

网络出版时间: 2017-3-21 13:44 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170321.1344.012.html>

免疫共沉淀联合质谱分析筛选 克罗恩病中 Intelectin-1 相互作用蛋白的初步研究

顾 问¹ 周 郑¹ 吴文涌¹ 刘晓昌² 余昌俊¹

摘要 目的 对比克罗恩病患者的病变与正常肠黏膜 筛选与肠凝集素-1 (Intelectin-1) 相互作用的差异蛋白,探讨 Intelectin-1 及其相互作用蛋白在克罗恩病发展中的作用。方法 利用免疫共沉淀技术筛选克罗恩病患者病变及正常组织中与 Intelectin-1 相互作用的蛋白;利用 MALDI-TOF/TOF-MS 质谱分析技术鉴定与 Intelectin-1 相互作用蛋白;并使用免疫共沉淀和 Western blot 分析技术验证所鉴定的 Intelectin-1 相互作用蛋白。结果 利用免疫共沉淀联合质谱分析技术成功筛选出 4 个与 Intelectin-1 相互作用差异蛋白,包括:肿瘤坏死因子受体相关因子 3 (TRAF3)、腺苷酸三磷酸酶 (ATPase)、热休克蛋白 90 (HSP90)、锌指蛋白 (ZNF)。结论 Intelectin-1 可能通过与 TRAF3、ATPase、HSP90、ZNF 蛋白相互作用,而影响克罗恩病的发展。

关键词 克罗恩病; Intelectin-1; 免疫共沉淀; 质谱; 蛋白质相互作用

中图分类号 R 574.6

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)04-0519-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.04.012

肠凝集素-1 (Intelectin-1) 是一种主要表达于小肠、结肠等组织的分泌性糖蛋白,含 313 个氨基酸,由 1 个分泌序列和 1 个纤维蛋白原相关结构域组成的分子量为 120 ku 的同源三聚体^[1]。研究^[2-3]表明,Intelectin-1 参与对抗微生物的肠道免疫防御,胰岛素刺激的葡萄糖摄取,慢性阻塞性肺疾病和哮喘。该研究前期通过免疫蛋白质组学的方法比较克罗恩病患者的病变肠黏膜和正常肠黏膜之间蛋白表达的差异,显示病变肠黏膜组织中 Intelectin-1 表达显著上调,提示 Intelectin-1 可能在克罗恩病发病中起到重要作用^[4]。而克罗恩病中 Intelectin-1 相互作用蛋白复合体至今未见报道,采用免疫共沉

淀技术,从克罗恩病组织中分离 Intelectin-1 相互作用蛋白,酶解后进行 MALDI-TOF/TOF-MS,以进一步鉴定并阐明克罗恩病中 Intelectin-1 相互作用蛋白的结构。

1 材料与方法

1.1 标本来源 本实验标本取自 2015 年 8 月~11 月安徽医科大学第一附属医院胃镜室。所有标本为前期病理明确的克罗恩病组织。标本存放于 -80 °C。本研究获安徽医科大学第一附属医院伦理委员会批准,患者或近亲属对研究方案签署知情同意书。
1.2 主要试剂 Intelectin-1 鼠抗人单克隆抗体、Protein A (美国 Santa Cruz 公司); BCA 试剂盒 (美国 Sigma 公司); 细胞裂解液、二抗 (上海碧云天公司); TRAF3 鼠抗人单克隆抗体 (北京博奥森公司)。

