



· 论 著 ·

蛋白组挖掘 Fgf1 蛋白为纳米银医用材料毒性评估的潜在生物标志物

刘 赞 (辽宁省医疗器械检验检测院 辽宁沈阳 110179)

摘要: **目的** 探究纳米银医用材料在与患者身体接触时产生的毒性的程度,挖掘其毒性评估的早期诊断生物标志物。**方法** 采用 8-plex iTRAQ 方法鉴定雄性大鼠肾脏皮质实验组与正常雄性大鼠肾脏皮质(对照组)的差异蛋白,生物信息学分析具有 2 个及以上特异性肽段、差异倍数 > 1.5 的差异蛋白,采用免疫印迹方法和质谱多反应监测方法验证所筛选出的差异蛋白的可信程度。**结果** 筛选出上调目的差异蛋白 10 个,下调目的蛋白 10 个,其中, Fgf1 蛋白为纳米银医用材料毒性评估的潜在生物标志物。**结论** Fgf1 蛋白为纳米银医用材料毒性评估的潜在生物标志物。

中图分类号: TB383.1 文献标识码: A 文章编号: 1009-5187 (2016) 14-022-02

基金项目: 课题名称: 新型及高风险医疗器械检测与安全价技术评价, 课题编号: 2012BAI22B01

一. 引言

纳米粒子(纳米)广泛使用在人类和生态系统的潜在的毒性效应引起了人们的关注^[1]。纳米材料物理与化学特性与粒径大小、表面效应、反应率的高低、量子隧道效应等有关^[2]。氧化形式的纳米粒(nano-Ag₂O)转化为非氧化形式的纳米银(nano-Ag)或者银离子可能会对植物或其它物种造成毒性伤害^[3]。在医学领域,由于微生物对常规抗生素的耐药性,nano-Ag 粒子在抗菌方面的应用已经引起人们的兴趣。近来,很多研究团队致力于制定纳米银毒性评估的规定的的工作,然而,这些法规需要真正立法之后才能保护使用者免遭潜在的不良反应,因此,探寻特异性强、灵敏度高的 nano-Ag 毒性评估标志物将会加速材料毒性评估的立法进程^[4]。

位素相对标记与绝对定量(iTRAQ, Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation)技术,是近年来新开发的一种新的蛋白质组学定量研究技术。iTRAQ 试剂盒包括 8 种同量的胺活性试剂,能对蛋白质水解的肽段进行标记,因此采用串联质谱方法,可以对肽段进行准确的鉴别和定量。用先进的技术改进和先进的生物信息学、蛋白质组学的出现为识别由于纳米材料的暴露可能的生物标志物的发现提供了新的途径^[5]。然而,FGF1 在纳米银医用材料毒性评估中的发生机制尚未有报道,因此,本研究将利用定量蛋白质组学对其进行研究。

二. 材料与方法

1 实验动物 由辽宁长生生物技术有限公司提供,实验动物生产许可号: SCXK(辽)2010-0001,实验动物使用许可号: SYXK(辽)2010-0006,给浓度为 500mg/kg 的分散好的粒径 15nm 的纳米溶液,7 天后取雄性大鼠肾脏皮质组织进行全蛋白提取。

2 实验方法

2.1 组织样本提取 取雄性大鼠肾脏皮质 100 μg,加入液氮研磨至粉末状,加入 -20℃ 预冷的 0.1% TCA-冰丙酮,于 -20℃ 沉淀 2h,20000g,4℃,离心 30min。弃上清,取沉淀。沉淀中再加入预冷的纯丙酮,清洗沉淀, -20℃ 沉淀 30min,4℃,20000g 离心 30min,重复洗至沉淀基本为白色。在沉淀中加入裂解液(8M 尿素,30mM HEPES,1mM PMSF,2mM EDTA,10mM DTT),超声 5min 助溶;20000g 离心 30min 后取上清;加 DTT 至终浓度 10mM,56℃ 水浴 1h 后迅速加入 IAM 至终浓度 55mM,暗室静止 1h;加入 4 倍于样品溶液体积的预冷丙酮, -20℃ 沉淀 3h 以上。离心,4℃,20000g,30min,取沉淀;加入 400 μl 的复溶 buffer,终浓度为 50%TEAB,0.1%SDS。超声 3min 助溶,超声条件同上。离心,4℃,20000g,30min,取上清;Bradford 法进行蛋白定量。

