

文章编号: 1674-5566(2018)06-0855-09

DOI:10.12024/jsou.20180402267

## 不同渗透压条件下金钱鱼肾原代细胞的差异蛋白分析

廉颖, 桂朗, 张俊彬

(上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

**摘要:** 为了研究海水鱼类肾脏的渗透压调节功能,以金钱鱼肾原代细胞作为研究对象,使用低渗、等渗和高渗培养基处理细胞 24 h,通过 Label-free 定量法进行蛋白质组学分析,质谱定性得到蛋白质共计 3 787 个,低渗组与等渗组比较,得到显著差异蛋白 14 个;高渗组与等渗组比较,得到显著差异蛋白 31 个。筛选标准为 Ratio > + / - 2,且  $P < 0.05$ 。对差异表达蛋白进行 Gene Ontology (GO) 功能注释,GO 富集分析以及蛋白质聚类分析,并挑选了与细胞骨架、能量合成以及蛋白结合相关的蛋白质进行了 mRNA 水平的定量检测,从基因和蛋白水平了解肾脏细胞在渗透调节中的变化。结果显示:低渗组中,细胞骨架相关蛋白质受到的影响较大,其中包括微管蛋白  $\alpha$ -4A 链、微管蛋白  $\beta$  链、肌球蛋白-11 以及 type I cytoskeletal 18-like,而高渗组中差异显著的蛋白质多为细胞外间质蛋白,如纤连蛋白、胶原蛋白等。因此推测低渗刺激后,胞内渗透压高于胞外渗透压,细胞立即膨胀并大量表达细胞骨架蛋白应对低渗刺激,适应细胞形态的改变;而高渗刺激下,细胞处于失水状态,形态骤缩,影响细胞间的粘连,而 *fn*, *plod2* 和 *arf1* 升高表明,细胞正在修复受损蛋白。本研究从细胞水平初步分析了金钱鱼肾脏在不同渗透压刺激下的应答机制,为研究细胞水平的渗透压调节机制提供了新的观点。

**关键词:** 金钱鱼; 肾原代细胞; 蛋白质组学; Label-free 定量; 渗透压调节

**中图分类号:** S 917      **文献标志码:** A

盐度是影响鱼类各种生理活动的重要环境因子之一。河口等咸淡水交融区域内的鱼类容易受环境渗透压的影响,需要通过调节细胞膜内外的离子和水来维持细胞的渗透压<sup>[1]</sup>。肾脏、鳃和肠是参与渗透调节的主要器官,而肾脏在不同的环境盐度下的功能是不同的<sup>[2]</sup>。肾脏中含有特定的渗透信号接收细胞监测环境渗透因子浓度的变化,调节自身具有内分泌功能的细胞从而分泌特定的激素,作出相应地应答<sup>[3]</sup>。在细胞中,细胞骨架赋予细胞形状在细胞环境中的分子运输中起关键作用并形成复杂的网络<sup>[4]</sup>。然而,在渗透压感受因子识别的过程中,许多细胞的应激反应,如细胞体积的改变、细胞膜的伸缩、细胞骨架的改变和分子的聚集等,只有在渗透压骤变的情况下才会出现,这主要是因为细胞膜的渗透作用;若渗透压的改变程度较小且十分缓慢,细胞则难以出现相应的渗透反应,因此推测,细胞

内外的离子变化强度是触发渗透压感受因子的原始信号<sup>[5]</sup>。另外,细胞膜上通常存在离子通道、离子转运蛋白、水通道蛋白及膜脂质等,且结合方式不同,所产生的渗透作用也不同<sup>[5]</sup>。随着对渗透胁迫所造成细胞体积变化的调控机制的深入研究,细胞体积大小的调控已被证实是渗透胁迫下鱼类细胞的应答反应<sup>[6-7]</sup>。蛋白质通过调节体内平衡过程和内在代谢来确定细胞的功能和结构表型<sup>[8]</sup>。但这些大分子在细胞内外的变化以及低渗和高渗刺激下调控机制的区别尚未清楚。因此,使用功能蛋白质组学技术来发现渗透胁迫下蛋白质的变化是至关重要的。

蛋白质组学是全面了解蛋白对环境压力反应的主要方法之一<sup>[9]</sup>。目前也开始应用于鱼类渗透压相关研究。DIETMAR<sup>[10]</sup>等通过蛋白质组学分析海水种群和淡水种群中的三刺鱼 (*Gasterosteus aculeatus*) 肾脏中的差异蛋白,发现

收稿日期: 2018-04-09      修回日期: 2018-06-29

基金项目: 国家青年自然科学基金(31302214)

作者简介: 廉颖(1992—),女,硕士研究生,研究方向为海洋生物。E-mail:ly\_1104m@163.com

通信作者: 桂朗, E-mail:lgui@shou.edu.cn

了肾脏功能调节的多样化。MELODIE<sup>[9]</sup>等运用蛋白质组学分析了条纹鲶鱼 (*Pangasianodon hypophthalmus*) 细菌感染前后的肾脏蛋白表达变化。

金钱鱼 (*Scatophagus argus*) 作为一种广盐性鱼类,能够耐受一定范围内的盐度波动。我们的研究表明非等渗环境对金钱鱼肾细胞系的细胞生长,细胞形态,细胞体积均有影响并导致细胞损伤,引起体内和体外渗透调节相关基因和蛋白质表达变化<sup>[11-12]</sup>。本研究进一步通过蛋白质组学分析原代肾细胞内蛋白的变化趋势,为深入研究肾细胞渗透调节机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

