

急性脊髓损伤模型大鼠蛋白质组学研究：iTRAQ技术的验证

白晶晶¹, 王 翀¹, 丁俐文¹, 宋兴华¹, 陈江涛¹, 周义军², 徐磊磊¹(¹新疆医科大学第一附属医院, 新疆医科大学研究生院, 新疆医科大学, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054; ²湖南省常德市第一人民医院, 湖南省常德市 415900)

文章亮点:

- 1 实验对急性脊髓损伤模型大鼠脑脊液进行研究, 了解脑脊液中差异蛋白的动态变化。
- 2 应用同位素标记相对和绝对定量技术, 在一次实验中可进行 8 个样品的蛋白质组定量分析, 该定量方法几乎可以对任何蛋白样品进行定量分析, 具有定量敏感、反应速度快; 标记完全, 标记效率高, 重复性高, 并能简化谱的复杂程度、提高离子强度; 可对不同样本同时进行定量分析。
- 3 找出相应的敏感蛋白, 可为急性脊髓损伤疾病机制的分析及治疗提供有效、快捷的方法。

关键词:

实验动物; 组织工程; 急性脊髓损伤; 脑脊液; 神经再生; 蛋白质组学研究; 组织工程; iTRAQ

主题词:

脊髓损伤; 脑脊液; 蛋白质组学; 同位素标记

基金资助:

国家自然科学基金(81160218/H0605), 课题名称: 不同时间点鞘内注射甲基强的松龙治疗大鼠急性脊髓损伤的蛋白质组学实验研究

缩略语:

同位素标记相对和绝对定量: Isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ

摘要

背景: 同位素标记相对和绝对定量(Isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)质谱分析技术依据串联质谱中信号离子表达质荷比峰值的不同来研究相关对应蛋白质的信息。

目的: 建立急性脊髓损伤大鼠模型, 观察其脑脊液差异蛋白谱, 从微观分子水平研究急性脊髓损伤后继发性损伤的机制及有效治疗方法。

方法: 建立 SD 大鼠急性脊髓损伤模型, 取脑脊液应用 iTRAQ 技术鉴定 SD 大鼠急性脊髓损伤后脑脊液的差异蛋白质。

结果与结论: 共鉴定蛋白数 722 个, 差异表达蛋白 107 个: 下调的差异蛋白有 63 个, 上调的差异蛋白数是 44 个。其中相关神经再生的差异蛋白 19 个: 上调 14 个, 下调 5 个; 调节神经再生的差异蛋白 7 个。实验中检测到的多种差异蛋白及表达明显的神经再生因子可能作为急性脊髓损伤的生物标记物或可能作为临床管理监测急性脊髓损伤的损伤进程、靶向治疗及评估疗效的强有力证据。

白晶晶, 王翀, 丁俐文, 宋兴华, 陈江涛, 周义军, 徐磊磊. 急性脊髓损伤模型大鼠蛋白质组学研究: iTRAQ 技术的验证[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(49):7891-7896.

The study of proteomics in acute spinal cord injury rats by iTRAQ technology

Bai Jing-jing¹, Wang Chong¹, Ding Li-wen¹, Song Xing-hua¹, Chen Jiang-tao¹, Zhou Yi-jun², Xu Lei-lei¹
(¹The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Postgraduate College of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; ²The First People's Hospital of Changde, Changde 415900, Hunan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) mass spectrometry technology studies the information of relevant protein according to the ion signal shows different mass-to-charge ratio in the tandem mass spectrometry analysis.

OBJECTIVE: To establish the protein spectrum of differential proteins in cerebrospinal fluid of acute spinal cord injury rat model, study the secondary injury mechanism and find an effective method of treating acute spinal cord injury from molecular level.

METHODS: Acute spinal cord injury was produced in Sprague-Dawley rats and iTRAQ technology was applied to analyze the differential proteins in cerebrospinal fluid of acute spinal cord injury rat model.

RESULTS AND CONCLUSION: Total 722 proteins have been identified in this study, including 107 differentially expressed proteins, 63 downregulated proteins and 44 upregulated proteins. There were 19 proteins related to neurogenesis, including 14 up-regulation proteins and 5 down-regulation proteins. Seven proteins contributed to the regulation of neurogenesis. The differential proteins and growth factor identified in this study can be taken as the biomarkers of acute spinal cord injury or indicators of clinical monitoring of the progression, target treatment

白晶晶, 男, 汉族, 新疆医科大学在读硕士, 主要从事脊柱、骨肿瘤、软组织肿瘤及骨病的研究。

通讯作者: 宋兴华, 博士, 博士生导师, 新疆医科大学第一附属医院, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.49.004
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344
(2014)49-07891-06

稿件接受: 2014-08-30

Bai Jing-jing, Studying for master's degree, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Postgraduate College of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Corresponding author: Song Xing-hua, M.D., Doctoral supervisor, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Postgraduate College of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Accepted: 2014-08-30

and efficacy assessment after acute spinal cord injury.