2.2 蛋白消化与肽段标记 取雄性大鼠肾脏皮质 100 μg 蛋白体积,用含 0.1%SDS 的 TEAB 补齐所有样品体积。加入 1 μg/μl 的

Trypsin,每 100 μg 蛋白质底物加入 3.3 μg 的酶,37℃ 水浴 24h,然后补加 Trypsin 1 μg。37℃ 12h。冻干消化液,然后使用 TEAB(水:TEAB=1:1) 每管 30 μl 复溶肽段。将混好的标记试剂加入到肽段中,不同样品用不同大小的同位素标记。

2.3 强阳离子交换色谱 用 A 液(25%ACN,10mM KH₂PO₄,pH 值 3.0)将标记后的样品稀释 10 倍,15000g 离心 10min,取上清。将机器阀门打开,用 MilliQ 水做 A、B 泵的排气。排气后,关上阀门,用 MilliQ 水冲洗柱子,10min,观察压力是否平衡。打开阀门,让 A 泵充满 A 液,B 泵充满 B 液。关闭阀门,调 Pump B 至 0%,即用 A 液平衡系统,10-20min,1ml/min,同时 balance。平衡至压力,吸收峰都走平,上样。收集样品,平衡清洗。

2.4 肽段纯化 C18 反相色谱除盐 1ml 甲醇以流速(2-3 滴)/s 活化柱料,5%ACN 以 1 滴/s 速度平衡;样品用 1ml MilliQ 水溶解过柱;1ml 5% 以,1 滴/s 的速度乙腈洗柱除盐;2×500 μl 纯乙腈以 1 滴/s 洗脱;低温离心抽干乙腈;0.1%甲酸复溶肽段。

2.5 质谱检测 Q-Exactive 质谱仪检测肽段信号,参数如下:离子模式:正离子模式;一级扫描范围:350-2000Da;二级扫描范围:依赖于一级母离子质荷比自动选择;二级分辨率:17500;毛细管温:320 度;离子源电压:1800V;碎裂模式: HCD。

NanoLC 的洗脱条件及梯度: A 液成份: 水,0.1%FA,B 液成份: 乙腈,0.1%FA;色谱柱: 类型: C18,规格: 100mm*75mm,孔径 300A,粒径 6 μm;流速: 400nl/ml;洗脱。

2.6 蛋白质定量与定性分析

2.6.1 蛋白质定性分析与定量分析流程 ①质谱扫描完毕,得到质谱信号总图。②将质谱图输入到 PD (Proteome Discoverer 1.3, Thermo) 软件后,软件先对质谱谱图进行筛选。③PD 提取后的谱图用 mascot 进行搜索,搜索结束后,PD 软件根据 mascot 搜索结果和初步筛选后的谱图进行定量分析。

2.6.2 蛋白质定性分析结果 在 UNIPROT_2014_PAT 库蛋白定性信息

2.6.3 蛋白质定量分析结果

2.7 生物信息学分析

2.7.1 Mascot 对 iTRAQ 标记肽段的定量 iTRAQ 标记的相对定量的实验处理经过 MASCOT 软件完成。通过肽段的标记集团的信号强度代表肽段的定量信息,再将同一肽段的定量信息整合为蛋白的定量信息。

三. 结果

1 比较分析纳米银水溶液灌胃雌雄大鼠肾脏皮质蛋白质组差异蛋白 探究 15nm 粒径纳米银水溶液灌胃之后的雄性大鼠肾脏皮质蛋白质组比较分析得出差异蛋白共 211 个,其中上调 78 个,下调 133 个;其中具有 2 个以上特异性肽段的差异蛋白上调共 74 个,下调共 41 个。

