

网络出版时间: 2022-11-28 18:14 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20221128.1711.007.html>

巨噬细胞中与原肌球蛋白调节蛋白 1 相互作用的 迁移相关蛋白质分析

江思瑜^{1,2}, 马 杉^{1,2}, 袁 博¹, 谢利德¹, 姚伟娟², 郭丽娜³

摘要 目的 利用质谱联合 GeneCards 数据库挖掘分析 Raw264.7 小鼠单核巨噬细胞系中与原肌球蛋白调节蛋白 1 (TMOD1) 相互作用且与迁移相关的蛋白质。方法 使用 TMOD1-DDK 质粒在 Raw264.7 细胞中过表达 TMOD1, 免疫共沉淀联合质谱寻找巨噬细胞中与 TMOD1 存在相互作用的蛋白质, GeneCards 数据库检索巨噬细胞迁移已知蛋白质, Bioinformatics & Systems Biology 在线工具对已知蛋白质与质谱蛋白质进行关联分析找到共同差异蛋白 (CO-DEPs), WoLF PSORT 预测 CO-DEPs 亚细胞定位, EggNOG 数据库对 CO-DEPs 进行真核生物同源类群 (KOG) 注释, DAVID 数

库对 CO-DEPs 进行基因本体 (GO) 注释与京都基因组学和基因组学百科全书 (KEGG) 通路注释, String 数据库对 CO-DEPs 进行蛋白互作网络分析, CytoScape 软件绘图。结果 质谱与 GeneCards 数据库分析共获得 CO-DEPs 41 个, CO-DEPs 亚细胞定位主要分布于细胞骨架、细胞质、细胞核, KOG 注释主要为 O: 翻译后修饰、Z: 细胞骨架、J: 翻译, GO 分析显示 CO-DEPs 主要参与了 poly(A) RNA 结合、蛋白质折叠、黏着斑等过程, KEGG 分析显示 CO-DEPs 富集到的通路主要为致心律失常性右室心肌病 (ARVC)、紧密连接。β-肌动蛋白 (ACTB) 为蛋白交互作用最大的蛋白质。结论 巨噬细胞内与 TMOD1 发生相互作用的蛋白主要包括肌球蛋白重链-9 (MYH9)、α-辅肌动蛋白 1 (ACTN1) 与 ACTB 等, 提示 TMOD1 与巨噬细胞运动有关。

关键词 巨噬细胞; TMOD1; 相互作用; 质谱分析; GeneCards 数据库

中图分类号 R 33

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)12-1885-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.12.007

2022-10-18 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31771280、31570938); 河北省教育厅在读研究生创新能力培养资助项目(编号: CXZZSS2021135)

作者单位: ¹承德医学院基础医学院, 承德 067000

²北京大学医学部基础医学院, 生理系与病理生理系, 血液流变学研究中心, 北京 100083

³曹县人民医院康复科, 菏泽 274400

作者简介: 江思瑜, 女, 硕士研究生;

谢利德, 男, 博士后, 教授, 责任作者, E-mail: xielide65@163.com;

姚伟娟, 女, 博士后, 副教授, 责任作者, E-mail: wei-juan.yao@bjmu.edu.cn

血液内的巨噬细胞被吸引至炎症部位发挥生物学功能的过程称为巨噬细胞迁移。有学者研究^[1]显示, 当巨噬细胞迁移能力下降时, 细胞内纤维状肌动蛋白 (filamentous actin, F-actin) 的含量增加。原