金钱鱼 [(40.0 ± 5.0) g] 购于广东省湛江基地,取 5 尾金钱鱼暂养于实验室循环水 [盐度为 25,温度为 (27 ± 2) °C] 系统中,早、晚投喂一次丰年虾,解剖取组织前两天停止喂食。

### 1.2 肾原代细胞培养及高、低渗处理

配制 3 个不同渗透压的培养基,分别为 300 mOsmol/L (等渗培养基)、150 mOsmol/L (低渗培养基) 以及 600 mOsmol/L (高渗培养基)。通过向等渗溶液添加 ddH<sub>2</sub>O 配制低渗溶液;通过添加无菌饱和 NaCl 溶液配制高渗溶液,测量渗透压 (误差 < 2.0 mOsmol/L)。最后各渗透压溶液分别加入胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS),使 FBS 终浓度为 20%,备用。

取一尾状态良好的金钱鱼,抽血后无菌操作取肾组织,用含有 400 U 双抗冲洗肾脏。去除肾脏中残留的血液后,将肾组织剪至 1 mm<sup>3</sup> 大小,放入 15 mL 离心管中。加入 10 mL 0.25% Trypsin-EDTA,28 °C 消化 30 min 后加入 3 mL 20% FBS 的 L15 培养基 (300 mOsmol/L) 终止消化。用 200 目过滤细胞,细胞悬液室温离心 10 min,1 000 r/min,离心后弃上清。加入 5 mL 20% FBS/400 U 双抗的 L15 培养基重悬细胞,接种至细胞培养瓶,28 °C 培养,待细胞贴壁。

用 75 cm<sup>2</sup> 的细胞培养瓶培养肾原代细胞,将细胞分为等渗组、低渗组、高渗组,每组 3 个生物学重复。细胞长至 90% 时,分别更换相应培养基,同时培养 24 h 后,收集细胞,每组提取蛋白用

于蛋白质组学分析,提取 RNA 用于实时荧光定量 (Real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 分析。

### 1.3 蛋白提取及 SDS-PAGE 凝胶电泳

细胞加入 150 mL SDT 裂解液,沸水浴 15 min,每 5 min 在振荡器上振荡一次,超声处理 (100 W,工作 10 s,间歇 10 s,循环 10 次),12 000 g 离心 30 min,取上清。BCA 法进行蛋白质定量。

每组样品各取 20 μg 蛋白质,4:1 加入 5 × 上样缓冲液,沸水浴 5 min,14 000 g 离心 10 min,保留上清,进行 SDS-PAGE 电泳后,进行考马斯亮蓝染色,检测蛋白质量。

### 1.4 蛋白质样品酶解

每份样品取 200 μg 蛋白质,分别加入二硫苏糖醇,使之终浓度为 100 mmol/L,沸水浴 5 min 后,冷却至室温;加入 200 mL UA buffer,转入 30 kd 超滤离心管,室温离心 14 000 g,15 min,弃滤液,此步骤重复 1 次;加入 100 mL IAA,600 r/min 振荡 1 min,室温避光 30 min 后,离心 14 000 g,10 min;加入 100 mL UA buffer,离心 14 000 g,10 min,此步骤重复 2 次;加入 100 mL NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> buffer,离心 14 000 g,10 min,此步骤重复 2 次;加入 40 mL Trypsin buffer,600 r/min 振荡 1 min 后,37 °C 孵育 16 ~ 18 h;将液体移至新的离心管,离心 14 000 g,10 min,收集滤液,C18-SD Extraction Disk Cartridge 脱盐处理,吸光度 OD<sub>280</sub> 定量。

### 1.5 LC-MS/MS 及 Maxquant 非标记分析

按定量结果取 2 μg 酶解产物进行 LC-MS/MS 分析,每个样品进样 1 次,采用纳升流速 HPLC 液相系统 EASY-nLC1000 进行分离,再经过色谱柱进行分离,流速为 400 nL/min;酶解产物经毛细管高效液相色谱分离后用 Q-Exactive 质谱仪 (Thermo Finnigan, 硅谷, 美国) 进行质谱分析。LC-MS/MS 原始文件导入 Maxquant 软件 (版本号 1.3.0.5) 进行查库,进行非标记定量分析。数据库为 Uniprot\_Eupercaria\_200194\_20160826.fasta。

### 1.6 RNA 提取、cDNA 合成及 RT-qPCR

使用 Trizol Reagent 提取细胞样品总 RNA。用琼脂糖电泳检测 RNA 的完整性,用 Nanodrop ND-2000 对 RNA 浓度进行测定,1.0 mg RNA 为模板,以 Oligo d (T) 16 作为接头引物,合成 cDNA, -20 °C 保存备用。

