

应用蛋白质组学的方法筛选胰腺干细胞标记物*

杨明¹⁾ 王春友^{1)**} 刘涛¹⁾ 汪洋²⁾ 刘炜²⁾ 黎明涛²⁾

¹⁾ 华中科技大学同济医学院附属协和医院胰腺外科中心, 武汉 430022;

²⁾ 中山大学医学院蛋白质组学实验室, 广州 510089)

摘要 探索利用蛋白质组学的方法筛选胰腺干细胞的标记物. 通过大鼠胰腺大部分切除 (Px) 的方法建立胰腺增生模型, 采用双向电泳 (2DE) 分离比较 Px 术后第 3 天大鼠增生胰腺组织与假手术 (Sx) 非增生胰腺组织蛋白质的表达谱差异, 用基质辅助激光解吸离子化飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 和肽质量指纹图谱 (PMF) 的方法对差异蛋白进行鉴定, 进一步经生物信息学检索, 筛选与胚胎发育和细胞分化相关的蛋白质分子. 蛋白质印迹分析蛋白质 HSP47、Vimentin 在 Px 大鼠胰腺组织中的表达, 以验证 2DE 的结果. 2DE 显示 Sx 和 Px 大鼠胰腺组织平均蛋白质点数分别为 $(1\ 369 \pm 31)$ 和 $(1\ 315 \pm 28)$ 个, 其中共有 91 个蛋白质点出现 1.5 倍以上的表达差异. 所有差异蛋白质点 PMF 鉴定出 53 种蛋白质, 其中 Vimentin, cytokeratin 8 (CK8), lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin), heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 (hnRNP A2/B1) 和 L-arginine: glycine amidinotransferase (AGAT) 与胚胎发育和细胞分化有关, 这些蛋白质可能是胰腺干细胞潜在的候选标记物. 总之, 蛋白质组学的方法利用其高通量的特点能有效发现潜在的胰腺干细胞生物学标记物.

关键词 蛋白质组学, 胰腺干细胞, 胰腺增生, 分子标记物, Vimentin

学科分类号 Q26

糖尿病发病是因为有功能的胰腺 β 细胞的数量相对或绝对不足, 通过 β 细胞替代的方法可以补充 β 细胞的数量而治疗糖尿病. 胰岛移植因供体来源困难使得其在临床应用受到限制, 另外 β 细胞作为一种终末分化细胞其在人体内的增殖能力非常有限, 所以胰腺干细胞作为获取足量 β 细胞的潜在“种子”细胞, 成为研究的热点. 但是目前尚未明确什么是真正的胰腺干细胞, 关键是因为还不能确定胰腺干细胞的特异性表面标记^[1]. 研究发现, 成年大鼠胰腺大部分 (约 90%) 切除 (Px) 后, 确实出现有胰腺增生, 并且在增生早期发现有几种胚胎期胰腺发育起调节作用的因子 (PDX-1、NGN3 等) 又出现了高表达. 所以认为, 新生的 β 细胞来源于干细胞, 并且在其活化、增殖和定向分化过程中伴随有特征性的、标志着细胞原始表型的蛋白质分子的表达变化, 而这些蛋白质分子则可能成为潜在的成体胰腺干细胞的标记物^[2~4]. 蛋白质组学以双向电泳和质谱分析为技术平台, 具有高通量的特点, 对分析蛋白质表达差异、发现新的蛋白质信息、筛选干细胞标记物具有独特的作用^[5]. 本研究通过 Px 建立大鼠增生模型, 于增生早期 (术后第 3 天) 提取

胰腺组织蛋白质, 与假手术 (Sx) 非增生大鼠胰腺组织进行差异蛋白质组学分析, 初步筛选与胚胎发育和细胞分化相关的蛋白质作为潜在的胰腺干细胞标记物, 为下一步研究提供实验基础.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物. SPF 级雄性 Wistar 大鼠 (150~160 g) 共 24 只 (购自中山大学医学院动物实验中心), 随机分成手术组 (Px) 和假手术组 (Sx) (每组 12 只), 22℃ 环境中喂养, 光线充足, 饮水不限, 食物定量.

1.1.2 试剂. 蛋白质定量试剂盒 (2D Quant Kit), 24 cm IPG 胶条 (pH 3~10 non-linear (NL)), IPG 缓冲液干胶条覆盖油 (DryStrip Cover Fluid), 尿素,

*国家自然科学基金资助项目 (30571817) 和广东省科学技术厅重点攻关项目 (2003A3080402).

