

# Smad3 基因剔除致骨关节炎小鼠血清蛋白质组双向凝胶电泳分析

郝振明<sup>1</sup> 杨晓<sup>1\*</sup> 应万涛<sup>2</sup> 王杰<sup>2</sup> 钱小红<sup>2</sup> 黄翠芬<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(军事医学科学院生物工程研究所发育和疾病遗传学研究室 北京 100071)

<sup>2</sup>(军事医学科学院国家生物医学分析中心 北京 100850)

**摘 要** Smad3 基因剔除导致小鼠骨关节炎。为了进一步深入研究 Smad3 基因缺失导致骨关节炎形成的分子机制,寻找骨关节炎发生早期的分子变化。用双向电泳技术结合肽质量指纹谱技术对 Smad3 基因剔除小鼠和野生型小鼠血清蛋白质组进行了初步分析。对其中 7 个表达差异蛋白质进行了鉴定,并探讨了所鉴定蛋白质与骨关节炎发生的关系。为揭示 SMAD3 介导的 TGF-β 信号在骨骼发育中的重要作用提供了线索。

**关键词** 基因剔除, SMAD3, 2-DE, PMF

中图分类号 Q51 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)04-0452-05

骨关节炎(Osteoarthritis)又称退行性骨关节病,是一种最常见的非炎性滑膜关节病。骨关节炎以退行性关节软骨缺失伴随着关节软骨异常修复及软骨下骨重建为特征<sup>[1]</sup>,它的发生与年龄密切相关,60%~90%的 65 岁以上的人均患有各种程度的关节炎。骨关节炎的发展会导致关节僵硬、疼痛以至最后失去功能。骨关节炎发现时关节已发生了几乎是不可逆转的显著退变且至今尚无有效的治疗方法,因此研究骨关节炎的致病机制对于该病的早期诊断、预防及治疗具有重要的意义。

Smad3 基因剔除导致关节软骨丧失了对 TGF-β 信号的反应,引起软骨细胞分化异常,结果产生与人类骨关节炎相似的退行性病变<sup>[2,3]</sup>。为了研究 Smad3 基因剔除后血清中蛋白质表达谱的变化,我们用双向电泳技术结合肽质量指纹谱技术对 Smad3 基因剔除小鼠血清进行了初步分析,以期找出差异表达的蛋白质并进行研究。这些蛋白质可能为骨关节炎的诊断和治疗提供有益的线索。

## 1 材料和方法

### 1.1 Smad3 基因剔除小鼠血清的制备

取 20~39 日龄 Smad3<sup>ex8/ex8</sup> 小鼠及其同窝野生型对照小鼠各 10 只,摘其眼球取血,置室温下 30min,3 000r/min 离心 10min,各取 100μL 血清合并,

分装于灭菌的离心管中,-70℃冻存。

### 1.2 小鼠血清中蛋白质浓度的定量

用 0.9%的 NaCl 溶液对小鼠血清做 50 倍稀释,用 Pierce 公司的 BCA-200 蛋白质分析试剂盒测定蛋白质浓度。用酶联检测仪在 492 nm 和 630 nm 双波长测定吸光值。两种基因型小鼠血清蛋白质各取 500 μg 用于双向电泳。

### 1.3 小鼠血清的双向电泳

**1.3.1 第一向固相 pH 梯度等电聚焦:**分别取 Smad3<sup>+/+</sup>、Smad3<sup>ex8/ex8</sup> 基因型小鼠血清 10.3μL、9.7μL,含蛋白质总量均为 500μg,用 Amersham Pharmacia Biotech 公司的等电聚焦设备 IPGphor,胶条 pH 范围为线性 3~10,18cm,采用胶内泡涨方法,样品和泡涨液(尿素 8mol/L,CHAPS 2%,痕量溴酚蓝)共 350 μL。其中各加还原剂 DTT 至 20 mmol/L,IPG buffer 至 0.5%。等电聚焦条件如表 1。

