

# 基于质谱技术分析软骨细胞线粒体蛋白质及细胞凋亡机制

余光书<sup>1</sup> 熊国胜<sup>1</sup> 熊圣仁<sup>1</sup> 林焱斌<sup>1△</sup>

**[摘要]** **目的:**通过定性观察膝骨性关节炎软骨细胞线粒体中的蛋白质,进一步探讨软骨细胞凋亡的分子机制。**方法:**将收集到的膝关节软骨组织进行线粒体提取,并采用定量蛋白质组学串联质谱标签标记技术进行检测,再通过搜索 Uniprot 数据库和利用 Proteome Discoverer 软件进行分析,从而进一步分析其生物学信息。**结果:**通过数据库检索得到 294 个蛋白质点,其中有 14 种蛋白质点定位于线粒体,另外根据数据库及线粒体的结构可能有 11 种定位于线粒体。通过数据库的筛选、分析、分类,归纳出的蛋白质有 ATP 合酶、超氧化物歧化酶、谷氨酸脱氢酶 1、谷胱甘肽 S-转移酶、天冬氨酸转氨酶、胸苷激酶 2、苹果酸脱氢酶、补体、细胞色素 b-c1、热休克蛋白 10 kDa、热休克蛋白 60 kDa、Trifunctional enzyme 及 Stress-70 protein。另外,通过蛋白复合物的生物学进程、细胞成分及分子功能的分析,可能存在的信号通路有 BMP4-BGN 与 Cofilin-actin-CAP1。**结论:**对软骨细胞线粒体中的蛋白质作全面的定性观察有助于进一步了解软骨细胞凋亡的分子机制,从而为骨性关节炎寻找更好的预测指标和干预靶点。

**[关键词]** 串联质谱标签(TMT);软骨细胞;线粒体;蛋白质组学

**[中图分类号]** R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2018)01-0001-04

## Mitochondrial Protein Research in Chondrocytes and Analysis of Cell Apoptosis Mechanism Based on Mass Spectrometry

YU Guangshu<sup>1</sup> XIONG Guosheng<sup>1</sup> XIONG Shengren<sup>1</sup> LIN Yanbin<sup>1△</sup>

<sup>1</sup>Department of Orthopedics, Fuzhou Second Hospital Affiliated to Xiamen University, Fuzhou Fujian 350007, China.

**Abstract Objective:** To explore the molecular mechanism of chondrocytes apoptosis by observing the proteins of chondrocytes of knee osteoarthritis. **Methods:** Mitochondria were extracted from the organization of knee osteoarthritis, and were detected by the quantitative proteomics TMT technology. Then the Uniprot database and Proteome Discoverer software were applied to analyze the bioinformatics. **Results:** All 294 protein spots were retrieved from the database. 14 protein spots were located in mitochondria, and 11 protein spots were expected to be located in mitochondria according to the structure of the mitochondria and database. ATP synthase, superoxide dismutase, glutamate dehydrogenase 1, glutathione s-transferase p, aspartate aminotransferase, thymidine kinase 2, malate dehydrogenase, complement, cytochrome b-c1, 10 kDa heat shock protein, 60 kDa heat shock protein, trifunctional enzyme subunit alpha, stress-70 protein was summarized by screening, analyzing and classifying based on database. In addition, the signaling pathways of BMP4-BGN and Cofilin-actin-CAP1 may be in mitochondria by analyzing of biological process, cellular component, and molecular function. **Conclusion:** The molecular mechanisms of chondrocyte apoptosis is further understood by studying the proteins of chondrocytes of knee osteoarthritis, which will be used to screen the diagnostic biomarkers and related to therapeutic targets.