表 1 RT-qPCR 引物

Tab.1 Primer used for RT-qPCR

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	产物大小/bp Product size
<i>arf1</i> -F	GACAAAATCAGGCCGCTGTG	197
<i>arf1</i> -R	GCAGCATTCATAGCGTTGGG	
<i>fn</i> -F	CTCGATTACCAGTTGCCCT	143
<i>fn</i> -R	AGTCTCTCATCCTTGGCCCT	
<i>aldob</i> -F	TCGGCATCAAGGTGGACAAA	199
<i>aldob</i> -R	AGGACATTGGCGTTCTCTGC	
<i>ndrg1</i> -F	GTGCTGAGGGATGGATGGAC	144
<i>ndrg1</i> -R	AGATGTGCTGGCGGTATGTT	
<i>plod2</i> -F	CCTCAAACCTCTGCGCCTAT	151
<i>plod2</i> -R	CTCCCTTCCACGTTTCTCCC	
<i>p4ha2</i> -F	TTCCTGGGACACCTGTCAA	181
<i>p4ha2</i> -R	ACCGGAGGAGAGCTTTAGCA	
<i>myosin-11</i> -F	GCCCACCTCCACTAAATCCA	124
<i>myosin-11</i> -R	GATGATGCAGCGGACGAAGT	
<i>dnaja2</i> -F	CTGTGGCGTTTCCAGATGAC	130
<i>dnaja2</i> -R	TTCTGTATTGGCGCATTCCCT	
<i>coxVIIb</i> -F	CAACACCAATCAAACCCGCA	137
<i>coxVIIb</i> -R	TATTGGGGCAGAGGCTTTTGT	
<i>rbm8a</i> -F	GTGGAGGGCTGGATCTTGT	149
<i>rbm8a</i> -R	ACCAGTGGCTATCCCTTGAG	
$\beta$ -actin-F	TAGTCTGTGAGGTCACGG	151
$\beta$ -actin-R	CTGTGCTGTCCCTGTATG	

使用 ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, 旧金山福斯特, 美国) 进行 RT-qPCR 检测, 所用试剂盒为 TaKaRa SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa, 日本)。挑选的蛋白质为低渗组细胞色素 c 氧化酶 VIIb (cytochrome c oxidase subunit VIIb, COX VIIb), dnaJ 热休克蛋白 A2 (dnaJ homolog subfamily A member 2, DNAJA2), N-myc 下游调节蛋白 1 (N-

myc downstream regulated 1, NDRG-1), 肌球蛋白-11 (myosin-11); 高渗组: 纤连蛋白 (fibronectin, FN), 二磷酸腺苷-核糖基化因子蛋白 1 (ADP-ribosylation factor-like protein 1, ARF1), 赖氨酸羟化酶 (procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2, PLOD2), 脯氨酸-4-羟化酶  $\alpha$ 2 (prolyl 4-hydroxylase subunit  $\alpha$ -2, P4HA2), 醛缩酶 B (fructose-bisphosphatealdolase B, ALDOB), 核糖核酸结合基序蛋白 8A (RNA-binding protein 8A, RBM8A)。以  $\beta$ -actin 作为内参基因, 利用定量引物 (表 1) 进行 RT-qPCR。反应体系为 (10 mL); SYBR Premix Ex Taq II (2  $\times$ ) 5 mL, 上、下游引物 (10 pmol) 各 0.2 mL, ROX II (50  $\times$ ) 0.2 mL, cDNA 模板 1 mL, 用水补至 10 mL。二步法反应程序如下: (1) 95  $^{\circ}$ C, 预变性 30 s; (2) 95  $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 30 s, PCR 反应 40 个循环; 用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法进行分析, 为确保 RT-qPCR 反应的准确性和可重复性, 每个样品均重复测定 3 次, 使用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析。

## 2 结果

### 2.1 差异表达蛋白质 GO 功能注释及富集分析

提取高、低渗处理组的肾原代细胞蛋白质, 通过 label-free 蛋白定量分析法得到了 3 787 个蛋白质, 其中, 低渗组与等渗组比较得到 14 个显著差异蛋白, 高渗组与等渗组比较得到 31 个显著差异蛋白 (Ratio > +/ -2.0,  $P < 0.05$ ) (表 2 和表 3)。

表 2 低渗组中的差异蛋白

Tab.2 The differential proteins in hypo-group

蛋白编号 Protein ID	蛋白名称 Proteins name	$P$ $P$ -value	差异倍数 Fold change
A0A060DCP7	follistatin-related protein	0.011 9	2.08
A0A0F8BIK5	glycine dehydrogenase (decarboxylating) mitochondrial	0.042 1	2.84
A0A0F8BWL1	Transferrin receptor 1	0.000 007	2.66
C3KH65	cytochrome c oxidase subunit VIIb isoform 1	0.004 2	0.24
G0T332	peroxiredoxin-1	0.001 6	2.72
G3NDS5	adenylyl cyclase-associated 1	0.020 2	2.45
G3PIH1	tubulin beta chain	0.003 6	2.2
G3QBX9	leucine-tRNA cytoplasmic	0.001 4	2.14
H2RKZ6	tubulin alpha-4A chain	0.008 3	2.08
Q4S8F7	dnaJ homolog subfamily A member 2	0.003 2	2.05
H2TNG4	N-myc downstream regulated 1	0.000 0	4.54
H2UD86	uridine phosphorylase 1	0.000 6	2.35
Q4S7R9	myosin-11	0.001 8	2.67
Q4SY70	type I cytoskeletal 18	0.004 5	2.05

