基础研究 文章编号:0253-3626(2011)02-0145-03

多囊卵巢综合征胰岛素抵抗差异蛋白的分析

张丽静,丘 彦
(重庆医科大学附属第一医院辅助生殖中心,重庆 400016)

【摘 要】目的:筛选和鉴定与多囊卵巢综合征(Polycystic ovary syndrome,PCOS)胰岛素抵抗(Insulin resistance,IR)相关的蛋白。方法:采用固相 pH 梯度双向凝胶电泳分离血清蛋白质,银染显色,通过凝胶成像仪获取图像,PDQuest 软件分析电泳图谱,寻找有意义的差异蛋白点,运用 MALDI-TOF-MS 质谱鉴定,分析其意义。结果:选取具有明显差异的 5 个蛋白点进行质谱鉴定,经数据库查询,2 个蛋白点获得了有意义的结果,分别为结合珠蛋白(Haptoglo-bin,HP),RhoA 蛋白。结论:PCOS IR 患者与非胰岛素抵抗(Non-Insulin resistance,non-IR) PCOS 妇女血清蛋白表达存在差异,这些差异蛋白有可能是 PCOS IR 特异相关性蛋白,并有可能成为 PCOS IR 诊断的分子标志物。

【关键词】多囊卵巢综合征;胰岛素抵抗;血清;蛋白
【中国图书分类法分类号】R332 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-06-10

Proteomic analysis of serum from patients with polycystic ovary syndrome and insulin resistance

ZHANG Li-jing, et al
(*Center of Assisted Reproduction, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To find out disease specific-proteins(DSPs) which are closely related with polycystic ovary syndrome(PCOS) and insulin resistance (IR). *Methods*: The serum proteins were separated by immobilized pH gradient-based two-dimensional gel eletrophoresis (2-DE). The gels were stained by silver, scanned by gel formatter, and analyzed by using PDquest software. The differentially displayed protein spots associated with PCOS IR were searched for and identified by MALDI-TOF-MS. *Results*: Five DSPs were chosen for test and two DSPs were found, which were haptoglobin and RhoA protein. *Conclusion*: There are different protein expressions in 2D-PAGE of PCOS IR and non-IR PCOS. These proteins may be DSPs of PCOS IR, and may be the markers for diagnosis.

【Key words】polycystic ovary syndrome; insulin resistance; serum; protein

多囊卵巢综合征(Polycystic ovary syndrome,PCOS)是一种多因素,全身性疾病。近年来研究证实,胰岛素抵抗(Insulin resistance,IR)与 PCOS 间存在密切关系,将近 50%~70% PCOS 患者存在 IR[1]。IR 是 PCOS 的重要病理生理变化,在 PCOS 发病中起着关键的作用[2,3]。目前 PCOS IR 基因组学研究认为胰岛素基因可变数目串联重复序列调节的多态性是其重要易感位点,和高胰岛素血症密切相关,但各种基因表达改变的整体效应尚不清楚,也没有找到特异的生物学诊断标记[4]。蛋白质组学技术可以从整体蛋白水平上研究PCOS IR 的发病机制。本研究通过固相 pH 梯度双向电泳技术寻找相关差异蛋白质,联系其功能,寻找特异的诊断学分子标记,同时还可能为治疗提供新的靶点,从而为进一步研究生育调控机制提供重要的理论意义和临床实用价值。

1 材料与方法

1.1 材料

(1)血清:本实验所采集的 10 例 PCOS IR 妇女和 10 例 non-IR PCOS 的血清均来自重庆医科大学附属第一医院辅助生殖中心门诊,年龄均为 21~33 岁,分别提取每位妇女的血清。(2)试剂:Aurum™ Serum Protein Mini Kit,两性电解质 pH4~6,pH5~7,17 cm 固相 pH 梯度(IPG)胶条(pH4~7),均购自美国 Bio-Rad 公司;二硫苏糖醇(DTT),碘乙酰铵,四甲基乙二胺,牛血清白蛋白,十二烷基硫酸钠,丙烯酰胺,甘氨酸,甲叉双丙烯酰,硫脲,硝酸银,三羟甲基氨基甲烷均购自上海生工。等电聚焦仪(PROTEAN IEF Cell)及附件,垂直电泳系统(PRO-TEAN Ⅱ XI Cell)及附件均为美国 Bio-Rad 公司产品。

