

大鼠上橄榄复合体中枢听觉信息处理相关蛋白的研究

徐 莹,李宛桐,李晓璐*

(南京医科大学第一附属医院耳鼻咽喉科,WHO 预防聋和听力减退合作中心,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:同位素相对标记和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantitation,iTRAQ)技术分析大鼠上橄榄复合体(superior olivary complex,SOC)胞膜差异蛋白。方法:从 P60 健康的雄性 Sprague Dawley(SD)大鼠的脑组织中,分离出耳蜗核(cochlear nuclear complex,CN)、SOC 和下丘(inferior colliculus,IC),用 iTRAQ 技术检测 SOC 区域胞膜蛋白并分析其差异表达的蛋白质。以剩余脑组织(Rest)作为对照。结果:质谱分析共鉴定到 1 937 种膜蛋白,核团间两两比较,确定 SOC 有 14 种区域特异蛋白。Gene ontology(GO)功能分析提示丙氨酸-tRNA 连接酶(alanyl-tRNA synthetase,Aars)、双官能谷氨酰-脯氨酸-tRNA 合成酶(glutamyl-prolyl-tRNA synthetase,Eprs)、 α -内连蛋白(α -internexin,Ina)和溶质载体 44A1(solute carrier 44A1,Slc44A1)等蛋白主要参与神经系统发育、神经传递和突触可塑性,其余蛋白与能量代谢有关。结论:iTRAQ 技术分析 SOC 胞膜差异蛋白,鉴定到 Aars、Eprs、Ina、Slc44A1 等蛋白参与中枢听觉信息处理,为进一步研究中枢听觉处理障碍提供了理论依据。

[关键词] 中枢听觉信息处理;iTRAQ;蛋白质组学

[中图分类号] R393

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)09-1168-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20160909

A study on the proteins of superior olivary complex related to central auditory processing in SD rats

Xu Ying, Li Wantong, Li Xiaolu*

(Department of Otorhinolaryngology, the First Affiliated Hospital of NJMU, WHO Collaborating Centre for the Prevention of Deafness and Hearing Impairment, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** The proteomic analysis of isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) technique was performed to analyze the differential plasma membrane proteins of superior olivary complex (SOC) of SD rats. **Methods:** The cochlear nuclear complex (CN), SOC and inferior colliculus (IC) were isolated from P60 healthy male Sprague Dawley (SD) rats, the rest of the brain was used as control. Then the iTRAQ technique was used to detect and identify the differential plasma membrane protein expression in these regions. **Results:** A total of 1 937 plasma membrane proteins showed significantly different expression, between two regions. We found 14 region-typical proteins in SOC. Gene ontology (GO) functional analysis showed that alanyl-tRNA synthetase (Aars), glutamyl-prolyl-tRNA synthetase (Eprs), α -internexin (Ina) and solute carrier 44A1 (Slc44A1) might be involved in neural development, neurotransmission, synaptic remodeling, and affect the neurotransmission of auditory neurons. **Conclusion:** The quantitative comparison of protein screened reveals that several interesting candidate proteins, including Aars, Eprs, Ina, Slc44A1, are related to central auditory processing, which provides a theoretical basis for further study of auditory processing disorder.

[Key words] central auditory information processing; iTRAQ; proteomic

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(09): 1068-1071, 1078]

中枢听觉系统是由多个听觉中枢构成,在中枢听觉信息处理过程中,对声音定位、模式识别、复杂

声音处理、回声抑制以及声音感知等发挥重要作用。一旦出现异常,会导致中枢听觉处理障碍^[1]。但至今中枢听觉信息处理障碍的发生机制仍不清。本研究运用同位素相对标记和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantitation,iTRAQ)技术筛选并鉴定上橄榄复合体(superior olivary com-

[基金项目] 江苏省“科教兴卫工程”医学重点人才项目(RC2011073);江苏省科技厅国际合作项目(BZ2011043);江苏省人力资源和社会保障厅“六大人才高峰”项目(2009075)

