, 500 V 4 h;再进行 SDS-PAGE 电泳:体积分数 12.5% 的 SDS-PAGE 胶, 80 V 恒压, 溴酚蓝达到分离胶下沿 0.5 cm 即停。对蛋白质双向电泳图谱进行硝酸银染色和考马斯亮蓝染色后,采用 Image Master 2D Platinum 软件进行图像分析,预测蛋白点分子质量和等电点,并比较差异蛋白点。

选择 2-DE 胶上表达量差异达 2 倍以上的蛋白点进行胶内酶切、MALDI-TOF-MS 质谱分析,每个差异蛋白点重复测定 3 次。应用 Mascot 搜索引擎进行蛋白比对,结合 NCBI nr、Swissprot 等数据库和 Gene Ontology (GO)方法进行综合分析。

2 结果与分析

2.1 克隆猪与正常繁殖猪心脏的解剖观察和组织切片观察

解剖观察结果表明,对照猪心脏均发育正常,而 3 头克隆猪均存在不同程度的心肌肥厚,心脏体积均明显偏大。克隆猪心肌细胞发生较明显的溶解、轮廓模糊不清和细胞核碎裂消失等现象(图 1)。

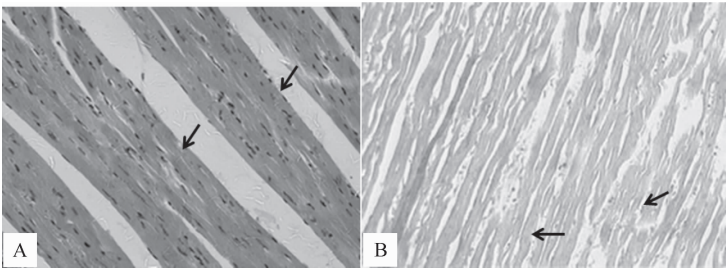


图 1 克隆猪与正常繁殖猪心脏组织切片

A. 正常繁殖猪心脏组织切片(200×),箭头标示心肌细胞轮廓清楚、细胞核完整;

B. 克隆猪心脏组织切片(400×),箭头标示心肌细胞轮廓模糊,细胞核发生明显的溶解

Fig.1 Histological sections of cloned and normal pigs

A. Histological section of heart from normal pigs (200×),arrows mean cardiac muscle cells with obvious outline and with intact nucleus;

B. Istological section of heart from cloned pig (400×),arrows mean cardiac muscle cells with vague outline and with soluble nucleus

2.2 克隆猪与正常繁殖猪心脏差异蛋白的检测

双向电泳图谱分析结果(图 2)表明,克隆猪与正常繁殖猪心脏差异蛋白中表达量差异在 2 倍以上的共有 6 种蛋白(编号 1~6)。本研究对这 6 种蛋

白进行了质谱鉴定,并结合 Gene Ontology (GO)等生物信息学手段对差异蛋白进行功能分类、鉴定和分析,结果见表 1。

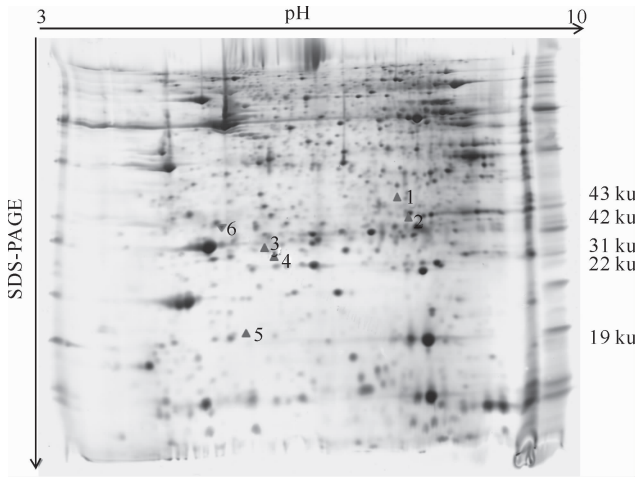


图 2 克隆猪心脏蛋白的双向电泳图谱(硝酸银染色)

1~6 为表达量差异在 2 倍以上的蛋白,其中 1~5 为上调蛋白,6 为下调蛋白

Fig.2 2-DE maps of proteins in heart from cloned pigs (Silver nitrate staining)