表 1 IPGphor 等电聚焦系统中固相干胶条 IEF 参数

Table 1 IEF parameters of immobiline drystrip in IPGphor IEF system

Step	Voltage(V)	Volt-hours (Vh)	Step duration (h)	Gradient type
Rehydration	0	0	6	Step-n-hold
Rehydration	30	180	6	Step-n-hold
1	500	500	1	Step-n-hold
2	1000	1000	1	Step-n-hold
4	8000	32000	4	Step-n-hold

收稿日期 2001-12-19,修回日期 2002-03-28。

基金项目 国家自然科学基金(No.39970413) 国家杰出青年科学基金(No.30025028)和国家高技术研究发展计划(No.2001AA216081)资助。

\* 通讯作者。 Tel 86-10-63895937 E-mail :Yangx@nic.bmi.ac.cn © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

**1.3.2 平衡** 将等电聚焦后的 IPG 胶条放入平衡液 (1.5mol/L Tris 0.335mL, 尿素 3.535g, 甘油 3mL, SDS 0.2g, 痕量溴酚蓝)10mL 中,于摇床上振荡  $2 \times 15$  min。其中,第一种平衡液中含 DTT 20 mmol/L,而第二种平衡液内由 100 mmol/L 碘乙酰胺取代。

**1.3.3 第二向垂直 SDS-PAGE** :用 Bio-Rad 公司的 Protein II xi cell 垂直电泳仪进行电泳。根据 IPG conversion Kit 的体积,配制大小为 200mm  $\times$  200mm  $\times$  1mm,12.5% 的均匀胶。将平衡后的 IPG 胶条移至凝胶的上方,用 0.5% 的琼脂糖/电泳缓冲液封闭。电泳缓冲液为 Tris-Glycine-SDS 系统 (500mL,5  $\times$ , 7.5g Tris, 2.5g SDS, 36g Glycine)。在 14 ~ 15°C 时,以每一胶条 20mA 恒流 40min,再加大至每块胶 30mA 恒流至溴酚蓝前沿到玻璃板下缘为止。按常规考马斯亮蓝染色方法固定、染色、脱色。

取几次电泳中重复性最好的胶进行分析。

#### 1.4 双向电泳结果的处理

用 Amersham Pharmacia Biotech 公司的图像分析软件 ImageMaster 2D Elite 3.10 分析电泳结果。

#### 1.5 差异蛋白质从 PAGE 胶中的酶切和提取

选取 2D 胶上存在明显差异的蛋白质斑点,用刀片沿斑点染色边缘切下蛋白质点置于样品管中,用含 50% 乙腈和 25mmol/L 碳酸氢铵溶液脱色,胶片真空离心干燥。罗氏公司的胰蛋白酶 (Trypsin, modified sequencing grade) 用 25mmol/L 碳酸氢铵溶液配成 0.01g/L 溶液,加 8 ~ 10 $\mu$ L 于各样品管中,37°C 保温 20h。加入 5% 三氟乙酸溶液 120 $\mu$ L 于 40°C 保温 1h,吸出上清,加入 2.5% TFA,50% ACN 溶液 120 $\mu$ L

于 30°C 保温 1h,合并上清液冰冻干燥<sup>[4]</sup>。

#### 1.6 差异蛋白质的肽质量指纹谱 (Peptide mass fingerprinting, PMF) 分析

冻干后用 10 $\mu$ L 0.5% 三氟乙酸溶解的肽混合物或脱盐后的提取液,用 Bruker 公司的质谱仪 REFLEX III 基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱 (Matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS) 进行分析。取 1 $\mu$ L 点靶,另取 1 $\mu$ L  $\alpha$ -萘基-4-羟基肉桂酸溶于 0.1% 三氟乙酸/50% 乙腈的饱和溶液作基质,室温干燥。质谱仪采用激光波长 337nm,反射检测。

#### 1.7 数据库检索初步鉴定蛋白质

数据库检索程序根据输入的蛋白质等电点、分子量范围及肽指纹谱数据和其它一些参数在数据库中寻找与这些参数相匹配的蛋白质。互联网上的蛋白质数据库检索程序有:ExPASy Molecular Biology Server 网站提供的 Peptide ( <http://www.expasy.ch/tools/peptide.html> ),UCSF Mass Spectrometry Facility 网站提供的 MS-Fit ( <http://prospector.ucsf.edu/htmlucs3.0/msfit.htm> )

