

小鼠主动脉平滑肌细胞 Robo4 膜蛋白的提取*

倪伟¹, 刘涛^{1△}, 王浩宇¹, 刘小艳¹, 刘丽华¹, 陈桂秀¹, 白亦光², 李健³ (1. 川北医学院第二临床医学院南充市中心医院心内科, 四川南充 637000; 2. 川北医学院组织工程与干细胞研究所, 四川南充 637000; 3. 泸州医学院, 四川泸州 646000)

【摘要】目的 优化小鼠主动脉平滑肌细胞膜蛋白提取方法, 获得高纯度的 Robo4 膜蛋白。**方法** 高速离心法选择性地分离提取总膜蛋白, BCA 法测定总膜蛋白含量, Western-Blot 检测目的蛋白条带。**结果** 成功提取总膜蛋白, 总膜蛋白浓度达 $1.47 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, Western-Blot 检测出 Robo4 膜蛋白条带。**结论** 该提取方法简单、可靠、快速, 获得的膜蛋白纯度高, 可用于 Western-Blot 后续试验。

【关键词】 主动脉; 平滑肌细胞; Robo4; 膜蛋白

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2013.22.015 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)22-2968-02

Extraction of Robo4 membrane proteins from mouse aortic smooth muscle cells* NI Wei¹, LIU Tao^{1△}, WANG Hao-Yu¹, LIU Xiao-Yan¹, LIU Li-Hua¹, CHEN Gui-Xiu¹, BAI Yi-Guang², LI Jian³ (1. Department of Cardiology, Nanchong Central Hospital, the Second Clinical School of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China; 2. Tissue Engineering and Stem Cell Institute of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China; 3. Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

【Abstract】Objective To optimize the method of extracting membrane proteins in mouse aortic smooth muscle cells and harvest high-purity Robo4 membrane proteins. **Methods** The total membrane proteins were selectively extracted by high speed centrifuge, the total membrane protein concentrations were measured by BCA, and Robo4 membrane proteins were assessed by Western-Blot. **Results** The total membrane proteins were successfully extracted, the membrane protein concentration was $1.47 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, and target protein bands were detected by western blot successfully. **Conclusion** This extraction method was simple, reliable, fast, and could harvest high purity of membrane proteins. It can be used for follow-up testing of western blot.

【Key words】 aortic; smooth muscle cells; Robo4; membrane proteins

Roundabout (Robo) 蛋白属于神经细胞黏附分子, 是神经轴突导向分子家族 Slit 蛋白的单次跨膜受体^[1]。Robo 蛋白在神经系统已被确认具有重要的轴突导向功能, 但是, 它们在哺乳动物血管系统的作用并不是很明确^[2]。研究证实, 血管内皮细胞和平滑肌细胞上均有 Robo4 膜蛋白的表达^[3], Robo4 可抑制内皮细胞迁移、病理性血管新生和内皮高渗透性, 但 Robo4 在平滑肌细胞上的作用却知之甚少^[4]。为此, 本文通过体外培养小鼠主动脉平滑肌细胞 (MASMCs), 优化 MASMCs 膜蛋白提取方法, 获取高纯度的 Robo4 膜蛋白, 为后续实验研究 Robo4 膜蛋白在 MASMCs 上的作用提供重要的技术支持, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料来源

1.1.1 实验动物 ICR 小鼠 3~4 只, 雌雄不限, 8 周龄以上, 购于川北医学院实验动物中心。

1.1.2 主要试剂 DMEM/F12 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶 (HYCLONE 公司), I 型胶原酶、二甲基亚砜 (Sigma 公司), 青霉素、链霉素 (索莱宝公司), 兔抗 α -SMA 多克隆抗体 (博奥森公司), 羊抗 Robo4 多克隆抗体 (Santa Cruz 公司), 羊抗 GAPDH 多克隆抗体 (Genscript 公司), 山羊抗兔 FITC 标记 IgG 二抗 (中衫金桥公司), HRP 标记兔抗山羊 IgG (H+L) (RARTH

公司), 膜蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白含量检测试剂盒、预染彩色蛋白分子量 Marker (凯基生物公司), 脱脂奶粉 (SCIENTIFIC RESEARCH SPECIAL 公司), 高敏发光 ECL 试剂盒 (Millipore 公司)。

