

孕鼠 PFOS 染毒后 shotgun 法检测仔鼠脑内蛋白差异改变

李庆, 龙燕, 洪浩*

(中国药科大学药理教研室, 江苏 南京 210009)

[摘要] 目的:本研究旨在分析孕鼠暴露于全氟辛烷磺酸(potassium perfluorooctanesulfonate, PFOS)后对仔鼠脑组织蛋白成分的影响。方法:将孕3 d母鼠随机分为2组。正常组孕鼠给予溶剂生理盐水灌胃;染毒组孕鼠给予0.5 mg/kg PFOS灌胃染毒,染毒连续进行7 d。收集正常组所产仔鼠(A组)与0.5 mg/kg PFOS染毒组所产仔鼠(B组)出生后24 h内全脑组织,使用蛋白质组学 shotgun 法进行脑组织蛋白成分鉴定并分析。结果:鉴定结果显示染毒组所产仔鼠脑组织蛋白种类相比于正常组数量减少,且有无功能蛋白产生。结论:孕鼠 PFOS 染毒对其仔鼠脑内蛋白质的种类组成有明显影响。

[关键词] 全氟辛烷磺酸;shotgun 法;仔鼠脑蛋白差异

[中图分类号] R966

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)03-314-04

doi:10.7655/NYDXBNS20130305

The shotgun analysis of brain proteins composition changes in filial mice after the pregnant mice exposure to PFOS

Li Qing, Long Yan, Hong Hao*

(Department of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective:** To clarify the changes in the filial mice brain proteins after the pregnant mice exposure to Potassium perfluorooctanesulfonate (PFOS). **Methods:** The 3 days pregnant mice were randomly divided into 2 groups. The mice in the control group were orally administered with the normal saline. The mice in the other group were orally administered with 0.5mg/kg PFOS for 7 days. The filial mice (within 24 hours) born from the control group (marked as A group) and 0.5 mg/kg PFOS-exposed group (marked as B group) were killed and the brain proteins were collected and homogenized respectively. Changes in brain proteins of the filial mice of A group and B group were examined by shotgun analysis. **Results:** Compared with A group, the categories of brain proteins in B group were significantly changed and some uncharacterized proteins were detected. **Conclusion:** Orally administration of PFOS to the pregnant mice results in the abnormal changes in the brain proteins of the filial mice.

[Key words] PFOS; shotgun analysis; differences of brain proteins in filial mice

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(3): 314-317]

全氟辛烷磺酸 (potassium perfluorooctanesulfonate, PFOS), 是全氟化合物家族 (fluorinated organic compounds, FOCs) 中应用最为广泛的一种。它被普遍使用于生产纺织品、皮革制品、涂料、纸制品表面处理剂、化妆品等生产过程, 对于化学镀膜领域也有相当地位的应用^[1-3]。因此, PFOS 已大量进入自然界中, 分布于大气、水体, 进一步进入动物以及人类

身体内^[4-5]。由于 PFOS 的大量存在, 且其化学性质十分稳定, 难以自身分解, 是一种重要的环境污染物来源。并且其具有在生物体内蓄积特性, 继而引起一系列诸如肝脏毒性、心血管毒性、胚胎毒性、生殖毒性、神经毒性等, 甚至研究表明 PFOS 还具有潜在的致癌作用^[6-7]。

PFOS 具有遗传毒性, 对于下一代的胚胎有着较强的毒性作用, 作用机制复杂, 有可能是通过胎盘屏障对子代产生影响^[8], 或是直接作用于基因水平。随后, PFOS 可能进一步通过血脑屏障, 或是直接改变血脑屏障通透性和功能结构, 影响中枢神经系统^[9]。由于神经系统是 PFOS 作用的重要靶标之一, 其毒

[基金项目] 国家自然科学基金资助 (81102494)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: haohongchina@hotmail.com