Spots 1-5 were up-regulated proteins,and spot 6 was down-regulated proteins

表 1 成年体细胞克隆猪心脏差异表达蛋白信息

Table 1 Information of differentially proteins of hearts from cloned pigs

	蛋白编号 Spot No.	NCBI 序列号 Accession No. (NCBI)	蛋白名称 Protein name	蛋白评分 Protein score	等电点 pI	分子质量/ku Molecular weight
上调蛋白 Up-regulated proteins	1	gi 56417363	组织蛋白酶-D Cathepsin D protein(CTSD)[<i>Sus scrofa</i>]	324	7.67	43
	2	gi 268607671	骨骼肌型 α-肌动蛋白 Actin,alpha skeletal muscle[<i>Sus scrofa</i>]	585	5.23	42
	3	gi 1431611	心肌肌球蛋白重链 Myosin heavy chain,cardiac (MHC) [<i>Sus scrofa</i>]	127	5.76	31
	4	gi 55926209	热休克蛋白-27 Heat shock protein Beta-1(HSP 27) [<i>Sus scrofa</i>]	149	6.23	22
	5	gi 166973772	Telethonin [<i>Sus scrofa</i>]	296	5.38	19
下调蛋白 Down-regulated proteins	6	gi 62287931	骨骼肌型 α-肌动蛋白 Actin,alpha skeletal muscle [<i>Sus scrofa</i>]	76	5.23	42

由图 2 和表 1 可以看出,这 6 种蛋白的等电点 pI 为 5~8,分子质量为 14~55 ku,其中 1~5 号蛋白表达上调,均为酸性蛋白;6 号蛋白表达下调,也为酸性蛋白。与同品种、同龄和同性别正常繁殖猪相比,体细胞克隆猪心脏肌肉运动性能(心肌肌球蛋白重链和骨骼肌型 α -肌动蛋白)和发育调节(组织蛋白酶-D、Telethonin 和热休克蛋白-27)等相关蛋白的表达水平均发生了较大变化。

3 讨 论

本研究通过心脏解剖和组织切片观察发现,3 头克隆猪均存在不同程度的心肌肥厚,而对照猪心脏均发育正常。蛋白质是生命存在和运动的物质基础,是细胞增殖、分化、衰老和凋亡等重大生命活动的执行者,比较蛋白质组学研究现在已成为发现疾病或性状异常形成机制乃至揭示生命奥秘等的重要手段之一。本研究结合解剖和心脏组织切片观察分析,对克隆猪心脏差异蛋白进行分离和鉴定,并借助生物信息学方法对差异蛋白逐一进行了功能分析。

3.1 心脏肌肉运动性能相关蛋白

心肌肌球蛋白重链(MHC)是心肌重要的结构和功能蛋白,其球形头部具有 ATP 酶活性,可以通过水解 ATP 为肌丝的运动提供能量,是平滑肌细胞收缩能力的重要指标,也是胚胎基因再编程和心肌肥厚的分子标志^[11-13]。Wang 等^[14]在小鼠心肌损伤模型研究中发现,心肌损伤或心肌遭受外源应激情况下 MHC 表达上调。一些研究表明,钙调神经磷酸酶(CaN)信号途径在形成病理性心肌肥大过程中较为关键,当刺激因素使胞质内钙离子浓度升高时,CaN 被激活,使下游的活化 T 细胞核因子(NFAT)家族成员脱磷酸并转入细胞核,与细胞内锌指转录因子(GATA4)结合共同使 MHC 蛋白表达增加^[15-16]。

另一种与心脏肌肉运动性能相关的骨骼肌型 α -肌动蛋白(Actin, 2 和 6)是由 ACTA 1 基因编码,主要参与心肌活动和心肌细胞骨架的构成。Branishte 等^[17]利用免疫印迹法在人扩张型心肌病研究中发现,扩张型心肌病患者体内的该蛋白表达明显上调,且在心肌病理切片中也观察到心肌细胞肥大。Stilli 等^[18]在大鼠模型上的研究结果表明,骨骼肌型 α -肌动蛋白表达上调与代偿性心肌肥大程度呈正相关,可能作为早期的代偿机制维持心脏的机械收缩功能。本研究中,克隆猪心脏中的 MHC 蛋白和骨骼肌型 α -肌动蛋白(2 号)均表达上调,可以推测肌肉