**Keywords:** tandem mass tags(TMT); chondrocytes; mitochondria; proteomics

软骨细胞的凋亡在骨性关节炎的发生发展过程中起着重要的作用,阻止或延缓软骨细胞发生凋亡是防治骨性关节炎的一条有效途径<sup>[1-3]</sup>。然而,目前文献对

细胞凋亡的机制报道各有不同,但一般认为是级联式基因表达的结果,细胞内部的基因直接调控凋亡的发生和发展,细胞外部因素通过信号转导通路影响这些基因的表达,从而间接调控凋亡。其中,线粒体参与调控的细胞凋亡是目前的研究热点<sup>[4]</sup>。线粒体介导的凋亡通路是一个非常复杂的过程,很多凋亡因子都参与其中。其可通过呼吸电子漏途径,线粒体产生大量活性氧,使其通透性转换孔开放,引起线粒体跨膜电位降低,导致 IGF-1, IGFBP-3 及 MAPK 等凋亡蛋白从线

基金项目:福建省自然科学基金资助项目(2016J01597)

福州市科技计划项目(2017-S-130-3)

福州市卫生计生科技计划项目(2016-S-wq2)

<sup>1</sup> 厦门大学附属福州第二医院骨科(福州, 350007)

<sup>△</sup>通信作者 E-mail: 812953900@qq.com

粒体释放到胞浆,随之引起半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶(Caspase)瀑布式活化和细胞死亡<sup>[5-7]</sup>。但是,目前对于关节软骨细胞线粒体中的蛋白认识仍不完善,通过线粒体蛋白质的研究对于进一步认识细胞的凋亡机制具有重要意义。

串联质谱标签(Tandem Mass Tags, TMT)是一种同量异序化学标签,通过串联质谱对不同样品中的蛋白进行同时鉴定和定量的有力工具。通过对各个时期蛋白质酶解后的肽段进行标记、质谱鉴定及分析,这种方法比其它化学标记更为有效、准确,目前已广泛应用于研究疾病发病机制及生物标志物寻找等方面。但由于人类骨性关节炎软骨细胞培养困难、正常人软骨细胞取材有限等原因,目前对于软骨细胞的蛋白质研究多取材于动物,对于研究人类骨性关节炎软骨细胞的凋亡存在一定的差异。为了更好了解人膝骨性关节炎软骨细胞线粒体中的主要蛋白质组成,以及探讨骨性关节炎软骨细胞中的信号通路,本研究采用质谱技术对线粒体中的蛋白质进行定性分析,为进一步实验做准备。

1 材料与方法

1.1 膝骨性关节炎软骨组织标本的获取与保存

软骨组织标本取材于70~75岁行膝关节表面置换术的骨性关节炎患者,骨性关节炎诊断依据国际骨关节炎研究学会(OARSI)2014年发布的膝骨关节炎指南<sup>[8]</sup>。软骨组织标本取材均经患者或家属知情同意,并经医院伦理委员会审批。所有软骨组织标本都在洁净环境下获取和进行软组织的剔除,取材后的标本迅速置于4℃下0.5 mol/L的甘油中保存,并且在1 h内进行软骨组织线粒体的提取。

1.2 软骨组织线粒体的提取

用刀片将软骨组织于4℃下0.5 mol/L的甘油中切成细小的组织碎片,称取80 mg于预冷的PBS中洗涤,离心后取沉淀的组织样品并加入胰酶消化液进行

裂解,离心后取沉淀组织样品并按照线粒体分离试剂盒的步骤进行线粒体提取(组织线粒体分离试剂盒由碧云天生物技术有限公司提供,选用线粒体分离试剂B),用线粒体储存液保存所提取的线粒体,以便进行后续的实验,以上实验操作均在4℃下进行。

1.3 线粒体蛋白质的提取、消化和TMT肽段标记

将上述所得的线粒体悬浮液置入4℃超速离心机中离心20 min,弃去上清液后加入GENMED裂解液VI裂解,经涡旋震荡、离心的步骤后获得可溶性线粒体蛋白液(GENMED裂解液由上海杰美基因医药科技有限公司提供)。取100 μL线粒体蛋白液加入胰酶于37℃摇床中振荡酶切24 h,冻干,使用TEAB每管30 μL复溶肽段。将TMT试剂于室温解冻后,加入无水乙醇,使之完全溶解后,加到上述酶解中(TMT tag 126)。通过使用BioLC HPLC柱子通过强阳离子交换的方法(SCX)将样本汇集、分液,再以LC-MS/MS方法进行分析。

1.4 LC-MS/MS分析与数据库检索

通过HPLC反向柱层析系统,按照不同乙醇梯度进行样品分离检测,并与LTQ Orbitrap XL质谱偶联。从NCBI下载人蛋白数据库供质谱数据分析,使用Proteome Discoverer软件在数据库中进行检索分析。