Subject headings: spinal cord injuries; cerebrospinal fluid; proteomics; isotope labeling

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81160218/H0605

Bai JJ, Wang C, Ding LW, Song XH, Chen JT, Zhou YJ, Xu LL. The study of proteomics in acute spinal cord injury rats by iTRAQ technology. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(49):7891-7896.

0 引言 Introduction

急性脊髓损伤是一种严重的神经系统创伤, 随着交通事故的增加和体育运动极限化, 急性脊髓损伤病例逐年增多, 脊柱骨折合并脊髓损伤已成为骨科领域中常见的疾患。据估计, 全球现有约200万脊髓损伤患者, 每年新发生近13万例, 且大多数患者是青年人, 急性脊髓损伤后并发症较多, 患者后期残疾发生率较高, 因此给患者自身及家庭、社会均带来较沉重的负担。从病理方面可将急性脊髓损伤分为原发性损伤和继发性损伤, 前者指外力直接或间接作用于脊髓所造成的机械性损伤, 导致损伤处细胞快速死亡, 为不可逆改变; 后者为脊髓损伤后发生的一系列生化改变所致的细胞死亡, 具有可逆性^[1-6]。

本实验从微观分子水平来探索SD大鼠急性脊髓损伤后0 h和8 h的脑脊液中差异蛋白的表达情况。神经再生因子是神经元生长所必须的蛋白质, 可维持感觉和交感神经的生存, 促进神经细胞的生长和分化。实验寻找急性脊髓损伤后的脑脊液中差异表达的神经再生因子, 为急性脊髓损伤的继发性损伤机制和有效治疗方法奠定基础。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 2012年6月在新疆医科大学第一附属医院动物实验中心完成。

材料: 选2个月龄SD雄性大鼠8只, 体质量0.25-0.35 kg (平均0.3 kg)。由新疆医科大学第一附属医院动物实验中心提供, 许可证编号SCXK(新)2011-0004。动物实验方法通过动物伦理学认证(伦理审批号20120220005)。

实验方法:

动物实验分组及模型建立: 将8只2月龄SD雄性大鼠随机分为2组: 脊髓损伤0 h组和脊髓损伤后8 h组, 每组4只。依照Allen's 等方法(取后正中切口, 切除T₉棘突、部分T₁₀棘突及椎板, 充分暴露硬膜, 用质量0.01 kg 铁锤自2.5 cm高处自由落下, 能量2.5 cm×0.01 kg, 直径0.25 cm撞击硬膜囊)建立大鼠急性脊髓损伤动物模型。

样品制备: 建立脊髓损伤模型, 分别于损伤后0, 8 h收集脑脊液。SD大鼠腹腔麻醉后, 去除寰枢椎表面皮肤及肌肉, 充分显露寰枕韧带, 用生理盐水清洁寰枕韧带。于寰枕韧带涂少量指甲油避免脑脊液被污染, 干燥3-5 min后, 用1 mL注射器在寰枕韧带抽取脑脊液100-150 μL, 收集于EP管。视觉检查脑脊液均无血液污染。用液氮速冻后, 放入深低温冰箱(-80 °C)保存。

样本检测:

从样品中提取蛋白: 称适量的样品加入500 μL蛋白裂解液溶解后, 分别添加终浓度为1 mmol/L PMSF、2 mmol/L EDTA, 5 min后, 添加终浓度10 mmol/L DTT; 超声15 min后, 离心20 min, 取上清; 上清液在56 °C条件下加入终浓度10 mmol/L DTT处理1 h, 还原打开二硫键; 加入终质量浓度55 mmol/L IAM暗室静置45 min, 进行半胱氨酸的烷基化封闭; 加入适量冷丙酮, 在-20 °C静置2 h; 再次离心20 min, 丢弃上清液; 沉淀在200 μL 0.5 mol/L TEAB中超声溶解15 min; 最后离心20 min后取上清液用于定量。

蛋白质浓度测量(Bradford定量): 准备BSA标准品的标准曲线, 9管的标准品量(0.2 g/L BSA)依次为: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 μL, 向每管添加纯水, 使最终体积为20 μL。管1是不含蛋白的参照, 其他管分别含有0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2, 2.4, 3.2, 4 μg蛋白。向每管添加180 μL protein assay reagent, 混合, 室温培养10 min后; 用酶标仪测量595 nm下的λ, 以管1作参照物, 记录各样品的吸收率。

SDS电泳: 配置12%的SDS聚丙烯酰胺凝胶。每个样品分别与2×loading buffer混合, 95 °C加热5 min。每个样品上样量为30 μg, 标记上样量10 μg。120 V恒压电泳120 min。电泳结束后, 考染液染色2 h, 再用脱色液脱色3-5次, 30 min/次。