** 通讯联系人.

Tel: 027-85726273, Fax: 027-85726830

E-mail: chunyouwang52@126.com

收稿日期: 2005-11-30, 接受日期: 2006-01-28

CHAPS, SDS, Tris, 丙烯酰胺, 甲叉双丙烯酰胺, TEMED, 过硫酸铵, 三氟乙酸甘油, 甘氨酸, 溴酚蓝, 琼脂糖, DTT 分子质量蛋白质标记物, 考马斯亮蓝 R-250, 玻璃板处理剂 (Bind-Silance) 均为瑞典 Amersham Biosciences 公司产品; 硫脲, 碘乙酰胺, 碳酸氢铵, PMSF, 基质 α - 氰基 -4- 羧基肉桂酸为美国 Sigma 公司; Contrad 70 去污剂为美国 DECON 公司产品; 乙腈, 甲醇为美国 Fisher 公司产品; 测序级胰蛋白酶为美国 Promega 公司产品; aprotinin、leupeptin 及 pepstatin 购自武汉凌飞公司; 抗 HSP47 单克隆抗体购自 Stressgen 公司; 抗 Vimentin 单克隆抗体购自 Sigma 公司; 辣根酶标记的羊抗鼠及羊抗兔 IgG 购自 PIERCE 公司; β -actin 抗体购自 Santa Cruz 公司。

1.1.3 仪器. 等电聚焦电泳系统 (Ettan IPGphor II), 大型垂直电泳系统 (Ettan DALTsix), 图像扫描仪 (Imagescanner II), 图像分析软件 (ImageMaster 2D Platinum 5.0), 全自动斑点处理系统 (Ettan Spot Handling Workstation), 基质辅助激光解析离子飞行时间质谱仪 (Ettan MALDI-TOF Mass Spectrometry) 及 MALDI EVALUATION V2.0 软件均为瑞典 Amersham Biosciences 公司产品; 台式高速冷冻离心机为德国 Eppendorf 公司产品; 血糖仪为强生稳豪公司产品; DU530 核酸 / 蛋白质分析仪为美国 Beckman 公司产品; PC-420 磁力加热搅拌器为美国 CORNING 公司产品; Milli-Q 超纯水系统为美国 Millipore 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 动物模型建立. 大鼠术前禁食 12 h, 禁水 4 h, 10%水合氯醛腹腔内注射麻醉, 固定, 消毒, 铺巾, 开腹。Px 参照 Bonner-Weir 等^[6]的方法作了少许更改, 切除脾脏、胰腺体尾及部分胰头部, 仅保留十二指肠降部与胰胆管之间的胰腺组织, 切除的胰腺组织称重。假手术组行脾脏切除及十二指肠结肠韧带的分离术。建模后 72 h 处死动物, 获取手术组的全部残余胰腺组织, 并称重; 假手术组切取与手术组残余胰腺对应解剖部位的胰腺组织作对照。

1.2.2 大鼠血糖水平的测定. 所有大鼠术后给予正常饮食。手术当天及术后第 1、2、3 天断尾取血, 血糖仪测量血糖。于术后第 3 天, 麻醉下, 获取胰腺组织样品后, 经颈动脉穿刺, 取动脉血 (1.0 ml) 置于肝素化的试管, 离心后取血清 10 μ l, 氧化酶

法测动脉血糖。

1.2.3 组织总蛋白质的制备. 将用于 2DE 分析的小鼠 (每组 6 只) 胰腺组织样品分别独立提取全蛋白质, 用于双向电泳分析。提取方法如下: 组织样品在冰上剪成碎片后溶于 300 μ l 裂解液 (7 mol/L 尿素, 2 mol/L thiourea, 2% CHAPS, 20 mmol/L Tris, 5 mmol/L 三丁基磷 (TBP), 0.5% IPG 缓冲液 pH3~10NL, 0.6 mmol/L PMSF), 再使用内切式匀浆机彻底破碎组织, 随后超声处理 15 次。于室温下放置 15 min 待蛋白质充分溶解后, 4 $^{\circ}$ C, 20 000 g 离心 30 min。吸取上清液体约 280 μ l, 室温放置 1.5 h 使 TBP 充分作用后, 加入 20 mmol/L 碘乙酰胺 (IAA) 室温下避光反应 1.5 h。缓慢加入 4 倍体积 -20 $^{\circ}$ C 预冷的丙酮, 震荡后置 -20 $^{\circ}$ C 沉淀过夜。样品 4 $^{\circ}$ C、12 000 g 离心 15 min, 去上清, 风干。重溶于 200 μ l 再水化液 (7 mol/L 尿素, 2 mol/L thiourea, 2% CHAPS, 0.5% IPG 缓冲液 pH3~10NL, 0.002% 溴酚蓝), -80 $^{\circ}$ C 保存。取 5 μ l 样品, 2D Quant Kit 测定样品蛋白质浓度, 并据此确定蛋白质上样量。

1.2.4 固相 pH 梯度双向凝胶电泳 (2DE). 按 Görg 等^[7]报道的方法, 第一向电泳 (IEF, 等电聚焦) 采用 24 cm、pH3~10NL IPG 胶条, 上样量 600 μ g, 进行等电聚焦至 80 000 Vh, 第二向 SDS-PAGE。将在平衡缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8, 6 mol/L 尿素, 30%甘油, 2% SDS, 0.002% 溴酚蓝) 中平衡 25 min 后的 IPG 胶条放置在二向胶的上缘, 用 0.5% 琼脂糖密封。电泳参数设置: 第一步 2.5 W/ 胶, 30 min; 第二步 17 W/ 胶, 5 h, 当溴酚蓝跑至胶底缘时电泳结束。凝胶采用考马斯亮蓝染色。