2 结果

通过数据库检索得到294个蛋白质点,其中有14种定位于线粒体,另外根据数据库及线粒体的结构有11种可能定位于线粒体(见表1,2)。通过数据库的筛选、分析、分类,归纳出的蛋白质有ATP合酶、超氧化物歧化酶、谷氨酸脱氢酶1、谷胱甘肽S转移酶、天冬氨酸转氨酶、胸苷激酶2、苹果酸脱氢酶、补体、细胞色素b-c1、热休克蛋白10 kDa、热休克蛋白60 kDa、Trifunctional enzyme及Stress-70 protein。另外,通过蛋白复合物的生物学进程、细胞成分及分子功能的分析,可能存在的信号通路有BMP4-BGN与Cofilin-actin-CAP1。

表1 数据库中定位于线粒体的14种蛋白质点信息

Accession	Description	Score	MW[kDa]	calc. pI	Protein complex
P06576	ATP synthase subunit beta	404.11	56.5	5.40	F1F0-ATP synthase
P25705	ATP synthase subunit alpha	325.53	59.7	9.13	F1F0-ATP synthase
P04179	Superoxide dismutase	183.75	24.7	8.25	
P40939	Trifunctional enzyme subunit alpha	116.91	82.9	9.04	
P00367	Glutamate dehydrogenase 1	69.80	61.4	7.80	
P22695	Cytochrome b-c1 complex subunit 2	65.46	48.4	8.63	
P61604	10 kDa heat shock protein	63.10	10.9	8.92	
P38646	Stress-70 protein	56.44	73.6	6.16	Frataxin complex
P09211	Glutathione S-transferase P	54.75	23.3	5.64	
O00142	Thymidine kinase 2	53.28	31.0	8.46	
P40926	Malate dehydrogenase	52.99	35.5	8.68	
P00505	Aspartate aminotransferase	52.40	47.5	9.01	
Q07021	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein	51.11	31.3	4.84	FIB-associated protein complex
P10809	60 kDa heat shock protein	35.32	61.0	5.87	Frataxin complex

表 2 可能定位于线粒体的 11 种蛋白质点信息

Accession	Description	Score	MW[kDa]	calc. pI	Protein complex
P21810	Biglycan	1 034.90	41.6	7.52	BMP4-BGN complex
P12109	Collagen alpha-1(VI)chain	1 006.44	108.5	5.43	
P02679	Fibrinogen gamma chain	757.72	51.5	5.62	
P20849	Collagen alpha-1(IX)chain	273.76	91.8	8.72	
Q9Y240	C-type lectin domain family 11 member A	118.58	35.7	5.16	
P12107	Collagen alpha-1(XI)chain	114.12	181.0	5.17	Cofilin-actin-CAP1 complex
Q9BWS9	Chitinase domain-containing protein 1	92.25	44.9	8.63	
P39059	Collagen alpha-1(XV)chain	89.61	141.6	5.00	
P23528	Cofilin-1	80.99	18.5	8.09	
P13611	Versican core protein	66.00	372.6	4.51	
Q76M96	Coiled-coil domain-containing protein 80	47.52	108.1	9.72	

3 讨论

线粒体是一种双膜系统的结构,从功能上可以划分为外膜、内膜、内膜间隙和基质四部分,由于内膜与外膜有着不同的通透性,各部分在相对的空间内有着稳定化学成分。本研究通过质谱技术分析了膝关节软骨细胞线粒体蛋白质,发现其种类明显少于细胞质,且分子质量多小于 100 kDa,这也有可能在线粒体外膜丰富的空隙只允许小分子透过有关<sup>[9]</sup>。同时,线粒体的这种结构对细胞的生存和凋亡起着关键作用<sup>[10]</sup>。细胞外膜受到外界激活时将会触发线粒体外膜透化,从而使线粒体膜间隙的整合蛋白释放到细胞质,通过加工处理细胞的关键调控点和结构蛋白而促进凋亡<sup>[11,12]</sup>。笔者在检测中也发现了细胞色素 C、谷胱甘肽 S 转移酶、天冬氨酸转氨酶及谷氨酸脱氢酶等蛋白质。但是,由于软骨细胞硬度大及线粒体的双模结构使得其裂解困难,笔者尝试进行正常软骨细胞与骨性关节炎软骨细胞的线粒体差异蛋白比较,结果并不理想,这需要今后更优的实验方案以进一步研究。