表 3 高渗组中的差异蛋白

Tab. 3 The differential proteins in hyper-group

蛋白编号 Protein ID	蛋白名称 Proteins name	<i>P</i> <i>P</i> -value	差异倍数 Fold change
A0A0F8AM34	fibronectin	0.000 2	0.25
A0A0F8AMM7	Matrix-remodeling-associated protein 7	0.007 8	0.41
A0A0F8AN86	lysosomal alpha-mannosidase	0.000 1	0.5
A0A0F8B7E5	collagen alpha-1(I) chain	0.000 0	0.08
A0A0F8CCA4	ADP-ribosylation factor-like protein 1	0.000 8	0.46
A0A0F8CI24	disulfide-isomerase A3	0.002 7	0.43
A0A0F8CXT8	procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	0.000 3	0.42
A0A0F8D151	multidrug resistance-associated protein 4	0.013 4	2.61
A0A0F8D302	collagen alpha-1(XII) chain	0.000 0	0.17
C3KH96	RNA-binding protein 8A	0.010 0	2.11
E6ZHW3	collagen type I alpha 3 chain	0.000 0	0.02
F5BZR0	adenylate kinase mitochondrial	0.011 8	2.12
G3NCL3	propionyl- carboxylase alpha mitochondrial	0.026 6	2.30
G3NGH7	collagen, type I, alpha 1b	0.000 0	0.18
G3NLY4	peptidyl-prolylcis-trans isomerase FKBP9	0.000 0	0.30
G3NTK4	collagen, type I, alpha 2	0.005 4	0.28
G3NUQ2	collagen, type XII alpha 1a	0.000 0	0.23
G3PB57	cysteine-rich 1	0.000 0	0.28
G3Q8L2	cytoskeleton-associated 4	0.039 7	0.35
G3QCH2	prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-2	0.000 3	0.41
H2RKK7	prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-2	0.000 2	0.36
H2RXE0	collagen, type V, alpha 2a	0.000 2	0.13
Q4RNG3	prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1	0.001 5	0.46
H2T6E5	fructose-bisphosphatealdolase B	0.034 4	2.22
H2TKD8	calponin-1	0.002 2	0.49
H2U841	lamin A/C	0.000 4	0.44
H2VE16	procollagen, type V, alpha 1	0.000 0	0.03
Q4RKG5	collagen alpha-2(I) chain	0.000 0	0.12
H3C6Q3	procollagen, type V, alpha 1	0.022 2	0.16
H3CK32	reticulocalbin-3	0.000 2	0.34
H3DHU8	peptidyl-prolylcis-trans isomerase FKBP9	0.001 6	0.49

利用蛋白聚类分析高、低渗刺激后,显著变化蛋白在每个样品中的表达含量。每组 3 个生物学重复,红色代表表达上调,绿色代表表达下调(图 1)。从图中可以看到差异蛋白的平行性良好。

运用 Uniprot 蛋白数据库和 GO 数据库,对显著差异蛋白进行注释和功能分析(图 2 和图 3)。GO 功能分析结果中,主要分类包括 3 类,分别为细胞组成(Cellular component)、分子功能(Molecular function)以及生物学过程(Biological process)。在低渗组中,细胞组成“细胞(cell)”和

“细胞器(organelle)”的比例最大,分子功能中,“结合(binding)”和“催化活性(catalytic activity)”的标注最多,生物学过程中,注释中多与“细胞过程(cell process)”相关,其次为“单组织过程(single-organism process)”;高渗组细胞组成这一类中,蛋白质主要涉及“细胞”和“细胞组分(cell part)”,分子功能中,标注为“结合”的蛋白质占大部分,其次为“催化活性”,生物学过程中,比例最大的是“细胞过程”,其次为“单组织过程”。

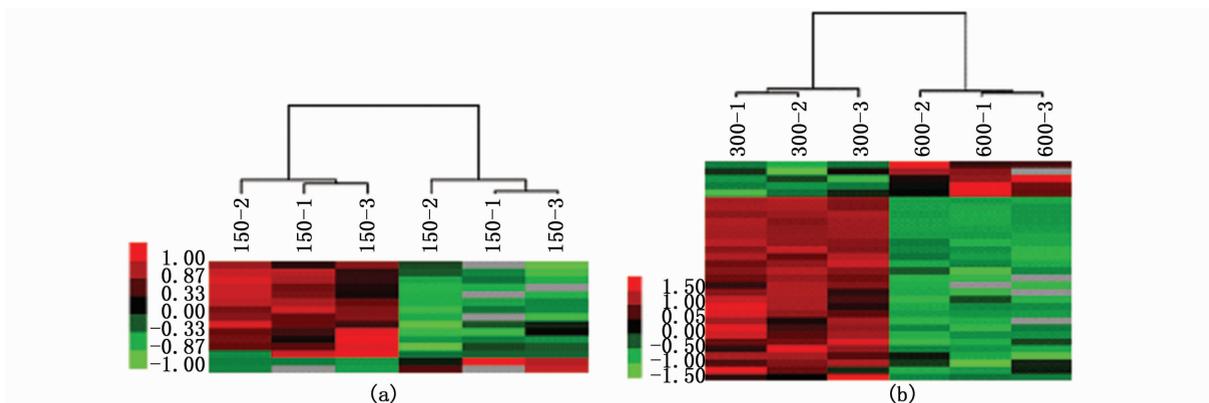


图 1 蛋白质聚类分析

Fig.1 Clustering of proteins

(a) 低渗组(150-1,150-2,150-3)与等渗组(300-1,300-2,300-3)比较的热图分析; (b)高渗组(600-1,600-2,600-3)与等渗组比较的热图分析

(a)Heat map analysis of hypo-osmotic group (150-1, 150-2, 150-3) compared with control group (300-1, 300-2, 300-3); (b)Heat map analysis of hyper-osmotic group (600-1, 600-2, 600-3) compared with control group