蛋白质酶解: 每个样品精确取出100 μg蛋白后; 按蛋白: 酶=20: 1的比例加入Trypsin, 37 °C酶解4 h后; 按上述比例再补加Trypsin一次, 37 °C继续酶解8 h。

同位素标记相对和绝对定量(Isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)标记: 胰蛋白酶消化后, 用真空离心泵抽干肽段; 再用0.5 mol/L TEAB复溶肽段, 按照手册进行iTRAQ标记后; 每一组肽段被不同的iTRAQ标签标记, 室温培养2 h; 再将标记后的各组肽段混合, 用SCX柱进行液相分离。

SCX分离: 采用岛津LC-20AB液相系统、分离柱为4.6×250 mm型号的Ultremex SCX柱对样品进行液相分离。将标记后抽干的混合肽段用4 mL buffer A(25 mmol/L NaH₂PO₄ in 25% ACN, pH 2.7)复溶。进柱后以1 mL/min的速率进行梯度洗脱: 先用buffer A洗脱10 min, 接着逐渐混入5%-35% buffer B(25 mmol/L NaH₂PO₄, 1 mol/L KCl in 25% ACN, pH 2.7)洗脱11 min, 最后逐渐混入35%-80% buffer B洗脱1 min。整个洗脱过程在214 nm吸光度下进行监测, 经过筛选得到20个组分。每个组分分别用StrataX除盐柱除盐, 然后冷冻抽干。

表 1 SD 大鼠急性脊髓损伤后脑脊液蛋白同位素标记相对和绝对定量标记结果

Table 1 Information of cerebrospinal fluid proteins of Sprague-Dawley rats after acute spinal cord injury

类型	CSF-H-0_113-VS-CSF-H-8_116
上调蛋白数量	44
下调蛋白数量	63
总差异蛋白数量	107

表注: 当蛋白丰度差异倍数达到 1.2 倍以上, 且经统计检验其 $P < 0.05$ 时, 视为差异蛋白。

基于Triple TOF 5600的LC-ESI-MS/MS分析: 与质谱仪相结合的液相系统为nanoACQuity(Waters), 包括Symmetry C18柱(规格5 μm , 180 $\mu\text{m} \times 20 \text{ mm}$)和BEH130 C18柱8/32(规格1.7 μm , 100 $\mu\text{m} \times 100 \text{ mm}$)两部分。Symmetry C18柱用于肽段吸附和除盐, BEH130 C18柱用于分离。

主要观察指标: ①iTRAQ标记大鼠急性脊髓损伤后脑脊液差异蛋白质结果。②相关神经再生的差异蛋白表达。

数据分析及处理: 经检测得到的原始质谱数据与“IPI 大鼠蛋白数据库”比对找出蛋白序列号, 然后通过Mascot蛋白质鉴定软件找出具体的蛋白。IPI大鼠蛋白数据库是由EBI(欧洲生物信息研究所, 全称 EMBL-European Bioinformatics Institute)负责维护的蛋白数据库之一。Mascot是一个蛋白质鉴定软件, 曾被Frost/Sullivan研究机构评为生物质谱软件的黄金标准。该项目中使用的软件版本为Mascot2.3.02。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验选用SD大鼠共8只, 随机分为2组, 实验过程无脱失, 均已进入结果分析。

2.2 iTRAQ标记结果 用iTRAQ技术对SD大鼠急性脊髓损伤后所提取8 h组和0 h组脑脊液进行蛋白质组学研究共鉴定出差异蛋白107个。其中上调蛋白数量为44个, 下调蛋白数量为63个; 其中相关神经再生的差异蛋白19个: 上调14个, 下调5个; 调节神经再生的差异蛋白7个(见表1, 图1)。

2.3 相关神经再生的差异蛋白表达 找出相关神经再生的差异蛋白19个, 其中上调的14个为: Cofilin-1, Apolipoprotein A-I, Clusterin, Adenylate kinase isoenzyme 1, LOC100361457 Actin cytoplasmic 2, Prothrombin (Fragment), Isoform Somatic of Angiotensin-converting enzyme, Gsn Uncharacterized protein, PpiaLOC100360977 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A, Apolipoprotein D, Vimentin, Apolipoprotein A-IV, Isoform 1 of Glial fibrillary acidic protein, LOC681544 histidine-rich glycoprotein-like; 下调的5个为: Cadherin-2, Neurosecretory protein VGF, Sema7a Uncharacterized protein, Nov Protein NOV homolog, Neural cell adhesion molecule 1(见表2); 调节神经再生的