1.2.5 图像分析. 通过 Imagescanner II 扫描仪以及 LabScan 扫描软件进行扫描获取图像, 利用 ImageMaster 2D Platinum 5.0 分析软件对图像进行强度校正、点检测、匹配、比较差异等分析。

1.2.6 蛋白酶解及质谱鉴定. 所有 91 个差异点在 Workstation 进行全自动斑点切割, 胶内酶解、肽段提取、基质混合及点靶过程。将制备好的点样板置于 Ettan MALDI-TOF Mass Spectrometry 仪上进行分析, 质谱使用胰蛋白酶自动降解离子峰作为内部标准校正, 获得了肽质量指纹图。

1.2.7 数据库查询. 通过 MALDI EVALUATION V2.0 软件在 NCBI nr 数据库中进行搜寻^[8]。相应参数设置为: 肽质量指纹图中的肽片段质量选择在

800~4 000 u 范围, 半胱氨酸为脲甲基半胱氨酸(carbamidomethyl-Cys), 每个肽允许有 1 个不完全裂解位点, 最少匹配肽片段数为 5, 物种来源选择鼠, 离子选择[MH]⁺ 和 Monoisotopic, 另根据需要调整参数.

1.2.8 蛋白质印迹分析胰腺组织蛋白质 HSP47、Vimentin 的表达水平. 为验证 2DE 结果的可靠性, 任意选取差异表达蛋白质 HSP47 及 Vimentin 进行蛋白质印迹 (Western blotting) 分析. 大鼠 (每组 4 只) 胰腺组织样品于匀浆器, 加入蛋白质提取液 (40 mmol/L Tris-HCl pH 7.0, 1% Triton X-100, 0.2% SDS, 1.0 mmol/L 脱氧胆酸钠, 0.6 mmol/L PMSF, 1.0 mmol/L EDTA, 1.0 mmol/L EGTA, 2.0 mg/L 的 aprotinin、leupeptin 及 pepstatin), 冰上匀浆. 于 4 °C, 12 000 g 离心 10 min, 取上清, 取 10 μl 用 Bradford 法测定蛋白质浓度, 其余置于 -80 °C 备用. 用前加 2× 样本缓冲液并混匀, 于 100 °C 变性 5 min. 在具有 10 道双垂直电泳槽内每孔内加入 40 μg 蛋白质, 12% SDS-PAGE 电泳, 结束后全湿转至 NC 膜. 摇床上 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 杂交一抗, 4 °C 过夜. PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min. 杂交二抗, 室温摇床上 1 h, PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, DAB 试剂盒显色. 运用 BandScan V5.0 软件对免疫反应条带进行定量分析.

1.2.9 资料用 SPSS V10.0 数据处理软件包进行统计学处理. 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间均数比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著意义.

2 结 果

2.1 动物模型特征指标

Px 组大鼠被切除的胰腺组织为 (0.89 ± 0.02) g, 术后第 3 天从每只 Px 大鼠获取的全部残余胰腺组织为 (0.091 ± 0.005) g, 切除胰腺平均占全部胰腺组织的 90.72%. 术后大鼠均存活至第 3 天. 术后第 1、2、3 天, Px 大鼠静脉血糖逐步升高 (图 1a). Px 术后第 2、3 天尾静脉血糖值 ($D_2 = 6.13$ mmol/L; $D_3 = 6.53$ mmol/L) 均高于 Sx 组 ($D_2 = 5.17$ mmol/L; $D_3 = 5.23$ mmol/L) (均 $P < 0.001$). 术后第 3 天, Px 组动脉平均血糖水平 (15.75 mmol/L) 明显高于 Sx 组 (8.44 mmol/L) ($P < 0.001$) (图 1b).

2.2 双向电泳

分别抽提大鼠非增生以及增生胰腺组织的蛋白

质进行 2DE 分离, 考马斯亮蓝染色, 且每组中选取不同的个体样品重复 6 次, 从每组胶中筛选出分辨率、重复性均较高的胰腺组织 2DE 图谱各 3 张, 用 ImageMaster 2D Platinum 5.0 software 进行差异表达分析. 匹配蛋白质点平均表达量的比值, 即 ratio 值, 反映蛋白质的表达变化. Sx 组凝胶蛋白质点数为 ($1\,369 \pm 31$) 个, Px 组蛋白质点为 ($1\,315 \pm 28$) 个. 平均表达量差异在 1.5 倍以上的蛋白质点有 91 个. 图 2 是 Sx 术后 (a) 和 Px 术后 (b) 第 3 天的 2DE 考马斯亮蓝染色凝胶图, 它显示了从胰腺组织分离的蛋白质点.