2 IPA 数据库筛选目的差异蛋白

将上述筛选蛋白经 IPA (Ingenuity Pathway Analysis) 数据库进行分析,分析表明,参与某种信号转到通路的差异蛋白上调 10 个,下调 10 个(表 1, 2)

作者简介: 刘赞, (1976-), 女, 辽宁沈阳人, 博士, 主要研究方向为: 1. 医疗器械生物学毒性评估的生物标志物挖掘; 2. 肺腺癌的发病机制研究及早期血清标志物探测。



表 1: 15nm 粒径、浓度为 500mg/kg 纳米银水溶液灌胃的 SD 雄性大鼠与对照组大鼠肾皮质组织比较差异上调蛋白

Accession	Description	Score	Coverage (%)	Unique Peptides	PSMs	MW [kDa]	calc. pI	Ratio(雄性组肾溶液 δ : 对照组肾溶液 δ)
Q63014	A-kinase anchor protein 8 (Akap8)	67.51	4.22	2	2	76.1	5.14	1.634
P61149	Fibroblast growth factor 1(Fgf1)	38.59	7.74	2	2	17.4	7.02	1.45
Q61FW6	Keratin, type I cytoskeletal 10 (Krt10)	163.93	9.32	4	10	56.5	5.15	1.439
Q9R0D6	Transcobalamin-2 (Tcn2)	58.67	9.37	2	3	47.4	7.74	1.268
A1L108	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein (Arpc5l)	70.59	16.34	2	4	17	6.8	1.304
Q63544	Gamma-synuclein OS=Rattus norvegicus (Snrg)	75.1	20.33	2	2	13	4.79	1.552
P60825	Cold-inducible RNA-binding protein (Cirbp)	61.63	20.35	2	2	18.6	9.61	1.355
Q68FT5	S-methylmethionine--homocysteine S-methyltransferase BHMT2 (Bhmt2)	278.31	31.13	5	22	39.9	6.61	1.419
P62076	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim13 (Timm13)	153.22	36.84	3	6	10.5	8.18	1.54
Q6PEC1	Tubulin-specific chaperone A OS=Rattus norvegicus (Tbca)	129.34	37.96	4	9	12.7	5.47	1.475

表 2: 15nm 粒径、浓度为 500mg/kg 纳米银水溶液灌胃的 SD 雄性大鼠肾皮质组织与正常雄性大鼠肾皮质比较差异下调蛋白

Accession	Description	Score	Coverage (%)	Unique Peptides	PSMs	MW [kDa]	calc. pI	Ratio(雄性组肾溶液 δ : 对照组肾溶液 δ)
Q08603	Geranylgeranyl transferase type-2 subunit beta(Rabggtb)	88.97	6.04	2	3	36.8	5.08	0.595
Q99PD6	Transforming growth factor beta-1-induced transcript 1 protein(Tgfbli1)	41.94	6.51	2	2	50.1	6.92	0.662
P05369	Farnesyl pyrophosphate synthase(Fdps)	57.95	6.52	2	2	40.8	5.43	0.566
Q5XIU5	Proteasome inhibitor PI31 subunit(Psmf1)	49.47	7.75	2	2	29.8	5.26	0.718
Q63507	60S ribosomal protein L14(Rp114)	64.42	8.41	2	6	23.3	11.11	0.619
P21744	Insulin-like growth factor-binding protein 4	54.23	8.66	2	2	27.7	7.17	0.654
Q6AYR8	Secernin-2(Scrn2)	106.31	10.87	3	3	46.5	5.39	0.601
P127493	60S ribosomal	38.78	11.03	2	2	17.3	10.62	0.653
Q6SKG1	Acyl-coenzyme A synthetase ACSM3 (Acsm3)	832.5	50.69	23	66	65.7	7.99	0.668
BOBND0	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 6(Enpp6)	191.69	11.82	4	8	50.7	6.95	1.73

