基础研究 文章编号:0253-3626(2010)01-0022-03

多囊卵巢综合征差异蛋白质组分析

秦 芬,丘 彦,杨 曦,孟江萍
(重庆医科大学附属第一医院辅助生殖中心,重庆 400016)

【摘 要】筛选和鉴定与多囊卵巢综合征相关蛋白。方法:以固相 pH 梯度等电聚焦为第一向,垂直平板十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳为第二向进行血清蛋白质分离;图像分析软件 PDQuest 7.3 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 3 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载脂蛋白 A-Ⅰ(Apolipoprotein A-Ⅰ,ApoA-Ⅰ),热休克蛋白 70(Heat shock protein,HSP70)。结论:多囊卵巢综合征患者与正常妇女的血清蛋白表达存在差异,这些差异蛋白有可能是多囊卵巢综合征特异相关性蛋白,并有可能成为多囊卵巢综合征诊断的分子标志物。

【关键词】多囊卵巢综合征;血清;蛋白质组
【中国图书分类法分类号】R332 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-06-07

Proteomic analysis of serum from patients with polycystic ovary syndrome

QIN Fen, et al
(*Center of Assisted Reproduction, the First Affiliated Hospitial, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To find out disease specific-proteins (DSPs) which are closely collelated with Polycystic ovary syndrome. *Methods*: proteins ext racted from serum were run in immobilized pH gradient isoelectic focusing (IPG-IEF) at the first dimension.The proteins pots in gels were visuali zed by silver staining protocol followed by gel scanning and analysised by Pdquest 7.3 software. The differentially displayed protein spot s were searched and identifiyed by MALDI-TOF-MS. spots associated with PCOS.

作者介绍:秦 芬(1984-),女,硕士,
研究方向:生殖内分泌。
通讯作者:丘 彦,女,教授,E-mail:cqartq@163.com。
基金项目:重庆市自然科学基金项目(编号:2007BB5300)。

亡、免疫应答、水解酶等相关基因上调,以及细胞粘附、转录因子、细胞周期调节相关基因下调可能与滋养细胞侵袭行为变化和自然流产有关。本实验将患者和对照组的各 10 例总 RNA 分别等量混合,在实验设计上存在一定的不足。在后续的研究中,我们将对芯片结果进行进一步验证,对表达有明显差异的基因进行深入的功能研究,了解 EVTs 异常侵袭和自然流产的复杂病理过程,为揭示 EVTs"有控制性侵袭"母体子宫内膜和自然流产的发生机制提供依据。

参 考 文 献

[1] Askelund K, Liddell H S, Zanderigo A M, et al.CD83$^+$ dendritic cells in the decidua of women with recurrent miscarriage and normal pregnancy [J].Placenta, 2004, 25(2-3): 140-145.

[2] Blomberg L, Hashizume K, Viebahn C. Blastocyst elongation, trophoblastic differentiation, and embryonic pattern formation[J]. Reproduction, 2008, 135(2): 181-195.

[3] Kliman H J, Nestler J E, Sermasi E, et al.Purification, characterization, and invitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae[J].Endocrimology, 1986, 118(4): 1567-1582.

[4] Hannan N J, Salamonsen L A.CX3CL1 and CCL14 regulate extracellular matrix and adhesion molecules in the trophoblast: potential roles in human embryo implantation[J].Biol Reprod, 2008, 79(1): 58-65.

[5] Yamada H, Shimada S, Morikawa M, et al. Divergence of natural killer cell receptor and related molecule in the decidua from sporadic miscarriage with normal chromosome karyotype[J]. Mol Hum Reprod, 2005, 11(6): 451-457.

[6] Quenby S, Farquharson R.Uterine natural killer cells, implantation failure and recurrent miscarriage[J].Reprod Biomed Online, 2006, 13(1): 24-28.

[7] Shimada S, Nishida R, Takeda M, et al. Natural killer, natural killer T, helper and cytotoxic T cells in the decidua from sporadic miscarriage[J]. Am J Reprod Immunol, 2006, 56(3): 193-200.

[8] Ordi J, Casals G, Ferrer B, et al. Uterine (CD56$^+$) natural killer cells recruitment: association with decidual reaction rather than embryo implantation[J]. Am J Reprod Immunol, 2006, 55(5): 369-377.

[9] Varla-Leftherioti M.The significance of the women's repertoire of natural killer cell receptors in the maintenance of pregnancy[J]. Chem Immunol Allergy, 2005, 89(4): 84-95.

[10] Wu G, Aoyama C, Young SG, et al.Early embryonic lethality caused by disruption of the gene for choline kinase alpha, the first enzyme in phosphatidylcholine biosynthesis[J]. J BiolChem, 2008, 283(3): 1456-1462.

(责任编辑:关蕴良)

Results: Two DSPs were found and they were apolipoprotein A-I, Heat shock protein 70. *Conclusion*: There were different protein expressing in 2D-PAGE of Polycystic ovary syndrome and control group. These proteins may be DSPs of Polycystic ovary syndrome.

