

- 19 Cortals G L, Molloy M P, Herbert B R, *et al.* Prefractionation of protein samples prior to two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, 1997, **18** (3~4): 317~323
- 20 Coumans J V, Humphrey-Smith I, dos Remedios C G, *et al.* Two-dimensional gel electrophoresis of actin-binding proteins isolated by affinity chromatography from human skeletal muscle. *Electrophoresis*, 1997, **18** (7): 1079~1085
- 21 Murakami K, Lagarde M, Yuki Y. Identification of minor protein of human colostrum and mature milk by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, 1998, **19** (14): 2521~2527
- 22 Görg A, Bough G, Obermaier C. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis immobilized pH gradients in the first dimensional the state of the art and the controversy of vertical and horizontal systems. *Electrophoresis*, 1995, **16** (7): 1079~1086

Improvement of Two dimensional Gel Electrophoresis for Proteomics of Rat Central Nerve System.

ZHAO Cong-Jian, JIA Yu-Feng, DING Qian-Xue, QUE Hai-Ping, LIU Shao-Jun (*Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*); GUO Yao-Jun (*Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*).

Abstract Two-dimensional gel electrophoresis (2-

DE) is a key technique for proteomics. To analyze the proteome of PC12 cells and rat central nerve tissues, including brain and spinal cord, 2-DE technique is established. Due to much lipid and other non-protein interfering constituents, protein extraction is much more difficult for nerve tissues than for other tissues. Two different methods, i. e., precipitation with trichloroacetic acid/acetone and ultracentrifugation were employed to extract protein from rat brain and spinal cord for 2-DE. Other factors such as method and volume of loading sample, choice of IPG gels, concentration of SDS gels, preset of electric parameters, protocol for staining and drying the gels were also improved. Using the proper method described above, satisfactory 2-DE maps of PC12 cells, rat brain and spinal cord were obtained.

Key words proteome, two-dimensional electrophoresis, PC12 cell, central nerve system

选择性标记法及脂类信号转导途径的检测*

陈军松 宋建国¹⁾

(中国科学院上海生命科学研究院, 上海生物化学研究所, 分子生物学国家重点实验室, 上海 200031)

摘要 确定由脂类分子介导的信号转导途径和细胞内某些信使分子的生成及改变是信号转导研究领域中的一个重要组成部分。如确定不同磷脂酶活性的调控及细胞内不同来源的第二信使分子及其他脂类生物活性分子的生成与调节, 成为探讨生长因子或其他许多分子的生物效应及其作用机理的重要研究内容。为了增加人们对有关研究工作的了解及在方法上的选择, 介绍了研究脂类代谢信号转导中广泛运用的一个基本而重要的方法——选择性标记法, 并且以实际研究结果为例, 说明如何运用该方法检测不同的信号传递途径和有关信号分子的生成与变化。该法针对性强而灵活, 重复性高, 能有效地检测某些不同来源的信号传递分子的生成及其变化。此外, 对脂类代谢信号转导途径及对该途径的研究在信号转导领域的地位和意义也作了简要的介绍。

关键词 磷脂, 磷脂酶, 选择性标记法, 信号转导

学科分类号 O5-3. O545

在生物整个生命过程中, 细胞信号转导起着十分重要的作用。生物的生长、发育、衰老和死亡均与信号转导密切相关, 疾病的发生和发展常常是细胞信号转导途径发生了异常改变的结果。因此, 研究细胞信号转导不但有助于更深入地了解生命的本质, 还有助于从分子水平上发现各种威胁人类生命的重大疾病的发病机理并为寻找有效的治疗途径