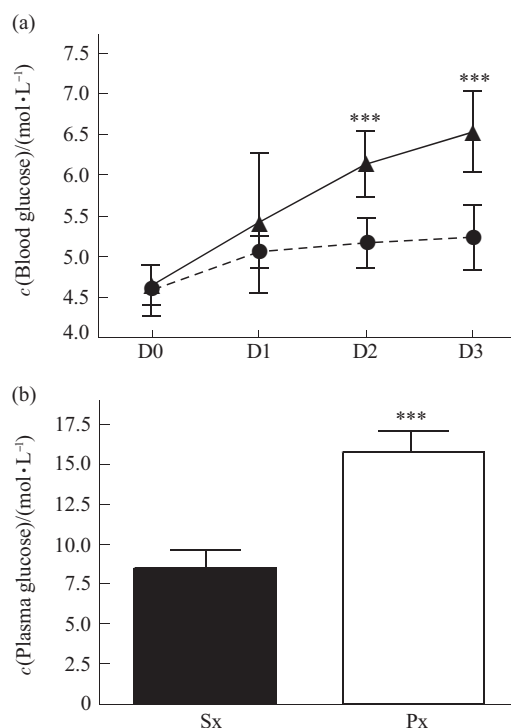


Fig. 1 Effects of partial (90%) pancreatectomy (Px) on non-fasting blood glucose (a) and plasma glucose levels (b)

Test group rats got Px and control group rats ($n = 12$ in each group) got a sham operation (Sx). For measure of non-fasting blood glucose and plasma glucose level, blood samples were taken from snipped tails and arteria carotis, respectively. Non-fasting blood glucose levels (a) were measured by a blood sugar meter in Sx (●—●) and Px (▲—▲) rats according to time after operation: day 0 (D0), D1, D2 and D3. Plasma glucose concentrations (b) were measured by the glucose oxidase method on the 3rd day after operation. Results are given as ($\bar{x} \pm s$). Significant differences between glucose concentrations on the same day (D2 and D3) after operation in Px rats relative to Sx rats are indicated by *** $P < 0.001$.

2.3 蛋白质质谱鉴定及胰腺干细胞标记物的筛选

所有的 91 个表达量差异在 1.5 倍以上的蛋白质点进行质谱分析. 为了提高质谱的灵敏度, 每组样品中对应的蛋白质斑点同时切下混合, 以增加待鉴定蛋白质的量. 所有 91 个蛋白质点中有 89 个获得了完整的指纹图谱. 进一步的数据库检索中, 有 68 个蛋白质点被成功鉴定得到相应的蛋白质 (结果

未列出). 在上调的蛋白质点中有一个蛋白质点被鉴定为 HSP47 (图 2). 有些不同的点被鉴定为相同的蛋白质, 总共有 53 种不同的蛋白质被鉴定出. 通过进一步的生物信息学分析, 从这 53 种蛋白质中筛选到与胚胎发生和细胞分化相关的蛋白质有 5 种, 分别为表达上调的 Vimentin, L-plastin, CK8, hnRNP A2/B1 和表达下调的 AGAT (表 1, 图 2).

Table 1 List of identified proteins associated with embryogenesis and cells differentiation

Spot ID	MS(m/z)				pVal	Name	NCBI ID	Coverage/%	pI	M/ku	Ratio
A	906.481,	1046.566,	1081.555,	1093.552,	0	vimentin	gi 14389299	45	5.1	53.71	6.75
	1121.655,	1125.639,	1254.605,	1295.719,							
	1296.666,	1309.643,	1490.762,	1533.877,							
	1539.971,	1570.931,	1587.819,	1661.988,							
	1688.848,	1704.923,	1734.844,	1750.817,							
	1836.802,	2200.952,	2233.079,	2283.175,							
	2324.082										
B	2638.605,	2463.327,	2135.896,	1815.919,	0.002	L-plastin	gi 34875362	13.9	5.9	80.27	3.03
	1773.866,	1757.904,	1741.856,	1689.871,							
	1459.8,	1234.666,	1135.584,	1126.67,							
	1117.622,	1069.609,	1012.577,	994.551,							
	970.528										
C	2108.852,	2018.762,	1797.797,	1531.765,	0.001	CK8	gi 203734	21.2	5.5	52.69	3.54
	1497.579,	1419.71,	1358.679,	1348.629,							
	1341.706,	1093.5,	1030.604,	928.412							
D	1031.484,	1097.599,	1128.656,	1178.639,	0	AGAT	gi 13591949	38.3	7.2	48.22	0.58
	1226.647,	1242.645,	1259.68,	1342.695,							
	1375.747,	1560.81,	1596.832,	1632.867,							
	1671.795,	1687.765,	1707.945,	1927.953,							
	1950.885,	1962.952,	2064.976,	2169.072,							
	2283.308,	2364.117,	2394.111,	2504.912,							
	2716.599,	3080.342									
E	912.324,	1013.519,	1087.516,	1110.495,	0	hnRNP A2/B1	gi 34855868	49.6	8.7	35.99	2.1
	1163.741,	1188.578,	1221.582,	1248.601,							
	1311.004,	1314.095,	1377.675,	1397.676,							
	1410.739,	1491.693,	1493.768,	1677.806,							
	1695.776,	1718.784,	1798.924,	1879.968,							
	1926.997,	2008.004,	2081.835,	2132.663,							
	2189.902,	2220.026,	2282.01,	2638.575,							
	3387.372,	3418.401,	3435.475,	3467.861							