性作用在脑组织和神经系统中较突出,导致神经元的缺失,认知功能的损伤,严重的可能还会影响脑组织的形态学特征^[10-12]。并且,PFOS 对神经系统的毒性作用很可能是通过改变脑组织中蛋白质的表达,从而进一步影响脑内神经相关蛋白质的种类、含量、功能等实现^[13]。PFOS 具有胚胎毒性^[8],但对于孕早期母鼠 PFOS 染毒后,PFOS 对子代小鼠的脑组织蛋白成分产生何种影响鲜见报道。shotgun 法是对蛋白质混合物酶解后产生的肽段混合物进行液相色谱串联质谱分析,然后采用特定鉴定方法得到肽段的一级结构信息,同时完成蛋白质的鉴定。该技术实现了对复杂的蛋白质混合物的鉴定^[14]。根据文献报道且以 PFOS 染毒后不引起孕鼠流产为前提^[15-16],本课题组对孕 3 d 母鼠用 PFOS(0.5 mg/kg)灌胃染毒 7 d,待产仔后取新生仔鼠全脑,利用 shotgun 法检测仔鼠脑组织蛋白的成分差异。通过实验中对染毒孕鼠的子代进行 shotgun 法蛋白组学检测,试图阐明孕早期母鼠 PFOS 染毒后,其仔鼠脑组织蛋白成分产生显著性改变。

1 材料和方法

1.1 材料

健康 Balb/c 孕鼠,清洁级,由上海伊莱克斯提供。动物饲养于食物、水源充足,温度、湿度适宜(22°C ± 2°C, 55% ± 5%),照明水平均衡的环境中。

全氟辛烷磺酸 (PFOS, Cat. No.33607, Sigma 公司, 美国), 胰蛋白酶(Gibco 公司, 美国), Ettan™ MDLC(GE Healthcare 公司, 美国), RP 捕获柱 (Zorbax 300 SB C18, Agilent Technologies), LTQ(Thermo 公司, 美国)

1.2 方法

1.2.1 模型建立

本实验采用正常孕 3 d Balb/c 小鼠,按照体重随机分为 2 组,每组 10 只。给药剂量如下:正常组(给予溶剂生理盐水),PFOS 染毒组(给药剂量 0.5 mg/kg),给药方式为灌胃,染毒持续时间为 7 d。染毒结束后待正常组与 PFOS(0.5 mg/kg)染毒组孕鼠产仔鼠后,于冰面上取仔鼠(出生 24 h 内)新鲜脑组织(每组收集 5 只孕鼠的仔鼠,每只孕鼠收集 3 只仔鼠)进行 shotgun 蛋白组学分析。将正常组所产仔鼠作为 A 组,PFOS(0.5mg/kg)染毒组所产仔鼠作为 B 组。

1.2.2 shotgun 混合蛋白鉴定

分别将 A、B 两组仔鼠脑蛋白预混,加入胰蛋白

酶酶解 > 20 h (温度 37°C ± 0.5°C)。使用 Ettan™ MDLC 系统将酶解后的混合物去盐,并分离。将分离后的肽段混合物进行 LC-MS-MS (LTQ, Thermo 公司, 美国)检测(样品检测均重复 3 次)并查库。

shotgun 查库软件:BioworksBrowser rev. 3.1。结果过滤参数为:当 Charge + 1, Xcorr ≥ 1.9; 当 Charge + 2, Xcorr ≥ 2.2; 当 Charge + 3, Xcorr ≥ 3.75; 其中 Del-CN ≥ 0.1。

2 结果

2.1 仔鼠脑内蛋白种类及差异分析

A 组仔鼠脑蛋白共有鉴定蛋白群 811 个,相较于 B 组 808 个无显著差异。A 组内蛋白包括各种亚型和异构体总数目为 1 860 种, B 组内蛋白包括各种亚型和异构体总数目为 1 882 种。其中两者共有蛋白 1 085 种,占总蛋白 41%; 特异性存在于 A 组的蛋白种类为 775 种,占总蛋白 29%; 特异性存在于 B 组的蛋白种类为 797 种,占总蛋白 30%(图 1)。