和方法提供理论上的指导。近年来, 对细胞信号转导的研究已成为生命科学研究领域中的第一大热点。

* 国家自然科学基金资助项目 (39625007, 39870396)。

¹⁾ 通讯联系人。

Tel: (021) 64317660, E-mail: songj@sunm.shnc.ac.cn

收稿日期: 1999-10-25, 修回日期: 2000-04-03

目前已发现在细胞膜上存在着甘油磷脂 (glycerophospholipid) 代谢信号转导途径和鞘磷脂 (sphingomyelin, SPM) 代谢信号转导途径^[1~3]. 其中前者又包括磷脂酰肌醇磷酸 (phosphatidylinositol phosphates, PIPs) 信号转导途径^[4]和磷脂酰胆碱 (phosphatidylcholine, PC) 信号转导途径^[5]. 这些脂类信号途径在将胞外信号传入胞内的过程中起着非常重要的作用. 已发现它们可介导包括生长因子刺激、细胞转化、病原体感染、离子辐射、紫外照射、细胞凋亡、免疫反应等一系列生理及病理过程^[6~10]. 细胞内这些脂类信号转导途径相互之间及与其他信号途径之间还存在着一定的“对话” (crosstalk) 的关系, 一条信号途径的改变或某一种第二信使分子水平的变化可影响其他的信号途径及其有关信号传递分子的生成或活性的变化. 因此, 脂类信号转导在参与形成相互关联、相互制约的信号传递网络的过程中起着非常重要的作用^[11].

选择性标记是研究脂类信号转导的一个重要手段. 不同的放射性同位素分子可掺入或高度优先地掺入到不同的脂类分子中去, 根据这种特点, 使用不同的放射性同位素分子标记细胞, 便可达到追踪检测和分析不同信号传递分子生成与改变的目的. 有些同位素虽也同时掺入到细胞内其他的分子中去, 但是通过硅胶薄层层析分离的方法可以将其加以区分. 例如, ³H-豆蔻酸 (³H-myristate) 和 ³H-棕榈酸 (³H-palmitate) 主要掺入到磷脂酰胆碱中; ³H-花生四烯酸 (³H-arachidonate) 优先掺入到磷脂酰肌醇中^[12]; ³H-肌醇则完全掺入到磷脂酰肌醇中; 而 ³H-丝氨酸 (³H-serine) 则可快速掺入到鞘磷脂骨架中去. 选择性标记法灵敏、方便, 在信号转导研究中应用非常广泛. 本文把选择性标记法在检测信号转导途径的改变和第二信号分子的生成中的应用介绍给大家, 并借此对脂类代谢信号转导方面的内容做一简介.

1 材料和方法

1.1 材料

[³H]-myristic acid (4.625×10^{11} Bq/mmol), [³H]-arachidonic acid (3.7×10^{12} Bq/mmol) 和增感剂 (ENHANCE spray) 购自 New England Nuclear Life Science Products (Boston, MA, USA). [³H]-serine 和液闪剂 (Biodegradable counting scintillant) 购自 Amersham Life Science

(Buckinghamshire, UK). 甘油二酯标准物、PMA 和鞘磷脂酶 SMase 购自 Sigma (St. Louis, MO, USA). 磷脂酰丁醇 (phosphatidylbutanol, PBut) 标准物购自 Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). 表皮生长因子 EGF 购自 Calbiochem 公司. 正丁醇购自 Aldrich 公司. 薄层硅胶层析板 (TLC) 购自 Whatman 公司 (Clifton, NJ, USA).

1.2 细胞培养和同位素标记

A-431 细胞购自美国 ATCC 公司, 培养在含有 5% (体积比, 下同) 小牛血清、5% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 培养基中. 培养条件是: 温度控制在 37℃, 培养箱内充有饱和的水蒸气和 5% 的 CO₂. 当细胞在 60 mm 细胞培养皿中长至铺满培养皿表面的 80%~90% 时, 把培养基换成 1.5 ml 低血清浓度培养基 (含 1% 小牛血清及抗生素的 DMEM) 并继续培养 24 h 使细胞达到相对静止状态. 随后用 7.4×10^6 Bq [³H]-arachidonate 或 $1.11 \times 10^7 \sim 1.48 \times 10^7$ Bq [³H]-myristate 标记细胞 16 h, 或用 1.85×10^7 Bq [³H]-serine 标记细胞 4 h.

1.3 脂类分子的抽提

抽提方法如文献 [7] 所述. 试剂处理细胞后, 迅速倾去培养基, 快速用冰冷的 PBS 淋洗三遍后加入 0.6 ml 冰冷的终止液 (甲醇/6 mol/L HCl, 25:1, 体积比). 然后将细胞刮入 Eppendorf 管, 加入 0.6 ml 的氯仿和 0.2 ml 的 1 mol/L NaCl 进行抽提. 取有机相, 加入 0.6 ml 的 0.35 mol/L NaCl 和 0.2 ml 的终止液进行再抽提. 最后取有机相, 用氮气流吹干, 重新溶于少量的氯仿/甲醇 (9:1) 中.