运动性能相关蛋白表达异常可能是造成猪心肌肥厚的重要原因之一。

3.2 心脏发育调节相关蛋白

组织蛋白酶是一大类裂解肽键的蛋白水解酶,依据催化中心不同可以分为组织蛋白酶 B、C、K 等多个类型。组织蛋白酶-D(CTSD)在蛋白水解过程中发挥天冬氨酸型内肽酶活性,其可独立或协同其他细胞因子参与基质降解、生长因子和血管增殖调节等过程。在氧化应激时,CTSD 从溶酶体转位到胞浆,通过诱导细胞色素 C 从线粒体释放,激活 caspase 级联反应促使细胞凋亡,同时它也能促使 TNF- α 和 Fas 配体诱导的细胞凋亡^[14,17]。Gacko 等^[19]研究发现,动脉瘤患者血液的 CTSD 活性显著高于正常人,高表达的 CTSD 可以作为诊断该疾病的一个标记。本研究证实,在猪心脏中 CTSD 的高表达也可能导致其心脏功能异常。Telethonin 是一种位于骨骼肌和心肌细胞 Z 盘的肌节蛋白,具有形成和稳定肌节结构功能的重要蛋白——Titin 酶的底物^[20]。研究证实,Telethonin 基因发生突变会造成肥厚型心肌病和扩张型心肌病,严重的可导致心脏衰竭甚至死亡^[21]。Telethonin 蛋白表达异常也对 Titin 蛋白和肌肉 LIM 蛋白均有直接影响作用,而 Titin 蛋白和肌肉 LIM 蛋白分别在决定心肌舒张压和维持心肌细胞正常结构中发挥重要作用^[22]。也有研究认为,Telethonin 蛋白与心肌早期缺血相关^[23]。热休克蛋白-27(HSP-27)是热休克蛋白家族中的重要一员,在心肌细胞和神经原等终末分化细胞中的表达最为丰富,在非心肌细胞的体内外研究中证实,其具有抗氧化应激和抗细胞凋亡的生物学功能^[24]。体外试验结果表明,HSP-27 对某些应激诱导心肌细胞损害具有保护作用^[25]。在本研究中,克隆猪心脏可能在心脏缺血缺氧等应激状态下诱导 HSP-27 表达上调。在本研究中,CTSD、Telethonin 和 HSP-27 均显著高水平表达,表明发育调节相关蛋白异常表达也是导致克隆猪心脏发育异常的重要原因之一。

综上,体细胞克隆操作可能会导致克隆猪心脏一些重要功能蛋白表达异常,从而对心脏的正常发育产生不同程度的负面影响(如心肌损伤、心肌缺血等问题),对成活克隆后代的器官正常发育有不可忽视的影响。故猪体细胞克隆技术仍需进一步优化和完善。

[参考文献]