线粒体介导的细胞凋亡通路属于内源性通路,通过呼吸链电子漏途径完成,而线粒体的另一主要功能是通过氧化磷酸化等代谢途径为细胞提供 ATP 供能。其中,线粒体基质中的苹果酸脱氢酶等可以催化完成三羧酸循环、脂肪酸和丙酮酸氧化等。线粒体内膜上具有呼吸链酶系及 ATP 酶复合体,其标志性酶为细胞色素 C 氧化酶,这些酶复合物利用过程中释放的能量将质子逆浓度梯度泵入线粒体膜间隙,但仍有少量电子会过早地还原氧气,形成超氧化物等活性氧(ROS),这些物质能引起氧化应激反应使线粒体性能发生衰退,这也是线粒体跨膜电位改变引起凋亡蛋白激活而导致细胞凋亡的因素之一<sup>[13]</sup>。本研究在检测中也证实了 ATP 合酶、超氧化物歧化酶、细胞色素 b-c1 复合物、胸苷激酶 2、苹果酸脱氢酶及 Trifunctional enzyme 等的存在。

另外,通过蛋白复合物的生物学进程、细胞成分及分子功能的分析,推测还存在 BMP4-BGN 与 Cofilin-actin-CAP1 两种信号通路。二聚糖(Biglycan,BGN)是一个富含亮氨酸的蛋白多糖,富集在骨骼组织的细胞外基质,是 BMP4 信号的外调制器<sup>[14]</sup>。实验研究表明,BGN 缺陷的小鼠将造成更少的 BMP-4 的结合,降低 BMP-4 刺激细胞的敏感性而导致成骨细胞分化的缺陷,从而出现骨性关节炎早期的表现<sup>[15]</sup>。本研究通过数据库检索分析后考虑 BMP4-BGN 复合体源于线粒体,这对于研究骨性关节炎的发生发展机制具有重要意义,但需要考虑线粒体纯度等因素对实验结果的影响,因而今后需要进一步的实验研究。腺苷酸环化酶相关蛋白 1(Cyclase-associated Protein 1,CAP1)易与肌动蛋白结合,Cofilin-1 是其一个重要的区域,其缺失将会加速肌动蛋白微丝解聚和细胞形态的改变,并且其在非肌细胞中也可以广泛表达<sup>[16]</sup>。有研究表明 CAP1 与 Cofilin-1 相互作用能够活化 Caspase 蛋白,从而调控线粒体释放凋亡因子进而诱导细胞的凋亡<sup>[17]</sup>。另外,CAP1 是参与糖原合成酶磷酸化的重要物质<sup>[18]</sup>。但是,本研究对线粒体中 Cofilin-actin-CAP1 信号通路只是一种推测,对于细胞凋亡机制的研究仍需进一步研究。

软骨细胞的凋亡是骨性关节炎发生发展的一个重要因素,促凋亡与抗凋亡信号之间的失衡是介导软骨细胞凋亡的关键。细胞凋亡是级联式基因表达的结果,其内部的基因直接调控细胞的凋亡,而外部因素可通过信号转导通路影响这些基因的表达,从而间接调控凋亡<sup>[19]</sup>。很多学者认为线粒体凋亡通路是软骨细胞凋亡的重要途径之一<sup>[20]</sup>。但是,目前对于骨性关节炎软骨细胞线粒体中的蛋白质认识仍不完善,并且各蛋白质多通过协调作用起到调控作用,因此本研究通过对软骨细胞线粒体中的蛋白质作全面的定性观察,有助于进一步了解软骨细胞凋亡的分子机制,从而为