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

plex, SOC)胞膜差异表达蛋白,分析差异蛋白的功能,借以探讨其在中枢听觉信息处理过程中的作用,为进一步研究揭示中枢听觉处理障碍发生机制提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

实验动物为健康成年雄性 SD 大鼠,8~9 周龄,体重约 230 g。按组织来源分成耳蜗核(cochlear nuclear complex, CN)组、SOC 组、下丘(inferior colliculus, IC)组、剩余脑组织(Rest)组,每组样本数量分别为 15、24、6、1 只,并行 3 次生物学重复。

超速离心机、分光光度计、LTQ Orbitrap XL 质谱仪(Thermo Fisher 公司,美国);低温高速离心机(Eppendorf 5430R 公司,德国);酶标仪、微分分光光度计、真空离心浓缩仪、UHPLC U3000(Thermo Fisher 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 样品制备

用 10%的水合氯醛行腹腔注射麻醉(700 mg/kg),断头,快速分离出脑组织,并在直视下取出 IC 和 CN^[2],从柄突处水平切割并分离出小脑组织。切取 SOC 部分,将脑干冻干,用冰冻切片机切成 100 μm 厚的冠状切片,然后对照大鼠脑立体定位图谱^[1],用刀片提取出感兴趣的部分。所有分离后的组织放置在液氮中,并快速储存于-80℃冰箱中。

组织样品用液氮研磨成粉状。加适量的 RIPA 裂解液溶解,混匀,冰上放置 10 min,根据需要加入适量抑制剂。超声提取,充分裂解后,140 000 r/min 离心 5 min,取上清。

1.2.2 iTRAQ 质谱分析

各取 300 μg 定量后的样品蛋白进行 Filter aided proteome preparation(FASP)酶解,多次离心后取滤液,采用微分分光光度计行肽段定量。分别取出 40 μg 各组织样品,用 iTRAQ Reagent-4plex Multiplex Kit(AB SCIEX)对其进行标记。然后将标记后的所有肽段混合,对其行 RP(ratio of probability)预分级。收集流穿及洗脱部分,根据色谱图将样品合并后,真空离心浓缩。经毛细管高效液相色谱分离后,用 LTQ Orbitrap XL 质谱仪进行质谱分析。

1.2.3 质谱及生物信息学分析

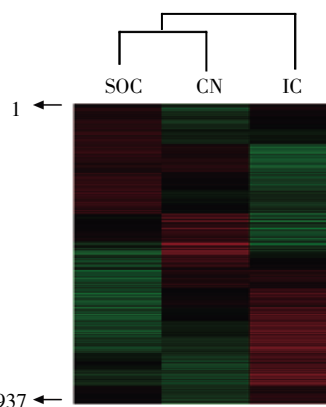
质谱分析原始数据为 RAW(原始)文件,用软件 Proteome Discoverer 1.4(Thermo Scientific 公司,美国)进行查库、鉴定和定量分析。然后对所鉴定出的

蛋白进行生物信息学分析,通过 Gene Ontology 数据库对差异蛋白的主要生物学功能进行分析。运用 STRING9.0 检索分析这些区域特异蛋白间的相互作用,找出一些可能与中枢听觉处理相关的蛋白。

2 结果

2.1 整体比较分析

3 次生物学重复实验中,用 iTRAQ 技术共鉴定出 3 061 个听觉脑干蛋白,其中特征肽段(unique peptides)数≥2 的蛋白数有 1 937 个。以小脑蛋白(非听觉蛋白)作参照,运用 cluster 3.0 软件对 3 个区域听觉脑干蛋白进行聚类分析,结果显示 SOC 和 CN 之间蛋白表达相似,而 IC 与前两者间的蛋白表达相差较大(图 1)。对每 2 个区域蛋白进行比较分析,确定差异蛋白数量,发现 3 个听觉区域蛋白与小脑非听觉蛋白比较,差异蛋白点数相近,分别为 439、458 和 432 个。CN-IC 间和 SOC-IC 间的差异蛋白点数比较接近,分别为 367 和 477,而 CN-SOC 之间的差异蛋白点数为 171 个,由此也可得出 CN 和 SOC 之间蛋白相似,而两者与 IC 相比存在较大差异。