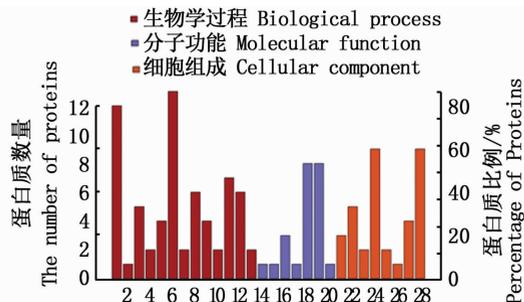


图 2 低渗差异蛋白 GO 功能注释

Fig.2 GO functional annotation of hypo-osmotic differential proteins

- 1. 单组织过程 single-organism process; 2. 脱毒 detoxification;
- 3. 发育过程 developmental process; 4. 信号 signaling; 5. 刺激反应 response to stimulus; 6. 细胞过程 cell process; 7. 免疫系统过程 immune system process; 8. 生物学过程调节 regulation of biological process; 9. 多细胞生物过程 multicellular organismal process; 10. 定位 localization; 11. 代谢过程 metabolic process; 12. 生物学调节 biological regulation; 13. 细胞组分的组织和生物合成 cellular component organization or biogenesis; 14. 抗氧化活性 antioxidant activity; 15. 分子传递活性 molecular transducer activity; 16. 结构分子活性 structural molecule activity; 17. 转运活性 transporter activity; 18. 结合 binding; 19. 催化活性 catalytic activity; 20. 电子载体活性 electron carrier activity; 21. 超分子复合物 supramolecular complex; 22. 细胞器 organelle; 23. 膜 membrane; 24. 细胞 cell; 25. 大分子复合物 macromolecular complex; 26. 膜组分 membrane part; 27. 细胞器组分 organelle part; 28. 细胞组分 cell part

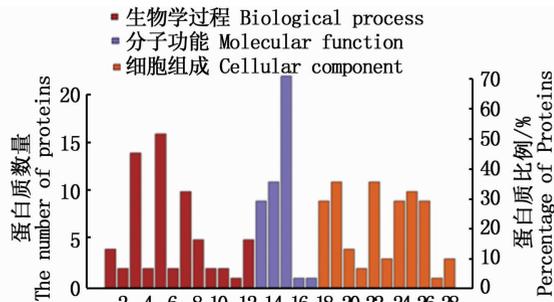


图 3 高渗差异蛋白 GO 功能注释

Fig.3 GO functional annotation of hyper-osmotic proteins

- 1. 定位 localization; 2. 发育过程 developmental process; 3. 单组织过程 single-organism process; 4. 多细胞生物过程 multicellular organismal process; 5. 细胞过程 cellular process; 6. 信号 signaling; 7. 代谢过程 metabolic process; 8. 生物学过程调节 regulation of biological process; 9. 刺激反应 response to stimulus; 10. 细胞组分的组织和生物合成 cellular component organization or biogenesis; 11. 运动 locomotion; 12. 生物学调节 biological regulation; 13. 结构分子活性 structural molecule activity; 14. 催化活性 catalytic activity; 15. 结合 binding; 16. 分子功能调节物 molecular function regulator; 17. 转运活性 transporter activity; 18. 胞外区部分 extracellular region part; 19. 细胞组分 cell part; 20. 细胞器组分 organelle part; 21. 膜包围腔 membrane-enclosed lumen; 22. 细胞 cell; 23. 膜 membrane; 24. 细胞器 organelle; 25. 胞外区 extracellular region; 26. 大分子复合物 macromolecular complex; 27. 超分子复合物 supramolecular complex; 28. 膜组分 membrane part

## 2.2 RT-qPCR 验证显著差异蛋白的 mRNA 水平

为了验证蛋白质组数据的可靠性,挑选了 10 个显著差异蛋白(低渗组 4 个,高渗组 6 个),根据已有的金钱鱼转录组数据进行 RT-qPCR 分析(图 4 和图 5)。挑选的蛋白包括细胞骨架相关蛋

白、能量合成代谢相关蛋白以及蛋白结合相关蛋白等。低渗组 4 个蛋白的 mRNA 表达变化与蛋白表达变化一致;高渗组中有 3 个蛋白的 mRNA 水平与蛋白表达水平趋势相反,它们为 *fn*、*arf1* 和 *plod2*。

