

人骨髓间质干细胞诱导成骨分化过程中差异表达蛋白的质谱鉴定及生物信息学分析

张爱霞^{1,2}, 余伟华², 王涛¹

摘要 目的 比较人骨髓间质干细胞(hMSCs)诱导成骨分化过程中的蛋白质组差异,寻找hMSCs成骨分化相关蛋白质。方法 体外培养hMSCs并诱导成骨分化,收集hMSCs和成骨诱导分化3 d的细胞的全蛋白,应用双向凝胶电泳(2-DE)分离和图像分析软件进行蛋白质点的识别和检测,通过比较蛋白质组学技术找出凝胶上差异2.0倍以上的蛋白质点,应用基质辅助激光解析离子化飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)和生物信息学方法对差异蛋白点进行蛋白质的鉴定和分析。结果 hMSCs在体外成功诱导成骨分化,通过2-DE分离、MALDI-TOF-MS分析和生物信息学方法鉴定出了38种差异蛋白,其中22种蛋白质在成骨诱导3 d后表达明显上调,16种蛋白质在成骨诱导3 d后表达明显下调。利用Gene Ontology对所鉴定的蛋白质按分子功能和生物学途径进行分析显示,参与体内代谢、发育过程、催化反应和酶调节活性的蛋白质分别占29%、32%、44%、16%。结论 蛋白质组学较好地显示了hMSCs诱导成骨分化过程中的蛋白质表达差异,这为进一步阐明hMSCs成骨分化的分子机制提供了新的思路。

关键词 骨髓间质干细胞;蛋白质组学;成骨分化;质谱鉴定;生物信息学

中图分类号 329.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)12-1722-05

间质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)分化为成骨细胞,是由于特异基因表达的时、空、量模式的改变,揭示其中的关系,对于研究MSCs的定向分化、骨发生机制和骨相关疾病的治疗都具有重要意义。尽管目前对MSCs的成骨分化机制进行了大量研究,但大多以单基因或少基因、单通路或少通路研究为主。MSCs的成骨分化的确切机制尚未阐明。蛋白质组学的诞生,为快速、有效、整体地分析成骨特定蛋白的表达及功能提供了有力的工具。该研究利用体外定向诱导人骨髓间质干细胞(human bone

marrow mesenchymal stem cells, hMSCs)分化为成骨细胞的模型和蛋白质组学技术,研究hMSCs分化为成骨细胞过程中成骨相关蛋白的变化,对于阐明MSCs分化为成骨细胞的分子机制具有重要意义,也将为临床上治疗骨质疏松、难治性骨损伤等奠定初步的实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料 hMSCs来自中山大学中山医学院干细胞与组织工程中心。L-DMEM培养基、H-DMEM培养基均购自美国GIBCO BRL公司;胎牛血清(FCS)、胰蛋白酶均购自美国Hyclone公司;维生素C、地塞米松、碘乙酰胺、硫脲、二硫苏糖醇(DTT)均购自美国Sigma公司;β-甘油磷酸钠购自德国Calbiochem公司;尿素、Tris碱、3-[3-(胆酰胺基丙基)二甲氨基]丙磺酸盐、十二烷基磺酸钠、过硫酸铵、IPG干胶条(pH=3~10)、IPG buffer、蛋白质纯化试剂盒、蛋白质定量试剂盒均购自瑞典Amersham Biosciences公司。IX71-22FL/PH倒置显微镜(日本OLYMPUS公司);2406-2自控式CO₂恒温培养箱(美国SHEL LAB公司);NU-301-630E超净工作台(美国NUARIE公司);DU530型核酸/蛋白分析仪(美国Beckman公司);Ettan IPGphor II等电聚焦电泳系统、Ettan DALTsix垂直电泳系统、Typhoon 9400扫描仪和图像分析软件ImageMaster™ 2-D Platinum software 5.0、全自动斑点处理工作站、基质辅助激光解析离子飞行时间质谱分析仪(瑞典Amersham Biosciences公司)。

1.2 方法

1.2.1 hMSCs的体外培养及成骨诱导 取实验室培养至第4代的hMSCs,用L-DMEM完全培养液培养,并逐日观察细胞的生长情况,待细胞基本融合,用胰酶消化,按1:3比例进行传代、扩增培养。将传代扩增后至第5代的hMSCs接种于六孔板,实验组每孔加入成骨细胞诱导液(含10⁻⁷ mol/L地塞米松,10 mmol/L β-甘油磷酸钠,50 μg/ml维生素C)2 ml;对照组每孔加入L-DMEM完全培养液,置培养箱中,隔天换液1次,每日镜下观察细胞形态的变化