scription factor-6 (ATF6), cAMP-response element binding protein (CREB), CREB-regulated transcription coactivator-2 (CRTC2), double-stranded RNA-dependent protein kinase-like ER kinase (PERK), eukaryotic initiation factor 2α (eIF2α), protein kinase B (AKT), phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), glucose-6-phosphatase (G6Pase) mRNA were measured at baseline, week 8, and week 12. **Results** There was no significant difference in each observation index between the two groups at baseline; at 8 weeks, the levels of FBG, FINS and the mRNA levels of IRE1α, XBP1s, ATF6, PERK, eIF2α, PEPCK and G6Pase in the CIH group were higher than those in the NC group ($P < 0.05$), while the mRNA levels of CREB, CRTC2 and AKT were lower than those in the NC group ($P < 0.05$); at 12 weeks, there was no significant difference in each observation index between the two groups. Pearson correlation analysis showed (8th week of intermittent hypoxia group): homeostasis model assessment-insulin resistance (HOMA-IR) was positively correlated with FoxO1, CREB, CRTC2 and PERK, eIF2α mRNA levels ($r = 0.172, 0.595, 0.183, 0.702, 0.608$; $P < 0.05$) while it was negatively correlated with IRE1α, XBP1s, ATF6, AKT mRNA levels ($r = -0.422, -0.327, -0.309, -0.399$; $P < 0.05$). **Conclusion** Intermittent hypoxia can lead to insulin resistance, and endoplasmic reticulum stress may mediate this effect.

Key words intermittent hypoxia-reoxygenation; insulin resistance; endoplasmic reticulum stress; unfolded protein response

肌球蛋白调节蛋白 1 (tropomodulin1, TMOD1) 是 F-actin 末端唯一的盖帽蛋白,通过结合 TM5b 分子的 N 末端来调控 F-actin 的解聚并阻止其增长。在敲除 TMOD1 的树突状细胞中,细胞的趋化能力降低、F-actin 表达减少^[2];有研究^[3]表明,在宫颈癌细胞中敲除 TMOD1 能够促进细胞迁移,这提示 TMOD1 在调节细胞迁移能力中发挥重要作用,但其分子机制还有待进一步研究。该研究利用免疫共沉淀结合蛋白质质谱技术寻找巨噬细胞中与 TMOD1 存在相互作用的蛋白,并与 GeneCards 数据库中巨噬细胞迁移相关的蛋白共同分析得到共同差异蛋白 (common differentially expressed proteins, CO-DEPs),并对 CO-DEPs 进行了生物信息学分析。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株与细胞 TMOD1-DDK 质粒(载体为 pCMV6-Entry,包含小鼠 TMOD1 开放阅读框,所带标签为 Myc-DDK)购自美国 Origene 公司, DH5 α 感受态细胞购自北京索莱宝科技有限公司, Raw264.7 小鼠单核巨噬细胞系为实验室留存。

1.2 主要试剂与仪器 高糖 DMEM 培养基、双抗均购自北京中科迈晨科技有限公司, BI 特级胎牛血清购自北京中科科奥生物科技有限公司, lipo8000TM 转染试剂、快速银染试剂盒、抗荧光淬灭封片剂均购自上海碧云天生物技术有限公司, 兔抗 TMOD1 抗体购自北京京天成生物技术有限公司, Protein A/G PLUS-Agarose 购自北京永泰兴成商贸有限公司, 鼠抗山羊/辣根酶标记、兔抗山羊 IgG/辣根酶标记均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 细胞培养与质粒转染 Raw264.7 细胞用高糖 DMEM 完全培养基(含 8% 胎牛血清、1% 双抗)在 37℃、含 5% CO₂ 的培养箱中培养。质粒转染前 1 d, 细胞在 6 孔板中按 3.5×10^5 个/孔接种,待细胞达到 80% 融合度后更换培养基。将 lipo8000TM 转染试剂、DMEM 培养基和 TMOD1-DDK 质粒按比例为 4 : 125 : 2.5 配置混合液,加入 6 孔板中。转染质粒载体的为 Con^{DDK} 组,转染 TMOD1-DDK 质粒的为 TMOD1^{DDK} 组。转染 24 h 和 48 h 后分别收取 RNA 和总蛋白质。

1.4 免疫共沉淀、银染及质谱分析 将 RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂 PMSF 和磷酸酶抑制剂按 100 : 1 : 1 的比例制备裂解液,提取细胞总蛋白质。用 BCA 试剂盒测量蛋白浓度后取 50 μ g 蛋白做为总蛋白,其余分成 2 份(约 500 μ g/份)。将蛋白和

