技术方法 文章编号:0253-3626(2009)04-0442-05

# 双向电泳分析精索静脉曲张不育患者精浆蛋白质的表达差异

李 杰,唐 伟,唐亚雄
(重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:初步观察精索静脉曲张不育患者与正常成人精浆中蛋白质的差异表达,为进一步探讨精索静脉曲张导致不育的分子机制奠定基础。方法:应用蛋白质组学的双向电泳技术,对精索静脉曲张患者与正常成人精浆蛋白质表达进行比较,观察其差异点。结果:得到分辨率和重复性均好的精索静脉曲张患者与正常成人精浆蛋白的双向凝胶电泳图谱,发现二者之间在表达上有明显差异,差异表达蛋白质点数共 38 个。结论:精索静脉曲张患者导致不育可能与精浆中某些蛋白质的表达和修饰改变有关,对这些差异蛋白质点的进一步分析有助于揭示精索静脉曲张导致男性不育的分子机制。

【关键词】精索静脉曲张;蛋白质组;双向凝胶电泳
【中国图书分类法分类号】R697.24 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-10-10

# Differential analysis on two-dimensional electrophresis pattern of seminal plasma protein of varicocele patients

*LI Jie, et al*
(*Departmeny of Urology, the First Affliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To identify differential proteins expression of seminal plasma of varicocele patients and normal person, providing evidence for further exploring the molecular mechanism of infertility caused by varicocele. *Methods*: The differential proteins expression of seminal plasma of varicocele patients and normal

作者介绍:李 杰(1982- ),男,硕士
研究方向:男性不育。
通讯作者:唐 伟,男,教授,E-mail:tangwei2060@yahoo.com.cn。
基金项目:重庆市卫生局项目(渝卫科教[2007]1 号文 07-1-020)。

看,引入微泡造影剂提高了 HIFU 损伤山羊肝脏含有较大血管靶区的效率。

## 参 考 文 献

[1] ter Haar G R.High intensity focused ultrasound for the treatment of tumors[J]. Echocardiography, 2001, 18(4): 317-322.

[2] Ringgaard E, Wolny W W, Bove T.Designing advanced piezoelectric ceramics for novel ultrasonic applications[J]. J Acoust Soc Am, 2008, 123(5): 3782.

[3] Fillinger L, Sutin A, Sarvazyan A. Time Reversal Acoustic focusing with random reverberator[J]. J Acoust Soc Am, 2008, 123(5): 33-38

[4] Wu F, Wang Z B, Chen W Z, et al. Advanced hepatocellular carcinoma: treatment with high-intensity focused ultrasound ablation combined with transcatheter arterial embolization[J]. Radiology, 2005, 235(2): 659-667.

[5] Ko E Y, Lee S H, Kim H H, et al. Evaluation of Tumor Angiogenesis with a Second-Generation US Contrast Medium in a Rat Breast Tumor Model[J]. Korean J Radiol, 2008, 9(3): 243-249.

[6] Kaneko Y, Maruyama T, Takegami K, et al. Use of a microbubble agent to increase the effects of high intensity focused ultrasound on liver tissue[J]. Eur Radiol, 2005, 15(7): 1415-1420.

[7] Malcolm A L, ter Haar G R. Ablation of tissue volumes using high intensity focused ultrasound[J]. Ultrasound Med Biol, 1996, 22(5): 659-669.

[8] Yu T, Fan X, Xiong S, et al. Microbubbles assist goat liver ablation by high intensity focused ultrasound[J]. Eur Radiol, 2006, 16(7): 1557-1563.

[9] Luo W, Zhou X, Ren X, et al. Enhancing effects of SonoVue, a microbubble sonographic contrast agent, on high-intensity focused ultrasound ablation in rabbit livers in vivo[J]. J Ultrasound Med, 2007, 26(4): 469-476.

[10] Yang R, Sanghvi N T, Rescorla F J, et al. Liver cancer ablation with extracorporeal high-intensity focused ultrasound[J]. Eur Urol, 1993, 23(1): 17-22.

[11] Wu F, Chen W Z, Bai J, et al. Tumor vessel destruction resulting from high-intensity focused ultrasound in patients with solid malignancies [J]. Ultrasound Med Biol, 2002, 28(4): 535-542.

[12] Hwang J H, Brayman A A, Reidy M A, et al. Vascular effects induced by combined 1-MHz ultrasound and microbubble contrast agent treatments in vivo[J]. Ultrasound Med Biol, 2005, 31(4): 553-564.

