

基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000329

人骨髓间质干细胞诱导成骨分化蛋白质的鉴定及生物信息学分析

张爱霞¹, 余伟华², 王涛¹, 马保锋², 徐彩霞³

(1. 嘉应学院生命科学院生物工程系, 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;
3. 中山大学附属第一医院转化医学中心实验室, 广州 510080)

【摘要】目的:通过蛋白质组学和生物信息学技术建立人骨髓间质干细胞(human bone marrow mesenchymal stem cells, hMSCs)诱导成骨分化蛋白表达谱, 为进一步阐明 hMSCs 的成骨分化机制提供基础资料。**方法:**收集 hMSCs 诱导成骨分化的全蛋白, 应用双向凝胶电泳(two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE)技术和图像分析软件进行蛋白质点的识别和检测, 选择清晰表达的蛋白质点, 应用基质辅助激光解析离子化飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)和生物信息学方法进行蛋白质的鉴定和分析。**结果:**通过 MALDI-TOF-MS 和生物信息学鉴定了 77 种蛋白质; 建立了 hMSCs 诱导成骨分化蛋白质表达谱; 利用 Gene Ontology 对这些蛋白按分子功能和生物学途径进行了归类。**结论:**成功建立了 hMSCs 诱导成骨分化蛋白质表达谱; 为进一步阐明 hMSCs 成骨分化的分子机制提供了基础资料, 为进一步构建 hMSCs 诱导成骨分化蛋白质表达数据库奠定了坚实的基础。

【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】R329.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-02-03

Protein identification and bioinformatics analysis of osteoblast differentiation from human bone marrow mesenchymal stem cells

Zhang Aixia¹, Yu Weihua², Wang Tao¹, Ma Baofeng², Xu Caixia³

(1. Department of Biological Engineering, College of Life Sciences, JiaYing University; 2. Center for Stem Cell and Tissue Engineering, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University; 3. Laboratory of Research Center for Translational Medicine, the First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University)

【Abstract】Objective: To establish protein expressing profile of human bone marrow mesenchymal stem cells(hMSCs) which were induced into osteoblasts through proteomic and bioinformatic techniques and to further elucidate the precise molecular mechanism of hMSCs osteoblast differentiation. **Methods:** The total protein extracts were obtained with cell lysis buffer from hMSCs which were induced into osteoblasts. Two-dimensional gel electrophoresis(2-DE) and 2-DE gel analysis software were used to recognize and test protein spots. Clearly expressed protein spots were selected and were identified and analyzed by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry(MALDI-TOF-MS) and bioinformatics. **Results:** Protein expressing maps of hMSCs induced into osteoblasts were set up. Seventy-seven proteins were identified by MALDI-TOF-MS and bioinformatics, which were classified by Gene Ontology according to molecular function and biological process. **Conclusion:** Protein expressing maps of hMSCs induced into osteoblasts are built, which will provide basal information to illuminate the molecular mechanism of hMSCs differentiation into osteoblasts and to build protein expression database of osteoblast differentiation from hMSCs.

【Key words】bone marrow mesenchymal stem cells; proteomics; osteoblast differentiation; mass spectrometry identification; bioinformatics

间质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是

作者介绍: 张爱霞, Email: rosaleo2008@aliyun.com,

研究方向: 干细胞分化机理。

通信作者: 徐彩霞, Email: xucx@scut.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81000681)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20150209.1115.021.html>
(2014-05-23)

成体干细胞的一种, 它具有很强的自我增殖能力和多向分化潜能。大量研究表明, 体外培养的 MSCs 在合适的诱导条件下, 可分化为成骨细胞、成软骨细胞、脂肪细胞和成肌细胞等多种细胞^[1-3]。MSCs 取材方便, 易于在体外分离、纯化, 具有多向分化潜能, 有较弱的免疫抗原性, 体内植入反应较弱, 可在