[1] 吴志强,谢一妮,张廷宇,等. 克隆猪印迹基因 IGF2/H19 印迹

- 控制区的甲基化状态 [J]. 中国畜牧兽医, 2012, 38(11): 125-131.
- Wu Z Q, Xie Y N, Zhang T Y, et al. The methylation status of IGF2/H19 imprinting control region in cloned pig [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2012, 38(11): 125-131. (in Chinese)
- [2] Chae J I, Cho Y K, Cho S K, et al. Proteomic analysis of pancreas derived from adult cloned pig [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 366(2): 379-387.
- [3] Chae J I, Yu K, Cho S K, et al. Aberrant expression of developmentally important signaling molecules in cloned porcine extraembryonic tissues [J]. Proteomics, 2008, 8(13): 2724-2734.
- [4] Yang L, Chavatte-Palmer P, Kubota C, et al. Expression of imprinted genes is aberrant in deceased newborn cloned calves and relatively normal in surviving adult clones [J]. Mol Reprod Dev, 2005, 71(4): 431-438.
- [5] Su J M, Yang B, Wang Y S, et al. Expression and methylation status of imprinted genes in placentas of deceased and live cloned transgenic calves [J]. Theriogenology, 2011, 75(7): 1346-1359.
- [6] Kim H R, Kang J K, Yoon J T, et al. Protein profiles of bovine placenta derived from somatic cell nuclear transfer [J]. Proteomics, 2005, 5(16): 4264-4273.
- [7] Kim H R, Han R X, Yoon J T, et al. A two-dimensional electrophoresis reference map for the bovine placenta during late pregnancy [J]. Proteomics, 2010, 10(3): 564-573.
- [8] Lee S Y, Park J Y, Choi Y J, et al. Comparative proteomic analysis associated with term placental insufficiency in cloned pig [J]. Proteomics, 2007, 7(8): 1303-1315.
- [9] Park J Y, Kim J H, Choi Y J, et al. Comparative proteomic analysis of malformed umbilical cords from somatic cell nuclear transfer-derived piglets: Implications for early postnatal death [J]. BMC Genomics, 2009(10): 511.
- [10] Choi J S, Cho Y K, Yoon S H, et al. Proteomic analysis of porcine pancreas development [J]. BMB Rep, 2009, 42(10): 661-666.
- [11] Koike K, Suematsu T, Ehara M. Cloning, overexpression and mutagenesis of cDNA encoding dihydrolipoamide succinyltransferase component of the porcine 2-oxoglutarate dehydrogenase complex [J]. Eur J Biochem, 2000, 267(10): 3005-3016.
- [12] DiSanto M E, Wang Z, Menon C, et al. Expression of myosin isoforms in smooth muscle cells in the corpus cavernosum penis [J]. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 1998, 275(4): C976-C987.
- [13] Davoli R, Zambonelli P, Bigi D, et al. Isolation and mapping of two porcine skeletal muscle myosin heavy chain isoforms [J]. Anim Genet, 1998, 29(2): 91-97.
- [14] Wang X, Gong J, Liu X, et al. Expression of uncoupling protein 3 in mitochondria protects against stress-induced myocardial injury: A proteomic study [J]. Cell Stress Chaperones, 2010, 15(6): 771-779.
- [15] Wilkins B J, Molkentin J D. Calcium-calmodulin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 322(4): 1178-1191.
- [16] Molkentin J D. Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs [J]. Cardiovasc Res, 2004, 63(3): 467-475.
- [17] Branishte T A, Dudnakova T V, Dergilev K V, et al. Expression of contractile and cytoskeletal proteins in myocardium of patients with dilated cardiomyopathy [J]. Kardiologiia, 2004, 44(12): 31-36.
- [18] Stilli D, Bocchi L, Berni R, et al. Correlation of alpha-skeletal actin expression, ventricular fibrosis and heart function with the degree of pressure overload cardiac hypertrophy in rats [J]. Exp Physiol, 2006, 91(3): 571-580.
- [19] Gacko M, Ostapowicz R, Chrostek L, et al. Activity of enzymes with different subcellular localization in the blood plasma of patients with aortic aneurysm [J]. Medical Science Monitor, 2005, 11(4): 211-213.
- [20] Valle G, Faulkner G, De Antoni A, et al. Telethonin, a novel sarcomeric protein of heart and skeletal muscle [J]. FEBS Lett, 1997, 415(2): 163-168.
- [21] Hayashi T, Arimura T, Itoh-Satoh M, et al. Tcap gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy [J]. J Am Coll Cardiol, 2004, 44(11): 2192-2201.
- [22] Knoll R, Hoshijima M, Hoffman H M, et al. The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy [J]. Cell, 2002, 111(7): 943-955.
- [23] 张更谦. 大鼠急性心肌缺血早期标记物及其差异基因筛选的研究 [D]. 成都: 四川大学, 2007.
- Zhang G Q. Time course proteomic profile and differentially expressed genes of rat acute myocardial ischemia [D]. Chengdu: Sichuan University, 2007. (in Chinese)
- [24] Concannon C G, Gorman A M, Samali A. On the role of Hsp-27 in regulating apoptosis [J]. Apoptosis, 2003, 8(1): 61-70.
- [25] Williams K L, Rahimtula M, Mearow K M. Heat shock protein 27 is involved in neurite extension and branching of dorsal root ganglion neurons *in vitro* [J]. J Neurosci Res, 2006, 84(4): 716-723.