2014-06-27 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81000681、81000177)

作者单位:¹嘉应学院生命科学学院,梅州 514015

²中山大学中山医学院干细胞与组织工程中心,广州 510080

作者简介:张爱霞,女,博士,讲师,责任作者,E-mail: rosaleo2008@aliyun.com

和生长的情况。

1.2.2 体外定向诱导 hMSCs 分化为成骨细胞的染色鉴定 碱性磷酸酶染色: 取成骨细胞诱导分化第 10 天的细胞, 用吸管吸去诱导液, PBS 洗涤 3 次, 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗涤 3 次, 然后加入适量碱性磷酸酶染色液在室温下孵育 10~20 min, 显微镜下观察染色的结果。茜素红-S 染色: 取诱导分化 18 d 的细胞, 吸去成骨细胞诱导液, 用 PBS 洗涤 3 次, 然后加入适量的茜素红-S 染液染 10~15 min, 用吸管吸去多余的染液, 用 PBS 洗涤 3 次, 显微镜下观察结果。

1.2.3 蛋白样品的制备和双向凝胶电泳(2-DE)

加入裂解液裂解 hMSCs 及诱导成骨分化 3 d 的细胞, 冰上放置 10~15 min, 超声波处理, 15 000 r/min, 4 °C 离心 30 min, 取上清液。按蛋白质纯化试剂盒说明书方法纯化蛋白后, 使用 2-D Quant Kit, 按照说明书方法, 对蛋白浓度进行定量。

将蛋白样品进行 2-DE 第一向等电聚焦电泳参数设置为: 30 V、12 h; 500 V、1 h; 1 000 V、1 h; 8 000 V 至 80 000 Vh 收胶。IEF 结束后, 在平衡缓冲液中平衡胶条, 平衡 25 min。将胶条转移至 12.5% 浓度的 SDS-PAGE 胶面上进行第二向电泳, 参数设置为: 2 W/gel、12 W, 40 min 后改为 17 W/gel、100 W; 直至胶内电泳指示剂溴酚蓝跑出凝胶下缘 10 min。对凝胶按 Deep Purple 说明书方法进行荧光染色。为了避免实验操作误差本实验每组重复 3 次。

1.2.4 凝胶扫描和图像分析 用 Typhoon 9400 扫描仪对荧光染色的凝胶进行扫描, 扫描的波长为 532 nm。利用 ImageMaster™ 2-D Platinum software 5.0 图像分析软件进行 2-DE 图像分析, 通过背景消减、斑点检测等, 建立 hMSCs 和诱导成骨分化 3 d 的凝胶图像, 选择其中的一张图谱作为标准凝胶图像, 其他的图谱与之进行比较, 选取 ratio ≥ 2.0 的差异表达候选蛋白, 建立切点目录, 进行质谱鉴定和生物信息学分析。

1.2.5 质谱鉴定和生物信息学分析 将切点目录输入全自动斑点处理工作站, 该仪器能对差异蛋白斑点自动进行切割、脱色、干燥、酶解、加入基质和质谱靶点样等一系列操作。将点好的质谱靶放入 Etan MALDI-TOF Pro 质谱仪, 激光源为 337 nm 波长的氮气激光器, 离子源加速电压为 20 kV, 离子延迟提取 200 ns, 质谱信号单次扫描累加 200 次, 正离子谱鉴定。质谱质量范围: MS, 700~3 000, 胰蛋白酶自切峰(842.509, 2 211.104) 作内标, 获得样品的肽

质量指纹图谱。

质谱数据的分析使用 Profound 软件检索, 以 MASCOT 为搜索引擎在人的 NCBI nr 和 Swiss-prot 数据库中进行搜索, 数据库检索参数如下: 固定修饰为半胱氨酸甲基化修饰; 可变修饰为蛋氨酸氧化修饰; 单同位素峰; 电荷数为 1+; 每个肽最大允许 1 个不完全裂解位点; 质量容忍度为 100 ppm。