1.4 信号分子的分离和测定

标记后的细胞用预温的 PBS 洗三次后, 用 1 ml 的无血清培养基 (含 0.5% 牛血清白蛋白的 DMEM) 在培养箱中继续温育 1 h. 随后按要求用试剂处理细胞. 对于要用转磷脂酰基反应测定磷脂酶 D 活性的实验, 先加入 0.35% 的正丁醇, 培养箱中温育 5 min 后再加入相应的药物处理. 然后如前面所述终止反应和抽提脂类. 抽提得到的脂类用以下的展层剂在硅胶薄层层析板上进行分离. a. 甘油二酯: 正己烷/乙醚/甲醇/冰乙酸 (90:20:3:2, 体积比). b. 磷脂酸和磷脂酰丁醇: 乙酸乙酯/异辛烷/冰乙酸/水 (90:50:20:100) 的上层液相. c. 神经酰胺: 氯仿/甲醇/冰乙酸 (94:2:4). 脂类标准

物同样品一起展层. 然后用碘染判定位置. TLC 板用增感剂喷过后进行放射自显影. 最后根据胶片的条带位置将 TLC 板上相应位置的硅胶刮入液闪瓶, 加入 500 μ l 甲醇和 2.5 ml 液闪剂 (BCS) 进行液闪计数.

2 结 果

2.1 磷脂酰肌醇信号途径的检测

当外界刺激作用于细胞, 通过不同的机制使细胞膜上的磷脂酶 C (phospholipase C, PLC) 和 (或) 磷脂酶 D (phospholipase D, PLD) 发生活化, 从而触发了磷脂酰肌醇和磷脂酰胆碱信号转导途径. 磷脂酰肌醇中的磷脂酰肌醇 4, 5-二磷酸 (phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate, PIP_2) 经磷脂酶 C 水解产生了两类重要的第二信号分子, 即甘油二酯 (glyceride, DAG) 和三磷酸肌醇 (inositol triphosphate, IP_3). 甘油二酯引起胞内蛋

白激酶 C (protein kinase C, PKC) 的活化, 触发 PKC 介导的有关信号转导途径. 三磷酸肌醇则促使胞内 Ca^{2+} 的释放, 从而触发钙离子介导的有关信号转导途径. 另外, 膜上磷脂中甘油骨架上由 C_2 位羟基形成的酯键可被活化的磷脂酶 A_2 (phospholipase A_2 , PLA_2) 水解生成游离的花生四烯酸 (arachidonic acid, AA). 花生四烯酸可被环加氧酶 (cyclooxygenase) 氧化而生成一类被称作类花生酸 (eicosanoid) 的生物活性分子 (包括 prostaglandins、prostacyclines、leukotriens 和 thromboxanes 等). 用 ^3H -花生四烯酸标记细胞, 试剂处理后提取脂类, 然后用 TLC 分离测定甘油二酯, 可以得知磷脂酰肌醇来源的甘油二酯水平的变化. 如图 1 所示用表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 处理 A431 细胞引起了甘油二酯的增加.

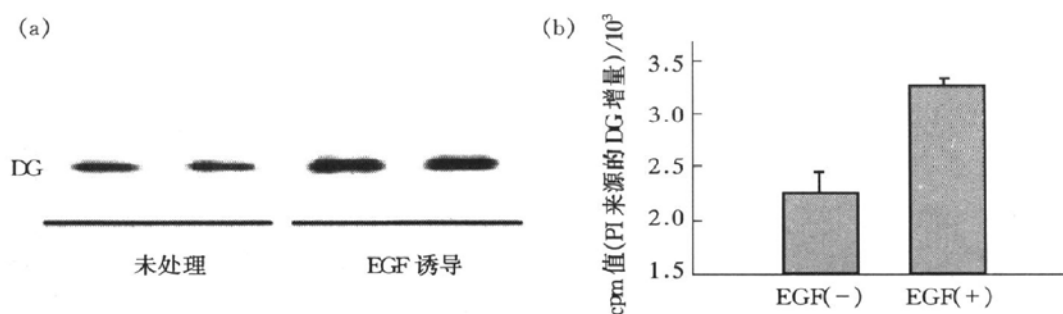


图 1 EGF 诱导的来源于 PIPs 的甘油二酯的生成

(a) 放射自显影结果的照相记录; (b) 图 (a) 条带放射性强度的液体闪烁计数结果的图示.