体内外表达多种治疗性的外源目的基因,因而近年来已成为细胞治疗和组织工程领域中研究的热点^[4]。研究表明 MSCs 在骨损伤的修复中起重要作用,可通过直接注入 MSCs 或将 MSCs 贴附于生物材料来修复骨损伤^[5-6]。但是目前对 MSCs 的研究还面临着许多问题有待解决,其中 MSCs 成骨分化的分子机制和成骨分化方向的控制是亟待解决的问题。

蛋白质组学是高通量、系统性研究蛋白质的有效方法,蛋白质组学的发展为 MSCs 成骨分化机制的研究提供了理论基础与技术手段,Leonard 等^[7]对人骨髓 MSCs(human bone marrow mesenchymal stem cells, hMSCs)及成骨诱导分化 4 d 的细胞的膜蛋白表达变化情况进行了蛋白质组学分析,Salasznyk 等^[8]运用蛋白组学技术对 hMSCs 及其分化成熟的成骨细胞进行了研究,刘元林等^[9]对 hMSCs 及成骨诱导分化 14 d 的细胞进行蛋白质组学研究,这些研究成功建立了 hMSCs、成骨诱导分化 4 d、成骨诱导分化 14 d 以及成熟骨细胞的蛋白表达谱,这些研究成果成为 hMSCs 成骨诱导蛋白质数据库的重要组成部分。成骨诱导 7 d 位于成骨过程的中间环节,是成骨分化过程中的关键点,但成骨诱导 7 d 的蛋白质组表达情况无相关报道,本研究利用蛋白质组学和生物信息学技术,研究 hMSCs 诱导成骨分化 7 d 的蛋白表达,本研究对于阐明 hMSCs 成骨分化的分子机制具有重要意义,将为进一步建立 hMSCs 成骨诱导蛋白质表达数据库提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 骨髓 MSCs hMSCs 来自中山大学中山医学院干细胞与组织工程中心。

1.1.2 试剂 L-DMEM 培养基、H-DMEM 培养基均购自美国 GIBCO BR L 公司;胎牛血清、胰蛋白酶均购自 Hyclone 公司;Vitamin C、地塞米松、蔗糖、碘乙酰胺、硫脲、甘油、二硫苏糖醇(DTT)均购自 Sigma 公司; β -甘油磷酸钠购自 Calbiochem 公司;尿素、Tris 碱、3-[3-(胆酰胺基丙基)二甲氨基]丙磺酸盐、溴酚蓝、十二烷基磺酸钠、过硫酸铵、IPGstrip、IPG buffer、蛋白质纯化试剂盒、蛋白质定量试剂盒、低溶点琼脂糖、考马斯亮蓝均购自瑞典 Amersham Biosciences 公司;丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺均购自 BBI 公司;其他常用试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 hMSCs 的体外培养及成骨诱导分化 取培养至第 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。于倒置相差显微镜下观察细胞形态。

将传代扩增后至第 5 代的 hMSCs 接种于 6 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 μ g/ml VitC)2 ml;对照组每孔加入 L-DMEM 完全培养液,置培养箱中。诱导分化第 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,显微镜下观察结果。

1.2.2 蛋白样品的制备 加入裂解液裂解 hMSCs 诱导成骨分化 7 d 的细胞,冰上放置 10~15 min,超声波处理,20 000 g,4 $^{\circ}$ 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。

1.2.3 双向凝胶电泳分析 将蛋白样品进行第一向电泳。等电聚焦电泳参数设置为:30 V、12 h(胶条再水化);500 V、1 h;1 000 V、1 h;8 000 V、6 h。等电聚焦电泳结束后,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共重复 3 次。

用 Typhoon9400 扫描仪对 Deep Purple 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,选择表达清晰的蛋白质点建立切点目录(picklist),进行质谱鉴定和生物信息学分析。