【Key words】Polycystic ovary syndrome; Serum; Protein

多囊卵巢综合征(Polycystic ovary syndrome, PCOS)是一种多因素,全身性疾病。近年研究认为 PCOS 的排卵障碍、高雄激素血症、胰岛素抵抗等表现与相应基因表达改变密切相关[1]。PCOS 基因组学目前集中于基因表达改变与各种临床改变的关联性研究,这些研究发现了一系列表达改变的基因,如控制甾体激素合成的基因表达普遍上调,免疫应答基因和调控卵泡调亡的基因表达也发生了改变,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[2]。蛋白质组学的相关技术可以从整体上,蛋白水平上研究多囊卵巢综合征发病机制。本研究采用蛋白质组学技术比较 PCOS 和正常妇女的血清蛋白质的差异,联系差异蛋白质的功能,寻找特异的诊断学分子标记,对进一步研究生育调控机制有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:2007 年 5 月 ~ 2009 年 8 月重庆医科大学附属第一医院辅助生殖中心门诊不孕患者。(2)试剂:17 cm 固相 PH 梯度(IPG)胶条(PH4-7)两性电解质 PH4-6,5-7,碘乙酰铵,尿素,四甲基乙二胺,丙烯酰胺,甲叉双丙烯酰,甘氨酸,甘油,硫脲,二硫苏糖醇(DTT),三羟甲基氨基甲烷,十二烷基硫酸钠 (SDS),Aurum Serum Protein Mini Kit 均购自美国 Bio-Rad 公司;牛血清白蛋白,硫代硫酸钠、碳酸钠、甲醛、硝酸银、乙醇、冰醋酸、醋酸钠等均为国产分析纯市售产品。等电聚焦仪(PROTEAN IEF Cell)及附件,垂直电泳系统(PROTEAN II XI Cell)及附件均为美国 Bio-Rad 公司产品。

1.2 研究方法

1.2.1 血清的保存及蛋白质前处理和定量 将不抗凝血 4℃下 4 000 r/min 离心 15 min,上清液在4℃下 2 400 r/min 离心 5 min[3]后,置于 -80℃保存备用。按照 Aurum™ Serum Protein Mini Kit 操作说明书进行蛋白质的纯化,去除白蛋白和 IgG;加 4 倍蛋白液体积的 -20℃丙酮,-20℃过夜,12 000 g 4℃离心 60 min;用 200 μl 水化上样缓冲液重悬溶解蛋白质。Bradford 法定量,分装,-80℃保存备用。

1.2.2 双向凝胶电泳

1.2.2.1 电泳样品的制备 取 300 μg 血清蛋白质样品,加入含适当浓度尿素,硫脲,CHAPS 的上样缓冲液至溶液总体积为 400 μl。

1.2.2.2 等电聚焦 被动水化 14 h,150 V 1 h,250 V 1 h,1 000 V 1 h,10 000 V 4 h,聚焦到 60 000 Vh。

1.2.2.3 SDS-PAGE 12%的胶浓度,10 mA/gel 电泳 30 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 按参考文献[4]进行硝酸银染色方案。

1.2.4 图像扫描与软件分析 凝胶染色后,用 GS-800 高精度扫描仪透射扫描,利用 PDQuest 7.3.0 软件进行图像分析。比较 PCOS 患者与正常妇女的 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 差异表达蛋白 MALDI—TOF 质谱分析 将差异点从胶上切下置于 EP 管中,进行脱色、干燥、酶解进行蛋白质胶内消化,再加入基质和质谱靶点样。制备好的样品用美国 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)。查询条件为:database(NCBInr); Type of search(Peptide Mass Fingerprint); Mass values(monoisotopic); Peptide Mass toleranc(± 100ppm); enzyme(Try-psin); Peptide Charge State(1+); Max Missed Cleavages(1); Fixed modification(Carbamidomethyl C)。寻找与之匹配的相关蛋白质,同时查询其功能。

2 结 果

2.1 多囊卵巢综合征和正常妇女的血清 2-DE 图谱

见图 1、2。

2.2 血清 2-DE 图谱的建立

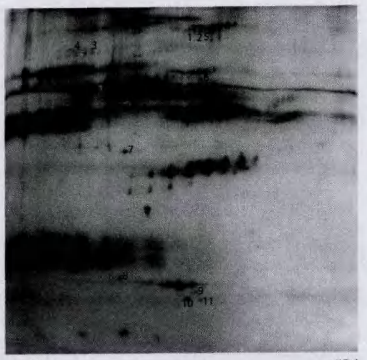
通过上述方法能够得到较好的 PCOS 和正常妇女的 2-DE 图谱,每一标本的 3 张 2-DE 图谱平均蛋白质点数 360 个。

2.3 多囊卵巢综合征和正常妇女的血清蛋白质组的表达差异

比较多囊卵巢综合征和正常妇女的血清 2-DE 图谱,并用 PDQuest 7.3 软件进行分析,按 3 倍的表达量计算,发现有差异表达的蛋白质有 14 个,11 个在多囊卵巢综合征中高表达,3 个在多囊卵巢综合征中低表达。

