

蛋白质组技术在鼠胚胎早期发育研究中的应用^{*}

潘卫^{**} 王应雄 黎刚

(重庆医科大学计划生育系遗传优生教研室 重庆 400016)

摘要 人类基因组大规模测序,揭示基因组精细结构的同时,还显示出基因数量的有限性和结构的相对稳定。随分析仪器和生物技术的飞速发展,创立了与基因组相对应的蛋白质组学,将精力集中于从生命功能的执行体——蛋白质水平研究基因的表达及功能。生殖技术的研究已取得了惊人的进展,但人们对生殖尤其是人类生殖的分子机制了解仍很贫乏。鼠胚胎发育过程蛋白质组的研究,为了解人类生殖健康和疾病发生的机制提供了有意义的资料。

关键词 蛋白质组学 胚胎 发育 二维电泳 质谱

近十年来,生殖技术的研究,如体外受精(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)、动物克隆及胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)工程等方面取得了惊人的进展,但人们对生殖尤其是人类生殖的分子机制了解仍很贫乏。生育异常,如胚泡不着床、流产、不育等,并非均由遗传变异引起,多是由于蛋白质的表达、定位发生了差错,许多分子水平的变化为关键蛋白质的翻译后修饰。因此,利用蛋白质组学可从蛋白质分子水平了解生育的健康状况和生育异常的发生机制。由于在研究人类胚胎发育时某些材料不易获得,鼠胚胎发育过程的研究为了解人类生殖健康和疾病发生的机制提供了有意义的资料。

1 蛋白质组和蛋白质组学

蛋白质组(proteome)的概念最先由 Wilkins^[1]提出,指由一个基因组,或一个细胞、组织表达所有的蛋白质。蛋白质组的概念与基因组的概念有许多差别,它随着组织、甚至环境的发展变化而改变。在转录时,一个基因可以多种 mRNA 形式剪接,并且,同一蛋白可能以许多形式进行翻译后的修饰^[2]。故一个蛋白质组不是一个基因组的直接产物,蛋白质组中蛋白质的数目可以超过基因组存在的数目^[3]。基因组基本上是固定不变的,而蛋白质

组是动态的,一种生物只有一种基因组,却有不同的功能蛋白质组。

蛋白质组学(proteomics)是研究蛋白质组的一个新领域,主要研究蛋白质的特性,包括蛋白质表达水平、氨基酸序列、翻译后加工和蛋白质的相互作用,在蛋白质水平上了解细胞的各项功能、各种生理生化过程及疾病的病理过程等^[4]。蛋白质组学集中于动态描述基因调节,对基因表达的蛋白质水平进行定量测定,鉴定疾病、药效对生命过程的影响,以及解释基因表达调控的机制^[5]。

2 蛋白质组研究的核心技术

目前蛋白质组技术主要以二维电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)为核心,结合质谱(mass spectrometry, MS)技术对蛋白进行分离、分析及鉴定。

2-DE 是一种方便、灵敏的蛋白质分离方法,其原理简明^[6]。第一相进行等电聚焦(isoelectric focusing, IEF),根据蛋白质的不同等电点分离蛋白质;第二相进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis),沿第一相垂直的方向,根据蛋白质的不同分子量进一步分离等电点相同的蛋白质。电泳后的染色方法主要有考马斯亮蓝染色、银染和荧光染色等。

电泳图谱用软件进行图象分析后,将蛋白质斑点块切下,用蛋白酶(常用胰蛋白酶)对蛋白质样品进行胶内酶解,获得肽片段利用 MS 分析肽片段,得到肽指纹图谱^[7]。利用生物信息学将质谱分析

收稿日期: 2003-01-24

^{*} 国家自然科学基金项目(30270510)资助

^{**} 电子信箱: pw_6602@sina.com

结果与蛋白质数据库中的氨基酸序列进行比较,如果数据库中有被研究蛋白质的氨基酸序列,可进一步结合已有资料进行分析,如果蛋白质数据库中没有被研究蛋白质的氨基酸序列,或者其序列不全,则用 Edman 降解法测定其全部氨基酸序列,并将氨基酸序列输入数据库。质谱分析还可以测定蛋白质修饰位点、基因突变位点和缺失位点。