2.2 磷脂酰胆碱信号途径的检测

磷脂酰胆碱是构成细胞膜骨架的另一类磷脂分子. 与磷脂酰肌醇信号途径一样, 磷脂酰胆碱途径激活后也可增加胞内甘油二酯的水平, 即由磷脂酶 D 水解磷脂酰胆碱产生磷脂酸 (phosphatidic acid, PA) 和胆碱, 磷脂酸随后由磷脂酸磷酸水解酶 (phosphatidate phosphohydrolase, PAP) 作用生成甘油二酯, 从而引起蛋白激酶 C 的活化. 应注意这两条途径激活的蛋白激酶 C 种类有所不同. 另外磷脂酰胆碱来源的甘油二酯在细胞中能长时间地保持较高水平, 持续地活化蛋白激酶 C 从而持续地介导诸如细胞生长、分化等生物效应. 磷脂酸还可由甘油二酯经甘油二酯激酶作用生成. 磷脂酸也是具有生物活性的重要信号分子, 可以促进细胞的

生长. 另外, 磷脂分子经磷脂酶 A_2 催化水解还可产生溶血磷脂酸 (lysophosphatidic acid, LPA). 同磷脂酸一样, 溶血磷脂酸也是细胞增殖的促进剂. 但除此之外, 溶血磷脂酸还能提高胞内钙离子的水平. 溶血磷脂酸还具有自己的 G 蛋白偶联的受体. 磷脂酶 D 活性的检测可通过一个磷脂酶 D 活性的标志性反应——转磷脂酰基反应 (transphosphatidyl-lation reaction) 来进行. 在测定磷脂酶 D 活性时, 细胞培养基内加入伯醇 (如丁醇), 于是该伯醇取代了水作为亲核基团进攻磷脂酰胆碱上的磷酸酯键, 生成磷脂酰伯醇和胆碱. 磷脂酰伯醇在胞内很难被代谢, 因而很容易被检测到. 图 2 显示了磷脂酰胆碱途径中甘油二酯、磷脂酸和磷脂酶 D 活性的检测.