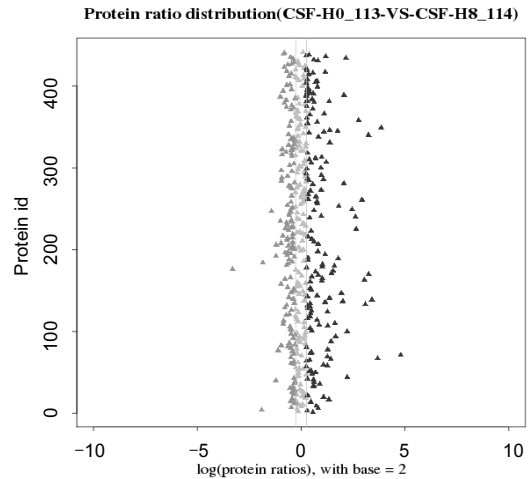


图 1 SD 大鼠急性脊髓损伤后脑脊液蛋白质丰度分布

Figure 1 Abundance distribution of cerebrospinal fluid proteins in Sprague-Dawley rats after acute spinal cord injury

图注: 图中显示可定量所有蛋白质的差异倍数的分布情况, 其中横坐标表示差异倍数经过以 2 为底数的对数转化后的值, 大于 0 的为表达量上调, 小于 0 的为表达量下调。其中差异倍数大于 1.2 的点用黑色和灰色标出(黑色为表达量上调, 灰色为表达量下调)。

差异蛋白7个: Sema7a Uncharacterized protein, Adenylate kinase isoenzyme 1, Cdh2 Cadherin-2, Gfap Isoform 1 of Glial fibrillary acidic protein, Vim Vimentin, Ace Isoform Somatic of Angiotensin-converting enzyme, F2 Prothrombin (Fragment)(见表3)。这些差异蛋白相对分子质量在22 654~170 224之间, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。

3 讨论 Discussion

iTRAQ技术是一种新的、功能强大蛋白绝对和相对定量研究的方法^[7-10], 是美国应用生物系统公司在2004年推出的一项新的同位素标记技术^[11], 为解决低丰度蛋白的定性、定量研究提供了有效的方法。iTRAQ技术可同时对4种或8种样品进行绝对和相对定量研究, 相对于传统蛋白质组学研究中运用的定性及定量方法, 其重复性好, 尤其适用于对低峰度蛋白质的研究, 并且能够通过同位素标记准确把握差异表达蛋白的动态变化。iTRAQ技术突出优点: ①样品要求量低。②敏感性、精确性强。③可观察蛋白的动态变化。

实验通过运用iTRAQ技术联合2D-LS-MS/MS蛋白质组学鉴定技术, 鉴定了脑脊液蛋白722个、差异蛋白107个; 下调的差异蛋白有63个, 上调的差异蛋白数是44个。其中相关神经再生的差异蛋白19个; 调节神经再生的差异蛋白7个。以下就几个典型差异表达的神经再生因子作相关描述。

凝聚素(Clusterin)即载脂蛋白J, 涉及广泛的生理和病理过程, 如精子成熟, 癌症的发展等^[12-14]; 在各组织中它以不同水平结构性表达^[15], 被认为是人类脑脊液的正常组成部分。正常和病态的中枢神经系统神经元和神经胶质细胞均可检测到凝聚素或mRNA^[16]。其作为伴侣蛋白, 除生

表 2 神经再生差异蛋白基本信息

Table 2 The basic information of neurogenesis differential proteins

检索号	蛋白质名称	Mass(u)	Cov(%)	Peptide	iTRAQ 比率(8 h/0 h)	Sig(*)
IPI00327144	Cfl1 Cofilin-1	26 658	43.4	5	1.991	有(*)
IPI00362131	Cdh2 cadherin-2	111 336	6.2	5	0.759	有(*)
IPI00197703	Apoa1 Apolipoprotein A-I	37 705	44.4	11	2.466	有(*)
IPI00198667	Clu Clusterin	60 792	21.7	7	2.068	有(*)
IPI00210351	Ak1 Adenylate kinase isoenzyme1	27 768	22.2	3	6.905	有(*)
IPI00324864	Vgf Neurosecretory protein VGF	72 454	24	10	0.817	有(*)
IPI00896224	Actg1 LOC100361457 Actin cytoplasmic2	48 192	48.8	13	1.967	有(*)
IPI00371101	Sema7a Uncharacterized protein	83 424	9.3	5	0.578	有(*)
IPI00215256	Nov Protein NOV homolog	47 152	9.7	2	0.665	有(*)
IPI00189981	F2 Prothrombin (Fragment)	81 527	17	9	1.255	有(*)
IPI00324300	Ace Isoform Somatic of Angiotensin-converting Enzyme	170 224	2	2	3.571	有(*)
IPI00476991	Ncam1 Neural celladhesion molecule1	113 650	23.9	14	0.772	有(*)
IPI00363974	Gsn Uncharacterized protein	99 579	24.8	13	1.256	有(*)
IPI00387771	LOC100362969 PpiaLOC100360977 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	22 654	43.3	6	1.494	有(*)
IPI00212005	Apod Apolipoprotein D	25 804	25.4	4	2.308	有(*)
IPI00230941	Vim Vimentin	60 754	30.3	13	1.426	有(*)
IPI00324272	Apoa4 Apolipoprotein A-IV	53 859	37.6	12	1.225	有(*)
IPI00190943	Gfap Isoform1 of Glial fibrillary acidic protein	56 372	17.9	7	1.313	有(*)
IPI00769165	LOC681544 histidine-rich glycoprotein-like	67 970	16.2	9	4.535	有(*)