1.3 Western blot 法检测 取 3 个克罗恩病患者病变及正常组织样本各约 100 mg 于液氮中研磨至粉末,加入裂解液提取蛋白,BCA 法蛋白定量,调整蛋白浓度至浓度为 2.5 μg/μl,加入蛋白上样缓冲液,震荡混匀后,100 °C 水浴 5 min,12 000 r/min 离心 1 min,上样 50 μg,电泳至溴酚蓝到凝胶底部 (电泳条件:浓缩胶恒压 70 V,约 20 min;分离胶恒压 120 V,约 1 h)。将蛋白转至 PVDF 膜 (30 mA,120 min);将膜放入含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液中封闭 1 h 后加入 Intelectin-1 一抗 (1:1 000,美国 Santa Cruz 公司,sc-130923) 4 °C 水平摇床过夜, TBST 缓冲液洗涤 3 次,羊抗鼠-HRP 二抗室温孵育 40 min; TBST 缓冲液洗涤 3 次,显影呈像。

1.4 免疫共沉淀检测 Intelectin-1 相互作用蛋白 取克罗恩病病变及正常组织样本各约 100 mg 于液氮中研磨至粉末,加入裂解液提取蛋白,BCA 法蛋白定量,用预冷 PBS 将克罗恩病组织蛋白样品稀释至 1 mg/ml,放置于冰上待用; Protein A 琼脂糖凝胶制成约 50% 的悬液,加入在蛋白样品中,4 °C 振荡混匀孵育 1 h。4 °C 离心后吸取上清液加入 Intelectin-1 抗体 5 μg,4 °C 振荡混匀 1 h,在蛋白样品中加入 50% Protein A 琼脂糖凝胶悬液 50 μl,4 °C 振荡混匀

2017-01-11 接收

基金项目:安徽省高校优秀青年人才支持计划重点项目 (编号: gxyqZD2016051)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院¹ 普外科、² 消化内科,合肥 230022

作者简介:顾 问,男,硕士研究生;

周 郑,男,博士,副教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: zhougnehz@sina.com

过夜,蛋白裂解液洗涤 Protein A 琼脂糖凝胶-抗体-蛋白复合物(免疫沉淀)3次,取磁珠沉淀加入上样缓冲液,沸水浴5 min,离心收集上清液。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测未知蛋白,电泳条件:浓缩胶恒压80 V,约20 min;分离胶恒压100 V,电泳至溴酚蓝跑出凝胶底部。对电泳胶进行考马斯亮蓝快速染色。

1.5 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱分析(MALDI-TOF/TOF-MS)鉴定未知蛋白质 将电泳后凝胶中条带切成约1~2 mm³大小的小胶块,用含50%乙腈、25 mmol/L碳酸氢铵溶液100~200 μl脱色后,真空干燥约20 min,干燥好的胶块上加入胰蛋白酶酶液37℃温浴20 h。收集酶切后的上清液,加入胶块内50~100 μl 5%三氟乙酸40℃置1 h,收集上清液;再加入胶块内20 μl 5%三氟乙酸、50%乙腈50~100 μl,30℃置1 h,收集上清液;合并上清液,离心干燥。Q-Exactive - Orbitrap(美国Thermo-fisher公司)的MALDI-TOF/TOF-MS质谱分析。仪器设置:正离子,20 kV,基质用CCAα-氰基-4羟基肉桂酸,内标按照胰蛋白酶自切峰2 163.05为校正标准,外标为4种标准肽段的混合物。得到的质谱数据用Mascot软件在Swissprot数据库内进行检索。

1.6 免疫共沉淀和Western blot分析验证Intelectin-1结合蛋白 实验组Intelectin-1抗体与对照组免疫球蛋白G(Immunoglobulin G, IgG)分别和2 mg总蛋白进行免疫共沉淀,收集蛋白质复合物进行12.5% SDS-PAGE分离,胶中蛋白质电转移至PVDF膜上。印迹膜在5%脱脂牛奶中4℃封闭过夜;在鼠抗人TRAF3一抗(1:1 000,北京博奥森公司,bs-1185R)中室温温育2 h, TBST缓冲液洗涤3次,每次10 min;在1:500稀释的羊抗鼠二抗中室温温育2 h, TBST缓冲液洗涤3次,显影呈像。