热图与聚类分析 SOC、CN 和 IC 部位的蛋白相对于 Rest 部位的蛋白表达谱,其中红色表示上调,绿色表示下调。

图 1 热图与聚类分析

Figure 1 Dendrograms and cluster maps

2.2 SOC 区域特异蛋白

本研究发现 14 种 SOC 区域特异性蛋白(表 1)。当某蛋白在某区域的表达量超过在其他区域表达量的 50%,则认为此蛋白为该区域的特异性蛋白。SOC/CN 比率表示蛋白在 SOC 区域和 CN 区域的表达比率,以蛋白表达倍数变化的 1.5 倍(上调 50%)卡值进行筛选,同时保证变异系数≤30%,且两组 *t* 检验 *P* 值<0.05,然后将 SOC 针对其他 3 个部分高表达的蛋白取交集,即得到 SOC 的区域特异性蛋白。

表1 SOC区域特异蛋白
Table 1 SOC region-typical proteins

登录号	蛋白名称	基因名称	比值		
			SOC/Rest	SOC/CN	SOC/IC
Q5XIF6	tubulin alpha-4A chain	Tuba4a	2.066	1.501	1.666
P23565	α -internexin	Ina	1.707	1.556	1.638
P11348	dihydropteridine reductase	Qdpr	3.991	1.701	2.437
Q68FS4	cytosol aminopeptidase	Lap3	3.080	1.574	2.215
G3V9G4	ATP citrate lyase, isoform CRA_b	Acly	4.312	1.658	2.427
P50475	alanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	Aars	2.785	1.627	1.898
F1M5N4	malic enzyme	Me3	2.864	1.548	2.357
Q498N3	Dctn4 protein	Dctn4	1.801	1.590	1.828
Q6TXE9	glutamyl-prolyl-tRNA synthetase	Eprs	3.179	1.602	1.955
G3V8B6	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	Psm1	2.140	1.594	1.508
F1LPF3	solute carrier 44A1	Slc44a1	3.788	1.970	1.579
G3V796	acetyl-coenzyme A dehydrogenase, medium chain	Acadm	3.737	1.716	1.881
Q5IOD7	Xaa-Pro dipeptidase	Pepd	2.058	1.568	2.684
B1WC11	acyl-CoA synthetase short-chain family member 2		4.581	1.631	2.504

2.3 区域蛋白的生物信息学分析

将所获得的区域表达蛋白进行GO(Gene Ontology)分析(图2),参与的生物过程分析(biological process, BP)显示,线粒体及能量代谢相关蛋白高表达,部分蛋白质作用于神经系统发育、神经递质释放、冲动传导和突触可塑性,研究发现丙氨酰-tRNA合成酶(alanyl-tRNA synthetase, Aars)、双官能谷氨酰-脯氨酰-tRNA合成酶(glutamyl-prolyl-tRNA synthetase, Eprs)、 α -内连蛋白(α -internexin, Ina)和溶质载体44A1(solute carrier 44A1, Slc44A1)等蛋白可能在中枢听觉处理过程中具有一定意义:①运用STRING9.0检索分析这些区域特异蛋白间相互作用(图3),Aars和Eprs蛋白为相互作用关键点;②Ina和Slc44A1与信号转导相关。