Spot ID were defined according to spot positions in 2D gel indication as in Figure 1. MS: Peptide masses of protein spots digested by trypsin. pVal: The possibility that the observed match is a random event. Name: Name of each matched protein in NCBI database. NCBI: NCBI database accession number. Coverage: Percent of identified sequence to the complete sequence of the known protein. pI: Theoretical isoelectric point of the matching protein. M: Theoretical molecular mass of the matching protein in ku. Ratio: The ratio of average volume of each spot in Px pancreas to Sx pancreas.

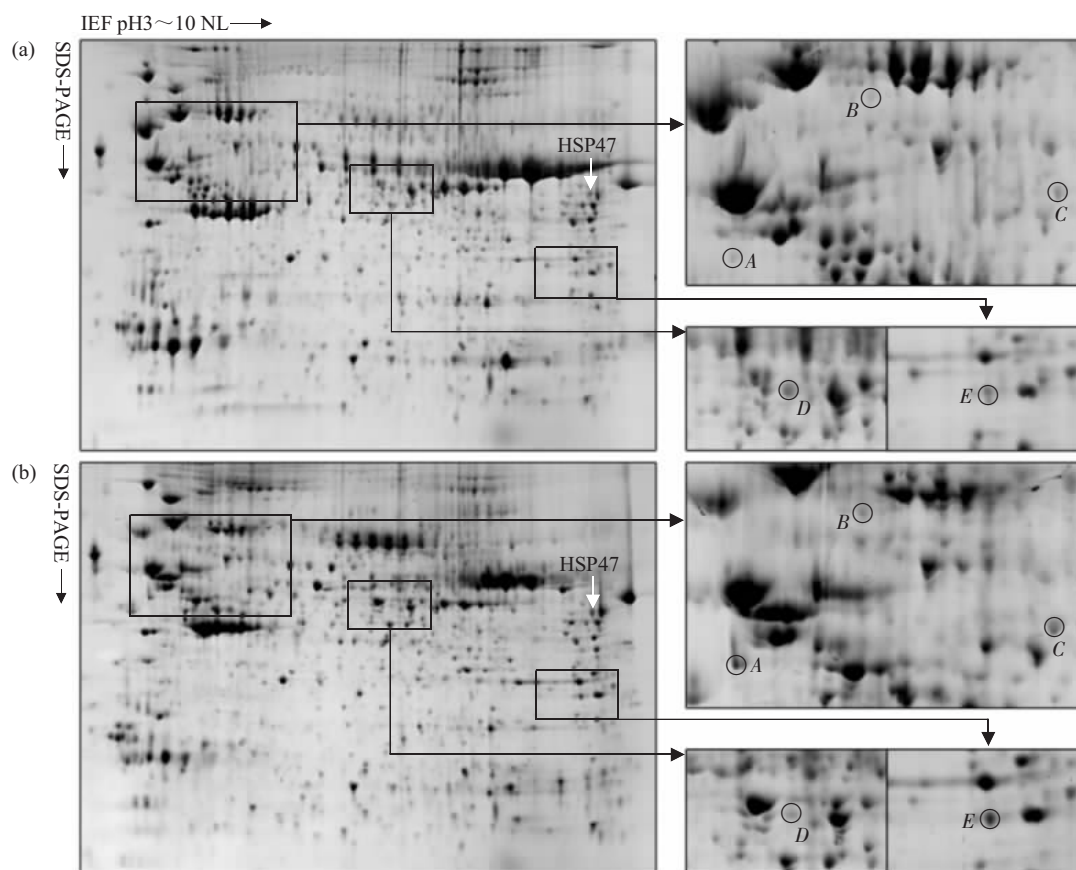


Fig. 2 Representative Coomassie blue-stained 2DE gels loaded with extracts of Sx (a) and Px (b) rats' pancreas tissues

The differential expression spots were detected with ImageMaster 2D Platinum 5.0 software. 91 spots displayed a significant and at least 1.5-fold change in abundance. One of up-regulated proteins in Px pancreas tissue was identified as HSP47 by MS (white arrows). Circles indicate some of up-expressed (A, B, C and E) and down-expressed (D) proteins in Px pancreas comparing with Sx on the images from 2D-PAGE focusing on corresponding areas that contain them (see Table 1).

2.4 蛋白质印迹分析 HSP47 及 Vimentin 蛋白质的表达

为验证双向电泳分析的准确性, 任意选取差异表达蛋白质 HSP47 和 Vimentin 作进一步的蛋白质印迹分析 (图 2, 3). 结果显示在术后第 3 天 Px 大鼠的 HSP47、Vimentin 表达量较 Sx 大鼠升高 ($P < 0.001$), 其平均表达量的比值分别为 2.14 及 2.76, 与双向电泳分析结果 (比值分别为 2.8 及 6.75) 基本一致 (图 3).