2 结果

2.1 Intelectin-1蛋白组织表达检测结果 通过Western blot检测显示克罗恩病病变组织中较正常组织Intelectin-1蛋白高表达,大小120 ku,见图1。

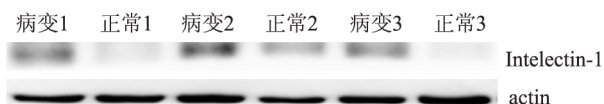


图1 Western blot法检测克罗恩病病变组织与正常组织Intelectin-1蛋白表达

2.2 免疫共沉淀分离与Intelectin-1相互作用的蛋白质 裂解病变及正常对照组织,提取总蛋白。将得到的病变和正常组织蛋白各分为两组(实验组及对照组)。实验组以Intelectin-1特异性抗体免疫共沉淀,对照组以鼠抗人IgG进行免疫沉淀。经SDS-PAGE后用考马斯亮蓝染色,切取实验组与对照组条带(图2),进行质谱鉴定。

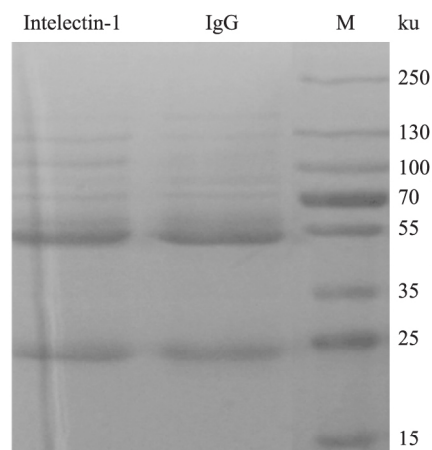


图2 免疫共沉淀分离Intelectin-1蛋白复合体
M: Marker

2.3 MALDI-TOF/TOF-MS质谱分析结果 筛选出4个与Intelectin-1相互作用差异蛋白,包括:肿瘤坏死因子受体相关因子3(tumor necrosis factor receptor-associated factor 3, TRAF3)、腺苷酸三磷酸酶(adenosine triphosphatase, ATPase)、热休克蛋白90(heat shock protein 90, HSP90)、锌指蛋白(zinc finger protein, ZNF)(表1、图3)。进一步挑选了TRAF3以验证质谱分析结果。

表1 质谱鉴定出与Intelectin-1相互作用的差异蛋白名称与评分

| 蛋白 | 分子量(ku) | 匹配序列数 | 评分 |
|--------|---------|-------|--------|
| ATPase | 114 | 4.1 | 37.009 |
| HSP90 | 5 481 | 25.0 | 6.076 |
| TRAF3 | 17 901 | 13.5 | 5.611 |
| ZNF | 67 214 | 3.9 | 5.746 |

2.4 免疫共沉淀和Western blot分析验证Intelectin-1结合蛋白 TRAF3能激活NF-κB、JNK信号途径而促进克罗恩病的发生发展。本研究中使用另外3个患者(I、II、III组)的病变组织进行免疫共沉淀,免疫复合物电泳转膜后与抗人TRAF3抗体进行Western blot分析。结果显示:TRAF3仅在Intelectin-1免疫共沉淀复合物中检测到,而在对照IgG未检测到。这与MALDI-TOF/TOF-MS分析鉴定的结