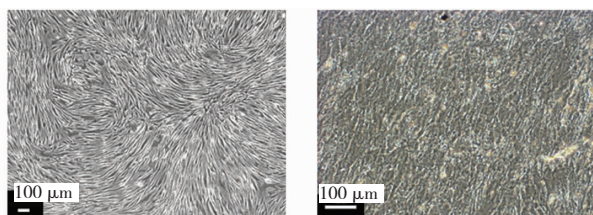
1.2.4 质谱鉴定和生物信息学分析 将 picklist 输入全自动斑点处理工作站,该仪器能对差异蛋白斑点自动进行切割、脱色、干燥、酶解、加入基质和质谱靶点样等一系列操作。将点好的质谱靶放入 Ettan MALDI-TOF Pro 质谱仪。激光源为 337 nm 波长的氮气激光器。离子源加速电压为 20 kV,离子延迟提取 200 ns,质谱信号单次扫描累加 200 次,正离子谱鉴定。质谱质量范围:MS,700~3 000。胰蛋白酶自切峰(842.509, 2 211.104)作内标,获得样品的肽质量指纹图谱(peptide mass fingerprinting, PMF)。

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 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。利用鉴定出来的蛋白质数据库登入号登陆 NCBI 的蛋白质网站和 Swiss-prot 数据库查询相关蛋白质的信息。对所鉴定出的蛋白,依据 Gene Ontology 的生物过程和分子功能分别对它们进行分类,并绘制成图。

2 结果

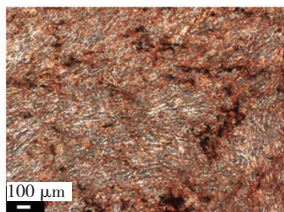
2.1 hMSCs 的体外培养及分化潜能

hMSCs 呈梭形,平行或漩涡状方式贴壁生长;hMSCs 经成骨诱导液诱导 2 周后,细胞转变为多角形细胞,呈多层重叠生长,可观察到较大的细胞结节,有明显的钙沉积;在成骨诱导培养 18 d 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 1。



A. 体外培养的 hMSCs

B. hMSCs 成骨诱导 2 周



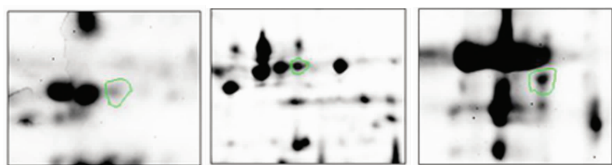
C. 茜素红-S 检测钙沉积

图 1 hMSCs 的体外培养形态及向成骨分化的鉴定

Fig.1 Cell shape of hMSCs cultured in vitro and identification of differentiation to osteoblast

2.2 hMSCs 总蛋白的 2-DE

ImageMaster™ 2-D Platinum software 5.0 软件分析结果显示,3张双向凝胶电泳图谱蛋白质斑点匹配率是 76%,胶的重复性好,分子量主要集中在 20~80 kD 之间,等电点主要分布在 pH 4.0~8.0 之间,蛋白质斑点分散性好,图 2 是其中 3 个蛋白质点的 2-DE 图,经质谱鉴定和数据库查询,分别为原肌球蛋白 3、核纤层蛋白 A/C 和线粒体苹果酸脱氢酶。



A. 原肌球蛋白 3

B. 核纤层蛋白 A/C

C. 线粒体苹果酸脱氢酶

图 2 3 个蛋白质点的 2-DE

Fig.2 Maps of three protein spots by two dimensional gel electrophoresis

2.3 质谱鉴定和生物信息学分析

从 3 块胶上匹配的点上选取表达清晰的蛋白点,经过胶内酶切和多肽提取后,进行 MALDI-TOF-MS 鉴定,90 多个

蛋白质点成功的获得了肽质量指纹图谱。图 3 是其中 1 个蛋白质点的肽质量指纹图谱,图中 X 轴为分子量,Y 轴为相对强度,峰上标记的数字为多肽的分子量,通过数据库查询,该蛋白质为精脢合酶。