DDK 抗体按质量比为 200 : 1 的比例混合,4℃ 旋转过夜后加入 20 μ l Protein A/G 琼脂糖珠在 4℃ 下旋转 4 h。用 500 μ l 裂解液洗涤琼脂糖珠后用 2 $\times$ Loading Buffer 重悬,在 95℃ 下将蛋白变性后用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白。凝胶进行银染后,切下差异条带并送至北京大学医学部大型仪器平台进行质谱分析。

1.5 Western blot 实验 取 20 μ g 蛋白,用 10% 分离胶进行电泳后转膜。5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,一抗 4℃ 孵育过夜,二抗室温孵育 1 h, ECL 超敏显影液显影。

1.6 总 RNA 提取与实时荧光定量 PCR (qPCR)

在细胞中加入 1 ml RNA 提取试剂 RNAtrip,冰上裂解 10 min,加三氯甲烷 200 μ l 后室温静置 5 min。离心并吸取上层水相,加 500 μ l 异丙醇进行沉淀。将沉淀用 75% 乙醇漂洗,干燥后用焦碳酸二乙酯 (diethyl pyrocarbonate, DEPC) 水溶解。RNA 逆转录与 qPCR 操作按照试剂说明书完成。

1.7 免疫荧光染色 细胞用 4% 多聚甲醛室温固定 30 min,再用 0.1% Trion-100 透膜 10 min, 3% BSA 室温封闭 30 min,一抗 4℃ 孵育过夜,二抗室温孵育 1 h,含 DAPI 封片剂封片。TCS-SP8 DIVE 荧光显微镜拍照。

1.8 已知巨噬细胞迁移的蛋白质的获取及与质谱蛋白质的关联分析 在 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)中输入关键词“Macrophage migration”获取与巨噬细胞迁移相关的基因列表,选取“Protein Coding”基因与质谱结果在 Bioinformatics & Systems Biology 在线工具中(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>)绘制韦恩图,交集即为 CO-DEPs。

1.9 生物信息学分析 在 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>)上查找 CO-DEPs 的蛋白质序列,将序列上传至 WoLF PSORT(<https://wolfsort.hgc.jp/>)查询蛋白质的亚细胞定位。在 EggNOG(<http://eggno-mapper.embl.de/>)对 CO-DEPs 进行真核同源基因组 (eukaryotic orthologous genome, KOG) 注释。在 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>)对 CO-DEPs 进行 GO 富集分析与 KEGG 通路分析。String 数据库(<https://www.string-db.org/>)对 CO-DEPs 进行蛋白互作网络分析,再通过 CytoScape 软件绘制 PPI 网络图。

1.10 统计学处理 GraphPad Prism 软件对数据进行非配对 *t* 检验并绘图, *P* < 0.05 为差异有统计学

意义。

2 结果

2.1 TMOD1 的细胞定位分析与重组质粒过表达验证 为了明确 TMOD1 在细胞中的定位,该研究在 GeneCards 数据库中下载 TMOD1 的蛋白质亚细胞定位数据(表 1),可信度得分越高,可信度越大。结果显示, TMOD1 主要分布于细胞骨架、细胞质,其余部分定位可信度较低。为了验证这一结果,该实验在 Raw264.7 细胞中转染了 TMOD1-DDK 质粒,利用 DDK 抗体进行免疫荧光染色以指示 TMOD1 在细胞内的定位。结果显示,荧光信号主要分布在胞质中,这与 GeneCards 的 TMOD1 定位数据是一致的(图 1A)。此外,为了验证过表达效率,该实验利用 qPCR 和 Western blot 分别检测了 Raw264.7 细胞中 TMOD1 的表达(图 1B、C),结果显示 TMOD1 能够成功过表达。