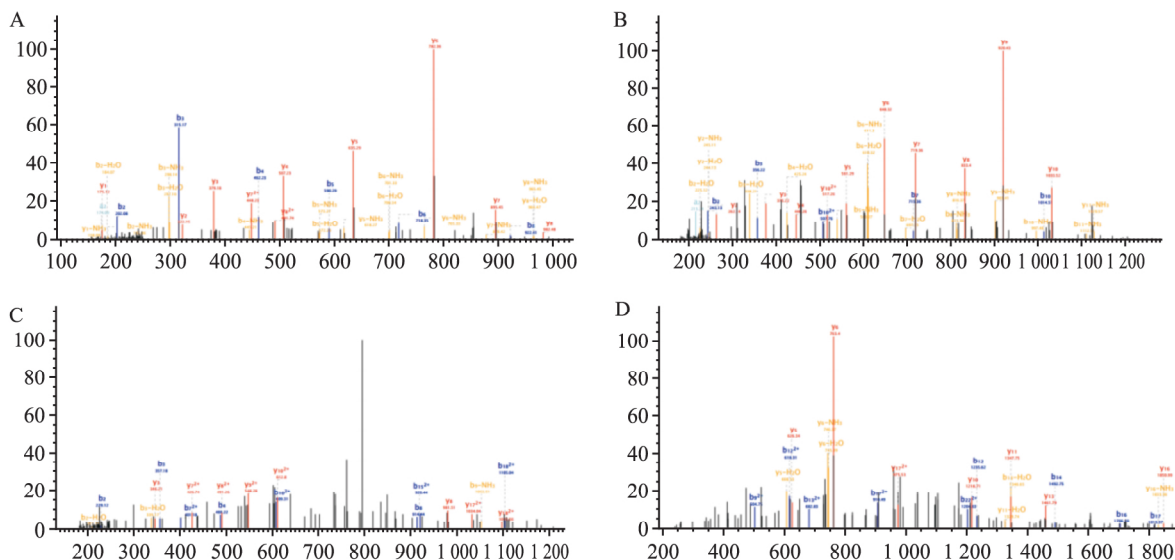


图3 差异蛋白多肽质谱图

A: ATPase; B: HSP90; C: TRAF3; D: ZNF

果一致(图4)。

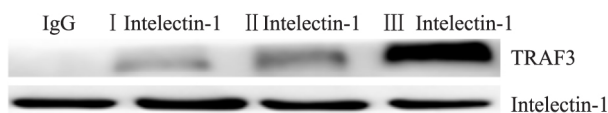


图4 Western blot 验证 TRAF3 与 Intelectin-1 特异性结合

3 讨论

本研究前期证实 Intelectin-1 蛋白在克罗恩病中高表达,提示 Intelectin-1 蛋白可能在克罗恩病发病中起到重要作用^[4]。本研究利用免疫共沉淀联合质谱技术成功筛选出克罗恩病病变组织标本中 4 个 Intelectin-1 相互作用差异蛋白: TRAF3、ATPase、HSP90、ZNF。

NF- κ B 和 JNK 信号途径可促进炎症性肠病的发生^[5]。TRAF3 是 TNF 受体家族和 IL-1/Toll-like 受体家族的主要信号传导子。研究^[6]表明 TRAF3 能激活 NF- κ B、JNK 信号途径和诱导 I 型 *ifn* 基因表达,从而促进克罗恩病的发生发展。TRAF3 可与 LT β R、TNFR II 和 LMP1 结合,进一步激活 CD30、LT β R 和 LMP1 介导的 NF- κ B 信号通路。此外,当细胞受到肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、白细胞介素(interleukin, IL)、细菌及其产物等刺激时, I κ B 分子(NF- κ B 抑制分子)发生磷酸化及泛素化而被蛋白酶体裂解,进一步导致 NF- κ B 被