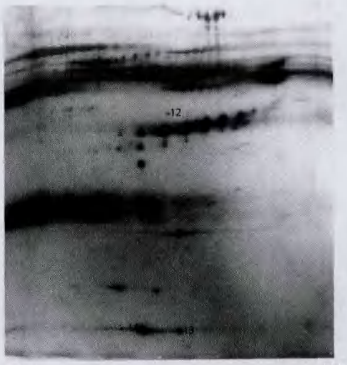
2.4 差异候选蛋白 MALDI—TOF 质谱鉴定

经过对上述差异点行质谱分析得到比较满意的肽质量指纹图并对其进行数据库检索最终鉴别出 2 个蛋白点,即点 12、14,此 2 个点分别为载脂蛋白 A-I(Apolipoprotein A-I, ApoA-I),热休克蛋白 70(Heat shock protein, HSP70)。此 2 个



pH7　　pH4

图 1　多囊卵巢综合征患者血清 2-DE 图谱



pH7　　pH4

图 2　正常妇女血清 2-DE 图谱

表 1　在数据库中搜索的有意义的蛋白质

	蛋白名称	Mascot 分值	相对分子量	等电点	表达
1	载脂蛋白 A-Ⅰ	101	23454	5.39	减少
2	HSP70	50	73280	6.51	减少

点在多囊卵巢综合征中均是下调的。结果见表 1。

3　讨　论

本研究通过双向电泳技术，成功建立了多囊卵巢综合征患者血清 2-DE 图谱，并且对比分析了正常人血清蛋白质图谱，发现了 14 个差异表达蛋白。结合飞行时间一质谱系统对蛋白质或多肽进行质谱分析鉴定，经数据库查询，发现 2 个有意义的差异点，结果是 ApoA-Ⅰ，HSP70。这些蛋白主要涉及脂代谢，细胞凋亡，与多囊卵巢综合征密切相关。

ApoA-Ⅰ是在肝脏和小肠中合成，经过蛋白酶解加工后形成由 243 个氨基酸残基组成的单一多肽。ApoA-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。ApoA-Ⅰ能与磷脂、多种血浆因子及细胞膜受体结合，可以激活卵磷脂胆固醇酰基转移酶，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[4]。PCOS 血中脂蛋白及相应的载脂蛋白异常是合并症发生的主要制病因素。俞琳[5]等人对多囊卵巢综合征的研究发现，ApoA-Ⅰ在多囊卵巢综合征患者中的水平下降。本研究通过血清蛋白组学技术证实 ApoA-Ⅰ在多囊卵巢综合征中的表达低于正常妇女。提示 ApoA-Ⅰ参于了多囊卵巢综合征的脂代谢。

HSP70 作为分子伴侣在提高细胞对应激原的耐受性和抗细胞凋亡发挥重要作用。沙加豪等[6]的研究显示低水平的 HSP70 使组织更易受损，防御应激的能力减弱，升高胰岛淀粉样多肽，增加了胰岛素抵抗。HSP70 通过抑制 C-JunN-terminal 激酶，应激激酶 P38 以及 caspase 的活性，从而减少细胞凋亡[7]。Yamada 等人[8]应用 caspases-3 抑制剂发现小鼠胰岛 β 细胞凋亡减少。本研究结果显示，HSP70 在 PCOS 中表达水平下降，提示 HSP 参与胰岛 β 细胞和胰岛素抵抗。能否作为 PCOS 的诊断标志物需要做进一步的研究。

本试验采用双向凝胶电泳结合质谱分析对多囊卵巢综合征和正常妇女的血清蛋白进行了研究正常。试验结果显示：两组中的蛋白质点表达有差异。这种差异可为探索多囊卵巢综合征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多囊卵巢综合征分子诊断标志物。

参　考　文　献

[1] Legro R S, Strauss J F. Molecular progress in infertility: polycystic ovary syndrome[J]. Fertil Steril, 2002, 78: 569-576.

[2] Hughes C, Layfield R. Genomic and post-genomic approaches to polycystic ovary syndrome-progress so far: Mini Review[J]. Human Reproduction. 2006, 21(11): 2766-2775.

[3] 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.

[4] 徐勇霞，付明德. 载脂蛋白 AI 结构与功能研究进展[J]. 国外医学分子生物学分册，2002，24(1)：62-63.

[5] 俞　琳，何　倩，来　蕾. 多囊卵巢综合征患者胰岛素抵抗与脂代谢的关系[J] 生殖与避孕，2002，22(5)：277-279.

[6] McCarty M F. Induction of heat shock proteins may combat insulin resistance[J]. Med Hypotheses, 2006, 66(3): 527-534.

[7] Rokutan K. Role of heat shock proteins in gastric mucosal protection [J]. Gastroenterology Hepatology, 2000, 15(s1): 12-19.

[8] Yamada K, IcNkawa F, Ishiyama S S. Essential role of Caspases-3 in apoptosis of mouse beta-cells transfected with human Fas [J]. Diabetes, 1999, 48(3): 478-483.

（责任编辑：冉明会）