3 早期胚胎发育过程中的蛋白质组研究

3.1 蛋白质组技术在胚泡植入前研究的应用

从受精卵正常发育到胚泡形成及脱透明带,是着床的先决条件,目前对这一过程发生的分子机制仍不明确。

20 世纪 90 年代初, Latham 等^[8]用高分辨率的 2-DE 定量分析鼠胚发育的 1-cell 期和 2-cell 期,发现分别有 60% 和 85% 的蛋白质合成率至少发生 2 倍以上的变化,尤其在 1-cell 晚期和 2-cell 中期,在第一次卵裂 15h 后蛋白质的合成模式完成了广泛的重建(remodeling),一旦这一过程完成,蛋白质的合成在 2-cell 晚期和 4-cell 期极少发生变化,并分析了少数几组与广泛重建有关的具有协同作用的蛋白质。2-cell 期,有 1/3 的蛋白质平均增加 5 倍,另有 1/3 的蛋白质平均减少 7 倍,10% 蛋白质发生短暂的变化。Latham 等^[9]进一步构建了鼠胚不同发育时期的蛋白质数据库,更详细地提供了鼠胚胎发生过程中蛋白质合成变化的特点,有助于哺乳动物胚胎发生的研究。

为了洞察促进早期胚胎发生的分子机制, Latham 等^[10]将鼠胚 8-cell 期的核移植到去核的 1-cell 期后,用 2-DE 定量分析了蛋白质合成所发生的变化。发现 8[→]1-cell 核移植的胚细胞至少有 50 种蛋白质合成发生变化,其中 4 种蛋白质合成明显增高,46 种蛋白质合成降低。降低的 46 种蛋白质分为两类,一类(set KL201)含有 27 种蛋白质,它们在正常的 2-cell 和 8-cell 期的合成也减少,另一类(set KL202)含有 19 种蛋白质,它们在 8-cell 期的合成率接近或超过 2-cell 期。在 8[→]1-cell 核移植的胚细胞合成率明显高于对照组的 4 种蛋白质(set KL203),在整个正常发育的 2-cell 期合成较低。这些结果显示了伴随着形态学和细胞学的重要生化改变,提示 8-cell 期的核不能完全重新演示(recapitulate)发生在正常 2-cell 期的蛋白质合成模式的变化过程。

Sasaki 等^[11]用微量电泳后银染技术分析鼠卵母细胞和围着床期胚胎蛋白质表达的变化,建立了鼠胚胎发育不同时期的蛋白质图谱。1-D 微量电泳分析单个卵母细胞和 2-cell 期胚,发现较高分子量范围(大约 70~290kD)的蛋白质带存在于未受精的卵母细胞,而在 2-cell 期明显减少或消失。2-D 微量电泳分析 20 个卵母细胞、不同时期的胚(embryos)和积云细胞(cumulus cell),结果显示,积云细胞蛋白质模式完全不同于未受精的卵母细胞和不同时期的胚;未受精的卵母细胞蛋白质点的数目明显多于受精后各个时期的胚,结合 1-D 微量电泳结果,表明受精引起来自母体基因表达的蛋白质减少或消失。银染密度分析,蛋白质含量较多的 8 个点(major spots)在胚的发育过程中几乎不变,认为是基本的结构蛋白质或功能蛋白质,它们也存在于未受精的卵母细胞,不存在于积云细胞;另外一些微量点(minor spots)在胚泡的分布与从 1-cell 到桑葚胚期的完全不同。分析了其中的 32 个微量点,它们在 1-cell 到桑葚胚期各期均存在明显的差异,提示围着床期发展过程中蛋白质表达模式发生改变,并按其密度在各期变化的趋势分为 3 组,其中 50% 增加,19% 减少,其余 31% 呈可变性。为了阐明单个胚之间是否存在差异,分析了 1 个和 5 个 1-cell embryos,一些 major spots 和 minor spots 在 1 个和 5 个 1-cell embryos 均易测到,并且它们的相对银染密度没有差别,更多的 minor spots 出现在 5 个 1-cell embryos,由此可扩大微电泳的检测限。桑葚胚 2-D 微量电泳后 GLUT1(glucose transporter 1)的免疫印迹模式显示,有两组 pI 峰在 6.6、6.4 的蛋白质,每组均含有一些或较多的寡聚物。

3.2 蛋白质组技术在胚泡植入研究的应用

胚泡植入是哺乳动物生殖过程中的重要步骤之一,是决定妊娠成功与否的关键。着床涉及胚胎与母体子宫间及其复杂而精细的多因素协同作用,至今对其机制仍不清楚。目前已发现胚泡植入前后子宫内膜及循环中某些蛋白质的表达发生改变,并与植入的成败有一定的相关性。例如, *LIF* (leukemia inhibitory factor) 基因缺陷型的同种纯合体雄鼠未发现生育力低下的现象,而雌鼠却完全不孕^[12]。从 *LIF* 基因缺损同种纯合体的雌鼠体内取出未着床的胚胎,移植到正常的鼠子宫内,便可以着床并维持妊娠^[13]。而从正常鼠中取出胚胎在有 *LIF* 存在的条件下培养后,将胚胎移入 *LIF* 基因缺