释放并活化^[7]。TRAF3 可磷酸化 MAPKK/MEK/SEK 并使之活化,后者进一步磷酸化 JNK 并使之活化,活化的 JNK 可磷酸化转录因子 AP-1 并使之活化而促进克罗恩病发生发展。通过将大肠杆菌蛋白和 TLR 信号蛋白 MyD88 或 TRAF3 融合, Häcker et al^[8]模拟了 Toll 样受体信号途径,发现 TRAF3 与活化后的接头分子 MyD88 相互作用,促进蛋白激酶 I-RAK-1、TBK-1 和 IKK- ϵ 的复合物形成,最终激活 IEF3 和(或) IEF7 的激活以及 I 型 *ifn* 基因的转录。克罗恩病存在许多细胞免疫异常的现象,如黏膜 T 细胞异常激活、存活。TRAF3 缺失的小鼠显示免疫反应异常,且 TRAF3 缺陷鼠中分离的 T 细胞缺乏对抗原的有效应答,这提示 TRAF3 促进 T 细胞产生和激活的信号级联反应。同时 TRAF3 可以诱导活化 NKT 释放细胞因子促使炎症发生。最新研究^[9-10]表明 TRAF3 在炎症性肠病内高表达,提示 Intelectin-1 可能通过上调 TRAF3 蛋白表达激活 NF- κ B、JNK、I 型 *ifn* 基因进而诱导克罗恩病的发生。

ATPase 是为主动转运提供能量的专一性酶。ATP 经 ATPase 酶去磷酸化而在主动转运和细胞的形态维持、能量代谢等方面发挥重要作用。肠黏膜上皮细胞的能量代谢对维持肠黏膜屏障的完整性有着重要的影响。干扰上皮组织的能量代谢会引起肠黏膜屏障功能异常,导致肠道内细菌、抗原等物质穿过肠黏膜屏障,进入固有层进而激活炎症反应,诱导促炎因子的产生及释放从而启动炎症性肠病的

发病^[11]。通过改善肠黏膜上皮细胞能量代谢,保护线粒体功能等方法,能有效缓解炎症性肠病的严重性,减少复发率。研究^[12]表明,在炎症性肠病患者病变肠黏膜组织中 ATPaes 酶表达量下调。本研究推测 Intelectin-1 可能通过下调 ATPaes 酶干扰肠黏膜细胞能量代谢,引发肠黏膜屏障异常。

ZNF 是一种具有泛素化和去泛素化双重酶活性蛋白,其在肠道炎症反应过度的炎症性肠病患者体内表达显著下调,起着负调控多种信号介导的炎症反应和细胞凋亡的作用。研究^[13]表明 ZNF 可使 NF- κ B 信号通路中的关键接头分子 TRAF 去泛素化并使受体作用蛋白 1 泛素化而降解,从而负调 Toll 样受体、肿瘤坏死因子受体、B 细胞受体、T 细胞受体介导的 NF- κ B 信号通路。另外,ZNF 的过表达可以抑制 TNF- α /TNFR1 及 OxLDL 等信号途径而抑制炎症反应和细胞凋亡。在 IBD 小儿患者中 ZNF 表达量下调。本研究推测 Intelectin-1 可能通过下调 ZNF 表达激活 NF- κ B 进而诱导克罗恩病的发生。

HSP90 是一种可促进结肠黏膜上皮细胞的修复而保护黏膜的热休克蛋白^[13],其在细胞外调控抗原递呈、机体免疫调控,在细胞内通过抑制单核巨噬细胞中 TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-12 等多种炎症因子的生成和释放负调节炎症介质^[14]。克罗恩病等炎症性肠病发生时,肠道黏膜屏障功能异常,肠腔内细菌及其产物等抗原移位至肠黏膜固有层并激活黏膜免疫系统^[15],在炎症性肠病患者血清中热休克蛋白表达量下调。Intelectin-1 可能通过下调 HSP90 蛋白表达,诱导克罗恩病的发生。

综上所述,本研究推测 Intelectin-1 通过与 ATPase 家族蛋白相互作用,干扰肠黏膜细胞能量代谢,引发肠黏膜屏障异常;通过 TRAF3 蛋白及 ZNF 激活 NF- κ B 以及 JNK 通路;通过调控 HSP90 蛋白表达,促进单核巨噬细胞中 TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-12 等多种炎症因子的生成和释放,促进克罗恩病的发展。本文首次在克罗恩病中鉴定了 4 个 Intelectin-1 结合蛋白,虽然对于克罗恩病发展的确切机制尚待进一步研究,但为克罗恩病的发病机制研究提供了全新的视角。

参考文献

[1] Schäffler A, Neumeier M, Herfarth H, et al. Genomic structure of

human omentin, a new adipocytokine expressed in omental adipose tissue [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1732(1-3): 96-102.