表注: 众多差异蛋白中找出相关神经再生的差异蛋白 19 个, 其中上调的有 14 个, 下调的有 5 个。

表 3 调节神经再生差异蛋白基本信息

Table 3 The basic information of differential proteins that regulated neurogenesis

检索号	蛋白质名称	Mass(u)	Cov(%)	Peptide	iTRAQ 比率(8 h/0 h)	Sig(*)
IPI00371101	Sema7a Uncharacterized protein	83 424	9.3	5	0.578	有(*)
IPI00210351	Ak1 Adenylate kinase isoenzyme1	27 768	22.2	3	6.905	有(*)
IPI00362131	Cdh2 Cadherin-2	111 336	6.2	5	0.759	有(*)
IPI00190943	Gfap Isoform 1 of Glial fibrillary acidic protein	56 372	17.9	7	1.313	有(*)
IPI00230941	Vim Vimentin	60 754	30.3	13	1.426	有(*)
IPI00324300	Ace Isoform Somatic of Angiotensin-converting Enzyme	170 224	2	2	3.571	有(*)
IPI00189981	F2 Prothrombin (Fragment)	81 527	17	9	1.255	有(*)

表注: 差异蛋白中找出调节神经再生的差异蛋白 7 个, 其中上调的有 5 个, 下调的有 2 个。

理体液中含量较多外, 神经组织也有表达, 一些神经性的疾病凝聚素也会明显上调, 如肌萎缩性脊髓侧索硬化症等; 在运动神经元和星形胶质细胞, 凝聚素以细胞核、细胞质形式结构性的表达^[17]。凝聚素广泛表达于神经系统的神经元, 尤其在脊髓运动神经元和pontobulbar(脑桥延髓)神经元比较显著, 也存在于星形胶质细胞^[18-20]。

在中枢神经系统, 凝聚素在神经缺血性损害后可能发挥抗凋亡、促细胞存活及缺血后神经可塑性的作用^[21]; 而在神经退行性疾病中, 如阿尔茨海默症、亨廷顿疾病患者及急性和慢性实验性神经损伤的模型的脑组织中凝聚素信使mRNA起诱导作用^[22], 在阿尔茨海默病中, 凝聚素可能发挥促进作用, 隔离和 β -淀粉样蛋白的间隙作用^[23]。

研究发现凝聚素与载脂蛋白E受体2(ApoER2)和极低密度脂蛋白受体绑定, 通过细胞表达被内化成为受体之一。凝聚素可与受体绑定触发络丝蛋白类似物(Reelin-like)信号在细胞表达为衔接蛋白disabled-1(Dab1), 这样可使衔接蛋白Dab1磷酸化, 从而激活PI3K/Akt信号通路和

n-cofilin蛋白, 从而诱导络丝蛋白类似物(Reelin-like)信号级联; 在室管膜下区ApoER2、极低密度脂蛋白受体、Dab1、凝聚素可能参与维持体内神经发生^[24]。研究发现凝聚素在细胞程序化死亡(凋亡)和实验性组织损伤后, 凝聚素信息快速且大量的增加, 在反复抽搐、脊髓压迫的患者脑脊液中凝聚素浓度明显增高^[25-26]; 在一些神经性疾病中凝聚素也会升高, 如癫痫持续状态^[27]、多发硬化症^[28]、阿尔茨海默症^[29]; 最近报道多态性凝聚素作为阿尔茨海默氏症的高危因素。本实验中凝聚素明显上调与神经损伤再生有明显相关。作者认为脑脊液中凝聚素表达可能是神经细胞损伤后神经再生或死亡的一个标志。

载脂蛋白D可调节周围神经和局部中枢神经系统损伤, 如大脑皮质等, 且与衰老和某些神经系统疾病的进展有关。Navarro等^[30]认为目前载脂蛋白D已经在许多器官、组织和体液的人类和其他物种被发现, 肾上腺、肾脏、胰腺、脑和周围神经及脑脊液等; 在细胞水平上, 载脂蛋白D通常表达在成纤维细胞, 尤其是靠近血管的成纤维细胞。