损的雌鼠体内, 胚泡不能着床, 妊娠不能维持; 但如在交配后向腹腔内持续注射 *LIF*, 即使在 *LIF* 基因缺损同种纯合体内, 胚泡也可发生着床, 并维持妊娠^[12]。实验证明, *LIF* 的缺损通过子宫发生异常来影响胚胎的着床。对流产小鼠的研究证明, 妊娠期子宫内膜T淋巴细胞以Th2细胞为优势, 而流产的子宫内膜局部Th1细胞明显增加^[14]。人子宫内膜的研究也证明妊娠成立后Th2细胞占优势, 围着床期的内膜中Th1细胞因子减少, Th2细胞因子增加^[15]。流产子宫内膜增加的中性粒细胞由于抗原的刺激及TNF- α (tumor necrosis factor α) 的作用, 可分泌Th1细胞因子IFN γ (interferon γ)^[16]。此外, 还有多种蛋白质也发现与胚泡的着床有关, 如层粘连结合蛋白LN^[17]、基质金属蛋白酶MMPs^[18]、巨噬细胞集落刺激因子M-CSF^[19]等。这些实验为人类了解胚泡着床的机制提供了有用的资料, 但它们都仅限于研究单个蛋白质对胚泡着床的影响, 不能解释胚泡植入的整个复杂过程。蛋白质组技术的应用, 将使人类从蛋白质的整体水平了解胚泡植入的分子机制。

3.3 蛋白质组技术在胚泡植入后研究的应用

胚泡植入后, 胚层的正常形成和分化是胎儿形成的第一步。为了解胚胎不同区域蛋白质合成的差异, Latham等^[20]用2-DE定量分析了鼠胚胎内胚层、中胚层、外胚层蛋白质合成的模式。对于6.5 dpc (days postcoitum) 的胚胎, 比较分析了胚外区和胚区之间、内胚层和外胚层之间的蛋白质合成模式。7.5 dpc 的胚胎, 比较分析了胚外区和胚区之间以及分离的内胚层、中胚层和外胚层之间的蛋白质合成模式。为了评价可能存在沿轴前后区域基因表达的差异, 并将7.5 dpc 分离的胚层又分为前后片段, 结果显示, 内胚层和外胚层之间蛋白质合成的模式有极显著差异, 提示早在6.5 dpc 这两种组织基因的表达模式就明显不同; 同时发现外胚层和整个胚胎区域之间、内胚层和整个胚外区之间的蛋白质合成模式有极大的相似性, 这很可能反映了胚胎区和胚外区的整个细胞组成, 并鉴定了内胚层和外胚层均极喜爱合成的四组蛋白质群; 另外一种蛋白质, 据其电泳迁移位置认为是波形蛋白质, 在中胚层有高的合成率; 还分析了细胞骨架组成 α -微管蛋白、原肌球蛋白5在胚层之间合成有差异; 内胚层的前后区域之间的整个蛋白质合成模式有极显著差异。这些结果提供了三个原始胚层的蛋白

质合成模式, 表明蛋白质组技术可用于分析鉴定不同胚层的有效标志物, 是不同胚层分化研究的重要手段。

4 展望

由于受到取材的限制, 尽管对鼠早期胚胎发育过程中的蛋白质组进行了上述研究, 但人们对整个胚胎发育的过程的系统了解仍需要充实。随着新的先进的一系列蛋白质组取材、分离、分析等技术的到来, 结合生物信息学的迅猛发展, 对与早期胚胎发育有关的蛋白质性质进行进一步测定, 特别是鉴定一些与受精后核重建有关的卵细胞质中的因子, 以及在蛋白质水平鉴定胚胎组织和ES细胞之间的不同, 将具有十分重要的意义。研究人类胚胎发育时某些材料不易获得, 上述研究为人类生殖健康和疾病发生的机制提供了新的思路 and 手段。