3 讨论

蛋白质组学技术以其高通量、微型化和自动化的特点,目前已被广泛应用于基础及临床疾病研究。iTRAQ技术作为一种新的、功能强大的蛋白绝对和相对定量研究的方法,可同时对4种或8种样品进行绝对和相对定量研究,相对于传统蛋白质组学研究中运用的定性及定量方法,具有重复性好、灵敏度高、反应速度快、标记完全等优点^[3-4]。质膜蛋白富含转录因子、受体和通道蛋白等,是细胞内外物质交换和信息交流的场所^[1]。因而,本研究采用iTRAQ技术对听觉脑干膜蛋白进行分析,共鉴定出1937个听觉脑干差异膜蛋白,其中CN和SOC间较其他部位相比,相似性较高,分析得出CN、SOC、

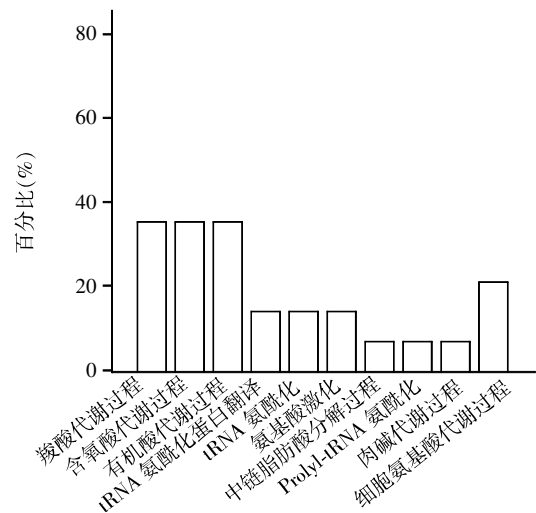


图2 SOC的GO分析结果
Figure 2 GO analytical results of SOC

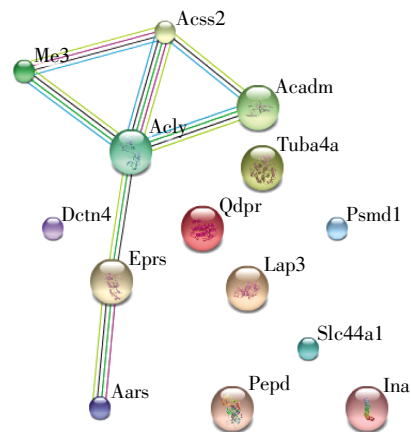


图3 SOC区域特异蛋白的相互作用分析
Figure 3 Interaction analysis of region-specific proteins of SOC

和 IC 区域特异蛋白分别有 17、14 和 53 个。各区域的蛋白表达不同,决定每个区域功能,暗示功能需求不同决定蛋白变化。

本研究认为值得关注的蛋白有:Aars、Eprs、Ina、Slc44A1 等。

Aars 和 Eprs 同属于氨基酰-tRNA 合成酶蛋白家族,存在于细胞质和线粒体中^[5]。两者催化 tRNA 的氨基酰化反应,为蛋白质生物合成的原料^[6],还具有转录和翻译调控、RNA 的剪切、tRNA 的成熟与转运、氨基酸的生物合成、DNA 结合以及细胞因子等功能。当氨基酰-tRNA 合成酶在识别底物时发生错误,将会导致新合成的蛋白质一级结构发生变化,进而导致细胞功能紊乱。研究发现,当 Aars 蛋白基因发生突变,蛋白的编校功能发生异常,影响中枢神经系统功能,导致神经系统退行性疾病的发生^[7]。不仅如此,Aars 和 Eprs 还能在中枢神经及轴突生长过程中起重要作用,而轴突直径大小影响神经信号转导速度,最终影响信息处理能力^[8]。Yao 等^[9]发现,线粒体内 Aars 异常,会导致听觉系统功能的下降,这或许因线粒体 tRNA 的异常,进而影响中枢听觉信息处理能力,需我们进一步验证。