(责任编辑:冉明会)

person were characterized by means of two-dimensional gel electrophoresis (2-DE).*Results*: The well-resolved, reproducible 2-DE seminal plasma were obtained.The 38 differential protein spots were identified.*Conclusion*: The male infertility might due to the expression and modification of some proteins in seminal plasma of varicocele patient. Further analysis on the different proteins' expression helps revealing molecule mechanism of varicocele causing male infertility.

【Key words】Varicocele; Proteome; Two-dimensional gel electrophoresis

精索静脉曲张是由于精索静脉回流受阻或瓣膜失效而使血液倒流,引起血液淤滞,精索蔓状静脉丛迂曲、扩张所致。临床上精索静脉曲张术前患者精液常规检查,多表现为精子密度低下,活率、活力降低,畸形率升高等,目前国外发现大约 30%男性不育患者有精索静脉曲张。患者术后随访,精液常规检查发现,精子质量较术前有明显改观。为了了解精索静脉曲张患者术前术后和正常精浆的蛋白质改变,探讨其导致男性不育的分子机理,我们利用日益成熟的差异蛋白质组学技术进行了相关研究。

本文中,作者利用双向电泳(Two-dimensional gel electrophoresis,2-DE) 和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术 (Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry,MALDI-TOF-MS) 研究了 5 例精索静脉曲张患者术前和术后精液蛋白质组的改变,对其精液中差异蛋白质与不育的关系进行了初步探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

1.1.1 试剂 福尔马林、分析纯异丙醇、冰醋酸、乙醇、甲醇、电泳纯蔗糖(重庆川东化工集团)、分析纯 NaCl、KCl、$Na_2CO_3$、$Na_2S_2O_3$ (重庆化学试剂厂)、*DNase* Ⅰ、*RNase* A、ASB-14、HEPES、分析纯 $AgNO_3$(SIGMA,USA)、蛋白质定量试剂盒(SANGON,上海)、PMSF(Promega,USA)、Percoll (Bioshorp)、TBP、Ampholyte(pH 4~7)、IPG(17 cm,pH4~7)(Bio-Rad,USA)、超纯水(MiniPore,USA)、溴酚蓝、电泳级尿素、硫脲、CHAPS、Tris 碱、碘乙酰胺(IAA)、二硫苏糖醇(DTT)、低熔点琼脂糖(SANGON,上海)。

1.1.2 仪器 低温离心机(SIGMA,USA)、电热恒温水浴锅、双向电泳仪、PROTEAN IEF Cell、PRPTEAN Ⅱ Xi Cell (Bio-Rad,USA)、ArtixScan 1100(MICROTEX) (6 400×32 00)扫描仪、PDQuest software 8.1.0(Bio-Rad,USA)。

### 1.2 精浆样品的采集和裂解

根据世界卫生组织编写的《不育夫妇标准检查与诊断手册》(WHO 诊断标准) 收集精索静脉曲张不育男性手术前的精液共 5 份,研究对象:①成年男性,年龄 20~35 岁,从事非有害有毒工作;②无吸烟史或吸烟极少,不善于饮酒和近 2 周未饮酒;③符合精索静脉曲张曲张的诊断标准,男性患者的女方妇科检查正常,但婚后一年之内无怀孕史;④标本精液量 <2 ml、a 级精子 <25%、a+b 级 <50%, 用伊红染色活精子超过 60%;精子密度 $<20\times10^6$ 个 /ml;酸碱度 <7.2(正常范围为 7.2~8.0)。上述 5 例患者术后 5 个月随访,收集患者精液 5 份, 在精液量、密度、活动率和形态分析等方面符合 WHO 的正常精液标准[1]。收集正常生育患者精液 5 份。所有样本均禁欲 7 d 后收集,并经过伦理道德委员会批准和获得志愿者签署知情同意书。

将精液液化 30 min,经 300 g/min 离心 20 min,去掉游动精子,然后将精浆用 4 倍体积的冰丙酮沉淀过夜,沉淀物用冰丙酮洗 3 次后 -70℃保存备用于抽提蛋白。总蛋白的提取采用含 9 mol/L urea,2 mol/L Thiourea,2%(W/V)CHAPS,65 mmol/L DTT(DL-Dithiothreitol,$C_4H_{10}O_2S_2$),0.2%(W/V)的 Ampholyte,0.001%(W/V)的 Bromchlorphenol blue(溴酚蓝)以及用终浓度为 1 mmol/L 的 PMSF(Phenylmethanesulfonyl fluoride)与各 10 U/ml 的 *DNase* Ⅰ,*RNase* A 酶的 Buffer 在冰浴条件下裂解蛋白。提取后的初蛋白溶液在 4℃,6 000 g/min 离心 60 min,收集上清液冷存备用于双向电泳分离。