表 1 TMOD1 蛋白质亚细胞定位

亚细胞定位	可信度得分
细胞骨架	5
细胞质	5
细胞核	2
细胞膜	1
胞外	1
线粒体	1
内质网	1
溶酶体	1
高尔基体	1

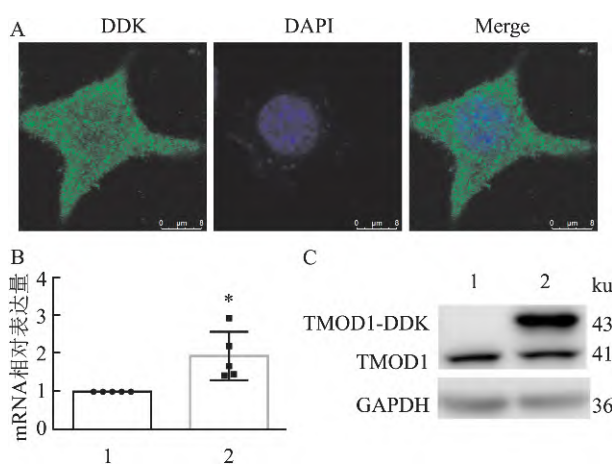


图 1 TMOD1 定位分析与重组质粒过表达验证

A: TMOD1^{DDK} 组 Raw264.7 细胞的免疫荧光染色 $\times 300$; B: qPCR 检测 TMOD1 过表达效率; C: Western blot 检测 TMOD1 过表达效率; 1: Con^{DDK} 组; 2: TMOD1^{DDK} 组; 与 Con^{DDK} 组比较: * $P < 0.05$

2.2 免疫共沉淀联合质谱分析巨噬细胞中 TMOD1 的相互作用蛋白 为了寻找 Raw264.7 细胞中与 TMOD1 相互作用的蛋白质,该实验进行了免疫共沉淀,所得蛋白样品经 SDS-PAGE 凝胶电泳后银染,共发现 3 条有差异的条带,分别编号 1、2、3 送质谱分析(图 2)。质谱共发现差异表达的蛋白质 71 个,排除 18 个污染的角蛋白(KERATIN)后,共余 MYH9、IGHG、ACTB、HSP90B1、UBA1、ACTN1、HSPA8、FCGR1、ALB 等 53 个蛋白(表 2)。

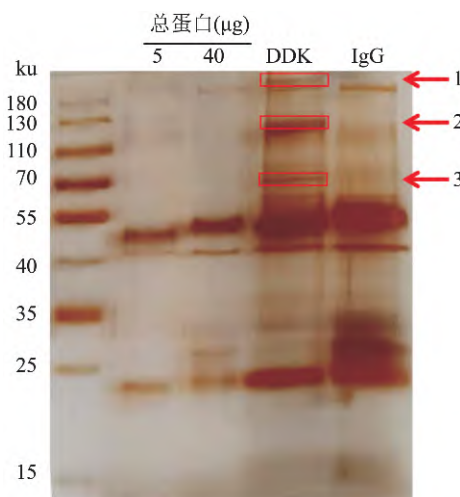


图 2 PAGE 凝胶银染

1、2、3: 差异表达蛋白条带编码

表 2 每个条带中的部分蛋白质

条带编码	蛋白编号	蛋白名称	得分
1	Q8VDD5	MYH9	239.58
	P01863	IGHG	81.27
	P60710	ACTB	53.95
2	P08113	HSP90B1	28.78
	Q02053	UBA1	14.49
	A1BN54	ACTN1	3.98
3	Q504P4	HSPA8	28.75
	P26151	FCGR1	24.76
	P07724	ALB	20.96

2.3 质谱结果与已知靶蛋白的关联分析 为了获取已知的迁移相关蛋白质,该实验在 GeneCards 数据库中输入关键词“Macrophage migration”,得到包含 12 878 个基因的 Excel 表格,选取“Protein Coding”基因 11 483 个,将质谱获得的蛋白列表(53 个)与已知巨噬细胞迁移相关蛋白列表(11 483 个)输入网页 <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/> 获得 CO-DEPs 41 个,包括 ACTN1、MYH9、ACTB 等。见图 3。