1.1.3 主要仪器 CO₂ 培养箱、台式高速冷冻离心机、-80℃ 冰箱 (Thermo 公司), 微量移液器 (Eppendorf 公司), 荧光倒置显微镜 (Nikon 公司), 倒置生物显微镜 (上海万衡精密仪器公司), T-25 细胞培养瓶、离心管 (Corning 公司), 垂直电泳槽、电泳仪、凝胶成像系统 (BIO-RAD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 原代细胞培养 颈椎脱臼法处死 ICR 小鼠, 将整个小鼠浸泡于 75% 乙醇中消毒约 5 min。在无菌状态下, 逐层剪开胸腔, 分离取出主动脉, 放入含有无菌磷酸盐缓冲液 (PBS) 的培养皿中。用眼科剪、眼科镊尽量去除血管外膜的脂肪和纤维组织, 再用含抗菌药物的 PBS 清洗血管的外表面及血管腔内的血凝块 3 次, 将主动脉放入另一无菌培养皿中, 用眼科剪纵向剪开血管, 再剪成小段, 收集到 15 mL 离心管中。用 0.1% 的胰蛋白酶和 0.1% 的 I 型胶原酶消化组织块 (置 37℃ 水浴) 约 40~50 min。然后进行镜检, 终止消化时加入含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液, 200 目不锈钢筛网过滤去除大的组织。1 200 r/min 离心 5 min, 倒掉上清液, 沉淀用培养基悬

* 基金项目: 四川省南充市应用技术与开发资金项目 (12A0040); 川北医学院科研发展计划项目 (CBY12-A-ZP15)。△ 通讯作者, E-mail: nclt456@sina.com。

浮,接种 25 cm² 培养瓶。最后放入 37 ℃,5%CO₂ 培养箱中培养。24 h 后,观察细胞是否贴壁,大量贴壁后,更换 1 次培养基,放入培养箱中继续培养,3~4 d 更换 1 次培养液,7~9 d MVMSCs 可铺满 T-25 细胞培养瓶,用 0.125%胰蛋白酶消化后进行传代培养。

1.2.2 膜蛋白的提取 收集不少于 1×10⁷ 细胞,用冷 PBS (pH=7.4) 洗涤细胞 2 次(每次 3 000 r/min,离心 5 min);在细胞标本中加入 1 mL Lysis Buffer(使用前,每 1 毫升 Lysis Buffer 加入 1 μL 蛋白酶抑制剂和 1 μL 1 mmol/L DTT),置玻璃均浆器冰中均质 30~50 次,置于冰上冷却。均质或超声破碎细胞后镜检,细胞破碎率不小于 90%;将均浆液转移至冷的离心管中,于 4 ℃,3 000 r/min 离心 10 min,弃沉淀;取上清液转移至新离心管中,于 4 ℃,14 000 r/min 离心 30 min,所得上清液转至新管中,即为胞浆蛋白,分装冷冻保存;取沉淀,加入 1 mL 冷的抽提 Buffer,涡旋振荡混匀后,4 ℃放置 10~15 min;于 4 ℃,3 000 r/min 离心 5 min,取上清液转移至新管,进行下步提取;置于 37 ℃水浴 10 min;于室温,13 000 r/min 离心 5 min,标本分成上层和下层,最终得到的下层即为膜蛋白提取物。

1.2.3 BCA 法测定总膜蛋白含量 按照 BCA 蛋白含量检测试剂盒制作标准曲线,稀释待测标本至合适浓度,使标本稀释液总体积为 20 μL,加入 BCA 工作液 200 μL,充分混匀,37 ℃放置 30 min 后,在 562 nm 波长下比色,记录吸光值。根据所测标本吸光值,在标准曲线上查得相应蛋白含量,除以稀释液总体积,乘以标本稀释倍数,即为标本试剂浓度(μg/μL)。

1.2.4 Western-Blot 检测 根据 Robo4 蛋白相对分子量约 150×10³,配制 8%SDS-GAGE 分离胶和 5%SDS-PAGE 浓缩胶进行灌胶,根据标本蛋白浓度调整上样体积,加入 5×SDS 上样至终浓度为 1×,上样总体积不超过 20 μL,上样前将标本于沸水中煮 5 min 使蛋白变性。上样后,开始电泳,预染 Marker 监测蛋白电泳情况,设置 GAPDH 内参。积层胶电压 40 V,20 min,到达界面后提至 120 V,电泳 90 min,电泳结束后,进行蛋白质半干转,20 V,20 min。转膜结束后,用 5%脱脂奶粉摇床封闭 1 h。封闭结束后,加入 1:100 稀释的 Robo4 抗体,室温孵育 1.5 h。用含 0.05%吐温 20 的磷酸盐溶液(PBST)洗膜 4×10 min。加入 1:5 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 1 h,PBST 洗膜 4 次。按说明书进行增强的化学发光(ECL)显色。