## 2 结果

#### 2.1 小鼠血清双向电泳结果及图像分析

图 1 为小鼠血清蛋白质经双向凝胶电泳、考马斯亮蓝染色的图谱,图 1A 为 *Smad3*<sup>+/+</sup> 小鼠血清的双向电泳图,图 1B 为 *Smad3*<sup>ex8/ex8</sup> 突变小鼠血清的双向电泳图。胶均为 18  $\times$  18cm PAGE 胶,两块胶在同一电泳槽中同时电泳。电泳结果用 ImageMaster 2D

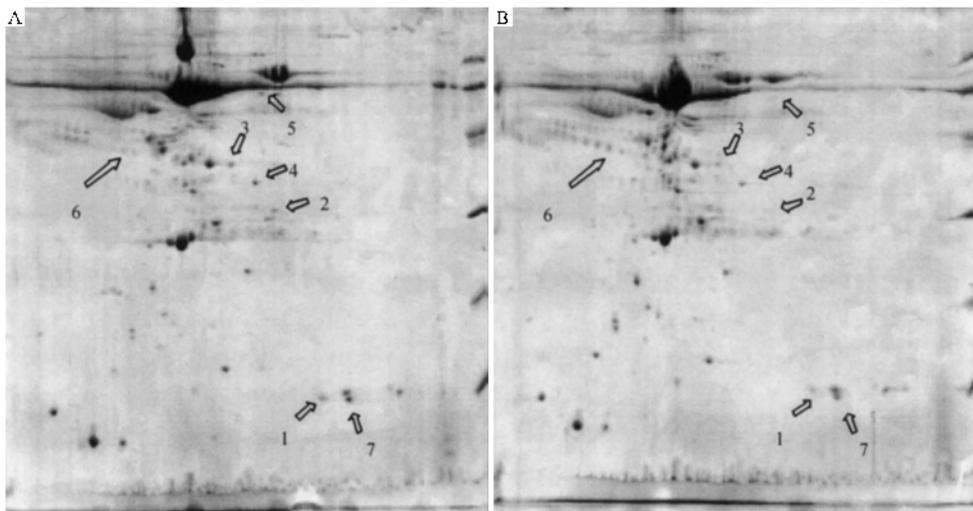


图 1 *Smad3*<sup>+/+</sup> 野生型对照小鼠 (A) 及 *Smad3*<sup>ex8/ex8</sup> 突变型小鼠 (B) 血清双向电泳图谱 (考马斯亮蓝染色)

Fig. 1 2-D gel map of serum proteins from *Smad3*<sup>+/+</sup> wild type mice (A) and *Smad3*<sup>ex8/ex8</sup> mutation type mice (B). (CBB stained)

Elite 3.10 双向电泳图像分析软件分析,部分差异点以数字在图中标出。表 2 为 7 个差异蛋白质的分析结果。

## 2.2 差异蛋白质的肽质量指纹谱分析

表 3 列出了 7 个蛋白质肽指纹谱峰值的数据,黑体示含量极高的峰值,斜体为胰蛋白酶自消化的峰值。

进行数据库检索,必须确认一些重要的参数,比如分子量、等电点、消化所用酶、蛋白质的来源、肽质量精确度范围、最低匹配肽段数目、允许酶有多少误切等。总之,已知条件越多越精确结果就越准确。数据库检索各参数的设置见表 4。

表 5 为 2D-1 蛋白质的检索结果,它为鼠 II 型胶原前体的短异构体,其余 6 个从略。检索结果总结见表 6,表中列出了蛋白质的等电点、分子量和鉴定结果等重要数据。

## 3 讨 论

*Smad3* 基因剔除小鼠在半年后表现出明显的骨关节炎症状<sup>[3]</sup>。为了寻找与骨关节炎发生相关的早期血清蛋白质变化,我们选择了年龄不超过一个半月的年轻小鼠作为研究对象。为了最大程度地减少个体差异对结果的影响,除了选用同窝野生型小鼠作为对照,还将相同基因型的 10 只小鼠的血清混合后用于双向电泳分析。这在很大程度上削弱了个体差异,并使共同的差异得以放大,使得结果更为可靠。