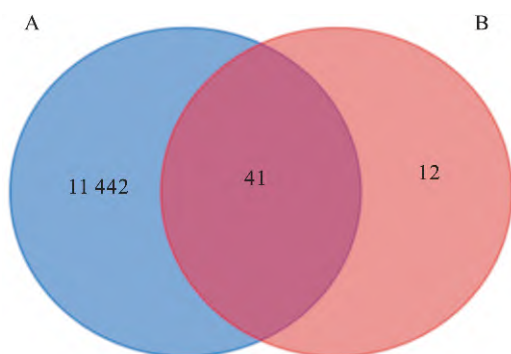


图3 质谱结果与已知靶点基因韦恩图

A: GeneCards 数据库中获得的已知靶点蛋白质; B: 质谱检测出的与 TMOD1 存在相互作用的蛋白质

2.4 CO-DEPs 的亚细胞定位 蛋白质被合成后即参与细胞代谢、信号转导,其在细胞中的定位能表明其细胞功能。为了明确 CO-DEPs 的亚细胞定位,该研究先在 NCBI 获取 CO-DEPs 蛋白质序列,将蛋白序列上传至 WoLF PSORT 预测 CO-DEPs 的亚细胞定位,结果显示,CO-DEPs 主要分布于细胞质(50.00%)、细胞核(30.96%)、线粒体(9.52%)。见图4。

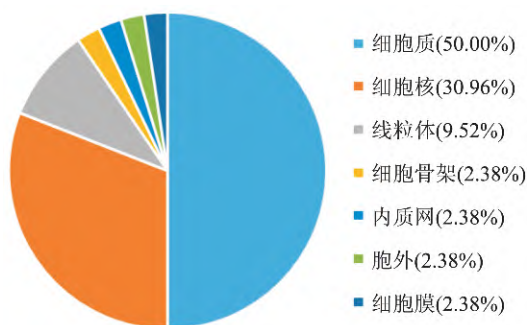


图4 差异表达蛋白质的亚细胞定位

2.5 CO-DEPs 的 KOG 注释 为了了解 CO-DEPs 可能参与的代谢途径与功能,该研究利用 EggNOG 数据库对 CO-DEPs 进行 KOG 注释,发现 41 个 CO-DEPs 共被分为 14 个分类,位于前 3 位的分别是 O: 翻译后修饰、Z: 细胞骨架、J: 翻译; 其中,参与翻译后修饰、细胞骨架组成、翻译的蛋白质数量分别为 8、7、6 个。见图5。

2.6 CO-DEPs 的 GO 富集分析 为了进一步明确 CO-DEPs 的生物功能,该研究进行了 GO 分析,结果显示,CO-DEPs 的细胞组成富集到外泌体、黏着斑等 42 个功能簇,分子功能富集到结构分子活性 poly (A) RNA 结合、蛋白质结合等 22 个功能簇,生物过

程富集到蛋白折叠、视网膜稳态等 36 个功能簇。其中,多种黏着斑相关蛋白与巨噬细胞迁移相关,该研究富集到的黏着斑相关蛋白质包括 HSPA9、HSPA8、ANXA1、JUP、ACTN1、DOCK7、RDX、HSPB1、ACTB、HSP90B1、RAB10、MYH9、LCP1。见图6。