2 结 果

2.1 膜蛋白的浓度 根据蛋白标准品及其对应吸光度 A 值,计算出标准曲线(图 1),测得标本平均吸光度 A 值为 0.259,由此推算出总膜蛋白浓度为 1.47 μg/μL。

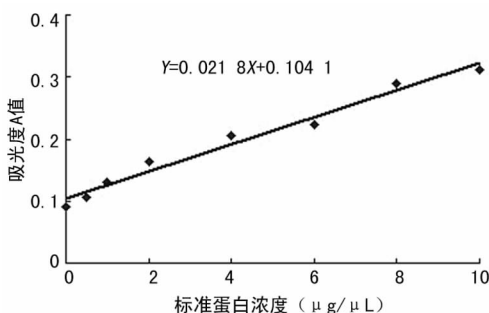


图 1 BCA 法测定蛋白浓度标准曲线

2.2 Western-Blot 检测目的蛋白条带 在 MAMSCs 上检测到 Robo4 膜蛋白的表达,蛋白相对分子量约 150×10³(图 2)。

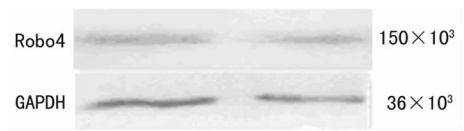


图 2 膜蛋白 Robo4 及 GAPDH 在 MAMSCs 上的表达

3 讨 论

细胞膜蛋白的提取原理是裂解细胞后,先离心分离出质膜粗提物,再利用特殊的抽提 Buffer,选择性地分离提取膜蛋白,抽提 Buffer 含一种特殊的去污剂,在 4 ℃时所有的蛋白质均可溶于抽提 Buffer,但在 37 ℃时,抽提 Buffer 分为水相和去污相;此时亲水性蛋白溶于水相,疏水的膜蛋白溶于去污剂相中,根据该性质分离出膜蛋白。产物不仅含细胞膜蛋白,也含胞器质膜蛋白。该方法提取膜蛋白成功的关键还在于:(1)保证足量的蛋白来源,细胞不少于 1×10⁷ 个,组织标本 200~300 mg,且尽量去除脂肪组织和结缔组织等非目的组织。(2)膜蛋白的提取需要在冰上进行,尽量减少蛋白流失,提取蛋白所需的玻璃器具、离心管需预冷,玻璃均浆器冰上均质 30~50 次,通过镜检,细胞破碎率要达到 90%以上。(3)膜蛋白的分离提取需要在高速低温的条件下进行,离心机转速 13 000 r/min 以上,且离心机需预冷至 4 ℃。(4)进行膜蛋白的提取最好使用进口透明性较好的微量离心管,以利于下层膜蛋白有机相的观察,因为上下两层液体为透明,只在交界处有一折光线,需仔细观察才可见到,室温静置 30 min 至 1 h 亦可见分层。(5)若需提取更高纯度的膜蛋白,可在获得的下层膜蛋白有机相中加入 500 μL 冰冷灭菌水,置于 4 ℃ 5 min,置于 37 ℃ 10 min;室温下 13 000 r/min,离心 5 min,标本分成上层和下层(含膜蛋白),重复该步骤 2 次,获得纯度更高的膜蛋白。(6)若目的膜蛋白本身表达丰度较低,BCA 法测得总膜蛋白浓度小于 1 μg/μL,可在 SDS-PAGE 电泳前进行蛋白浓缩:每 100 微升膜蛋白提取物,加入约 300 μL 溶解 Buffer 和 100 μL 三氯乙酸(TCA)试剂,混匀置冰上 20~30 min 后,13 000 r/min 离心 15 min,尽可能除去上清液;沉淀加入 1 mL 丙酮,室温静置 10 min 后,13 000 r/min 离心 15 min;弃上清液,沉淀真空旋干或置冰上干燥约 10 min(敞开离心管盖),加入适当体积的 Loading Buffer,煮沸 3~5 min,上样进行电泳。