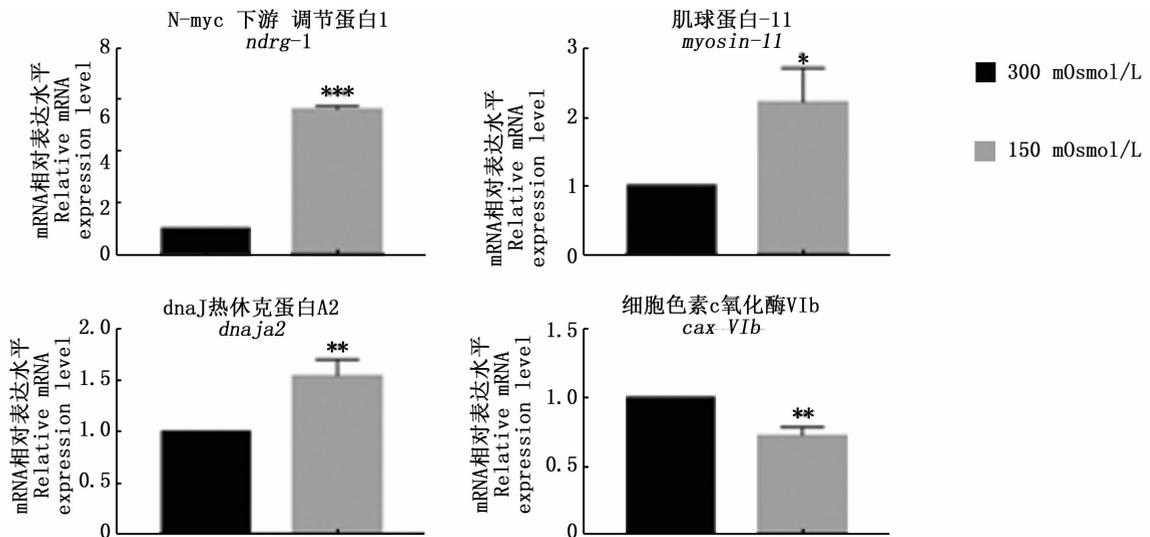


图 4 低渗组显著差异蛋白的 mRNA 表达水平

Fig. 4 mRNA expression of significantly differential proteins in hypo-osmotic group

\* 表示  $P < 0.05$ , \*\* 表示  $P < 0.01$ , \*\*\* 表示  $P < 0.001$ , 图 5 同

Bars with \* are  $P < 0.05$ , \*\* are  $P < 0.01$ , \*\*\* are  $P < 0.001$ , the same in fig. 5

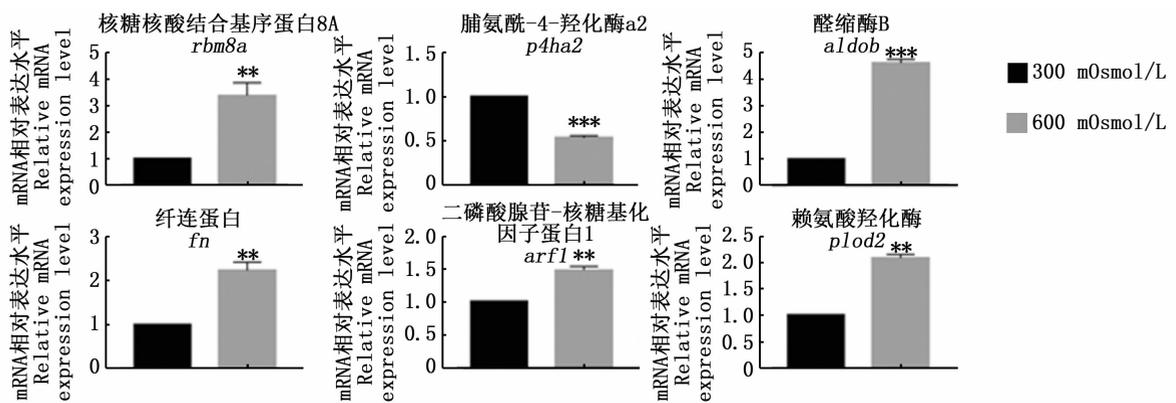


图 5 高渗组显著差异蛋白的 mRNA 表达水平

Fig. 5 mRNA expression of significantly differential proteins in hyper-osmotic group

## 3 讨论

本研究通过蛋白质组检测来探究蛋白质与渗透压调节的关系。比较非等渗组与对照组得到的差异显著的蛋白类型不同。差异蛋白的 GO

功能注释和富集分析结果说明升高或降低细胞培养基的渗透压对肾原代细胞内外的细胞结构有一定的影响。我们推测,肾细胞应对高渗和低渗的调节机制不同。非等渗刺激后,差异蛋白数量和种类较少,并且不直接与离子转运作用相

关。在细胞响应外界渗透压变化时,细胞骨架也会发生相应的变化。细胞骨架蛋白有多种类型,并在细胞内行使不同的功能。这些蛋白维持着细胞结构,并连接不同的细胞器,在细胞粘连、细胞体积调节中起到了重要的作用。

低渗组中与细胞骨架相关的显著差异蛋白为 type 1 cytoskeletal 18-like、微管蛋白  $\alpha$ -4A 链 (tubulin alpha-4A chain)、微管蛋白  $\beta$  链 (tubulin beta chain-like) 和肌动蛋白-11 (myosin-11)。微管蛋白 (tubulin) 虽然是形成丝状网络的微管 (microtubule) 亚基,但其也是一种能与微管以外的蛋白相结合,行使其他功能的胞浆蛋白<sup>[13-14]</sup>。在成核过程中,tubulin 的二聚体能够自我组织形成微管,并且在调节离子通道中起到了重要作用,例如,电压依赖性阴离子通道 (voltage-dependent anion channel,VDAC)<sup>[15]</sup>。VDAC 是线粒体外膜上的孔蛋白,其为线粒体和胞质间包含离子泵的 ADP/ATP 交换通路<sup>[16]</sup>。研究表明, $\alpha\beta$ -tubulin 二聚体的 C 末端尾部与 VDAC 结合,抑制 VDAC 的活性,从而起到抑制线粒体供能,其中细胞色素 c 氧化酶 (cytochrome c oxidase, COX) 也随即下降<sup>[16]</sup>。在萨罗罗非鱼 (*Sarotherodon melanotheron*) 中的研究表明,从淡水转至海水中分别驯养 10 和 45 d 后,鳃中 *vdac*、钠/钾-ATP 酶 ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase  $\alpha 1$ , *nka $\alpha$ 1*)、*cox1* 表达水平都显著上调,而由海水转至咸淡水中,这几个基因表达水平都有所下降<sup>[16-17]</sup>。我们的结果显示,tubulin alpha-4A chain、tubulin beta chain-like isoform X1 显著上调,COX VIIb 显著下调,而 VDAC 和 NKA $\alpha 1$  并没有显著变化。因此推测,低渗刺激后,细胞内渗透压大于外界渗透压,细胞膨胀,随即大量表达细胞骨架相关蛋白,而骨架蛋白作为细胞膜与各细胞器之间的桥梁,会调节其他的离子通道。而金钱鱼肾细胞在低渗状态下具有较强的适应能力<sup>[11]</sup>,在刺激 24 h 后,细胞已基本适应低渗环境,能量代谢、离子转运等生理活动趋于平衡。