### 1.3 精浆蛋白质含量测定

采用经典的 Bradford[2]蛋白质定量检测方法:在 0~100 μg/ml 浓度范围内,用 595 nm 处光吸收与蛋白质含量成正比的特性来建立标准曲线,然后进行样品蛋白质定量。

### 1.4 精液蛋白质的双向凝胶电泳分离以及染色

根据 Gorg[3]的方法进行双向凝胶电泳,第一向固相 pH 梯度等电聚焦采用 17 cm 的预制胶条(pH4~7)。上样量为 300 μg 总蛋白,总聚焦时间电压为 60 000V·h。聚焦结束后用 10%SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行第二向分离,电泳结束后采用高灵敏度、低成本的酸性硝酸银法染色。

### 1.5 凝胶图像扫描与计算机分析

为了便于图像分析,银染的凝胶用高分辨率扫描仪(ArtixScan 1100,MICROTEX)透射模式进行扫描,原始 2-DE 图用 PDQuest software 8.1.0 软件进行分析,蛋白点的 Mr 和 pI 通过 Bio-Rad 的 2-DE 内参和外标 Marker 蛋白校正后计算得到,为了保证重复性,每个样品进行 3 次电泳。

### 1.6 蛋白质斑点的胶内酶解

进行质谱分析前,差异蛋白斑点按下列程序准备:①脱色:将胶块放入 1 ml 规格的硅烷化 EP 管中。胶块先用超纯

水涡漩洗涤 1 min × 3 次;接着用 50 μl 30 mmol/L $K_3Fe(CN)$ 6/100 mmol/L $Na_2S_2O_3$(1:1)溶液脱色至银置换完全;水洗 3 遍至透明;用 5 倍胶块体积的 $CH_3CN$ 脱水 3 次,弃去 $CH_3CN$,以 50 μl/gel 100 mmol/L $NH_4HCO_3$ 使胶块溶胀,时间为 20 min/gel ;吸出液体后用无水 $CH_3CN$ 脱水完全;将 EP 管中胶块冰冻干燥。②酶解和萃取肽段:将冰冻干燥的胶块在 4℃ 冰浴中吸收 20 μl 10 ng/μl 的胰酶溶液 /gel 1 h;向每一胶块上层的液体中加入 30 μl 40 mmol/L $NH_4HCO_3$/$CH_3CN$ 溶液 (9:1,V/V),在 37℃水浴中酶解 24 h;吸出上清液,在水浴中用 30 μl 50%$CH_3CN$/5%TFA 水溶液萃取 1 h × 2 次; 分别将萃取液合并后冰冻干燥[4]。

1.7 质谱分析

以 $CH_3CN$/5%TFA 水溶液(1:1,V/V)配制 CHCA 基质饱和溶液;取 2 μl CH3CN/5% TFA 水溶液(1:1,V/V )将肽混合物溶解并与 CHCA 基质饱和溶液 2 μl 混合均匀,快速取 1 μl 点在质谱仪样品板上,在室温、洁净条件下自然干燥 8 h 后再对样品基质结晶进行质谱分析。

1.8 蛋白数据库搜索

采用 MS-Fit 搜索引擎肽,选择 NCBI.2008.06.16 数据库,对获得的质谱数据进行肽质量指纹谱查询和候选蛋白筛选,查询条件:肽质指纹图中的肽片段质量控制在 10 ~ 100 kD,表观 pI 的误差范围为 ± 0.15pH ,表观分子质量的误差范围为 ± 10% ,肽质量容错数为 ± 1 Da,漏切位点数为 1 个,物种来源选择人类,同时肽质量类型根据校正方式选择平均分子质量或者单同位素质量,最少匹配肽段数为 5,半胱氨酸为脲甲基半胱氨酸化(carbamidomethyl-Cys)。