人类周围神经系统, 在基本条件下载脂蛋白D合成和分泌成纤维细胞和许旺细胞, 而神经损伤后, 载脂蛋白D的mRNA和蛋白质表达水平显著提高, 从而来调节神经再生, 如坐骨神经损伤后, 载脂蛋白D的mRNA和蛋白表达水平远远多余其他载脂蛋白。另外, Thomas等^[31]认为载脂蛋白D升高与一些中枢神经系统疾病有关, 如阿尔茨海默病, 且载脂蛋白D被认为是一个脑部区域强有力特定的神经病理学标志; 它的升高可能与阿尔茨海默病患者的认知和行为观察下降有关, 进展性的认知能力下降是阿尔茨海默病临床特征的核心。本实验中载脂蛋白D的表达明显上调, 推测载脂蛋白D参与调节神经再生有重要的作用, 其具体机制有待进一步探索。

胶质原纤维酸性蛋白是中间丝状体(IF)体系第三类型的细胞支架蛋白; 报道显示胶质原纤维酸性蛋白拼接变体出现在中枢神经系统的星形胶质细胞和周围神经系统的许旺细胞; 大多数胶质原纤维酸性蛋白拼接变体在神经系统表达, 在静态和活性化的肝星状细胞也有发现。起初, 胶质原纤维酸性蛋白被作为一个特定的星形胶质细胞标记物, 最近研究胶质原纤维酸性蛋白也表达在其他细胞类型, 如肝星状细胞, 胰腺星状细胞和肾脏足细胞。研究表明, 大脑中存在一个以上胶质原纤维酸性蛋白的mRNA形式。6种不同的胶质原纤维酸性蛋白转录剪接变体, 即: 胶质原纤维酸性蛋白 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 κ , 它们区别在于5'翻译区(5'-UTR)或3'翻译区(3'-UTR)不同。目前其功能尚不明确, 但一些研究表明, 其分布或表达水平在不同大脑区域是有差异。胶质原纤维酸性蛋白 α 是在中枢神经系统主要的形式, 胶质原纤维酸性蛋白 β 是在周围神经系统最丰富的形式; 胶质原纤维酸性蛋白 δ 已证明只在大脑不同区域的星形胶质细胞亚种群表达, 即软膜下、颗粒下层和室管膜区域^[32]。Blechingberg等^[33]认为不同的剪接变体之间的比例及表达水平在大脑发育过程中是不断改变的。胶质原纤维酸性蛋白 δ 在室管膜下层区域的神经源性星形胶质细胞优先表达, 而胶质原纤维酸性蛋白 γ 在整个大脑中星形胶质细胞的一个亚群中被发现; 有报道胶质原纤维酸性蛋白亚型在人类癫痫症、阿尔茨海默病和神经胶质瘤患者的大脑实质表达; Kamphuis等^[34]首次做了全面研究胶质原纤维酸性蛋白在阿尔茨海默病野生型小鼠模型同种型表达。胶质原纤维酸性蛋白 δ 除存在于室管膜下层区域、RMS和SGZ神经源性星形胶质细胞, 也存在于神经性生理结构外。本实验中H-8组相比H-0组中的胶质原纤维酸性蛋白表达明显上调, 胶质原纤维酸性蛋白明显上调的确切机制尚未完全明确, 可能与神经再生、应激反应等有关。

Semaphorin 7(SEMA 7a)是一类重要的轴突诱导因子, 可通过促进轴突生长调节神经功能, 在调节黏附、增殖、迁移及形态变化、肿瘤生长转移、免疫反应及血管生成的过程中都具有特殊地位, 尤其在神经系统的发育过程中对神经元及胶质细胞发挥重要导作用。1992年, Kolodkin等发现了第

一个 Semaphorin 家族成员 -Sema21a(原称为原称为 Semaphorin I, 简称Sema.1)。目前发现Semaphorin家族成员至少含有20个, 可分8类, 前2类是无脊椎动物Semaphorin分子, 包括 Sema-1a, SEMA3等; 3-7类是脊椎动物 Semaphorin 分子, 包括 Sema-7A, Sema-3A-F 等和 Sema-6A-C; 另一类是病毒属Sema-8分子。Semaphorins 可通过特异性受体neuropilins及plexin(其中neuropilins为结合受体而plexins为信号转导受体)三者形成复合物通过 PlexinA1途径或PlexinB1途径促使细胞迁移及血管生成, 并且可借助多种信号途径调节发育过程中神经细胞突起形态。