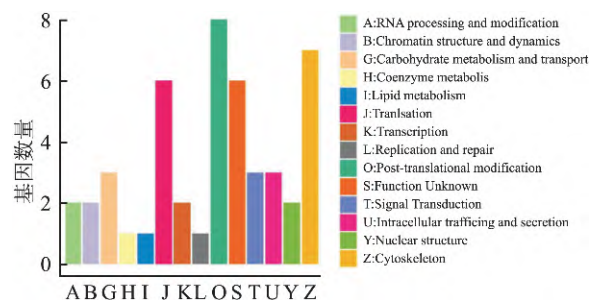


图5 CO-DEPs 的 KOG 注释

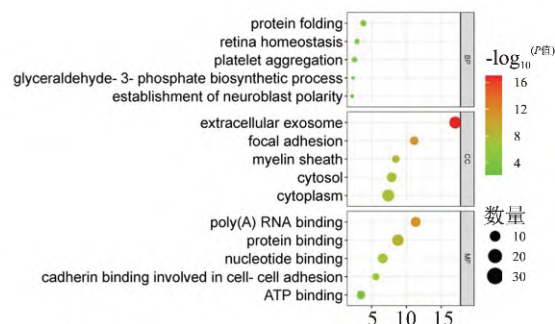


图6 CO-DEPs 的 GO 富集分析

2.7 CO-DEPs 的 KEGG 通路分析 为了明确 CO-DEPs 参与的代谢通路,该研究进行 KEGG 通路分析,结果显示,CO-DEPs 共能富集到 4 条通路,分别是富集到 ARVC、紧密连接、碳代谢信号通路以及催产素信号通路,但是其 $P < 0.05$ 为 ARVC 与紧密连接通路。参与 ARVC 通路的蛋白质为 DSP、JUP、ACTB,参与紧密连接通路的蛋白质为 ACTN1、MYH9、ACTB。见图7。

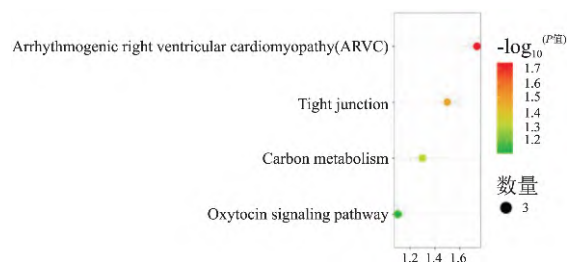


图7 CO-DEPs 的 KEGG 通路分析

2.8 CO-DEPs 的 PPI 分析 为了建立可视化的蛋白互作关系,该研究将 CO-DEPs 蛋白输入到 String 数据库,建立了 35 个节点的 120 条蛋白互作关系,其中 DOCK7、MORN1、KRT78、CEP162、MTHFD1、HIST1H1E 6 个蛋白质不与其他蛋白存在互作关系;将 PPI 文件导出后用 Cytoscape 软件绘制 PPI 蛋白网络互作图,红色代表最大蛋白交互作用,颜色依次递减为绿色,蛋白交互作用也随之降低。见图 8。

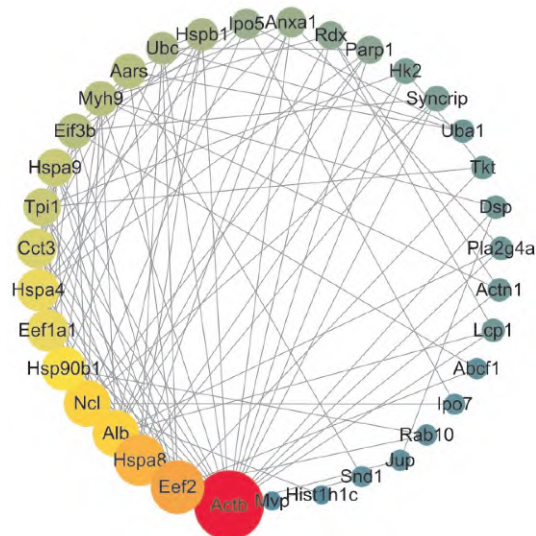


图 8 CO-DEPs 的 PPI 蛋白网络互作分析

3 讨论

巨噬细胞迁移能力的改变促进了疾病的进展,故探明影响巨噬细胞迁移的机制意义重大。近年来,蛋白质组学利用信息技术将复杂的蛋白质关系可视化,为科学研究提供了新思路。如 Li et al^[8] 分别提取了 THP-1 细胞、Raw264.7 细胞在不同表型下 (M0、M1、M2) 的蛋白质表达谱,通过对 5 000 多种蛋白质进行定量分析,结果显示,参与 THP-1、Raw264.7 细胞极化的蛋白质差异有统计学意义,但 CMPK2、RSAD2、DDX58 等 43 个蛋白质共同参与了 THP-1、Raw264.7 细胞 M1 型极化。这提示该研究生物信息学分析或能成为探索巨噬细胞迁移能力变化机制的重要方法。