参考文献

- [1] Wilkins M. Government backs proteome proposal, Nature, 1995, 378 (6538): 653
- [2] Humphrey Smith I, Cordwell SJ, Blackstock WP. Proteom research: complementarity and limitation with respect to the RNA and DNA works, Electrophoresis, 1997, 18: 1217~ 1242
- [3] Wilcin MR, Sanchez JC, Williams KL. Progress with Proteome projects: why all proteins expressed by a geome should be identified and how to do it, Biotechnology and genetic engineering reviews, 1995, 13: 19~ 45
- [4] Blackstock WP, Weri WP. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular protrins[J]. Trends Biotechnol, 1999, 17(3): 121
- [5] Anderson NI, Anderson NG. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words, Electrophoresis, 1998, 19: 1853~ 1861
- [6] Chambers G, Lawrie L, Cash P, et al. A new approach to the study of disease[J]. J. Path, 2000, 192: 280
- [7] Gevaert K, Vandekerckhove J. Protein identification methods in proteomics[J]. Electrophoresis, 2000, 21: 1145
- [8] Latham KE, Garrels JI, Chang C, et al. Quantitative analysis of protein in mouse embryos. I. Extensive reprogramming at the one cell and two cell stages. Development. 1991 Aug, 112(4): 921~ 32
- [9] Latham KE, Garrels JI, Chang C, et al. Analysis of embryonic mouse development: construction of high resolution, two dimensional gel protein database. Applied and Theoretical Eletrphoresis, 1992, 2: 163~ 170
- [10] Latham KE, Garrels JI, Solter D. Alteration in protein synthesis following transplantation of mouse 8-cell stage nucleated F-cell embryos, Developmental Biology, 1994, 163, 341~ 350

- [11] Sasaki R, Nakayama T, Kato T. Microelectrophoretic analysis of changes in protein expression patterns in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Biol Reprod*, 1999, 60: 1410~ 1418
- [12] Stewart C L, Kaspaar P, Brunet L J, et al. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor. *Nature*, 1992, 359(6390): 76~ 79
- [13] Huang T Y, En Y, Irwin J C. Cytokine mediated regulation of 92 kildalon type IV collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) and TIMP-3 messenger ribnucleic acid expression in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998, 83: 1721~ 1729
- [14] Clark D A, Chaouat G, Arck P C, et al. Cytokine dependent abortion in CBA \times DBA/2 mice is mediated by the procoagulant Fg 12 prothombinase. *J Immunol*. 1998, 160: 545~ 549
- [15] Lim K J, Odukoya O A, Ajjan R A. Profile of cytokine mRNA expression in per implantation human endometrium. *Mol Hum Reprod*, 1998, 4: 77~ 81
- [16] Yeaman G R, Collins J E, Currie J K, et al. IFN- γ is produced by polymorphonuclear neutrophils in human uterine endometrium and by cultured peripheral blood polymorphonuclear neutrophils. *J Immunol*, 1998, 160: 5145~ 5153
- [17] Zhang C, Duan E, Cao Y, et al. Effect of 32/27 kD laminin binding protein antibody on mouse embryo implantation. *J Reprod Fertil*, 2000, 119: 137~ 142
- [18] Lala P K, Graham C H. Mechanisms of trophoblast invasiveness and their control: the role of proteases and inhibitors. *Cancer Metastasis Rev*, 1990, 9(4): 369~ 379
- [19] Holmes P V, Racho et Akouni R R, Svalander PC. The antibody-neutralisation of PDGF, CSF 1, TGF β 2, 3, EGF and EGF receptor in utero in pre implantation mice. *Ups J Med Sci*, 1997, 102(1): 41~ 48
- [20] Latham KE, Beddington RS, Solter D, et al. Quantitative analysis of protein in mouse embryos. II: Differentiation of endoderm, mesoderm, and ectoderm. *Mol. Reprod. Dev*, 1993 Jun, 35(2): 140 ~ 150

Study on the Proteome of Embryo of Early Stage in Mice

Pan Wei Wang Yingxiong Li Gang

(Department of Reproductive Medical Science Chong Qing 400016)

Abstract With the human genome project fulfilling, it is revealed that human being just possess limited genes and a stable genome. The developments of biotechnology promote the establishment of the proteome which focus on the level of protein expression and function . Recent developments in certain areas of reproductive technology have been remarkable and advances are continuing at a considerable rate. However , our understanding of the molecular basis of most aspects of reproduction, particularly in the human , is still extremely poor. Study on the proteome of embryo in mice will contribute largely to the knowledge of mechanism during health and disease of reproduction.

Key words Proteome Embryo Development Two dimensional electrophoresis Mass spectrometry