神经系统的发育过程中, Semaphorin这类诱导因子使得各类细胞有序地分化、粘连、迁移、相互连接, 逐步形成功能各异的传导束、核团、功能区及脉管网络, 使中枢神经系统成为一个高度精密的整体。在成体仍然维持 Semaphorins 的表达, 提示此因子可能在神经元的可塑性、神经再生、细胞免疫及肿瘤侵袭及转移的过程中扮演重要角色^[35-36]。本实验基于 iTRAQ 技术对SD大鼠急性脊髓损伤后脑脊液蛋白质的检测, 发现脊髓损伤后8 h组相比脊髓损伤0 h组的脑脊液中Semaphorin 7蛋白表达明显下调, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。通过对其GO分析, Semaphorin 7蛋白与神经再生的生物学功能有关。作者认为Semaphorin 7蛋白对急性脊髓损伤后其神经再生有不可忽视的作用, 进而可能为临床治疗急性脊髓损伤提供可靠的依据, 其具体功能机制还有待进一步证实。

致谢: 感谢导师宋兴华教授在日常生活、工作学习中对我的关心与呵护, 并在本实验课题的定题、设计、实施和论文的撰写方面给予悉心指导。

作者贡献: 白晶晶主要负责论文资料的收集及撰写。宋兴华教授、丁俐文老师负责课题设计, 实验方案指导。徐磊磊、周亚军负责动物实验实施、论文撰写; 陈江涛、王翀负责实验数据的分析指导。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 通过新疆医科大学第一附属医院动物伦理委员会审批, 符合相关伦理学要求。

学术术语: 同位素标记相对和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)技术-是由 AB SCIEX 公司研发的一种体外同重同位素标记的相对与绝对定量技术。该技术利用多种同位素试剂标记蛋白多肽 N 末端或赖氨酸侧链基团, 经高精度质谱仪串联分析, 可同时比较多达 8 种样品之间的蛋白表达量, 是近年来定量蛋白质组学常用的高通量筛选技术。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] 郑启新, 汪健, 郭晓东. 急性脊髓损伤后神经保护的研究现状与展望[J]. 中华实验外科杂志, 2012, 29(7): 1213-1216.