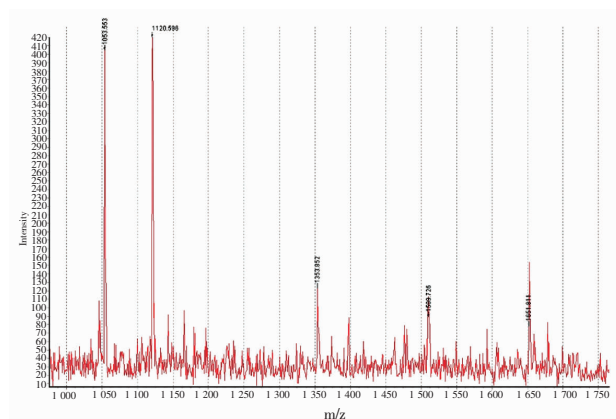
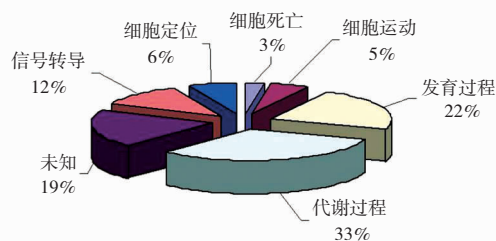


图 3 蛋白质点的肽质量指纹图谱

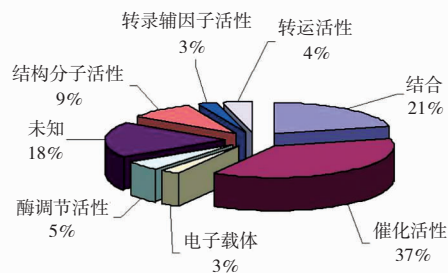
Fig.3 PMF map of one protein spot

通过数据库搜索,根据蛋白点在 2-DE 中的分子量和等电点进行综合考虑判定搜索结果,共鉴定出 77 种不同的蛋白质。表 1 列出了这些蛋白的相关信息,其中后 22 种蛋白在相关文献中已有报道^[10],表中从左到右依次是数据库登入号和蛋白质名称。

按照 Gene Ontology 的分类方式对所有鉴定的蛋白质分类绘图,生物学过程分类中发现参与体内代谢和发育过程的蛋白质分别占 33%和 22%,分子功能分类中发现参与催化反应和结合的蛋白质分别占 37%和 21%,见图 4。



A. 生物学过程分类



B. 分子功能分类

图 4 所鉴定蛋白质的 Gene Ontology 分类分析

Fig.4 Classification for the identified proteins by Gene Ontology

表 1 77 种蛋白质的鉴定结果

Tab.1 Results of 77 identified proteins

数据库登入号	蛋白质名称
gil55961069	前折叠素 2
gil9963785	reticulocabin 前体蛋白
gil500638	核不均一核糖核蛋白 A2
gil54648253	K 同源性片段调节蛋白
gil62897353	WD 重复蛋白 1
P18085	ADP 核糖基化因子 4
gil6653226	精子抗原 36
gil30841309	含锰超氧化物歧化酶
gil20530221	BLOCK 25 蛋白
gil62897507	草酰琥珀酸脱羧酶 α
gil17391461	mRNA 前体加工因子 19
P78330	磷酸丝氨酸磷酸化酶
gil5326998	51 kD 红细胞溶质蛋白
gil14517632	急性吗啡依赖相关蛋白 2
gil7106852	前折叠素亚单位 2
gil12653427	辅酶细胞色素 C 还原酶核心蛋白 2
gil33150636	GTP 结合蛋白
gil485388	真核起始因子 4A II
gil21735621	线粒体苹果酸脱氢酶
gil41350401	迁移诱导基因 10 蛋白
gil48145549	PGK1
gil66360348	碳酸酐酶
gil49168498	硫氧还蛋白还原酶 1
gil37181971	MWRP239 蛋白
gil12655087	蛋白酶抑制因子 6
gil10279687	一种新蛋白 bA234K24.2
gil14010354	原肌球蛋白 4 间变性淋巴瘤激酶融合蛋白小亚型
gil47938913	缺氧上调基因 1
Q5X8J8	过氧化氢 - 过氧化物酶 2
gil386856	核纤层蛋白 A
gil33990713	膜突蛋白
gil49456373	抑制素蛋白
gil33990951	根蛋白
gil13477151	辅肌动蛋白
gil55665780	tropomyosin3
gil1296664	Sec23 蛋白
gil62088766	CD68 变体
gil33341268	钾通道四聚体域 12
gil19072647	原肌球蛋白
gil30582379	晶体蛋白
gil28461313	外皮蛋白
gil55957497	核纤层蛋白 A/C
gil57014045	核纤层蛋白 A/C 转录本变体 1
gil12230943	蛋白酶调节因子 9
gil4502009	芳香烃受体相互作用蛋白
gil5052202	氯离子通道蛋白 4
gil55961619	氯离子通道 1
gil7770137	1 种预测蛋白 PRO1608