高渗刺激时,细胞也呈现了不同的变化。在显著差异蛋白中,FN 和胶原蛋白 (collagen) 都是细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 中与细胞骨架相关的必需蛋白质,有助于维持细胞结构和功能的完整性<sup>[18]</sup>。其中,FN 在调节细胞行为和细胞信号传导中起到了重要作用<sup>[19]</sup>。研究发现,

NKA 活性降低将会影响细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的浓度,同时伴随着钠偶联转运体梯度变化,降低细胞 FN 的粘附能力<sup>[20]</sup>。因此推测,这些蛋白的损伤,可能会导致离子转运失衡。而 ECM 和细胞骨架通过整合蛋白 (integrin) 形成复合结构,这种复合结构受到蛋白质二硫键异构酶 (protein disulfide isomerase, PDI) 和 ARF1 的调控。PDI 位于内质网,通过催化二硫键的形成、减少及重组来调节蛋白分泌或细胞表面蛋白的三级结构<sup>[21]</sup>。研究表明,PDI 在整合蛋白的合成中起到了重要的调节作用,从而参与到细胞的粘附调节和转录后修饰<sup>[22]</sup>。在血小板和肿瘤细胞中,PDI 可降低二硫键的数量来调节细胞的粘附或迁移,从而导致 FN 合成下降<sup>[23-24]</sup>。ARF1 也介导细胞内骨架与 ECM 的连接,间接影响细胞骨架的重排。

我们的结果显示,PDI、FN、胶原蛋白及促进胶原蛋白合成相关酶类,如 PLOD2 的蛋白表达量显著降低。因此推测,细胞在高渗刺激下,细胞处于失水状态,形态骤缩,影响细胞间的粘连,从而导致 FN 和胶原蛋白以及相应的调节蛋白受到损害,影响细胞内稳态。而 RT-PCR 结果表明,*fn*、*plod2* 和 *arf1* 含量升高表明,细胞在努力恢复受损蛋白,但高渗环境对细胞的损伤太大,导致 24 h 后仍无法恢复,因而影响各类生理活动,对细胞内其他离子转运蛋白的合成也造成一定影响,使细胞处于严重受损状态,细胞骨架的损伤严重影响离子转运等一系列生理活动,然而具体机制还需深入探讨。

本研究培养了金钱鱼肾原代细胞,经高、低渗透压刺激后,通过 Label-free 蛋白定量分析,得到了差异蛋白及这些差异蛋白的 GO 功能注释,了解到这些蛋白所行使的功能及参与的各项生理活动,着重探讨渗透调节过程中,细胞骨架在离子转运过程中起到的作用,为进一步研究细胞水平的肾脏渗透压调节机制奠定基础,而具体参与调控的蛋白研究需进一步探讨。

#### 参考文献:

- [1] BOUTET I, LONGKY C L, BONHOMME F. A transcriptomic approach of salinity response in the euryhaline teleost, *Dicentrarchus labrax*[J]. *Gene*, 2006, 379: 40-50.
- [2] ARUNA A, NAGARAJAN G, CHANG C F. Differential expression patterns and localization of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor transcripts in the osmoregulatory