2 结果

2.1 hMSC 成骨诱导分化过程中的形态变化及成骨诱导分化的鉴定 hMSCs 从加入成骨诱导液后的第 2 天开始, 即可见部分细胞由长梭形逐渐变为立方形, 并进而转变为多角形, 体积增大, 见图 1A。随着培养时间的延长, 这种多角形细胞逐渐增多, 培养至 8 d 时, 几乎所有的细胞转变为多角形细胞, 见图 1B。细胞持续增殖, 开始呈多层重叠生长, 细胞之间界限模糊, 细胞逐渐聚集形成多个散在的岛状细胞结构, 此岛状细胞结构逐渐被分泌的基质所包埋, 约 12 d 出现钙结节, 见图 1C。对照组加入 L-DMEM 完全培养液, 细胞增殖良好, 形态不变, 为长梭形, 见个别宽大、扁平的细胞, 随着培养时间延长, 呈克隆生长, 细胞融合, 但不见致密的岛状细胞结构和钙化结节, 见图 1D。

用 BCIP/NBT 染色液检测 hMSCs 向成骨细胞分化过程中碱性磷酸酶的表达情况。在诱导培养的第 10 天, 做碱性磷酸酶染色, 实验组可观察碱性磷酸酶反应为强阳性, 细胞密集区出现紫黑色颗粒, 胞质内有紫黑色的颗粒沉淀; 对照组染色阴性或弱阳性反应, 见图 1E。在成骨细胞诱导培养 2 周后用茜素红-S 检测钙沉积的情况, 实验组镜下可见散在大量橘红色的钙结节, 为茜素红-S 与钙盐形成的橘红色的复合物, 见图 1F, 对照组结果为阴性。

2.2 蛋白 2-DE 及 MALDI-TOF-MS 分析 ImageMaster™ 2-D Platinum software 5.0 软件分析结果显示 3 张 hMSCs 和 3 张诱导成骨分化 3 d 的 2-DE 图谱蛋白质斑点匹配率均达 75% 以上, 胶的重复性好, 分子量主要集中在 20~80 ku, 等电点(isoelectric point, pI) 主要分布在 pH 4.0~8.0, 见图 2。筛选 ratio ≥ 2.0 的差异表达候选蛋白, 经过胶内酶切和多肽提取后, 进行质谱鉴定, 获得肽质量指纹图谱。

2.3 生物信息学分析 通过数据库搜索, 共鉴定出 38 种蛋白质, 其中 22 种蛋白质在成骨诱导 3 d 后表达明显上调, 16 种蛋白质在成骨诱导 3 d 后表达明

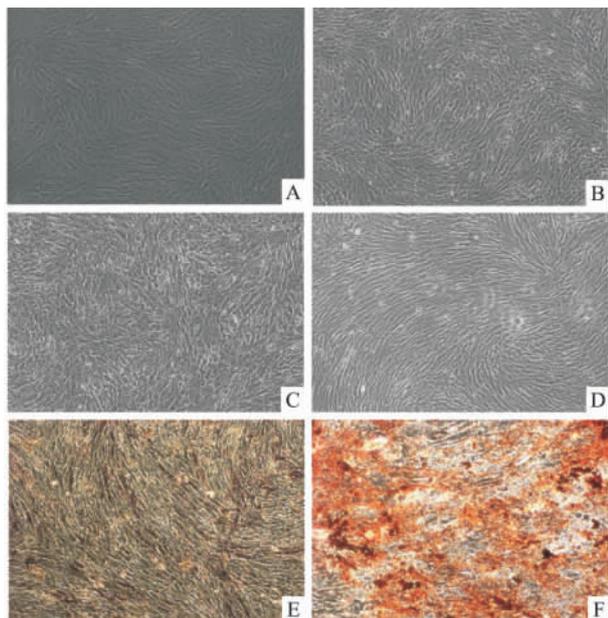


图1 hMSCs的体外成骨分化的细胞形态学变化及成骨分化的鉴定 ×40

A: 成骨诱导 3 d; B: 成骨诱导 8 d; C: 成骨诱导 12 d; D: 成骨诱导 8 d 的阴性对照; E: 碱性磷酸酶染色; F: 茜素红-S 检测钙沉积

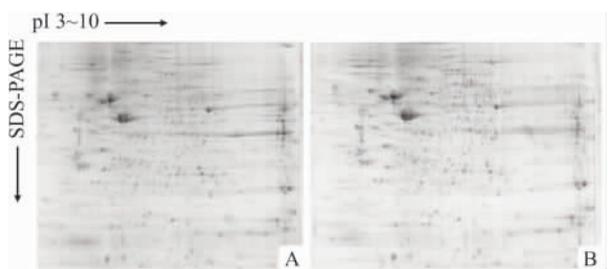


图2 hMSCs和诱导成骨分化 3 d 的 2-DE 图

A: hMSCs 的 2-DE 图; B: 诱导成骨分化 3 d 的 2-DE 图

显著下调。表 1 列出了这些蛋白质的相关信息,从左到右依次是数据库登入号、蛋白质名称和表达情况:上调/下调(↑/↓)。

按照 Gene Ontology 的分类方式对所有鉴定的蛋白质进行分析,结果如图 3 所示,生物学过程分类中参与体内代谢和发育过程的蛋白质分别占 29% 和 32%,分子功能分类中参与催化反应和酶调节活性的蛋白质分别占 44% 和 16%。