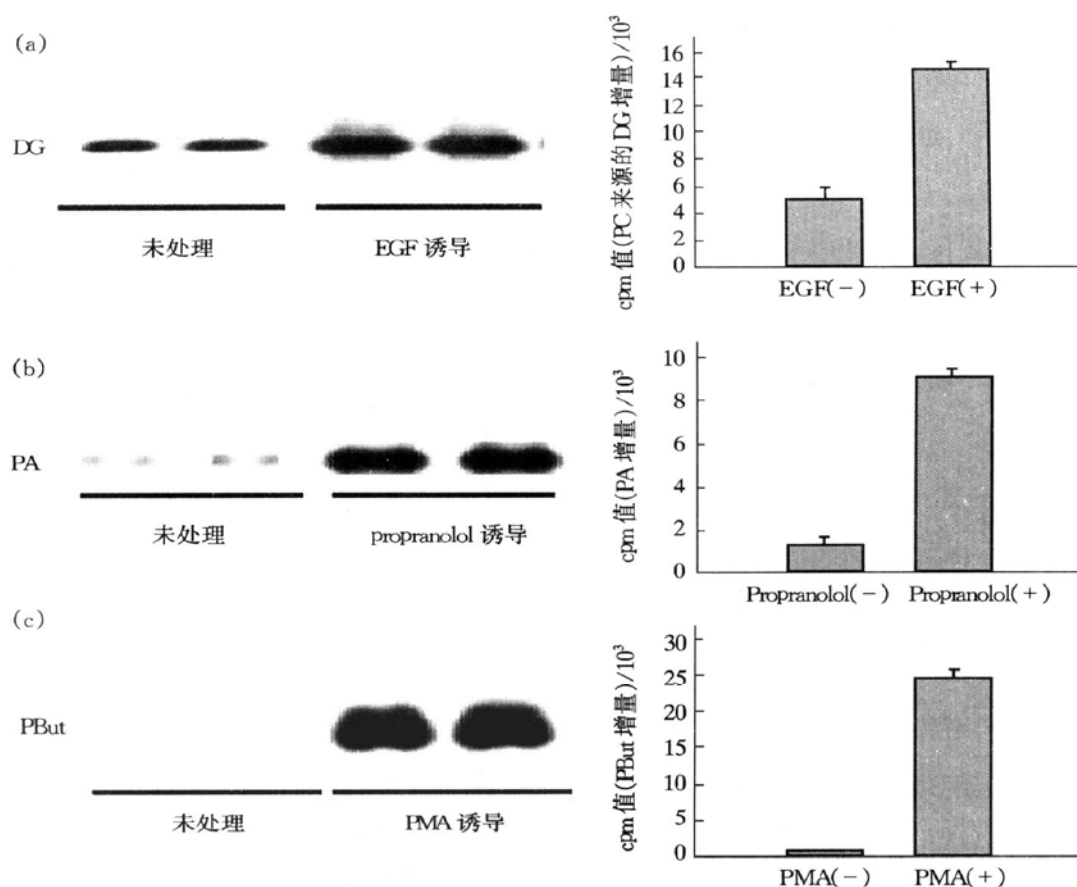


图2 磷脂酰胆碱信号途径的检测

(a) EGF 诱导的来源于磷脂酰胆碱的甘油二酯的生成; (b) 心得安 (propranolol) 诱导的磷脂酸水平的增加; (c) PMA 诱导的磷脂酶 D 活性的增加. 左边的图为放射自显影结果的照相记录; 右边为左边条带放射性强度的液体闪烁计数结果的图示.

2.3 鞘磷脂代谢信号途径的检测

该通路的触发是由胞外信号活化了细胞膜上的酸性或中性的鞘磷脂酶 (sphingomyelinase, SMase), 水解鞘磷脂产生神经酰胺 (ceramide). 越来越多的证据显示神经酰胺是诱导细胞发生凋亡 (apoptosis) 的第二信号分子, 被冠以“死亡信号分子”的称号. 许多文献显示由化学治疗药物、紫外照射、电离辐射、细胞因子及一些病原体等诱导

的细胞凋亡均由该脂类信号转导途径所介导. 由鞘磷脂的降解还可得到一系列重要的信号分子, 包括神经酰胺-1-磷酸 (ceramide 1-phosphate)、鞘氨醇 (sphingosine)、鞘氨醇-1-磷酸 (sphingosine 1-phosphate) 等. 它们均在细胞的生长、分化、衰老和死亡等过程中发挥着重要的生物学作用. 如图3所示, 用细菌来源的鞘磷脂酶 SMase 处理 A431 细胞, 引起胞内神经酰胺的水平大大增加.

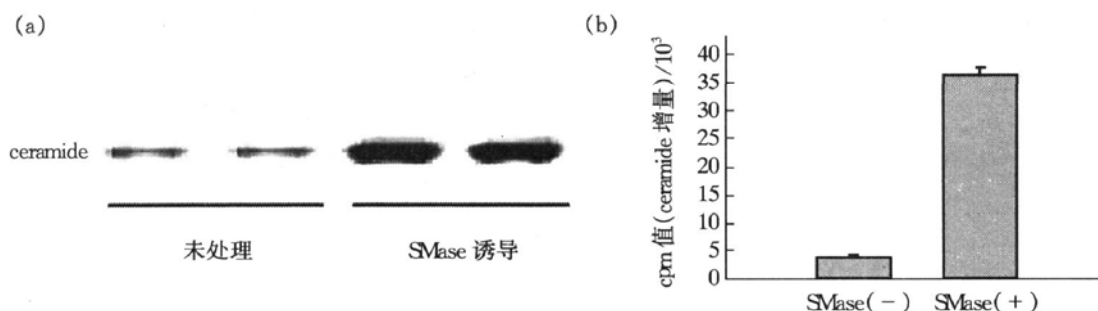


图3 来源于鞘磷脂信号途径第二信号分子神经酰胺水平的检测

(a) 放射自显影结果的照相记录; (b) 图 (a) 条带放射性强度的液体闪烁计数结果的图示.