蛋白质经胰蛋白酶消化后,会产生许多大小不同的肽段,对由这些肽段形成的峰值数据的选择关系到能否检索到正确的蛋白质。我们基于下面两条原则选择峰值数据:一是去掉胰蛋白酶自消化产生的峰值数据,包括:1020、1021、1434、1475、2163、

表 2 7 个差异蛋白质的分析结果

Table 2 Analysis of seven proteins

Protein samle	<i>Smad3</i> <sup>+/+</sup>			<i>Smad3</i> <sup>ex8/ex8</sup>			Protein mass ratio ( <i>ex8/ex8</i> / <i>+/+</i> )
	Relatively mass × 100	MW/kD	pI	Relatively mass × 100	MW/kD	pI	
2D-1	44.823	2.31	7.8	16.039	2.894	7.76	0.35783
2D-2	33.033	41.221	7.07				0
2D-3	88.77	51.289	6.41	11.727	51.808	6.34	0.132105
2D-4	156.006	47.36	6.77	85.578	47.66	6.71	0.548556
2D-5	1.074	66.547	6.86				0
2D-6	0.172	54.629	4.79	50.479	55.409	4.73	293.4826
2D-7	199.518	1.329	8.19	72.498	1.391	8.12	0.363366

注:质量差异比(*ex8/ex8*/*+/+*):*Smad3*<sup>ex8/ex8</sup>小鼠血清中某蛋白质占总蛋白质的相对量除以 *Smad3*<sup>+/+</sup>小鼠血清中对应蛋白质占总蛋白质的相对量。

表 3 7 个蛋白质肽指纹谱峰值数据

Table 3 PMF peaks Data of seven proteins

Protein sample	PMF peaks
2D-1	<b>887.176 949.621 1101.611 1445.863 1529.853</b> 1820.025 2109.220 2126.169 2824.409
2D-2	<b>918.704</b> 1221.708 1258.746 <b>1447.188 1472.843 1486.803 1502.789</b> 1737.054 1824.000 <b>1895.241 2010.108</b> 1006.640 1031.703 <b>1111.748</b> 1165.645 1175.750 1179.756 <b>1234.849 1239.837 1277.889</b> 1366.811 <b>1427.942</b> 1673.061 1708.824
2D-3	<b>1994.222</b>
2D-4	<b>973.699</b> 1020.680 <b>1031.681</b> 1089.751 <b>1111.755</b> 1165.770 1179.774 1216.786 <b>1239.836</b> 1277.860 1320.757 1366.806 1436.867 1456.844 1496.920 <b>1673.048</b> 1708.944 1788.138 1995.209 <b>2107.344</b> 2130.336 2386.417 2404.492
2D-5	1038.711 1041.753 1155.701 <b>1172.718</b> 1184.704 1188.785 1204.747 1283.764 1325.795 1341.794 1357.777 1479.946 <b>1544.987</b> 1767.434 1807.106 1823.164 1896.200 1910.303 <b>1989.176 2006.224</b> 2721.666
2D-6	1022.618 1066.328 1082.319 1090.732 1098.750 <b>1205.708 1274.785</b> 1343.747 1373.777 1388.859 1471.834 <b>1651.947 1671.977</b> 1708.846 1809.902 1995.159 2128.384 <b>2517.444</b>
2D-7	906.372 922.146 <b>1274.855 1511.839 1529.860 1571.898 1820.014</b> 1842.044 2851.675 2863.620