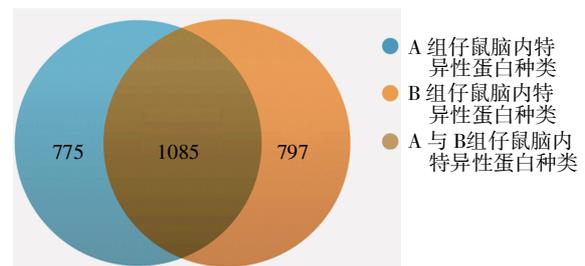


图 1 shotgun 法检测仔鼠脑内蛋白种类及差异统计

Figure 1 Differences of brain proteins categories in filial mice measured by shotgun analysis

2.2 特异性存在于 A 组和 B 组仔鼠脑内部分蛋白分析

A 组仔鼠脑内热休克蛋白(HSPs)特异性存在种类 7 种,明显高于 B 组仔鼠脑内的 3 种;肌动蛋白相关蛋白(actin related proteins, ARPs)在 A 组仔鼠脑内特异性存在的种类为 24 种,明显多于特异性存在于 B 组仔鼠脑内的 7 种;动力蛋白(motor proteins)在 A 组仔鼠中特异性存在 4 种,而 B 组仔鼠中不存在该类特异性存在的蛋白。另一方面,Ras 相关蛋白(ras associated proteins, Rab)两组的种类差异也较明显:在 A 组仔鼠脑内特异性存在的种类为 12 种,明显多于特异性存在于 B 组产生的子代小鼠脑内的 4 种。

2.3 A 组与 B 组仔鼠脑内部分差异蛋白

A 组与 B 组仔鼠脑内部分蛋白种类及数量存在

差异,并且B组仔鼠脑内出现较多的异常蛋白。在B组仔鼠脑蛋白分析中发现5种无功能蛋白,分别是:Hsph1 (Hsp105 of heat shock protein) putative uncharacterized protein,Mapre3 (microtubule-associated protein RP/EB family member 3)putative uncharacterized protein,Rsu1(Ras suppressor protein 1) putative uncharacterized protein,Capzb [(capping protein (Actin filament)muscle Z-line,beta)]putative uncharacterized protein,Macf1 (microtubule-actin crosslinking factor 1) putative uncharacterized protein。

3 讨论

PFOS 化学性质稳定,难以自身分解,是一种重要的环境污染物来源;并且具有在生物体内蓄积,继而引起一系列诸如肝脏、心血管、胚胎、生殖、神经毒性,甚至研究表明PFOS还具有潜在的致癌作用^[6-7,17]。而蛋白组学可用于检测与鉴定组织器官和机体内蛋白质种类、含量与结构功能的变化与差异。机体或组织蛋白的变化代表了相关基因的表达差异,因此蛋白组学实质上从基因角度阐述了生物体内现象。

通过本实验,发现孕早期母鼠PFOS染毒可改变仔鼠脑内蛋白种类。由结果可知,与A组仔鼠总脑蛋白相比,B组仔鼠脑蛋白鉴定群差异较小,群数仅相差3,但是蛋白的种类则相差巨大。两组仔鼠脑内蛋白种类仅有约一半为共有,这表明孕早期PFOS染毒后,PFOS的毒性对子代脑组织蛋白的组成具有明显影响。如ARPs在A组产生的子代小鼠脑内特异性存在的种类明显多于B组产生的子代小鼠。而ARPs在不同的细胞事件中扮演重要的角色,包括调节微丝蛋白的组装,调节由dynein蛋白催化的基于微管的细胞活力,以及作为很多蛋白复合物的组成部分调节基因的表达^[18]。Rab蛋白家族是一类小分子GTP酶,表达于各种真核生物中,其功能主要是调节细胞器间的囊泡运输^[19]。本实验结果提示A组与B组中Rab蛋白种类差异也较明显。同时,本实验发现B组仔鼠脑蛋白中存在5种无功能蛋白,包括Hsph1、Mapre3、Rsu1、Capzb以及Macf1。HSP是一类高度保守的应激反应蛋白,其主要功能是作为分子伴侣促进其他细胞蛋白的折叠、阻止蛋白聚集、或帮助错误折叠的蛋白进行降解^[20]。而Hsph1是HSP家族中的一员,该蛋白高表达于脑组织,热休克后可以抑制神经元凋亡并同时阻止蛋白的聚集^[21]。Mapre3是微管相关蛋白RP/EB蛋白