3 讨 论

在用选择性标记法研究脂类信号通路时, 可使用不同的同位素来相互印证实验结果. 例如用³H-豆蔻酸标记得知某一刺激引起磷脂酰胆碱来源的甘油二酯增加时, 可以通过³H-胆碱标记然后检测细胞释放³H-胆碱的增加来印证该刺激确实引起了磷脂酰胆碱信号途径的活化. 相应的, 磷脂酰肌醇信号途径的活化除了通过用³H-花生四烯酸标记然后检测甘油二酯的增加来反映外, 也可通过用³H-肌醇标记然后检测三磷酸肌醇的增加来印证. 而³H-豆蔻酸和³H-丝氨酸均能掺入鞘磷脂的碳骨架, 由此降解而产生的神经酰胺因均带有同位素标记而可被检测到.

HPLC 也可用于分离检测脂类信号分子. 但由于选择性标记法简便、灵敏的特点, 在脂类信号转导的许多研究工作中得到广泛的应用, 成为信号转导研究领域中的一种十分重要的方法.

参 考 文 献

- 1 Berridge M J. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, 1993, **361** (6410): 315~ 325
- 2 Exton J H. Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. *Biochim Biophys Acta*, 1994, **1212** (1): 26~ 42
- 3 Hannun Y A, Bell R M. Functions of sphingolipids and sphingolipid breakdown products in cellular regulation. *Science*, 1989, **243** (4890): 500~ 507
- 4 Lee S B, Rhee S G. Significance of PIP₂ hydrolysis and regulation of phospholipase C isozymes. *Curr Opin Cell Biol*, 1995, **7** (2): 183~ 189
- 5 Exton J H. Signaling through phosphatidylcholine breakdown. *J Biol Chem*, 1990, **265** (1): 1~ 4
- 6 Hsuan J J, Tan S K. Growth factor-dependent phosphoinositide signaling. *Int J Biochem Cell Biol*, 1997, **29** (3): 415~ 435
- 7 Song J, Pfeffer L M, Foster D A. v-Src increases diacylglycerol levels via a type D phospholipase mediated hydrolysis of phosphatidylcholine. *Mol Cell Biol*, 1991, **11** (10): 4903~ 4908
- 8 Kolesnick R, Golde D W. The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling. *Cell*, 1994, **77** (3): 325~ 328
- 9 Verheij M, Bose R, Lin X H, *et al.* Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signaling in stress-induced apoptosis. *Nature*, 1996, **380** (6569): 75~ 79
- 10 Santana P, Pena L A, Haimovitz-Friedman A, *et al.* Acidic sphingomyelinase deficient human lymphoblasts and mice are

defective in radiation-induced apoptosis. *Cell*, 1996, **86** (2): 189~ 199

- 11 Foster D A. Intracellular signaling mediated by protein-tyrosine kinases: Networking through phospholipid metabolism. *Cell Signal*, 1993, **5** (4): 389~ 399
- 12 Song J, Jiang Y W, Foster D A. Epidermal growth factor induces the production of biologically distinguishable diglyceride species from phosphatidylinositol and phosphatidylcholine via the independent activation of type C and type D phospholipases. *Cell Growth Diff*, 1994, **5** (1): 79~ 85

Differential Labeling and Determination of the Lipid Signaling Pathways. CHEN Jun-Song, SONG Jian-Guo (State Key Laboratory of Molecular Biology, Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China).

Abstract Determination of lipid signaling pathways and the production of some intracellular signaling molecules has been an focus of some research work in the field of signal transduction research. For example, the determination of the regulation of different phospholipase activity and the formation of intracellular second messengers and other lipid bioactive molecules from different sources is an important component in the studies on the biological effects and their mechanisms of growth factors and other molecules. Here, a method was introduced for selectively labeling different phospholipids, which has been widely used in the study of lipid signaling pathways. Experimental evidence was presented to demonstrate how to determine the different signaling pathway and the generation as well as the alteration of relevant signaling molecules. The application of this method is flexible and has a high reproducibility. It can be used to pinpoint some signaling pathways and the formation of different signaling molecules. A brief introduction about lipid signaling and its significance in the area of signal transduction was also given.

Key words phospholipid, phospholipase, differential labeling, signal transduction