作者介绍:张丽静(1984-),女,硕士,
研究方向:生殖内分泌。
通信作者:丘 彦,女,教授,Email:cqartq@163.com。
基金项目:重庆市卫生局基金项目(编号:2007-2-25)。

1.2 研究方法

1.2.1 血清的处理及蛋白质的定量 将血液标本 4℃下,4 000 r/min 离心 15 min,吸取上清液,将其在 4℃下 2 400 r/min 离心 5 min[5]后,置于 -80℃保存。按照 Aurum™ Serum Protein Mini Kit 操作说明书进行蛋白质的纯化;丙酮 -20℃过夜后,加 4 倍蛋白液体积的 -20℃丙酮,12 000 g,4℃离心 1 h;用 300 μl 水化上样缓冲液重悬溶解蛋白质。Bradford 法定量,分装,-80℃保存。

1.2.2 固相 pH 梯度双向凝胶电泳

1.2.2.1 样品的混合 取 300 μg 血清蛋白质样品,加入含适当浓度尿素,硫脲,溴酚蓝等的上样缓冲液,充分混合,总体积为 400 μl,进行加样。

1.2.2.2 等电聚焦电泳 条件为被动水化 14 h,100 V 1 h,250 V 2 h,500 V 2 h,1 000 V 1 h,10 000 V 5 h,聚焦到 60 000 Vh。

1.2.2.3 平衡 等电聚焦完毕,IPG 胶条立即在平衡液Ⅰ(6 mol/L 尿素、2% SDS、pH8.8 的 0.375 mol/L Tris-HCl、20% 甘油、2%DTT)中平衡 15 min,再于平衡液Ⅱ(以 2.5% 碘乙酰胺替换平衡液Ⅰ中 2%DTT)中平衡 15 min。

1.2.2.4 垂直板 SDS-PAGE 电泳 12%的胶浓度,10 mA/gel 电泳 40 min,改变电泳电流,继续电泳至溴酚蓝距底边 1 cm 时结束电泳。

1.2.3 2-DE 所得凝胶 进行硝酸银染色[6]。

1.2.4 图像扫描与软件分析 凝胶染色后,用 Bio-Rad 公司凝胶成像仪成像,利用 PDQuest 软件进行图像分析。比较 PCOS 中(non-IR PCOS)妇女的 2-DE 图谱,寻找差异蛋白质点。蛋白的相对表达量用扫描积分光密度值来表示,2 组间量升高或者降低 3 倍者被定义为差异点。

1.2.5 差异蛋白点 MALDI-TOF 质谱分析 将差异点从胶上切下置于 EP 管中,进行蛋白质胶内消化,再加入基质和质谱靶点样。制备好的样品用 ABI 公司的 Voyager DE-PROMAL-DI-TOF 质谱仪进行分析。

1.2.6 数据库检索 使用国际互联网 Matrix Science 公司提供的程序进行数据库查询(Mascot:Peptide Mass Fingerprint,http://www.matrixscienee.com)。

2 结 果

2.1 PCOS IR 和 non-IR PCOS 妇女的血清 2-DE 图谱的建立

通过上述方法得到了较好的 PCOS IR 和 non-IR PCOS 妇女的 2-DE 图谱,每一标本的 3 张 2-DE 图谱平均蛋白质点数 390 个。

2.2 PCOS IR 和 non-IR PCOS 妇女的血清蛋白质组的表达差异

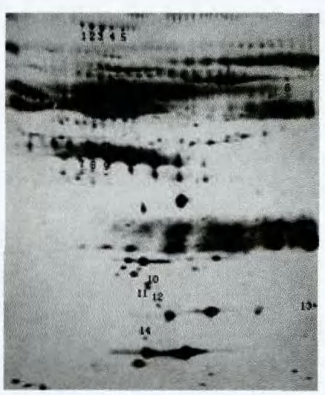
比较 PCOS IR 和 non-IR PCOS 妇女的血清 2-DE 图谱,并用 PDQuest 软件进行分析,发现有差异表达的蛋白质有 20 个,14 个在 PCOS IR 中高表达,6 个在 PCOS IR 中低表达。