续表 1

数据库登入号	蛋白质名称
gil23506465	突变结蛋白
gil49168516	ACTG2
gil189597	胰腺肿瘤相关蛋白
gil15990432	异质核糖核蛋白 F
gil62896585	腺苷酸环化酶相关蛋白
gil7705773	Bax 蛋白相互作用因子 1
gil17529991	氧类固醇结合蛋白样蛋白 7
gil338827	游离甲状腺激素结合蛋白
gil999911	组织蛋白酶 B
gil29468184	转移抑制基因
gil5822091	组织蛋白酶 D
gil40889569	尿卟啉原脱羧酶
gil35053	尿嘧啶 DNA 糖苷酶
gil55957792	泛素羧基端酯酶 L3
gil1145816	FK506 结合蛋白 54
gil7243266	KIAA1434 蛋白
gil56204109	精脬合酶
gil50513466	丝氨酸/苏氨酸磷酸酶 1- 肌球蛋白磷酸酶靶向亚基 1 复合物 A 链
gil62896849	N- 乙酰葡萄糖胺激酶
gil1168056	鸟氨酸转氨酶
gil33346925	丙酮酸激酶
gil56966699	Annexin A2
gil55958718	高迁移率族蛋白 1
gil809190	Annexin V
gil4323193	免疫球蛋白重链可变区蛋白
gil51459017	似红血球膜相关蛋白质抗原 332 蛋白
gil16877874	磷酸丙糖异构酶
gil37852	Vimentin
gil238427	电压依赖性阴离子通道蛋白

3 讨 论

研究发现, MSCs 向成骨细胞分化的发生与很多因素有关, 如骨形态发生蛋白 2、地塞米松、1,25-二羟基-VitD3 等。有研究显示^[11], 在 MSCs 向成骨分化过程中, VitC 的加入与胶原的合成有关, 并参与了调控碱性磷酸酶活性和蛋白合成, β -甘油磷酸钠可为骨组织在体外培养体系中发生钙沉积提供所需磷离子, 而地塞米松通过增强其受体与基因组靶序列的亲合性而调控分化细胞中基因表达。这些结果显示, 体外培养体系中加入地塞米松, β -甘油磷酸钠, VitC 可诱导 MSCs 向成骨细胞分化, 这为进一步研究骨发生的机理奠定了基础。本研究利用

含地塞米松、 β -甘油磷酸钠、VitC 的成骨诱导液,成功在体外定向诱导 hMSCs 分化为成骨细胞,其成骨过程与体内成骨细胞有相似的形态和生长特点。

蛋白质组学技术是大规模、系统性研究 hMSCs 成骨诱导分化的强有力工具,hMSCs、成骨诱导分化 4 d、成骨诱导分化 14 d 以及成熟的骨细胞的蛋白表达谱已成功建立并初步构建了 hMSCs 成骨诱导蛋白质数据库^[7-9],hMSCs 向成骨细胞定向分化是一个连续的过程,蛋白质组表达不断发生变化,成骨诱导 7 d 对成骨分化起到重要的承上启下的作用,本研究填补了 hMSCs 成骨诱导分化蛋白质组学研究的空白。