3 讨论

成骨诱导分化是一个复杂的过程,传统方法如:免疫组化、免疫印迹法和流式细胞仪间接免疫荧光技术等只能检测一种或几种蛋白质的表达,信息量有限,不能从整体水平反映 hMSCs 成骨诱导分化过程中蛋白质的作用机制^[1-2]。蛋白质组研究相关技

表 1 38 种差异蛋白的鉴定结果和表达情况

数据库登入号	蛋白质名称	上调/下调
gi 1310882	亲环素 B	↓
gi 12653427	辅酶细胞色素 C 还原酶核心蛋白 2	↑
gi 485388	真核起始因子 4AII	↑
Q5X8J8	过氧化氢-过氧化物酶 2	↑
gi 62088766	CD68 变体	↑
gi 14717805	谷胱甘肽过氧化物酶	↑
gi 13785574	整合素 β4 结合蛋白	↑
gi 11414808	血管扩张刺激磷蛋白	↓
gi 48145555	CCT7 蛋白	↓
gi 56203249	EFHD2 蛋白	↑
gi 62896585	腺苷酸环化酶相关蛋白	↓
gi 17529991	氧类固醇结合蛋白样蛋白 7	↓
gi 338827	游离甲状腺激素结合蛋白	↓
gi 10636566	成视网膜细胞瘤结合蛋白 9	↑
gi 5822091	组织蛋白酶 D	↓
gi 34811306	谷胱甘肽硫转移酶 pi	↑
gi 17389815	磷酸甘油醛异构酶 1	↑
gi 40889569	尿卟啉原脱羧酶	↑
gi 31417921	TKT 蛋白	↓
gi 135053	尿嘧啶 DNA 糖苷酶	↓
gi 155957792	泛素羧基端酯酶 L3	↑
Q13451	FK506 结合蛋白 5	↑
gi 49456371	过氧化还原酶 4	↓
gi 33346925	丙酮酸激酶	↓
gi 49456447	磷酸甘油酸变位酶 1	↓
gi 1168056	鸟氨酸转氨酶	↑
gi 1633300	醛还原酶	↑
gi 4502101	膜联蛋白 I	↓
gi 155958718	高迁移率族蛋白 1	↓
gi 156966699	膜联蛋白 A2	↑
gi 809190	膜联蛋白 V	↑
gi 32455248	磷酸肌醇 3-激酶调节亚单位 1	↑
gi 151470969	细胞周期调控因子 10 相似蛋白	↑
gi 14323193	免疫球蛋白重链可变区蛋白	↑
gi 151459017	似红血球膜相关蛋白质抗原 332 蛋白	↑
gi 16877874	磷酸丙糖异构酶 1	↓
gi 188586	肌球蛋白轻链 2	↓
gi 141351323	ZNF483 蛋白	↑

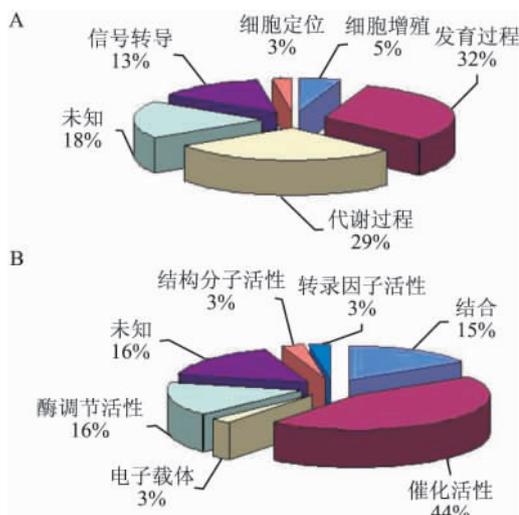


图3 所鉴定蛋白质的 Gene Ontology 分析
A: 生物学过程分类; B: 分子功能分类

术的发展,第一次在蛋白质组规模上对蛋白质改变进行全面的研究,蛋白质组学是从整体的角度分析在一定阶段或某一生理条件下组织细胞内动态变化的蛋白质组成成分、表达水平与修饰状态,了解蛋白质之间的相互作用和联系,揭示蛋白质功能与细胞生命活动规律^[3]。蛋白质组学提供了从动态、整体的角度,在蛋白质水平上探讨成骨诱导分化机理的有效手段。本研究应用蛋白质组学技术,共鉴定出38种蛋白质,其中32种蛋白质在文献^[4]中有报道。