3 讨 论

大鼠胰腺大部分切除模型被广泛引用到胰腺相关疾病的研究. 其通过手术方式, 制造出 β 细胞不足状态, 从而导致胰岛素分泌不足, 大鼠机体则通过反应性刺激胰腺增生, 新生 β 细胞来满足机体

需要. 本研究中大鼠胰腺平均被切除 90.75%. 术后静脉血糖呈现为上升趋势, 并且在 Px 术后第 2、3 天血糖明显高于对照组, 但测得的绝对静脉血糖升高并不是很明显. 进一步采用氧化酶法测动脉血糖显示血糖明显升高, 因而 Px 方式能有效造成胰岛素的绝对缺乏, 达到刺激大鼠残余胰腺增生的目的.

蛋白质组学其高通量的特点为筛选干细胞标记物提供了强有力的工具. 本研究在组织水平进行差异蛋白质组学研究, 获取了胰腺增生早期的蛋白质表达变化谱. 筛选差异蛋白质 HSP47 及 Vimentin, 用蛋白质印迹方法, 研究其在 Px 及 Sx 大鼠胰腺中的表达, 发现其与双向电泳分析的结果一致 (图 3), 从而验证了双向电泳分析结果的可靠性.

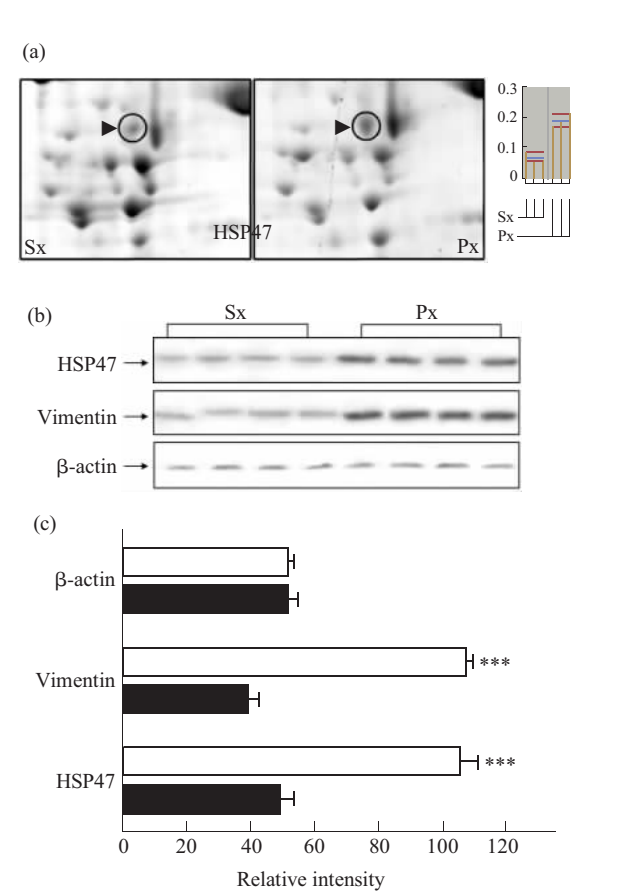


Fig. 3 Analysis of differential expression protein HSP47 and Vimentin

(a) 2DE analysis of a differential protein HSP47 by ImageMaster 2D Platinum 5.0 software. A histogram with the ratio 2.8 was supplied by the software, which indicated that an average expression ($n=3$) of HSP47 in Px rat was significantly higher than that in Sx rat. (b) (c) Western blotting analysis of candidate proteins HSP47 and Vimentin using β -actin as internal control between Sx and Px rats displayed a significant ($P < 0.001$) up-regulated change (2.14-fold and 2.76-fold respectively) in average abundance ($n=4$) in Px rats' pancreas. ■: Sx, □: Px.

本研究在 91 个差异表达蛋白质点中鉴定出了 53 种蛋白质, 通过生物信息学检索及相关蛋白质功能报道的分析, 筛选到 5 种与胚胎发育和细胞分化相关的蛋白质(表 1), 它们是上调的 hnRNP A2/B1、CK8、Vimentin、L-plastin 和下调的 AGAT. L-plastin 是一种肌动蛋白结合蛋白, 胚胎发育期, 从分化开始直到第 14.5 天, 肠上皮都表达 L-plastin, 但是在第 16.5 天时 L-plastin 表达消失^[9]. CK8 是多种脊椎动物发育早期和人类高增殖状态细胞中表达的主要角蛋白, 在 CK8 缺陷的转基因小鼠可出现胃肠道发育障碍而导致多种胃肠道疾病, 可见 CK8 与胃肠道的发育有关^[10~14]. Vimentin 在快速增殖的猪和人的胰腺导管细胞被诱