## 2 结 果

2.1 精索静脉曲张患者术前和正常成人精浆蛋白的双向电泳图谱分析

利用双向电泳技术分别分离 5 例精索静脉曲张术前患者的 15 份精浆标本(3 份/人)和 5 份正常精浆标本所提取的蛋白质,经计算机分析后,双向电泳图谱重复性高,重复性分别达到了 90.1%和 89.2%,符合比较差异蛋白的要求,也与文献描述的基本一致[5]。用 PDQuest software 8.1.0 软件分析术前和正常精浆蛋白电泳图谱,蛋白质斑点分子质量在 10~100 kD、pI4~7,蛋白斑点数量分别为(407±15)和(461±19)个。进行定量差异分析发现,在光密度总值相差 10 倍时,仅在术前不育精浆中存在的蛋白质斑点有 14 个;仅在正常成人中存在的蛋白质斑点有 21 个(图 1 和图 2)。

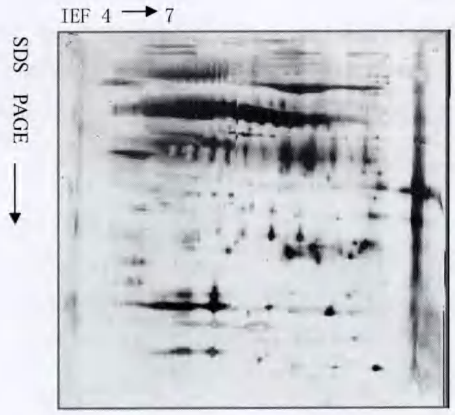



图 1 术前精浆蛋白质双向电泳图谱

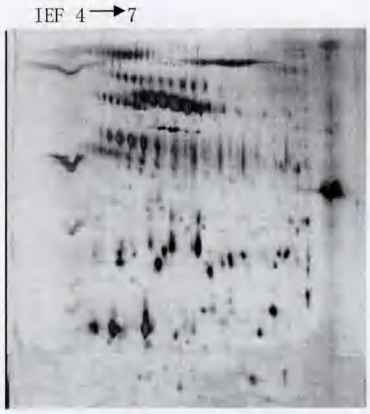



图 2 正常人精浆蛋白质双向电泳图谱

2.2 精索静脉曲张患者术后和正常患者精浆蛋白的双向电泳图谱分析

其术后 5 个月随访的精浆标本所提取的蛋白质,经计算机分析后,双向电泳图谱重复性高,重复性分别达到了 91.4%和 89.2%,用 PDQuest software 8.1.0 软件分析术后和正常患者精浆蛋白的双向电泳图谱,蛋白质斑点分子质量在 10~100 kD、pI 4~7,蛋白斑点数量分别为(447±11)和(461±19)个。进行定量差异分析发现,光密度总值相差 10 倍时,仅在术后精浆样本中高丰度表达的蛋白质斑点有 7 个;仅在正常成人精浆中高丰度表达的有 3 个。考虑到误差和统计学意义,本试验未对二者经行比较分析。

2.3 用质谱分析法鉴定蛋白质

选择在计算机定量差异分析中,精索静脉曲张患者术前和正常成人精浆蛋白的双向电泳图谱在光密度总值相差 10 倍时存在明显差异的 35 个蛋白质点,进行原位酶解和 MALDI-TOF-MS 肽质量指纹图分析(图 3),其中 25 个点得到较满意的肽质量指纹图(图 3 为点 3 的肽质量指纹图示例)。对所获得的肽质量指纹图用 MS-Fit 查询软件搜索 NCBI