- [2] Emery E, Aldana P, Bunge MB, et al. Apoptosis after traumatic human spinal cord injury. *J Neurosurg.* 1998; 89: 911-920.
- [3] Wyndaele M, Wyndaele JJ. Incidence, prevalence and epidemiology of spinal cord injury: what learns a worldwide literature survey? *Spinal Cord.* 2006; 44(9): 523-529.
- [4] Tsutsumi S, Ueta T, Shiba K, et al. Effects of the second national acute spinal cord injury study of high-dose methylprednisolone therapy on acute cervical spinal cord injury—results in spinal injuries center. *Spine.* 2006; 31(26): 2992-2996.
- [5] Wise Yong, 胥少汀, 苟三怀. 大剂量甲基强的松龙治疗急性脊髓损伤[J]. *中国脊柱脊髓损伤杂志*, 2000, 10(5): 304-305.
- [6] Awad H, Suntres Z, Heijmans J, et al. Intracellular and extracellular expression of the major inducible 70kDa heat shock protein in experimental ischemia-reperfusion injury of the spinal cord. *Exp Neurol.* 2008; 212(2): 275-284.
- [7] Boehm AM, Pütz S, Altenhfer D, et al. Precise protein quantification based on peptide quantification using iTRAQ. *BMC Bioinformatics.* 2007; (8): 214.
- [8] 杨星, 张纪阳, 朱云平, 等. 基于稳定同位素标记与质谱分析的蛋白质定量算法研究进展[J]. *分析化学*, 2009, 37(1): 144-151.
- [9] Wu WW, Wang G, Baek SJ, et al. Comparative study of three proteomic quantitative methods, DIGE, cIcAT, and iTRAQ, using 2D gel LC-MALDI TOF/TOF. 2006; 5(03): 651-658.
- [10] Ross PL, Huang YN, Marchese JN, et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using aminereactive isobaric tags and reagents. *Mol Cell Proteomics.* 2004; 3(12): 1154-1169.
- [11] Ross PL, Huang YN, Marchese JN, et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. 2004; 3(12): 1154-1169.
- [12] Trougakos IP, Djeu JY, Gonos ES, et al. Advances and challenges in basic and translational research on clusterin. *Cancer Res.* 2009; 69: 403-406.
- [13] Trougakos IP, Gonos ES. Regulation of clusterin/apolipoprotein J, a functional homologue to the small heat shock proteins, by oxidative stress in ageing and age-related diseases. *Free Radic Res.* 2006; 40: 1324-1334.
- [14] Wilson MR, Easterbrook-Smith SB. Clusterin is a secreted mammalian chaperone. *Trends Biochem. Sci.* 2000; 25: 95-98.
- [15] Rizzi F, Coletta M, Bettuzzi S. Chapter 2: Clusterin (CLU): from one gene and two transcripts to many proteins. *Adv Cancer Res.* 2009; 104: 9-23.
- [16] James RW, Hochstrasser AC, Borghini I, et al. Characterisation of a human high density lipoprotein-associated protein, NA1/NA2. *Arterioscler Thromb.* 1991; 11: 645-652.
- [17] Zinkie S, Gentil BJ, Minotti S, et al. Expression of the protein chaperone, clusterin, in spinal cord cells constitutively and following cellular stress, and upregulation by treatment with Hsp90 inhibitor. *Cell Stress Chaperones.* 2013; 18(6): 745-758.
- [18] Charnay Y, Imhof A, Vallet PG, et al. Clusterin expression during fetal and postnatal CNS development in mouse. *Neuroscience.* 2008; 155: 714-724.
- [19] Van Beek J, Chan P, Bernaudin M, et al. Glial responses, clusterin, and complement in permanent focal cerebral ischemia in the mouse. *Glia.* 2000; 31: 39-50.
- [20] Wiggins AK, Shen PJ, Gundlach AL. Delayed, but prolonged increases in astrocytic clusterin (ApoJ) mRNA expression following acute cortical spreading depression in the rat: evidence for a role of clusterin in ischemic tolerance. *Brain Res Mol Brain Res.* 2003; 114(1): 20-30.
- [21] Charnay Y, Imhof A, Vallet PG, et al. Clusterin in neurological disorders: molecular perspectives and clinical relevance. *Brain Res Bull.* 2012; 88(5): 434-443.
- [22] Polihronis M, Paizis K, Carter G, et al. Elevation of human cerebrospinal fluid clusterin concentration is associated with acute neuropathology. *J Neurol Sci.* 1993; 115(2): 230-233.
- [23] Narayan P, Orte A, Clarke RW, et al. The extracellular chaperone clusterin sequesters oligomeric forms of the amyloid-beta(1-40) peptide. *Nat Struct Mol Biol.* 2011; 19(1): 79-83.
- [24] Leeb C, Eresheim C, Nimpf J. Clusterin is a ligand for ApoER2 and VLDL receptor and signals via the Reelin-signalling pathway. *J Biol Chem.* 2014; 289(7): 4161-4172.
- [25] Bonnard AS, Chan P, Fontaine M. Expression of clusterin and C4 mRNA during rat peripheral nerve regeneration. *Immunopharmacology.* 1997; 38: 81-86.
- [26] Ohlsson M, Bellander BM, Langmoen IA, et al. Complement activation following optic nerve crush in the adult rat. *J Neurotrauma.* 2003; 20: 895-904.
- [27] Schreiber SS, Tocco G, Najm I, et al. Seizure activity causes a rapid increase in sulfated glycoprotein-2 messenger RNA in the adult but not the neonatal rat brain. *Neurosci Lett.* 1993; 153: 17-20.
- [28] Rithidech KN, Honikel L, Milazzo M, et al. Protein expression profiles in pediatric multiple sclerosis: potential biomarkers. *Mult Scler.* 2009; 15: 455-464.
- [29] Lidstrom AM, Bogdanovic N, Hesse C, et al. Clusterin (apolipoprotein J) protein levels are increased in hippocampus and in frontal cortex in Alzheimer's disease. *Exp Neurol.* 1998; 154: 511-521.
- [30] Navarro A, Méndez E, Diaz C, et al. Lifelong Expression of Apolipoprotein D in the Human Brainstem: Correlation with Reduced Age-Related Neurodegeneration. *PLoS One.* 2013 Oct 22; 8(10): e77852.
- [31] Thomas EA, Laws SM, Sutcliffe JG, et al. Apolipoprotein D levels are elevated in prefrontal cortex of subjects with Alzheimer's disease: no relation to apolipoprotein E expression or genotype. *Biol Psychiatry.* 2003; 54(2): 136-141.
- [32] Lim MC, Maubach G, Zhuo L. Glial Fibrillary Acidic Protein Splice Variants in Hepatic Stellate Cells - Expression and Regulation. *Mol Cells.* 2008; 25(3): 376-384.
- [33] Blechinger J, Holm IE, Nielsen KB, et al. Identification and characterization of GFAPkappa, a novel glial fibrillary acidic protein isoform. *Glia.* 2007; 55: 497-507.
- [34] Kamphuis W, Mamber C, Moeton M, et al. GFAP Isoforms in Adult Mouse Brain with a Focus on Neurogenic Astrocytes and Reactive Astroglia in Mouse Models of Alzheimer Disease. *PLoS One.* 2012; 7(8): e42823.
- [35] 向欣, 黄其林. Semaphorin 信号通路与细胞迁移[J]. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2011; 10(5): 477-478.
- [36] Maurin JC, Delorme G, Machuca-Gayet I, et al. Odontoblast expression of semaphorin 7A during innervation of human dentin Matrix Biol. 2005; 24(3): 232-238.