本研究鉴定的蛋白质,许多对成骨分化有着直接或间接的作用,如 Annexin A2 和 Annexin V,是已知的与骨发育有关的蛋白,研究表明,它们对于启动成骨的矿化过程有至关重要的作用,Annexin A2 能促使成骨必需的碱性磷酸酶到达释放基质小泡的脂质微域^[12],Annexin A2 的异常表达与骨髓瘤的发生有密切关系^[13],而 Annexin V 是基质小泡中成核复合物的重要组分,对成骨过程中矿物质成核过程至关重要^[14]。

蛋白质是基因功能活动的最终执行者,是生命现象复杂性和多变性的直接体现者。从基因水平向蛋白质水平的深化成为了医学研究发展的必然趋势。蛋白质组学的发展使蛋白质的高通量研究成为现实。本研究采用高分辨率的双向电泳技术、MALDI-TOFMS 质谱分析及生物信息学技术,成功地建立了 hMSCs 诱导成骨分化的蛋白质表达谱,所鉴定出的 77 种蛋白,将为后续的分析研究工作打下坚实的基础。

参 考 文 献

- [1] Khan WS,Hardingham TE.Mesenchymal stem cells,sources of cells and differentiation potential[J].J Stem Cells,2012,7(2):75-85.
- [2] You MH,Song MS,Lee SK,et al.Voltage-gated K⁺ channels in adipogenic differentiation of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells[J].Acta Pharmacol Sin,2013,34(1):129-136.
- [3] Supokawej A,Kheolamai P,Nartprayut K,et al.Cardiogenic and myogenic gene expression in mesenchymal stem cells after 5-azacytidine treatment[J].Turk J Haematol,2013,30(2):115-121.
- [4] Hsiao ST,Dilley RJ,Dusting GJ,et al.Ischemic preconditioning for cell-based therapy and tissue engineering[J].Pharmacol Ther,2014,142(2):141-153.
- [5] Rosset P,Deschaseaux F,Layrolle P.Cell therapy for bone repair[J].Orthop Traumatol Surg Res,2014,100(1S):S107-S112.
- [6] Goodman SB.Cell-based therapies for regenerating bone[J].Minerva Orthop Traumatol,2013,64(2):107-113.
- [7] Leonard J,Fostera B,Patricia A,et al.Differential expression profiling of membrane proteins by quantitative proteomics in a human mesenchymal stem cell line undergoing osteoblast differentiation[J].Stem Cells,2005,23(9):1367-1377.
- [8] Salasnyk RM,Westcott AM,Klees RF,et al.Comparing the protein expression profiles of human mesenchymal stem cells and human osteoblasts using gene ontologies[J].Stem Cells Dev,2005,14(4):354-366.
- [9] 刘元林,于晓姝,刘晓丹,等.间充质干细胞定向成骨细胞分化的蛋白质组学分析[J].第四军医大学学报,2006,27(17):1551-1554.
- [10] Zhang AX,Yu WH,Ma BF,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):167-179.
- [11] Langenbach F,Handschel J.Effects of dexamethasone,ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro[J].Stem Cell Res Ther,2013,4(5):117.
- [12] Gillette JM,Nielsen-Preiss SM.The role of annexin 2 in osteoblastic mineralization[J].J Cell Sci,2004,117(Pt 3):441-449.
- [13] D'Souza S,Kurihara N,Shiozawa Y,et al.Annexin II interactions with the annexin II receptor enhance multiple myeloma cell adhesion and growth in the bone marrow microenvironment[J].Blood,2012,119(8):1888-1896.
- [14] Wuthier RE,Lipscomb GF.Matrix vesicles:structure,composition,formation and function in calcification[J].Front Biosci(Landmark Ed),2011,16:2812-2902.

(责任编辑:关蕴良)