家族成员3,定位于胞浆中的微管网络,可促进微管的生长并稳定微管结构,在细胞迁移中发挥作用^[22]。Rsu1则在Ras信号转导通路、生长抑制以及神经生长因子诱导分化过程中起到一定作用^[23]。Capzb是F肌动蛋白戴帽蛋白复合物,参与肌动蛋白结合过程,对细胞运动性、肌动蛋白细胞骨架组织的生物发生以及肌动蛋白丝戴帽进行调节^[24]。Macf1是一种新的细胞骨架交联蛋白,是微管-微丝动力学的关键整合者,在参与胚胎发育、维持细胞及组织形态起到重要作用^[25]。上述蛋白在胚胎发育、细胞迁移、神经元分化及凋亡中都发挥一定作用,由此推测,PFOS染毒后子代小鼠脑内这些蛋白无功能而可能引起后期相关功能的损伤。当然,shotgun法也存在其局限性。如Ctnnd2编码的连环蛋白-β1蛋白表达于增殖的神经上皮神经元祖细胞和有丝分裂后神经元的树突网络,通过调节黏附因子参与神经元细胞连接、组织成形和完整性^[26]。本实验通过shotgun法在A与B组仔鼠脑蛋白中都检测到连环蛋白-β1蛋白。但鉴于shotgun法对混合蛋白质的鉴定只限于定性,因此,本实验结果尚不能提示孕早期母鼠PFOS染毒后,仔鼠脑内与脑功能相关的重要蛋白表达水平是否发生变化。

综上所述,本实验使用了蛋白组学方式,阐述了孕早期母鼠PFOS染毒后仔鼠脑内蛋白组成及差异分析,推测蛋白组成的差异对子代神经系统的发育及功能可能引起不同程度的损伤。并且,本实验也为后期研究PFOS的胚胎神经毒性提供了有用的研究靶点。

[参考文献]

- [1] 金一和,刘 晓,张 迅,等. 人血清中全氟辛烷磺酰基化合物污染现状 [J]. 中国公共卫生,2003,19(10): 1200-1202
- [2] Kissa E. Fluorinated surfactants and repellents[M]. 2nd. New York:Marcel Dekker,2001:97
- [3] Renner R. Growing concern over perfluorinated chemicals [J]. Environ Sci Technol,2001,35(7):154A-160A
- [4] Senthilkumar K,Ohi E,Sajwan K,et al. Perfluorinated compounds in river water,river sediment,mar ketfish, and wildlife samples from Japan [J]. Bull Environ Contam Toxicol,2007,79(4):427-431
- [5] Kärman A,Ericson I,Van Bavel B,et al. Exposure of perfluorinated chemicals through lactation;levels of matched human milk and serum and a temporal trend,1996-2004, in Sweden [J]. Environ Health Perspect,2007,115 (2): 226-230