2.3 MALDI-TOF 质谱鉴定

经过对上述差异点进行质谱分析得到较好的肽质量指纹图并对其进行数据库检索,结果为:结合珠蛋白(等电点为 6.42),RhoA 蛋白(等电点为 4.95),免疫球蛋白重链可变区(等电点为 8.56),MGAT5B 蛋白(等电点为 9.5),丝聚合蛋白原(等电点为 9.39)。本实验中选取的 IPG 胶条的 pH 值为 4~7,故最终鉴别出 2 个蛋白点,即点 13、14,此 2 个点分别为结合珠蛋白 (Haptogl-obin,HP),RhoA 蛋白。此 2 个点在 PCOS IR 中均为上调。结果见表 1。

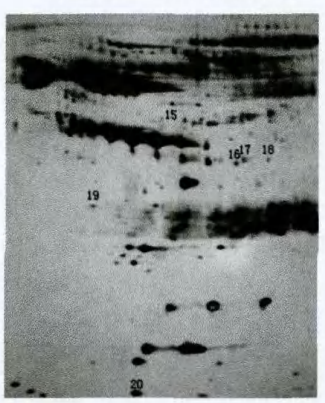
3 讨 论

本研究通过双向电泳技术,建立了 PCOS IR 患者血清



pH4 pH7

图 1 PCOS IR 患者血清 2-DE 图谱



pH4 pH7

图 2 non-IR PCOS 妇女血清 2-DE 图谱

表 1 在数据库中搜索的差异蛋白

蛋白名称	Mascot 分值	相对分子量	等电点	表达
HP	64	39 496	6.42	增高
RhoA 蛋白	50	1 712	4.95	增高

2-DE 图谱,并与 non-IR PCOS 妇女血清 2-DE 图谱相对比,发现了 20 个差异表达蛋白。结合质谱分析鉴定,经数据库查询,发现 2 个有意义的差异点,结果是结合珠蛋白,RhoA 蛋白。

HP 又称触珠蛋白,是血清球蛋白中的一种酸性糖蛋白,主要在肝脏合成。HP 分子量较大,是一种巨球蛋白,它的增加可导致血浆黏度和全血黏度增加。Moan 等[7]人研究发现,全血粘度增加引起血液黏滞性增加,血流速度减慢,使通过血液输送到骨骼肌的葡萄糖减少,出现葡萄糖处理率降低和 IR。丘彦[8]等人对 PCOS 的研究发现,载脂蛋白 A-I 在 PCOS 患者中的表达水平下降,而载脂蛋白 A-I 是高密度脂蛋白的载脂蛋白,它是细胞胆固醇逆向转运的特殊重要因素,起着促进细胞内胆固醇的移出,酯化,转移以及调节高密度脂蛋白代谢的作用。汪志红等[9]人研究表明,HP 水平随着胆固醇升高、胰岛素敏感指数和高密度脂蛋白的降低而升高。HP 水平越高,胰岛素敏感性越差,进而可引起 IR。本研究结果显示,结合珠蛋白在 PCOS IR 患者中表达水平升高,推测 HP参与了 PCOS IR 的脂代谢过程,但能否作为其诊断标志物仍需进一步的研究。