[2] Datta R, deSchoolmeester M L, Hedeler C, et al. Identification of novel genes in intestinal tissue that are regulated after infection with an intestinal nematode parasite [J]. *Infect Immun*, 2005, 73(7): 4025-33.

[3] Kuperman D A, Lewis C C, Woodruff P G, et al. Dissecting asthma using focused transgenic modeling and functional genomics [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2005, 116(2): 305-11.

[4] Zhou Z, Liu H, Gu G, et al. Immunoproteomic to identify antigens in the intestinal mucosa of Crohn's disease patients [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e81662.

[5] Atreya I, Atreya R, Neurath M F. NF- κ B in inflammatory bowel disease [J]. *J Intern Med*, 2008, 263(6): 591-6.

[6] Yamamoto H, Kishimoto T, Minamoto S. NF- κ B activation in CD27 signaling: involvement of TNF receptor-associated factors in its signaling and identification of functional region of CD27 [J]. *J Immunol*, 1998, 161(9): 4753-9.

[7] Maniatis T. A ubiquitin ligase complex essential for the NF- κ B, Wnt/Wingless, and Hedgehog signaling pathways [J]. *Genes Dev*, 1999, 13(5): 505-10.

[8] Häcker H, Redecke V, Blagojev B, et al. Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6 [J]. *Nature*, 2006, 439(7073): 204-7.

[9] Shen J, Qiao Y Q, Ran Z H, et al. Up-regulation and pre-activation of TRAF3 and TRAF5 in inflammatory bowel disease [J]. *Int J Med Sci*, 2013, 10(2): 156-63.

[10] Rojas-Cartagena C, Flores I, Appleyard C B. Role of tumor necrosis factor receptors in an animal model of acute colitis [J]. *Cytokine*, 2005, 32(2): 85-93.

[11] Ivanov A I. Actin motors that drive formation and disassembly of epithelial apical junctions [J]. *Front Biosci*, 2008, 13: 6662-81.

[12] Hsieh S Y, Shih T C, Yeh C Y, et al. Comparative proteomic studies on the pathogenesis of human ulcerative colitis [J]. *Proteomics*, 2006, 6(19): 5322-31.

[13] 桂俊,李桥,熊思东,等. 肿瘤坏死因子- α 诱导蛋白 3 对 NF- κ B 信号通路的抑制作用 [J]. *现代免疫学*, 2011, 31(2): 107-12.

[14] de Souza H S, West G A, Rebert N, et al. Increased levels of survivin, via association with heat shock protein 90, in mucosal T cells from patients with Crohn's disease [J]. *Gastroenterology*, 2012, 143(4): 1017-26.

[15] Abraham C, Medzhitov R. Interactions between the host innate immune system and microbes in inflammatory bowel disease [J]. *Gastroenterology*, 2011, 140(6): 1729-37.

网络出版时间: 2017-3-21 13:44 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170321.1344.013.html>