Ina,属于神经元中间丝蛋白家族,为 IV 型中间丝蛋白,主要存在于中枢神经元轴突中^[10],该蛋白能调节中间丝(neurofilament,NF),后者能调节轴突直径生长,而轴突直径大小与信号转导速度有关。有研究发现 Ina 减少,引起 NF 蛋白减少,会导致 30%的轴突量下降,而且当该基因发生突变时,还会引起 Charcot-Marie-Tooth(CMT)疾病的发生^[11],这对于中枢听觉神经系统中听觉信息的高效传递非常重要。Ina 蛋白还稳定神经元的结构,并通过其稳定的性能,保证结构的可塑性能^[12]。有研究发现,Ina 在视觉神经元的发育过程中,对其神经元的可塑性起着重要作用^[13],在感觉神经元(听觉)中可能也起到神经可塑性作用。

Slc44a1 也称之为胆碱转运蛋白 1 (Choline transporter-like protein 1,CTL1)的一种亚型,是最新发现的一种中间亲和力的胆碱能转运蛋白,质膜胆碱转运体蛋白。Slc44a1 主要在神经元和少突胶质细胞中高度表达,存在于细胞膜和线粒体中^[14]。其参与物质运输和胆碱代谢,能促进神经元和轴突的生长发育^[15],参与髓鞘形成,并最大限度地调节中枢神经系统后期的发育。中枢神经脉冲传递的速度受神经纤维的直径和髓鞘化程度的影响,当其发生变化,都能影响中枢神经对信息的快速处理能力。其

中,Slc44a1 还位于线粒体中,参与胆碱代谢途径,确保胆碱物质的转运,并对细胞活动提供能量,也能影响信息处理能力^[16]。但 Slc44a1 在中枢听觉信息处理过程中的具体机制却未可知。

除上述 4 种蛋白以外,表 1 中还有 10 种蛋白,经 GO 分析发现,它们主要与线粒体能量代谢有关^[17]。对成熟大鼠前脑皮质能量代谢研究发现,大脑中 47%的能量用于维持动作电位,34%的能量用于维持谷氨酸突触后膜效应^[18]。因此,中枢听觉系统处理信息需要消耗能量,一旦能量代谢蛋白出现异常,就有可能导致中枢信息处理障碍。

通过对 SOC 胞膜蛋白组学研究,发现 Aars、Eprs、Ina、Slc44A1 4 种蛋白可能在中枢听觉信息处理过程具有重要作用,为进一步探讨中枢听觉处理障碍的发病机制提供了理论依据。

[参考文献]

- [1] Nothwang HG, Becker M, Ociepka K, et al. Protein analysis in the rat auditory brainstem by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry[J]. Brain Res Mol Brain Res,2003,116(1/2):59-69
- [2] Becker M, Nothwang HG, Friauf E. Different protein profiles in inferior colliculus and cerebellum: a comparative proteomic study[J]. Neuroscience,2008,154 (1):233-244
- [3] Wu WW, Wang G, Baek SJ, et al. Comparative study of three proteomic quantitative methods, DIGE, cICAT, and iTRAQ, using 2D gel-or LC-MALDI TOF/TOF[J]. J Proteome Res,2006,5(3):651-658
- [4] Ross PL, Huang YN, Marchese JN, et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents[J]. Mol Cell Proteomics,2004,3(12):1154-1169
- [5] Antonellis A, Green ED. The role of aminoacyl-tRNA synthetases in genetic diseases[J]. Annu Rev Genomics Hum Genet,2008,9(1):87-107
- [6] Schimmel P. Aminoacyl tRNA synthetases: general scheme of structure-function relationships in the polypeptides and recognition of transfer RNAs[J]. Annu Rev Biochem, 1987,56(2):125-158
- [7] Lee JW, Beebe K, Nangle LA, et al. Editing-defective tRNA synthetase causes protein misfolding and neurodegeneration[J]. Nature,2006,443(717):50-55
- [8] Stum M, McLaughlin HM, Kleinbrink EL, et al. An assessment of mechanisms underlying peripheral axonal degeneration caused by aminoacyl-tRNA synthetase mu-

(下转第 1078 页)