Robo 属于神经细胞黏附分子,是 Slit 蛋白的单次跨膜受体,包括 4 种亚型(Robo1~4),Robo1、Robo2 和 Robo3 胞外区域相同,包含 5 个免疫球蛋白(Ig)样结构域和 3 个Ⅲ型纤维连接蛋白重复序列,胞内尾区含有 4 个保守区基序,即 CC0、CC1、CC2 和 CC3。但 Robo4 胞外区域只含 2 个免疫球蛋白样结构域和Ⅲ型纤维连接蛋白重复序列,胞内只含 CC0、CC2 基因序列,其蛋白相对分子量约在 150×10³[5]。目前的研究认为,Robo4 能够调控内皮细胞的迁移及血管新生,参与血管生长因子的信号转导,在血管稳定性的调节中发挥重要作用[2,6]。最近研究发现,Robo4 也表达在血管平滑肌细胞,但 Robo4 在血管平滑肌细胞上的作用并未见相关报道[3]。因此,研究 Robo4 膜蛋白在 MAMSCs 生理和病理状态下的表达及意义[7],对于揭示动脉粥样硬化、冠状动脉血管再通术后再狭窄等心血管疾病的发病机制具有重要意义。作者希望通过建立一种稳定、便捷的膜蛋白提取方法,获得高纯度的 Robo4 膜蛋白,进而为研究 Robo4 膜蛋白在 MAMSCs 生理和病理状态下的表达及意义奠定基础。该膜蛋白提取方法,所获得的总膜蛋白经 BCA 法测定浓度为 1.47 μg/μL,可直接用于 SDS-PAGE 电泳,经 Western-Blot 法检测到目的蛋白 Robo4 的表达。(下转第 2972 页)

者术后第 1 次月经第 3 天时,电凝组和缝合组 FSH 水平高于开腹组,而电凝组和缝合组 FSH 水平并未见明显差异。同时,电凝组和缝合组 E2 水平高于开腹组,而电凝组和缝合组 E2 水平并未见明显差异。在 FSH/LH 正常率方面,3 组患者之间有明显差异,电凝组与缝合组 FSH/LH 正常率高于开腹组。基础性激素水平是衡量卵巢储备功能的重要指标,从本研究结果中可以看出,两组使用腹腔镜的患者,其 FSH 和 E2 水平均较开腹组更积极,组中 FSH/LH 正常的患者所占的比例也更高,这说明腹腔镜与开腹手术相比,对患者的卵巢储备功能影响更小。电凝组和缝合组之间内分泌指标间未见明显差异,这可能是由于激素指标存在延迟性或卵巢代偿功能所致。为探究电凝与缝合是否对患者的卵巢储备功能有影响,又分别使用超声及新型的卵巢储备功能预测指标对两组患者的卵巢储备功能进行了比较。超声结果显示,缝合组在卵巢间质血流检查和卵巢形态学检查中,均得到了比电凝组和开腹组更积极的结果,电凝组又高于开腹组。而在新型卵巢功能评估指标的比较中,缝合组患者 INHB 和 AMH 水平高于电凝组和开腹组,电凝组又高于开腹组。

3.3 腹腔镜-缝合组卵巢储备功能水平最高的原因分析 首先应明确卵巢囊肿剔除术中卵巢储备功能下降的原因,主要包括三方面:首先是从疾病本身来看,卵巢的囊肿是植于卵巢表面并向内凹陷的^[9]。在剔除过程中,卵巢组织受到损伤,且由于内异症囊肿具有很高的浸润性,盆腔粘连严重,解剖结构有所改变,会导致在囊肿剔除的过程中对卵巢正常组织造成不可避免的损害。其次是从手术技术上来看,由于血管增生等原因,囊肿剔除术中极易发生出血,且囊肿与正常组织互相浸润,止血十分困难^[10]。目前应用的电凝止血法所造成的热损伤,也会加重卵巢的功能损害,甚至造成卵巢发生血供障碍。相比电凝止血法,缝合法对卵巢的损伤更小,对于囊肿较大,位置较深的囊肿更是如此。在手术中损伤较大血管或损伤面积较大时,采用电凝法操作时间长,其热作用会导致卵巢发生不可逆性的破坏和损伤。而采用缝合法对较大血管或大面积出血时止血,可以在保护卵巢组织安全的情况下快速止血,且术后血管可恢复血供,所以采用缝合法能更有效地保护卵巢储备功能。