- [6] Slotkin TA, MacKillop EA, Melnick RL, et al. Developmental neurotoxicity of perfluorinated chemicals modeled in vitro[J]. *Environ Health Perspect*, 2008, 116(6): 716-722
- [7] Chang SC, Thibodeaux JR, Eastvold ML, et al. Thyroid hormone status and pituitary function in adult rats given oral doses of perfluorooctanesulfonate (PFOS)[J]. *Toxicology*, 2008, 243(3): 330-339
- [8] Lau C, Thibodeaux JR, Hanson RG, et al. Exposure to perfluorooctanesulfonate during pregnancy in rat and mouse. II: postnatal evaluation[J]. *Toxicol Sci*, 2003, 74(2): 382-392
- [9] Austin ME, Kasturi BS, Barber M, et al. Neuroendocrine effects of perfluorooctane sulfonate in rats[J]. *Environ Health Perspect*, 2003, 111(12): 1485-1489
- [10] Johansson N, Fredriksson A, Eriksson P. Neonatal exposure to perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) causes neurobehavioural defects in adult mice[J]. *Neurotoxicology*, 2008, 29(1): 160-169
- [11] Shi X, Du Y, Lam PK, et al. Developmental toxicity and alteration of gene expression in zebrafish embryos exposed to PFOS[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008, 230(1): 23-32
- [12] Luebker DJ, York RG, Hansen KJ, et al. Neonatal mortality from in utero exposure to perfluorooctanesulfonate (PFOS) in Sprague-Dawley rats: dose-response, and biochemical and pharmacokinetic parameters[J]. *Toxicology*, 2005, 215(1-2): 149-169
- [13] Johansson N, Eriksson P, Viberg H. Neonatal exposure to PFOS and PFOA in mice results in changes in proteins which are important for neuronal growth and synaptogenesis in the developing brain[J]. *Toxicol Sci*, 2009, 108(2): 412-418
- [14] Yahia D, Tsukuba C, Yoshida M, et al. Neonatal death of mice treated with perfluorooctane sulfonate[J]. *Toxicol Sci*, 2008, 33(2): 219-226
- [15] Fuentes S, Colomina MT, Rodriguez J, et al. Interactions in developmental toxicology: concurrent exposure to perfluorooctane sulfonate (PFOS) and stress in pregnant mice[J]. *Toxicol Lett*, 2006, 164(1): 81-89
- [16] Fuentes S, Colomina MT, Vicens P, et al. Concurrent exposure to perfluorooctane sulfonate and restraint stress during pregnancy in mice: effects on postnatal development and behavior of the offspring[J]. *Toxicol Sci*, 2007, 98(2): 589-598
- [17] Butenhoff JL, Ehresman DJ, Chang SC, et al. Gestational and lactational exposure to potassium perfluorooctanesulfonate (K⁺PFOS) in rats: developmental neurotoxicity[J]. *Reprod Toxicol*, 2009, 27(3-4): 319-330
- [18] Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ. Molecular aspects of thyroid hormone actions[J]. *Endocr Rev*, 2010, 31(2): 139-170
- [19] Rendon WO, Martinez-Alonso E, Tomas M, et al. Golgi fragmentation is Rab and SNARE dependent in cellular models of Parkinson's Disease[J]. *Histochem Cell Biol*, 2012, [Epub ahead of print]
- [20] Reddy SJ, La Marca F, Park P. The role of heat shock proteins in spinal cord injury[J]. *Neurosurg Focus*, 2008, 25(5): E4
- [21] Hatayama T, Yamagishi N, Minobe E, et al. Role of hsp105 in protection against stress-induced apoptosis in neuronal PC12 cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 288(3): 528-534
- [22] Komarova Y, De Groot CO, Grigoriev I, et al. Mammalian end binding proteins control persistent microtubule growth[J]. *J Cell Biol*, 2009, 184(5): 691-706
- [23] Dougherty GW, Jose C, Gimona M, et al. The Rsu-1-PINCH1-ILK complex is regulated by Ras activation in tumor cells[J]. *Eur J Cell Biol*, 2008, 87(8-9): 721-734
- [24] Wang CY, Chen JK, Wu YT, et al. Reduction in antioxidant enzyme expression and sustained inflammation enhance tissue damage in the subacute phase spinal cord contusive injury[J]. *J Biomed Sci*, 2011, 18: 13
- [25] Goryunov D, He CZ, Lin CS, et al. Nervous-tissue-specific elimination of microtubule-actin crosslinking factor 1a results in multiple development defects in the mouse brain[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2010, 44(1): 1-14
- [26] Bareiss S, Kim K, Lu Q. Delta-catenin/NPRAP: A new member of the glycogen synthase kinase-3beta signaling complex that promotes beta-catenin turnover in neurons[J]. *J Neurosci Res*, 2010, 88(11): 2350-2363

[收稿日期] 2012-12-07