导表达, 而成熟的胰腺导管细胞不再有表达, 由此认为 Vimentin 是胰腺导管细胞处于低分化状态的一种标志物^[15~18]. hnRNP 是一组与 mRNA 成熟的蛋白质, 其成员之一 hnRNP A2/B1 的表达与胚胎期肺的发育有关, 至成体后, 肺中 hnRNP A2/B1 表达下调, 但在肺癌进展期又可出现高表达^[19, 20]. AGAT 在 Px 胰腺组织中表达出现下调. AGAT 是催化肌酸生物合成的关键酶之一, 也有研究表明其与早期胚胎发育有关, 其表达存在有时序性和空间位置的差异. 在胚胎发育期, AGAT 首先在胚孔周围表达, 随后则在神经胚的脊索表达^[21]. 本研究发现, 在 Px 术后第 3 天 AGAT 表达下调, 那么其在 Px 术后不同时间点的表达规律有待进一步的研究.

目前对大鼠胰腺大部分切除后, 新生 β 细胞的来源及胰腺干细胞存在有争议. 实验发现, 在大鼠 Px 后早期, 胰腺导管细胞出现有在胚胎期对胰腺发育有定向分化作用的转录因子 PDX-1 表达上调, 从而认为胰腺干细胞在 Px 术后早期活化, 并表达标志性的特殊分子, 因而有人认为 PDX-1 是胰腺干细胞的标记. 本研究选择大鼠胰腺大部分切除术后第 3 天(胰腺干细胞开始活化), 用差异蛋白质组学的方法对干细胞活化相关的蛋白质进行筛选, 寻找类似于 PDX-1 的胚胎发育调控分子. 实验初步筛选了数种表达发生变化的与胚胎发育或者细胞分化相关的蛋白质. 这些蛋白质出现表达变化, 可能是成熟细胞(功能干细胞)去分化出现原始表型的表现, 也可能是静止干细胞被激活的表征, 而这些蛋白质的表达变化也进一步支持了成体胰腺中存在有干细胞的理论. 另外, 筛选到的有些蛋白质, 以往并未见其在胰腺胚胎发育、胰腺增生及胰腺干细胞等方面的报道. 令人惊喜的是, 最近有文献报道认为 Vimentin 是胰腺干细胞的标记物^[16], 其正好也是本研究中被发现的差异表达蛋白质之一.

最近也有不少相似的报道, 通过手术方式减少正常组织和功能细胞后, 用蛋白质组学的方法研究组织或细胞增生的机制^[22, 23], 也有人通过蛋白质组学的方法研究胚胎干细胞的特性^[24, 25]. 本研究在成体组织水平研究成体干细胞的标记物, 并初步筛选出了 5 种可能的潜在标记物. 胰腺组织结构和生理功能复杂, 关于这些蛋白质的定位, 时序上的动态表达规律及功能学意义, 我们正在进行深入研究. 总之, 本研究为胰腺干细胞的研究提供了新的线索, 并且为干细胞研究在方法学上提供借鉴.

致谢 本研究承蒙华中科技大学同济医学院附属同济医院杨雁博士, 本校附属协和医院吕明良博士及同济医院内分泌实验室的大力支持, 在这里表示由衷的感谢!