- organs of tilapia during salinity stress [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2012, 179(3): 465-476.
- [3] KÜLTZ D. The combinatorial nature of osmosensing in fishes [J]. *Physiology (Bethesda)*, 2010, 27(4): 259-275.
- [4] KHAN H, SINGH R D, TIWARI R, et al. Mercury exposure induces cytoskeleton disruption and loss of renal function through epigenetic modulation of MMP9 expression [J]. *Toxicology*, 2017, 386: 28-39.
- [5] FIOL D F, KÜLTZ D. Osmotic stress sensing and signaling in fishes [J]. *The FEBS Journal*, 2007, 274(22): 5790-5798.
- [6] BOURQUE C W. Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation [J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2008, 9(7): 519-531.
- [7] CHARA O, ESPELT M V, KRUMSCHNABEL G, et al. Regulatory volume decrease and Preceptor signaling in fish cells: mechanisms, physiology, and modeling approaches [J]. *Journal of Experimental Zoology. Part A, Ecological Genetics and Physiology*, 2011, 315A(4): 175-202.
- [8] XIA C G, ZHANG D J, MA C N, et al. Characterization and comparison of proteomes of albino sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) by iTRAQ analysis [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 51: 229-239.
- [9] SCHMITZ M, MANDIKI S N M, DOUXFILS J, et al. Synergic stress in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*, S.) exposed to chronic salinity and bacterial infection: Effects on kidney protein expression profile [J]. *Journal of Proteomics*, 2016, 142: 91-101.
- [10] KLTZ D, LI J, PAGUIO D, et al. Population-specific renal proteomes of marine and freshwater three-spined sticklebacks [J]. *Journal of Proteomics*, 2016, 135: 112-131
- [11] GUI L, ZHANG P P, LIANG X M, et al. Adaptive responses to osmotic stress in kidney-derived cell lines from *Scatophagus argus*, a euryhaline fish [J]. *Gene*, 2016, 583(2): 134-140.
- [12] SU M L, MU X J, GUI L, et al. Dopamine regulates renal osmoregulation during hyposaline stress via DRD1 in the spotted scat (*Scatophagus argus*) [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 37535.
- [13] SHELDON K L, GURNEV P A, BEZRUKOV S M, et al. Tubulin tail sequences and post-translational modifications regulate closure of mitochondrial voltage-dependent anion channel (VDAC) [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(44): 26784-26789.
- [14] YU N, SIGNORILE L, BASU S, et al. Isolation of functional tubulin dimers and of tubulin-associated proteins from mammalian cells [J]. *Current Biology*, 2016, 26(13): 1728-1736.
- [15] ROSTOVTSEVA T K, GURNEV P A, CHEN M Y, et al. Membrane lipid composition regulates tubulin interaction with mitochondrial voltage-dependent anion channel [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(35): 29589-29598.
- [16] TINE M, MCKENZIE D J, BONHOMME F, et al. Salinity-related variation in gene expression in wild populations of the black-chinned tilapia from various West African coastal marine, estuarine and freshwater habitats [J]. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 2011, 91(1): 102-109.
- [17] TINE M, DE LORGERIL J, D'COTTA H, et al. Transcriptional responses of the black-chinned tilapia *Sarotherodon melanotheron* to salinity extremes [J]. *Marine Genomics*, 2008, 1(2): 37-46.
- [18] KHAN H, SINGH R D, TIWARI R, et al. Mercury exposure induces cytoskeleton disruption and loss of renal function through epigenetic modulation of MMP9 expression [J]. *Toxicology*, 2017, 386: 28-39.
- [19] WANG K, WU F, SEO B R, et al. Breast cancer cells alter the dynamics of stromal fibronectin-collagen interactions [J]. *Matrix Biology*, 2017, 60-61: 86-95.
- [20] BELUSA R, AIZMAN O, ANDERSSON R M, et al. Changes in Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity influence cell attachment to fibronectin [J]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2002, 282(2): C302-C309.
- [21] CHEN I H, CHANG F R, WU Y C, et al. 3,4-Methylenedioxy- $\beta$ -nitrostyrene inhibits adhesion and migration of human triple-negative breast cancer cells by suppressing  $\beta$ 1 integrin function and surface protein disulfide isomerase [J]. *Biochimie*, 2015, 110: 81-92.
- [22] KOZLOV G, MÄÄTTÄNEN P, THOMAS D Y, et al. A structural overview of the PDI family of proteins [J]. *The FEBS Journal*, 2010, 277(19): 3924-3936.
- [23] LAHAV J, JURK K, HESS O, et al. Sustained integrin ligation involves extracellular free sulfhydryls and enzymatically catalyzed disulfide exchange [J]. *Blood*, 2002, 100(7): 2472-2478.
- [24] GOPLEN D, WANG J, ENGER P, et al. Protein disulfide isomerase expression is related to the invasive properties of malignant glioma [J]. *Cancer Research*, 2006, 66(20): 9895-9902.

## Differential proteins analysis for primary renal cells of *Scatophagus argus* under different osmotic stresses

LIAN Ying, GUI Lang, ZHANG Junbin

(College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** In order to study the osmoregulatory function of kidney in *Scatophagus argus*, primary renal cells were treated with hyposmotic, isosmotic and hyperosmotic media for 24 h. The label-free quantitative method was employed in proteomic analysis, and a total of 3,787 proteins were obtained by mass spectrometry. Compared with isotonic group, 14 proteins were significantly expressed in the hypotonic group and 31 in the hyperosmotic group, respectively (Ratio > +/-2 and  $P < 0.05$ ). Differential expression profiles were analyzed by Gene Ontology (GO) annotations, enrichment analysis and clustering analysis. The proteins associated with cytoskeleton, energy synthesis and protein binding were selected for quantitative detection at mRNA level to confirm changes of renal cells at gene level and protein level. In hyposmotic group, cytoskeleton-related proteins were up-expressed significantly, including tubulin alpha-4A chain, tubulin beta chain, myosin-11 and type I cytoskeletal 18-like. In the hyperosmotic group, significantly expressed proteins were of extracellular matrix, such as fibronectin and collagen. Therefore, it is assumed that after hypo-osmotic stimulation, intracellular osmotic pressure was higher than extracellular osmotic pressure, and the cells expanded immediately, then expressed cytoskeleton related proteins in large quantities, thus affecting other ion channels. Under hyper-osmotic stimulation, the cells were in a state of water loss and morphologic contraction, which affected the adhesion between cells. However, the increase of fn and plod2 showed that the cells were repairing the damaged protein. This study showed changes of protein expression after anisotonic shocks of primary renal cells in *Scatophagus argus* and may provide references for further studies of osmoregulation.

**Key words:** *Scatophagus argus*; primary renal cell; proteomics; label-free quantitation; osmoregulation