表 4 用于检索蛋白质库的各蛋白质参数

Table 4 Parameters of protein database searching

Parameters	2D-1	2D-2	2D-3	2D-4	2D-5	2D-6	2D-7
Program used	PeptIdent						
PI range	6.5 ~ 8.5	5.7 ~ 7.7	5.2 ~ 7.2	5.6 ~ 7.6	5.6 ~ 7.6	3.7 ~ 5.7	6.9 ~ 8.9
Protein mass range(kD)	12.6 ~ 15.4	27 ~ 33	32.4 ~ 39.6	32.4 ~ 39.6	60.3 ~ 73.7	37.8 ~ 46.2	12.6 ~ 15.4
Species searched	MUS MUSCULUS						
Digest Used	Trypsin						
Peptide mass accuracy(kD)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1
Number of peptides required for match	4	4	4	4	4	4	4
Number of peptides used in search	1	1	2	0	2	2	2

表 5 2D-1 蛋白质的检索结果

Table 5 Database searching results of spot 2D-1

User mass	Matching mass	Mass/D	# MC	Position	Peptide
949.621	949.51	-0.1108	0	1067 - 1077	GPPGPVGPSPGK
1445.863	1445.742	-0.1212	0	1313 - 1325	ALLIQGSNDVEMR
2163.25	2163.094	-0.1558	1	808 - 832	VGPPGANGNPGPAGP PGPAGKDGPK
2824.409	2824.623	0.2139	1	4 - 29	LGAPQSLVLLTLIA AVLRCQGQDAR

表 6 检索结果总结

Table 6 the sum of database searching results

Protein sample	pI	MW/D	Database searching results
2D-1	8.16	131745.99	Short isoform of collagen alpha(II) chain precursor [ contains : chondrocalcin ]
2D-2	5.72	116674.19	Vinculin
2D-3	6.48	270642.21	Nuclear receptor co-Repressor 1 ( n-cor1 )( n-cor ), ( retinoid x receptor interacting protein 13 )( rip13 )
2D-4	7.03	28339.00	Chain2 : alpha-2-macroglobulin 35 kD subunit
2D-5	5.66	425817.50	Dystrophin
2D-6	unknown	unknown	Syne-11( fragment )
2D-7	7.97	15112.20	13days embryo liver cDNA , riken full-length enriched library , clone : 2510040p05 , full insert sequence. Hbb-b1

注 : 以上均为匹配 4 个肽段的鉴定结果

2185、2194、2273、2289 和 2384。如果不去除这些峰值数据,会使检索结果产生很大的偏差,其影响在酶消化的蛋白质量较少时尤为显著。二是所选峰值数据应尽量多地包含那些蛋白质含量相对较高的肽段,当蛋白质样品纯度不高或稍有降解时这点就显得尤其重要。

通过检索,我们初步鉴定了 7 个表达有差异的蛋白质,分别是 II 型胶原前体短的异构体、VINCULIN、核受体共抑制因子 1、 $\alpha$ -2-巨球蛋白亚基、dystro-

phin、SYNE-1B 片段、HBB-B1。其中存在于 *Smad3*<sup>ex8/ex8</sup> 小鼠血清中的 II 型胶原前体比 *Smad3*<sup>+/+</sup> 小鼠中少近 3 倍。已知 II 型胶原是在软骨细胞外基质中特异表达的蛋白质,血清中 II 型胶原前体是指软骨修复的标记分子之一<sup>[5]</sup>,它的减少会使软骨的修复作用不能顺利完成,这可能是造成 *Smad3*<sup>ex8/ex8</sup> 小鼠退行性软骨丧失的原因之一。VINCULIN 是一个与细胞粘附作用有关的蛋白质,细胞在高粘附基质条件下培养可以诱导 Vinculin 基因的

表达,骨关节炎表现为关节基质成分的减少<sup>[6]</sup>,而生长激素可以上调 Vinculin 基因的表达<sup>[7]</sup>,Vinculin 基因表达下降与 *Smad3*<sup>ex8/ex8</sup> 小鼠生长迟缓是一致的。核受体共抑制因子 1 (N-COR1)通过促进染色体浓缩来介导一些核受体的转录抑制活性,从而阻止转录的进行<sup>[8]</sup>。N-COR1 在 *Smad3*<sup>ex8/ex8</sup> 小鼠中减少了 7 倍以上,推测可能与软骨细胞异常分化密切相关。SYNE-1B 蛋白是 2000 年刚发现的一个蛋白质,广泛存在于骨骼肌、平滑肌和心肌中。可能参与肌核(Myonuclei)在肌管中的迁移<sup>[9]</sup>。*Smad3*<sup>ex8/ex8</sup> 小鼠中这一蛋白质浓度比野生型小鼠高出近 300 倍。这些分子在骨关节炎发生中的作用以及是否可能用作骨关节炎的早期诊断指标尚有待于进一步的研究。