在本研究中,鉴定了一些与成骨相关的蛋白质,如FK506结合蛋白5,其在蛋白水平的表达上调,FK506结合蛋白5是大分子量结合FK506的亲免疫素的一种,大分子量FK506结合亲免疫素具有多种作用方式及功能^[5-7]。研究^[8-9]显示,FK506结合蛋白5与类固醇激素有相互作用,类固醇激素在成骨过程中有重要作用。FK506结合蛋白5的上调表达有可能通过类固醇激素而激活相应信号通路,从而促进hMSCs成骨诱导分化。磷酸肌醇3-激酶调节亚单位1在本实验中上调表达,研究^[10-11]表明,磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase,PI3-K)信号传导通路在成骨分化中具有重要作用,PI3-K信号传导通路能调节成骨相关转录因子Runx2和骨形态发生蛋白2的表达,从而促进成骨分化。

此研究鉴定的蛋白质,许多在成骨分化中的作用在以前的文献中未见报道,如EFHD2蛋白、成视网膜细胞瘤结合蛋白9等,可能在成骨分化中起着重要的调节作用,这还需进行进一步的实验研究。

本研究通过高分辨率的双向电泳技术、MALDI-TOF-MS分析和生物信息学分析,成功地得到了hMSCs成骨诱导3d的差异表达蛋白,获得了大量的关于hMSCs诱导成骨分化的新信息,为进一步研究hMSCs成骨相关机制提供了新的依据。

参考文献

[1] Xu C, Zheng Z, Fang L, et al. Phosphatidylserine enhances os-

teogenic differentiation in human mesenchymal stem cells via ERK-signal pathways[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2013, 33(3): 1783-8.

- [2] Schulze J, Albers J, Baranowsky A, et al. Osteolytic prostate cancer cells induce the expression of specific cytokines in bone-forming osteoblasts through a Stat3/5-dependent mechanism [J]. *Bone*, 2010, 46(2): 524-33.
- [3] Noordin R, Othman N. Proteomics technology-a powerful tool for the biomedical scientists[J]. *Malays J Med Sci*, 2013, 20(2): 1-2.
- [4] Zhang A X, Yu W H, Ma B F, et al. Proteomic identification of differently expressed proteins responsible for osteoblast differentiation from human mesenchymal stem cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2007, 304(1-2): 167-79.
- [5] Patterson C E, Gao J, Rooney A P, et al. Genomic organization of mouse and human 65 ku FK506-binding protein genes and evolution of the FKBP multigene family [J]. *Genomics*, 2002, 79(6): 881-9.
- [6] Hubler T R, Denny W B, Valentine D L, et al. The FK506-binding immunophilin FKBP51 is transcriptionally regulated by progesterin and attenuates progesterin responsiveness [J]. *Endocrinology*, 2003, 144(6): 2380-7.
- [7] Soontornniyomkij V, Everall I P, Moore D J, et al. Increased cortical expression of FK506 binding protein-51 in HIV-associated neurocognitive disorders [J]. *J Neurovirol*, 2012, 18(4): 313-22.
- [8] Jääskeläinen T, Makkonen H, Palvimo J J. Steroid up-regulation of FKBP51 and its role in hormone signaling [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2011, 11(4): 326-31.
- [9] Wang W, Liu L, Dang X, et al. The effect of core decompression on local expression of BMP-2, PPAR- γ and bone regeneration in the steroid-induced femoral head osteonecrosis [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2012, 13: 142.
- [10] Kundu A K, Khatiwala C B, Putnam A J. Extracellular matrix remodeling, integrin expression, and downstream signaling pathways influence the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on poly(lactide-co-glycolide) substrates [J]. *Tissue Eng Part A*, 2009, 15(2): 273-83.
- [11] Liu J, Chen L, Tao X, et al. Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling is essential for prostaglandin E₂-induced osteogenic differentiation of rat tendon stem cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 435(4): 514-9.