参 考 文 献

- Bonner-Weir S, Sharma A. Pancreatic stem cells. *J Pathol*, 2002, **197** (4): 519~526
- Offield M F, Jetton T L, Labosky P A, *et al.* PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development*, 1996, **122** (3): 983~995
- Noguchi H, Kaneto H, Weir G C, *et al.* PDX-1 protein containing its own antennapedia-like protein transduction domain can transduce pancreatic duct and islet cells. *Diabetes*, 2003, **52** (7): 1732~1737
- 刘 涛, 王春友, 许逸卿, 等. 大鼠胰腺部分切除后导管细胞增殖规律研究. *中华实验外科杂志*, 2004, **21** (10): 1215~1216
Liu T, Wang C Y, Xu Y Q, *et al.* *Chinese Journal of Experimental Surgery*, 2004, **21** (10): 1215~1216
- Unwin R D, Gaskell S J, Evans C A, *et al.* The potential for proteomic definition of stem cell populations. *Exp Hematol*, 2003, **31** (12): 1147~1159
- Bonner-Weir S, Trent D F, Weir G C. Partial pancreatectomy in the rat and subsequent defect in glucose-induced insulin release. *J Clin Invest*, 1983, **71** (6): 1544~1553
- Görg A, Weiss W, Dunn M J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 2004, **4** (12): 3665~3685
- Zhang W, Chait B T. ProFound: an expert system for protein identification using mass spectrometric peptide mapping information. *Anal Chem*, 2000, **72** (11): 2482~2489
- Chafel M M, Shen W, Matsudaira P. Sequential expression and differential localization of I-, L-, and T-fimbrin during differentiation of the mouse intestine and yolk sac. *Dev Dyn*, 1995, **203** (2): 141~151
- Loranger A, Duclos S, Grenier A, *et al.* Simple epithelium keratins are required for maintenance of hepatocyte integrity. *Am J Pathol*, 1997, **151** (6): 1673~1683
- Jackson B W, Grund C, Schmid E, *et al.* Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. Intermediate filaments of the cytokeratin type and desmosomes in preimplantation embryos. *Differentiation*, 1980, **17** (3): 161~179
- Jackson B W, Grund C, Winter S, *et al.* Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. II. Epithelial differentiation and intermediate-sized filaments in early postimplantation embryos. *Differentiation*, 1981, **20** (3): 203~216
- Franke W W, Schiller D L, Moll R, *et al.* Diversity of cytokeratins. Differentiation specific expression of cytokeratin polypeptides in epithelial cells and tissues. *J Mol Biol*, 1981, **153** (4): 933~959
- Moll R, Franke W W, Schiller D L, *et al.* The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, 1982, **31** (1): 11~24
- Pagan R, Martin I, Alonso A, *et al.* Vimentin filaments follow the preexisting cytokeratin network during epithelial-mesenchymal transition of cultured neonatal rat hepatocytes. *Exp Cell Res*, 1996, **222** (2): 333~344
- Ko S H, Suh S H, Kim B J, *et al.* Expression of the intermediate filament vimentin in proliferating duct cells as a marker of pancreatic precursor cells. *Pancreas*, 2004, **28** (2): 121~128
- Casaroli-Marano R P, Pagan R, Vilaro S. Epithelial-mesenchymal transition in proliferative vitreoretinopathy: intermediate filament protein expression in retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, **40** (9): 2062~2072
- Bouwens L, Wang R N, De Blay E, *et al.* Cytokeratins as markers of ductal cell differentiation and islet neogenesis in the neonatal rat pancreas. *Diabetes*, 1994, **43** (11): 1279~1283
- Montuenga L M, Zhou J, Avis I, *et al.* Expression of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 changes with critical stages of mammalian lung development. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1998, **19** (4): 554~562
- Zhou J, Allred D C, Avis I, *et al.* Differential expression of the early lung cancer detection marker, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-A2/B1 (hnRNP-A2/B1) in normal breast and neoplastic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2001, **66** (3): 217~224
- Zhao H, Cao Y, Grunz H. Expression of xenopus L-arginine:glycine amidinotransferase (XAT) during early embryonic development. *Dev Genes Evol*, 2001, **211** (7): 358~360
- Strey C W, Winters M S, Markiewski M M, *et al.* Partial hepatectomy induced liver proteome changes in mice. *Proteomics*, 2005, **5** (1): 318~325
- Shin J S, Lee J J, Lee E J, *et al.* Proteome analysis of rat pancreas induced by pancreatectomy. *Biochim Biophys Acta*, 2005, **1749** (1): 23~32
- Hong O K, Suh S H, Kwon H S, *et al.* Proteomic analysis of differential protein expression in response to epidermal growth factor in neonatal porcine pancreatic cell monolayers. *J Cell Biochem*, 2005, **95** (4): 769~781
- Guo X, Ying W, Wan J, *et al.* Proteomic characterization of early-stage differentiation of mouse embryonic stem cells into neural cells induced by all-trans retinoic acid *in vitro*. *Electrophoresis*, 2001, **22** (14): 3067~3075

Screening Biomarkers of Pancreatic Stem Cells by Proteomics*

YANG Ming¹⁾, WANG Chun-You^{1)**}, LIU Tao¹⁾, WANG Yang²⁾, LIU Wei²⁾, LI Ming-Tao²⁾

¹⁾Department of Pancreatic Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College,

Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China;

²⁾Proteomics Laboratory, Zhongshan Medical College, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510089, China)

Abstract In order to examine potential molecular markers of pancreatic stem cells, a regeneration pancreatic model was induced by 90% partial pancreatectomy (Px) in rats. Changes in the protein expression in rat regeneration pancreas at 3rd day after Px, as comparing to sham surgery (Sx), were analyzed by using two-dimensional gel electrophoresis (2DE), mass spectrometry (MS), and peptide mass fingerprint (PMF) based on matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and database searching. HSP47 and Vimentin were analyzed in Px and Sx rat with Western blotting to confirm the results of 2DE. The average spots in gels for Sx and Px pancreatic tissues were $(1\,369 \pm 31)$ and $(1\,315 \pm 28)$, respectively. 2DE displayed 91 spots with at least 1.5-fold of differential expression at the time point of 3 days after pancreatectomy and 53 differentially expressed proteins were identified by PMF. Among them, Vimentin, CK8, L-plastin, hnRNP A2/B1 and AGAT are associated with embryogenesis and cells differentiation and may be new potential pancreatic stem cells markers. The proteome profiling technique provided a broad-based and effective approach for discovering potential biomarkers of pancreatic stem cells.

Key words proteomics, pancreatic stem cells, pancreatic regeneration, molecular markers, vimentin

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30571817) and The Natural Science Foundation of Guangdong Province (2003A3080402).

**Corresponding author . Tel: 86-27-85726273, Fax: 86-27-85726830, E-mail: chunyouwang52@126.com

Received: November 30, 2005 Accepted: January 28, 2006