TMOD1 是一种维持 F-actin 稳态的细胞骨架分子,在横纹肌中能够阻止 F-actin 过度伸长,而在非肌肉细胞中能够维持 F-actin-肌球蛋白间作用的稳定性使其不被解聚而非拉长^[9]。该课题通过免疫共沉淀技术获取了 Raw264.7 细胞中与 TMOD1 存在直接或间接相互作用的蛋白质,在进行 SDS-

PAGE 电泳后使用银染试剂盒对凝胶进行染色,选取有差异的蛋白条带进行质谱分析,共发现了 Raw264.7 巨噬细胞中存在 53 个与 TMOD1 有相互作用的蛋白质。另外,该研究还通过 GeneCards 数据库检索与巨噬细胞迁移相关的已知蛋白质共 11 483 个。经 Bioinformatics & Systems Biology 网站分析后共发现 41 个 CO-DEPs,这提示 TMOD1 可能直接/间接调控巨噬细胞迁移。

蛋白质在细胞中的具体分布又称亚细胞定位,了解蛋白质的亚细胞定位能够为进一步研究蛋白质功能奠定基础。TMOD1 的亚细胞定位主要在细胞骨架、细胞质、细胞核等处,41 个 CO-DEPs 主要位于细胞的细胞质 (50.00%)、细胞核 (30.96%)、线粒体 (9.52%),两者均有细胞质、细胞核的定位。KOG 注释能够以已知蛋白序列为基础对未知的蛋白序列进行功能注释,还能够推导特定的代谢途径是否存在。在该研究中,41 个 CO-DEPs 的 KOG 注释共被分为 14 个分类,位于前 3 位的分别是 O: 翻译后修饰、Z: 细胞骨架、J: 翻译,这提示 TMOD1 可能参与多种生物学功能。对 CO-DEPs 再进行 GO 富集分析,结果显示,分子功能富集到细胞间黏附、poly(A) RNA 结合等 22 个功能簇,生物过程富集到蛋白折叠、视网膜稳态等 36 个功能簇,细胞组成富集到外泌体、黏着斑等 42 个功能簇,其中细胞外泌体能够调节癌细胞的迁移,而黏着斑、细胞间黏附等与多种细胞迁移相关。进行 KEGG 分析显示可富集到 ARVC、紧密连接,其中,ARVC 患者容易伴发心肌梗死,心肌梗死后巨噬细胞数量的增多与心律失常发生关系密切^[10];而紧密连接相关蛋白 ZO 能够通过维持组织的流动性、抑制细胞增殖来保证细胞的迁移^[11]。CO-DEPs 中参与紧密连接通路且与黏着斑相关的蛋白质有 MYH9、ACTN1、ACTB。MYH9 突变能够损害巨核细胞的趋化性进而影响向血管的迁移^[12],沉默 ACTN1 表达能够使口腔鳞癌细胞增殖与迁移^[13],而编码序列介导的 β -actin、 γ -actin 翻译差异在细胞迁移中起着关键作用^[14];另外,在 PPI 蛋白网络互作分析中,ACTB 具有最大的蛋白互作关系,MYH9、ACTN1 也与多种蛋白质具有相互作用,故该研究认为 MYH9、ACTN1、ACTB 可作为进一步研究巨噬细胞迁移机制的重要因子。