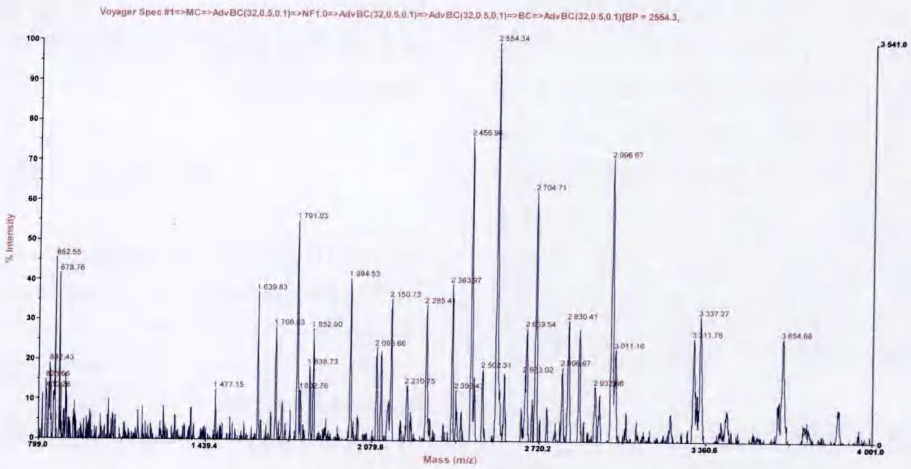



**图 3　CDK6 的肽指纹图谱**

数据库，结合双向凝胶电泳图谱上各点的表观分子质量、等电点、匹配肽段的多少和覆盖率进行综合分析。

## 3　讨　论

精浆是精子的天然培养基，精浆中含有的很多成分与血浆相同，同时含有一些来自睾丸、附睾和相关附属腺体的特有成分，决定着精液的生化及生理学特性。例如前列腺素及蛋白酶抑制因子等，可直接影响精子的活动度和受精能力。精浆作为精子的天然介质，对精子的生成、表面修饰、成熟、运动及受精产生重要影响。随着基因组计划的完成，蛋白质组的研究技术变得越来越成熟，它能从整体的角度分析动态变化的蛋白质组成成分、表达水平与修饰状态。本研究即利用蛋白质组学技术，对精索静脉曲张导致不育的男性精浆和其术后精浆、正常男性精浆进行分离，建立精浆蛋白质的双向电泳图谱，并进行对比后质谱分析，以期对精索静脉曲张导致不育的机制有初步探讨。

在本研究中，我们利用双向电泳技术研究精索静脉曲张患者术前精浆和有正常生育能力的成人精浆之间的差异表达蛋白，选定 35 个差异表达蛋白质点，其中 25 个点得到较满意的肽质量指纹图，通过 MS-Fit 查询软件搜索蛋白，成功搜索到 12 个差异蛋白。蛋白质未得到鉴定的原因可能是二维电泳的分辨力或质谱分析敏感性的限制，以及部分蛋白可能是未发现的新蛋白。

在实验中我们发现仅在正常人精浆中表达的 9 个蛋白质点，分别是 CDK6（细胞周期蛋白依赖性激酶 6）、Msh5 蛋白、Nek2 蛋白、酪氨酰-tRNA 合成酶、CBS 蛋白、EFR3B 蛋白、RIPK5 蛋白、甘氨酸脱氢酶，激肽释放酶。仅在精索静脉曲张术前精浆中高丰度表达的 3 个蛋白质点，分别是磷脂酶 A1、凝溶胶蛋白、羟肽酶 E。

细胞周期蛋白依赖性激酶（Cyclin-dependent kinase，CDK）是一类重要的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，以与 cyclin（细胞周期蛋白）结合的复合物形式出现，该复合物分为催化亚基和调节亚基两部分。目前发现的 CDK 在动物中有 7 种。各种 CDK 分子均含有一段相似的激酶结构域，这一区域有一段保守序列，与周期蛋白的结合有关。王亚轩[6]等研究发现，在生殖细胞增殖过程中，$G_1$ 期向 S 期转变是细胞分裂的关键步骤。$G_1$ 期向 S 期转变发挥作用的主要是细胞周期蛋白 D（cyclin D）及其结合分子 CDK4 和 CDK6。我们推测，CDK6 的缺失使得生殖细胞细胞周期内源性调控（细胞周期蛋白-细胞周期蛋白依赖蛋白激酶-细胞周期蛋白激酶抑制因子）受阻，使细胞停滞在 $G_1$ 期，起到抑制细胞分裂的作用。

Msh5 蛋白是蛋白错配修复蛋白家族中的一个成员。Winfried Edelmann 等[7]用人工干预雄性大鼠致其 Msh5 基因无效突变，研究发现这些大鼠均很活跃但已无生育能力，在减数分裂染色体配对 I 期出现障碍，并且导致睾丸体积缩小。本实验发现 Msh5 蛋白仅在正常人精浆中表达，但临床相关人类实验暂无报道，有待于进一步研究。

Nek2 蛋白（NIMA-related kinase2）是细胞循环调节激酶，有助于细胞进入有丝分裂。K Rhee 等[8]研究表明，Nek2 蛋白在细胞周期减数分裂阶段表达，并与减数分裂的同源染色体分离有关。Masumi Eto