RhoA 蛋白是一种小分子量 GTP 结合蛋白,是 Rho GTPases 家族中一类重要的信号传递分子,与 GTP 结合后,参与对细胞骨架的调节。细胞骨架是指真核细胞内蛋白质纤维交织而成的立体网架体系,包括微丝、微管和中间纤维,微丝的基本成分是肌动蛋白。Mack 等[10]发现 RhoA 可以激活血清反应因子引起肌动蛋白骨架重构,进而引起微丝结构的破坏。葡萄糖转运子 4(Glucose trans-porter 4,GLUT4)可被看作是磷酯酰肌醇 -3- 激酶途径下游信号分子,胰岛素刺激后 GLUT4 由核周移至胞膜,将葡萄糖转运到细胞内。Patki 等[11]研究发现:若破坏微丝后可以抑制50%GLUT4 的转运,进而引起细胞外的高糖环境。Clark 等人[12,13]研究表明,细胞长期暴露于高糖、高脂、高胰岛素环境后,胰岛素受体底物可从细胞骨架网罗的信号分子复合物中被释放出来,阻断信号转导,引起 IR。本研究通过血清蛋白组学技术证实 RhoA 蛋白在 PCOS IR 患者中的表达高于 non-IR PCOS 的妇女,提示 RhoA 蛋白可能参与了 PCOS IR 的糖代谢过程。

本试验采用固相 pH 梯度双向凝胶电泳结合质谱分析,对 PCOS IR 和 non-IR PCOS 妇女的血清蛋白进行了研究。试验结果显示:2 组中的蛋白质点表达存在差异。这种差异可为探索 PCOS IR 的病因和发病机制提供分子生物学依据,这些差异蛋白亦有可能成为 PCOS IR 分子诊断的标志物。

参 考 文 献

[1] Ovalle F, Azziz R. Insulin resistance, polycycstic ovary syndrome, and type 2 diabetes mellitur[J]. Fertil Steril, 2002, 77(6):1095-1105.

[2] 姜荣华,徐望明.多囊卵巢综合征的胰岛素抵抗研究进展[J].国外医学妇幼保健分册,2004,16(2):113-116.

[3] 罗 婷,韩 阳,刘 义.二甲双胍治疗多囊卵巢综合征合并胰岛素抵抗对改善内分泌、代谢及排卵功能的疗效观察[J].中国误诊学杂志,2008,8(8):1775- 1777.

[4] Michelmore K,Ong K, Mason S, et al. Clinical features in women with polycystic ovaries: relationships to insulin sensitivity, insulin gene VNTR and birth weight [J].Clin Endocrinol(Oxf),2001,55(4):439-446.

[5] 母昭德,彭咏波,易发平,等.血清蛋白质组双向凝胶电泳技术的建立[J].重庆医科大学学报,2006,31(6):821-823.

[6] Mortz E,Krogh T N,Vorum H,et al.Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis[J]. Proteomics,2001,1(11):1359-1363.

[7] Moan A, Nordby g, OS I, et al. Relationship between hemorrheologic factors and insulin sensitivity in healthy young men[J]. Metabolism, 1994, 43(40): 423-427.

[8] 秦 芬,丘 彦,杨 曦,等.多囊卵巢综合征差异蛋白质组分析[J]. 重庆医科大学学报,2010,35(1):22-24.

[9] 汪志宏,张素华,邱洪鑫,等.2 型糖尿病家系中血清结合珠蛋白水平和胰岛素抵抗[J].重庆医科大学学报,2000,25(3):262-264.

[10] Mack C P,Somlyo A V,Hautmann M,et al. Smooth muscle differen- tiation marker gene expression is regulated by RhoA-mediated actin poly- merization[J].J BiolChem,2001,276(1):341-347.

[11] Patki V,Buxton J,Chawla A,et al.Insulin action on GLUT4 traffic visualized in single 3T3-L1 adipocytes by using ultrafast microscopy[J]. Mol Biol Cell,2001,12(1):129-141.

[12] Clark S F,Molero J C,Ames D E.Release of insulin receptor substrate proteins from an intracellular complex coincides with the development of insulin resistance[J].J Biol Chem,2000,275(1):3819-3826.

[13] 赵海燕,钱 镭,傅雪莲,等.高糖对胰岛 β 细胞增殖活力、分泌功能及内质网应激相关分子表达的影响[J].上海交通大学学报(医学版),2009,29(5):487-491.

(责任编辑:关蕴良)