TMOD1 可能是调节巨噬细胞迁移的重要因子,而与其存在相互作用的蛋白质可能成为研究巨噬细胞迁移相关疾病的新靶点,有利于巨噬细胞迁移机制的进一步研究。

参考文献

- [1] Zerbinatti C V, Gore R W. Uptake of modified low-density lipoproteins alters actin distribution and locomotor forces in macrophages [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003, 284(2): C555–61.
- [2] Liu X M, Xia X, Wang X X F, et al. Tropomodulin1 expression increases upon maturation in dendritic cells and promotes their maturation and immune functions [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 587441.
- [3] Lu F J, Cui D D, Mu B, et al. Downregulation of TMOD1 promotes cell motility and cell proliferation in cervical cancer cells [J]. *Oncolet*, 2020, 19(4): 3339–48.
- [4] Li P F, Hao Z F, Wu J Y, et al. Comparative proteomic analysis of polarized human THP-1 and mouse RAW264.7 macrophages [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 700009.
- [5] Kumari R, Jiu Y, Carman P J, et al. Tropomodulins control the balance between protrusive and contractile structures by stabilizing actin-propomyosin filaments [J]. *Curr Biol*, 2020, 30(5): 767–78.
- [6] De J N M, Wang L G, Herren A W, et al. Atherosclerosis exacerbates arrhythmia following myocardial infarction: role of myocardial inflammation [J]. *Heart Rhythm*, 2015, 12(1): 169–78.
- [7] Skamrah M, Pang H T, Ferle M, et al. Tight junction ZO proteins maintain tissue fluidity, ensuring efficient collective cell migration [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2021, 8(19): e2100478.
- [8] Pal K, Nowak R, Billington N, et al. Megakaryocyte migration defects due to nonmuscle myosin IIA mutations underlie thrombocytopenia in MYH9-related disease [J]. *Blood*, 2020, 135(21): 1887–98.
- [9] Xie G F, Zhao L D, Chen Q, et al. High ACTN1 is associated with poor prognosis, and ACTN1 silencing suppresses cell proliferation and metastasis in oral squamous cell carcinoma [J]. *Drug Des Dev Ther*, 2020, 14: 1717–27.
- [10] Vedula P, Kurosaka S, MacTaggart B, et al. Different translation dynamics of β - and γ -actin regulates cell migration [J]. *Elife*, 2021, 10: e68712.

The analysis of TMOD1 interacting proteins associated with macrophage migration

Jiang Siyu^{1,2}, Ma Shan^{1,2}, Yuan Bo¹, Xie Lide¹, Yao Weijuan², Guo Lina³

(¹Dept of Basic Medical School, Chengde Medical University, Chengde 067000;

²Dept of Basic Medical School, Physiology and Pathophysiology, Hemorheology Center,

Peking University, Beijing 100083; ³Dept of Rehabilitation, Cao County People's Hospital, Heze 274400)

Abstract Objective To analyze interacting proteins of tropomodulin1 (TMOD1) in Raw264.7 mouse monocyte macrophage line by mass spectrometry and GeneCards database. **Methods** Immunoprecipitation combined with mass spectrometry was used to find interacting proteins of TMOD1 after overexpress TMOD1 in Raw264.7 cells. GeneCards database was used to search for known genes for macrophage migration. Bioinformatics & Systems Biology was used to analyze correlation between known targets and mass spectrometry proteins to find common differentially expressed proteins (CO-DEPs). WoLF PSORT was used to predict subcellular localization of CO-DEPs. EggNOG database was used to analyze eukaryotic orthologous group (KOG) of CO-DEPs. DAVID database was used to analyze gene ontology (GO) enrichment Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway of CO-DEPs. String database was used to analyze protein interaction network and CytoScape software drawing. **Results** There were 41 CO-DEPs in mass spectrometry and GeneCards database. Subcellular localization of CO-DEPs was mainly distributed in cytoplasm, nucleus and mitochondria. KOG notes were mainly O: post-translational modification, Z: cytoskeleton and J: translation. GO enrichment found that CO-DEPs was mainly involved in poly (A) RNA binding, protein folding and focal adhesion. KEGG was mainly enriched in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) and tight junction. ACTB was a protein with large protein interaction. **Conclusion** The proteins interacting with TMOD1 in macrophages mainly include myosin heavy chain-9 (MYH9), α -actinin 1 (ACTN1) and β -actin (ACTB), etc, suggesting that TMOD1 is related to macrophages migrate.

Key words macrophages; TMOD1; interaction; mass spectrometry; GeneCards database