骨性关节炎寻找更好的预测指标和干预靶点。

## 参考文献

- [1] Che X, Chi L, Park CY, et al. A novel method to detect articular chondrocyte death during early stages of osteoarthritis using a non-invasive ApoPep-1 probe[J]. *Arthritis Res Ther*, 2015, 17(1): 309.
- [2] Hwang HS, Kim HA. Chondrocyte apoptosis in the pathogenesis of osteoarthritis[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(11): 26035-26054.
- [3] Shi X, Ye H, Yao X, et al. The involvement and possible mechanism of NR4A1 in chondrocyte apoptosis during osteoarthritis[J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(2): 746-754.
- [4] Yang Q, Guo S, Wang S, et al. Advanced glycation end products-induced chondrocyte apoptosis through mitochondrial dysfunction in cultured rabbit chondrocyte[J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2015, 29(1): 54-61.
- [5] Wang J, Cao W, Niu F, et al. Adenoviral vector expressing IGF-1 protects murine chondrogenic ATDC5 cells against hydrogen peroxide-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis[J]. *J Toxicol Sci*, 2015, 40(5): 585-595.
- [6] Kong D, Zheng T, Zhang M, et al. Static mechanical stress induces apoptosis in rat endplate chondrocytes through MAPK and mitochondria-dependent caspase activation signaling pathways[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e69403.
- [7] Wei Z, Li HH. IGFBP-3 may trigger osteoarthritis by inducing apoptosis of chondrocytes through Nur77 translocation[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(12): 15599-15610.
- [8] McAlindon Y, Bannuru Y, Sullivan, et al. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis[J]. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2014, 22(3): 363-388.
- [9] Hanson B, Nuttal S, Hoogenraad N, et al. A receptor for the import of proteins into human mitochondria[J]. *Eur J Biochem*, 1996, 235(3): 750-753.
- [10] Xu JY, Zhou M, Ouyang J, et al. Gambogic acid induces mitochondria-dependent apoptosis by modulation of Bcl-2 and Bax in mantle cell lymphoma JeKo-11 cells[J]. *Chin J Cancer Res*, 2013, 25(2): 183-191.
- [11] Lee YJ, Kim SA, Lee SH, et al. Hyaluronan suppresses lidocaine-induced apoptosis of human chondrocytes in vitro by inhibiting the p53-dependent mitochondrial apoptotic pathway[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2016, 37(5): 664-673.
- [12] Lee SW, Rho JH, Lee SY, et al. Leptin protects rat articular chondrocytes from cytotoxicity induced by TNF-alpha in the presence of cyclohexamide[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2015, 23(12): 2269-2278.
- [13] Song W, Hu P, Shan Y, et al. Cartilage polysaccharide induces apoptosis in K562 cells through a reactive oxygen species-mediated caspase pathway[J]. *Food Funct*, 2014, 5(10): 2486-2493.
- [14] Parisuthiman D, Mochida Y, Duarte WR, et al. Biglycan modulates osteoblast differentiation and matrix mineralization[J]. *J Bone Miner Res*, 2005, 20(10): 1878-1886.
- [15] Chen XD, Fisher LW, Robey PG, et al. The small leucine-rich proteoglycan biglycan modulates BMP-4-induced osteoblast differentiation[J]. *FASEB J*, 2004, 18(9): 948-958.
- [16] Bertling E, Hotulainen P, Mattila PK, et al. Cyclase-associated protein 1 (CAP1) promotes cofilin-induced actin dynamics in mammalian nonmuscle cells[J]. *Mol Biol Cell*, 2004, 15(5): 2324-2334.
- [17] Wang C, Zhou GL, Vedantam S, et al. Mitochondrial shuttling of CAP1 promotes actin- and cofilin-dependent apoptosis[J]. *J Cell Sci*, 2008, 121(17): 2913-2920.
- [18] Zhou GL, Zhang H, Wu H, et al. Phosphorylation of the cytoskeletal protein CAP1 controls its association with cofilin and actin[J]. *J Cell Sci*, 2014, 127(23): 5052-5065.
- [19] Tew SR, McDermott BT, Fentem RB, et al. Transcriptome-wide analysis of messenger RNA decay in normal and osteoarthritic human articular chondrocytes[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2014, 66(11): 3052-3061.
- [20] Liu F, Liu G, Liang W, et al. Duhuo Jisheng decoction treatment inhibits the sodium nitroprussiate-induced apoptosis of chondrocytes through the mitochondria-dependent signaling pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2014, 34(6): 1573-1580.

(收稿日期: 2017-08-10)