## REFERENCES (参考文献)

- [1] Brandt K D, Slemenda C W. Osteoarthritis A Epidemiology, pathology and pathogenesis. Primer on the rheumatic diseases. In Schumacher, H. R. Jr.(ed), Tenth edition. *The Arthritis Foundation*, Atlanta, Georgia, 1993, pp. 184 ~ 188
- [2] Yang X, J J Letterio R J *et al.* Targeted disruption of *Smad3* results in impaired mucosal immunity and diminished T cell responsiveness to TGF-beta. *EMBO (Eur Mol Biol Organ)*

*J*, 1999, **18**: 1280 ~ 1291

- [3] Yang X, Chen L, Xu X L *et al.* TGF-beta/*Smad3* signals repress chondrocyte hypertrophic differentiation and are required for maintaining articular cartilage. *J Cell Biol*, 2001, **153**: 35 ~ 46
- [4] WANG J L(王京兰), WAN J H(万晶宏), LUO L(罗凌) *et al.* Development and preliminary application of a peptide mass fingerprinting technique in proteome research. *ACTA Biochimica et biophysica sinica(生物化学与生物物理学报)* 2000, **32**(4): 373 ~ 378
- [5] Bleasel J F, Poole A R, Heinegard D *et al.* Changes in serum cartilage marker levels indicate altered cartilage metabolism in families with the osteoarthritis-related type II collagen gene COL2A1 mutation. *Arthritis Rheum*, 1999, **42**(1): 39 ~ 45
- [6] Rodriguez Fernandez J L, Geiger B *et al.* Suppression of vinculin expression by antisense transfection confers changes in cell morphology, motility, and anchorage-dependent growth of 3T3 cells. *J Cell Biol* 1993, **122**(6): 1285 ~ 1294.
- [7] Guller S, Corin R E, Yuan-Wu K *et al.* Up-regulation of vinculin expression in 3T3 preadipose cells by growth hormone. *Endocrinology*, 1991, **129**(1): 527 ~ 533
- [8] Hoerlein A J, Naeaeer A M, Heinzl T *et al.* Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature*, 1995, **377**: 397 ~ 404
- [9] Elizabeth D, Apel, Renate *et al.* Syne-1, A Dystrophin-and Klar-sicht-related Protein Associated with Synaptic Nuclei at the Neuromuscular Junction. *J Biol Chem*, 2000, **275**: 31986 ~ 31995

## Analysis of the Proteomic Changes of the Serum of the *Smad3* Targeted Deficient Mice

HAO Zhen-Ming<sup>1</sup> YANG Xiao<sup>1\*</sup> YING Wan-Tao<sup>2</sup> WANG Jie<sup>2</sup> QIAN Xiao-Hong<sup>2</sup> HUANG Cui-Fen<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(Genetic Catoratory of Development and Diseases, Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

<sup>2</sup>(National Center of Biomedical Analysis, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

**Abstract** We have studied the proteomic changes of the serum of the *Smad3* targeted deficient mice using 2-DE and PMF approaches. 7 proteins expressed at different level in wild type mice and the *Smad3* deficient mice were identified. These results would benefit the research on diagnosis and therapy of osteoarthritis and provided clues to studing the important function of *Smad3* mediated TGF- $\beta$  signals during the skeletcal development.

**Key words** *Smad3*, 2-DE, PMF, osteoarthritis

Received: 12-19-2001

This work was supported by Grants from the National Natural Science Foundation of China(No.39970413), the Youth Fund of National Science Foundation of China(No.30025028) and State 863 High-Technology R&D Project(No.2001AA216081).

\* Corresponding author. Tel: 86-10-63895937; E-mail: Yangx@nic.bmi.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>