Identification and analysis of differential expressed proteins in osteoblast differentiation from human bone marrow mesenchymal stem cells by mass spectra and bioinformatics

Zhang Aixia^{1,2}, Yu Weihua², Wang Tao¹

(¹College of Life Sciences, Jiaying University, Meizhou 514015; ²Center for Stem Cell and Tissue Engineering, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080)

Abstract Objective To compare the proteomics discrepancies between human bone marrow mesenchymal stem

提高激素性股骨头坏死兔模型动物存活率的实验研究

李超 尚希福 李旭 付代杰

摘要 目的 应用内毒素脂多糖(LPS)联合甲基强的松龙(MPS)建立兔股骨头坏死模型,探讨提高兔存活率的方法。方法 将64只新西兰大白兔随机等分为4组:模型组(A组)、庆大霉素组(B组)、庆大霉素+泮托拉唑组(C组)和对照组(D组),每组各16只。A组、B组和C组兔建立股骨头坏死模型:单次经耳缘静脉注射LPS(10 μg/kg);24 h后于臀肌注射MPS(20 mg/kg),共3次,注射间隔24 h。D组臀肌注射同等剂量的生理盐水作为对照。B组和C组于最后一次注射MPS后连续7 d以 4×10^4 U/d臀肌注射庆大霉素注射液,C组同时连续7 d以40 mg/d臀肌注射泮托拉唑注射液。结果 造模期间A组、B组和C组分别有8只、5只和2只动物死亡,A、B组动物死亡原因主要为呕吐、腹泻、消化道出血等,C组动物死亡原因不明。4组动物的死亡数量差异有统计学意义($P < 0.05$);最后一次注射MPS 6周后,3组动物存活率分别为50.0%、68.6%、87.5%。实验期间D组未出现动物死亡。A组、B组和C组存活下来的动物经组

织病理学观察均显示造模成功。结论 在建立兔激素性股骨头坏死模型期间的同时,应用庆大霉素预防感染和泮托拉唑护胃,可以显著提高实验动物的存活率。

关键词 激素性股骨头坏死;动物模型;内毒素脂多糖;甲基强的松龙;庆大霉素;泮托拉唑

中图分类号 R 681.8

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)12-1726-04

兔是最常用的激素性股骨头坏死(steroid-induced osteonecrosis of the femoral head, SONFH)动物模型^[1-5],主要是由于其发病机制和病理改变与人类相似程度较高,同时具有良好的可重复性,因此在科研中应用广泛。现阶段,在SONFH造模过程中主要有两大障碍:较低的造模成功率和较高的动物死亡率。激素联合免疫方法,如内毒素脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)^[3-4]、异体血清^[5]等,能显著提高动物模型的骨坏死率;造模期间动物死因主要是激素严重的副作用,如免疫抑制会诱发感染、降低胃黏膜抵抗力会诱发消化性溃疡等,故针对激素副作用的一些预防措施是必要的。该研究拟在SONFH造模的同时预防性应用抗生素(庆大霉素)和抑酸剂

2014-08-27 接收

基金项目:安徽省教育厅自然科学基金(编号: KJ2013A160)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院骨科,合肥 230001

作者简介:李超,男,硕士研究生;

尚希福,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-

mail: shangxifu@163.com

cells (hMSCs) and its differentiation along osteoblasts to find the important functional protein candidates and elucidate the molecular mechanism in the process of differentiation into osteoblasts. **Methods** hMSCs were cultured and induced into osteoblast *in vitro*. The total protein extracts were obtained with cell lysis buffer from undifferentiated hMSCs and osteogenic induced hMSCs on day 3. Using proteomic approaches based on two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) and 2-DE gel analysis software, differently expressed protein spots that had an altered abundance ratio of greater than 2.0 fold were selected after being recognized and tested. The selected different protein spots were identified and analyzed by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and bioinformatics. **Results** hMSCs were induced into osteoblast *in vitro* successfully. The total protein extracts were separated effectively with 2-DE. By MALDI-TOF-MS analysis and database searching, 38 proteins were identified including 22 up-regulated, 16 down-regulated in osteogenic induced hMSC for 3 days relative to undifferentiated hMSCs. The identified proteins that participated metabolism, development process, catalytic reaction and enzyme regulation respectively possessed 29%, 32%, 44% and 16% according to molecular function and biological process by Gene Ontology analysis. **Conclusion** Proteomic analysis can identify the proteins with variance of osteogenic differentiation of hMSCs, meantime, provide a comprehensive reference to understand molecular mechanism of osteogenic differentiation.

Key words hMSCs; osteogenic differentiation; proteomics; mass spectra identification; bioinformatics