等[9]研究发现 Nek2 蛋白与催化亚基蛋白磷酸酶-1(Phosphatase-1,PP1)结合,形成一个复杂的络合物来发挥生物学作用。在细胞复制和分离阶段,位于中心体的络合物互相交织以便进行调节。Nicholas R.HELPS 等[10]研究发现,Nek2 蛋白复合物在细胞分裂 M 期和 $G_1$ 期低表达,但在 S 期和 $G_2$ 期高表达,是不可缺少的细胞周期调节蛋白。Nek2 蛋白的缺失表达,可能导致了精索静脉曲张患者精原细胞复制和分离阶段调节受阻,仍有待进一步研究验证。

激肽释放酶又称血管舒缓素,是一种蛋白水解酶,由 18 种氨基酸和 4 种糖所组成,是激肽释放酶-激肽系统(Kallikrein-kinin system,KKS)的重要成员。激肽释放酶-激肽系统是机体重要的调节系统,广泛存在于许多组织和器官中,参与多种生理和病理过程[11]。其体内主要作用为:在体内降解激肽原而释放出激肽,后者直接作用于小血管和毛细血管使其扩张。在扩张血管的同时增加血管网交点,改善血管的通透性和血液流量。在生殖方面,激肽释放酶可促进睾丸组织核酸的合成及对葡萄糖的吸收,增加睾丸血流,为生精细胞提供理想的微循环环境。利用这个特性,现在激肽释放酶已广泛应用于临床治疗男性不育。其余蛋白如酪氨酰-tRNA 合成酶,CBS 蛋白,EFR3B 蛋白,RIPK5 蛋白,甘氨酸脱氢酶等均未见在生殖方面的报道,有待于进一步研究。

综上所述,精索静脉曲张患者与正常成人精浆蛋白的质表达存在差异。上调和(或)下调相关蛋白质的表达,经其相应信号传导途径,导致了精索静脉曲张患者生育能力下降。但不育发生发展的确切分子机制、蛋白质间相互作用及其蛋白质表达调控网络,仍有待于今后进一步研究,并对其他有差异表达的蛋白质点进行质谱鉴定,利用免疫标记等技术对单个有意义的蛋白质进行精子中亚细胞定位和特征分析。本实验为进一步研究精索静脉曲张导致不育的机制提供了线索,相信随着医学科学的高速发展,精索静脉曲张导致男性不育的具体机理必将被人们所揭示。

## 参 考 文 献


[1] World Health Organization. WHO laboratory manual for examination of human semen and semen-cervical MUCUS interaction[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1999.

[2] Kruger N J. The Bradford method for protein quantitation[J]. Methods Mol Biol, 1994, 32(1): 9-15.

[3] Gorg A, Obermaier C, Boguth G, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 2000, 21(6): 1037-1053.

[4] Bergman A C, Alaiya A A, Wendler W, et al. Identification of gel-separated tumor marker proteins by mass spectrometry[J]. Electrophoresis, 2000, 21(3): 679-686.

[5] Pixton K L, Decks E D, Flesch F M, et al. Sperm proteome mapping of a patient who experienced failed fertilization at IVF reveals altered expression of at least 20 proteins compared with fertile donors: case report [J]. Hum Reprod, 2004, 19(6): 1438-1447.

[6] 王亚轩,蔡广增,杨书文,等. 原因不明少精子症睾丸生精细胞增殖与凋亡变化的研究[J]. 中华泌尿外科杂志, 2002, 23(11): 651-653.

[7] Edelmann W, Cohen P E, Kneitz B, et al. Mammalian MutS homologue 5 is required for chromosome pairing in meiosis[J]. Nature Genetics, 1999, 21(1): 123-127.

[8] Rhee K, Wolgemuth D J. The NIMA-related kinase 2, Nek2, is expressed in specific stages of the meiotic cell cycle and associates with meiotic chromosomes[J]. Development, 1997, 124(11): 2167-2177.

[9] Masumi Eto, Elizabeth Elliott, Todd D, et al. Inhibitor-2 regulates protein phosphatase-1 complexed with nimA-related kinase to induce centrosome separation[J]. J Biol Chem, 2002, 277(46): 44013-44020.

[10] Helps N R, Luo X, Barker H M, et al. NIMA-related kinase 2 (Nek2), a cell-cycle-regulated protein kinase localized to centrosomes, is complexed to protein phosphatase 1[J]. Biochem. J, 2000, 349(Pt 2): 509-518.

[11] 李世峰,陈 慧. 激肽释放酶-激肽系统与血管内皮细胞功能关系研究新进展[J]. 心血管康复医学杂志, 2005, 14(5): 508-510.


(责任编辑:关蕴良)