综上所述,腹腔镜-缝合法是卵巢子宫内位症囊肿患者的首选治疗方案,其能更好地保护患者的卵巢储备功能,保

障患者未来的生育功能。但也应该看到,电凝法作为一种经典的腹腔镜止血方法,方便、快速都是其优越性,在临床实际操作中,应该结合多种方法,取长补短,根据患者的实际情况和指征选择最有利于患者的止血方式,尤其是对于年轻女性,要尽最大限度地减少手术对其卵巢组织的损伤,提高患者术后卵巢储备功能水平。

参考文献

- [1] 郎景和. 子宫内膜异位症研究的理论和实践:发病、诊断和治疗的“三化”[J]. 中华妇产科杂志, 2011, 46(11): 801-802.
- [2] 程莉, 钟玲. 腹腔镜联合复方醋酸棉酚片治疗卵巢子宫内位囊肿临床观察[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(11): 1061-1062.
- [3] 孙爱军, 薛薇. 不孕患者子宫内膜异位囊肿的手术决策及卵巢功能保护问题[J]. 实用妇产科杂志, 2012, 28(8): 617-619.
- [4] 中华医学会妇产科学分会妇科内镜学组. 妇科腹腔镜诊治规范[J]. 中华妇产科杂志, 2012, 47(9): 716-718.
- [5] 梁秀云, 莫凤媚. 抗缪勒管激素和血清抑制素 B 检测对卵巢储备功能预测的价值[J]. 中国医药导报, 2012, 9(2): 106-107.
- [6] Begum T, Chowdhury SR. Aetiology and pathogenesis of endometriosis-a review[J]. Mymensingh Med J, 2013, 22(1): 218-221.
- [7] 王颖, 侯丽辉, 王薇, 等. 子宫内膜异位症药物治疗概况[J]. 医学研究杂志, 2009, 38(9): 117-118.
- [8] Howard FM. Surgical treatment of endometriosis[J]. Obstet Gynecol Clin North Am, 2011, 38(4): 677-686.
- [9] 冷金花. 深部浸润型子宫内膜异位症的诊治进展[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2008, 24(1): 12-15.
- [10] 欧阳卓, 卢丹, 张为远, 等. 卵巢子宫内位症病灶微血管内皮细胞的培养与鉴定[J]. 中华妇产科杂志, 2011, 46(10): 773-776.

(收稿日期: 2013-04-21 修回日期: 2013-06-03)

(上接第 2969 页)

综上所述,该膜蛋白提取方法简单,可靠,快速,获得的膜蛋白纯度较高,可直接用于 SDS-PAGE 电泳及 Western-Blot 等后续试验,为研究 Robo4 膜蛋白在 MAMCs 上的生物学功能提供了技术保障。

参考文献

- [1] Huminiecki L, Gorn M, Suchting S, et al. Magic roundabout is a new member of the roundabout receptor family that is endothelial specific and expressed at sites of active angiogenesis[J]. Genomics, 2002, 79(4): 547-552.
- [2] Jones CA, London NR, Chen H, et al. Robo4 stabilizes the vascular network by inhibiting pathologic angiogenesis and endothelial hyperpermeability[J]. Nat Med, 2008, 14(4): 448-453.
- [3] Zhang B, Dietrich UM, Geng JG, et al. Repulsive axon

guidance molecule Slit3 is a novel angiogenic factor[J]. Blood, 2009, 114(19): 4300-4309.

- [4] Park KW, Morrison CM, Sorensen LK, et al. Robo4 is a vascular specific receptor that inhibits endothelial migration[J]. Dev Biol, 2003, 261(1): 251-267.
- [5] Seth P, Lin Y, Hanai J, et al. Magic roundabout, a tumor endothelial marker: expression and signaling[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 332(2): 533-541.
- [6] Jones CA, Nishiyama N, London NR, et al. Slit2-Robo4 signaling promotes vascular stability by blocking Arf6 activity[J]. Nat Cell Biol, 2009, 11(11): 1325-1331.
- [7] 魏本, 郭富强. Periostin 与血管支架内再狭窄关系的研究进展[J]. 川北医学院学报, 2012, 27(4): 313-317.

(收稿日期: 2013-04-26 修回日期: 2013-07-12)