四. 讨论

成纤维细胞生长因子 1 (FGF1), 一种广泛表达的促血管生成的蛋白, 参与组织修复, 血管发生, 维护稳定, 通过应力依赖性的非经典分泌途径从细胞中释放。Prudovsky I 等^[6]研究表明 FGF1 的分泌是导致该蛋白的跨膜转运, 其与 FGF1 组成的酸性磷脂膜通透能力相关联。和其它一些非经典跨膜蛋白相似, FGF1 呈现 β 折叠。为了评估折叠 FGF1 在其分泌的作用, 人工膜通透性和应力释放实验后, 采用有针对性的突变与复杂的生物物理方法和分子动力学相结合进行研究。Li M 等^[7]研究表明, FGF1 介导营养过剩介导的代偿性 β 细胞分化, 而 FGF1 失活取消了代偿性 β 细胞分化。而且, 该实验结果表明, FGF1 是在哺乳动物的 β 细胞延长激活和内质网应激行为的持续激活期间上游释放的。

本研究中, 采用 iTRAQ 技术对雄性大鼠 (5nm 粒径、浓度为 500mg/kg) 肾皮质全蛋白进行分析, 结果发现上调蛋白 10 个, 下调蛋白 10 个。经过 IPA 数据库进行分析, 结果表明 FGF1 参与多种疾病的反应, 如短肠综合征^[8], 糖尿病^[9]、口部肿瘤^[10]等。迄今为止, FGF1 蛋白在纳米银医用生物材料制品中的毒性评估的确切性还有待于在 mRNA 水平和蛋白水平进行进一步的验证。

参考文献

- [1] Simon DF, Domingos RF, Hauser C, et al. Transcriptome sequencing (RNA-seq) analysis of the effects of metal nanoparticle exposure on the transcriptome of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Appl Environ Microbiol*. 2013 Aug;79(16):4774-85.
- [2] Xia G, Liu T, Wang Z, et al. The effect of silver nanoparticles on zebrafish embryonic development and toxicology.

Artif Cells Nanomed Biotechnol. 2016 Jun;44(4):1116-21.

- [3] Singh D, Kumar A. Effects of Nano Silver Oxide and Silver Ions on Growth of *Vigna radiata*. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2015 Sep;95(3):379-84.

- [4] Notter DA, Mitrano DM, Nowack B. Are nanosized or dissolved metals more toxic in the environment? A meta-analysis. *Environ Toxicol Chem*. 2014 Dec;33(12):2733-9.

- [5] Nanomaterial and toxicity: what can proteomics tell us about the nanotoxicology? Nath Roy D1, Goswami R2, Pal A3. *Xenobiotica*. 2016 Jul 14:1-12.

- [6] Prudovsky, Kacer D, Davis J, et al. Folding of Fibroblast Growth Factor 1 Is Critical for Its Nonclassical Release. *Biochemistry*. 2016 Feb 23;55(7):1159-67.

- [7] Li M1, Page-McCaw P1, Chen W2. FGF1 Mediates Overnutrition-Induced Compensatory β -Cell Differentiation. *Diabetes*. 2016 Jan;65(1):96-109.

- [8] Schall KA1, Holoyda KA1, Isani M1, et al. Inhibition of Fgf signaling in short bowel syndrome increases weight loss and epithelial proliferation. *Surgery*. 2016 Oct 19.

- [9] Kyrou I, Weickert MO, Gharane S, et al. Fibroblast growth factors: new insights, new targets in the management of diabetes. *Minerva Endocrinol*. 2016 Jul 14.

- [10] Weaver AN1, Burch MB2, Cooper TS1, et al. Notch Signaling Activation Is Associated with Patient Mortality and Increased FGF1-Mediated Invasion in Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity. *Mol Cancer Res*. 2016 Sep;14(9):883-91.