miR-21 介导肠上皮细胞凋亡维持肠道稳态 参与溃疡性结肠炎相关癌变研究

周海新¹, 方健松², 张涛², 马媛萍², 黄晓燕³

摘要 目的 观察溃疡癌变小鼠结肠黏膜 miR-21、Caspase-8、肠上皮细胞凋亡及 β -防御素表达, 探讨溃疡相关癌变的可能发病机制。方法 40 只雄性清洁级 Balb-c 小鼠按体质量随机分 2 组即正常组和模型组, 其中正常组 10 只, 模型组 30 只。采用二甲胍/葡聚糖硫酸钠 (DMH/DSS) 复合法制备溃疡癌变相关模型, 造模 30 周结束后处死全部小鼠, 应用光镜检测小鼠结肠黏膜组织形态学变化, 电镜检测超微组织结构及上皮细胞凋亡变化; 应用现代分子生物学技术检测 miR-21、Caspase-8 及 β -防御素表达变化。结果 与正常组比较, 溃疡相关癌变小鼠结肠黏膜光镜下见结肠黏膜不同程度缺损, 表面渗出及坏死物, 细胞形态异型, 呈浸润癌改变; 电镜下见肠黏膜层上皮细胞表面微绒毛稀疏, 长短不一, 细胞连接间隙增宽, 见大量上皮细胞凋亡小体及细胞自噬, 线粒体肿胀, 结构不清, 嵴结构消失, 造模成功率约 70%。与

正常组比较, 溃疡癌变小鼠结肠黏膜 miR-21、Caspase-8、 β -防御素蛋白及 mRNA 表达均呈明显上升趋势, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 溃疡相关癌变的发生及发展可能是由于溃疡性结肠炎 (UC) 炎症持续, 诱导 miR-21、Caspase-8 及 β -防御素表达增加, 破坏肠道免疫平衡, 导致肠黏膜通透性增加, 肠上皮细胞凋亡/自噬加剧, 造成恶性循环, 进一步破坏肠道稳态, 上皮细胞异型增生, 甚则癌变。

关键词 miR-21; 肠上皮细胞凋亡; 肠道稳态; 溃疡相关癌变
中图分类号 R 574.62

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)04-0523-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.04.013

“炎癌转化”这一理念已被广为接受, 但是其具体发病机制尚未完全明晰, 微小 RNA (microRNA) 作为一类非编码的内源性小分子 RNA, 能在转录后水平负性调节靶基因 mRNA 表达, 结肠黏膜 miRNA 差异性表达参与维持肠道黏膜免疫和肠屏障通透性完整而发挥重要作用^[1-2], 有研究^[3-4]推测 miRNA 在细胞内源性和外源性免疫调节系统中起重要作用, 且参与炎症调节过程及炎癌转化, 调节肠道黏膜 miRNA 表达可能为溃疡相关癌变 (ulcerative colitis associated carcinogenesis, UCAC) 靶向治疗提供新的

2016-12-30 接收

基金项目: 海南省卫生计生行业科研项目 (编号: 14A210219); 广西自然科学基金项目 (编号: 2013GXNSFAA019116)

作者单位: ¹ 海南省中医院消化科, 海口 570203

² 广西中医药大学附属瑞康医院消化科, 南宁 530011

³ 广西中医药大学第一附属医院, 南宁 530011

作者简介: 周海新, 男, 副主任医师, 本科;

张涛, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 327664246@qq.com

Screening of proteins interacting with Intelectin-1 in Crohn disease by co-immunoprecipitation and MALDL-TOF/TOF-MS

Gu Wen, Zhou Zheng, Wu Wenyong, et al

(Dept of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To screen the proteins interacted with Intelectin-1 in Crohn disease via comparing Crohn disease and normal tissues and investigate the function of Intelectin-1 in the development of Crohn disease. **Methods** The proteins interacting with Intelectin-1 were screened by co-immunoprecipitation and identified by MALDL-TOF/TOF-MS and finally confirmed by immunoprecipitation and Western blot analysis. **Results** Data of Western blot showed that Intelectin-1 was overexpressed in Crohn disease tissues compared with normal tissues. In addition, four novel proteins (ATPase, HSP90, TRAF3 and ZNF) interacted with Intelectin-1 were successfully verified by MALDL-TOF/TOF-MS. **Conclusion** Intelectin-1 involves in the development of Crohn disease via interacting with TRAF3, ATPase, HSP90 and ZNF.

Key words Crohn disease; Intelectin-1; co-immunoprecipitation; mass spectrometry; protein-protein interaction