维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)08-0959-04

2 型糖尿病患者唾液双向电泳图谱的建立和分析

申琳琳,张 渊,李惠芝,邱宗荫

(重庆医科大学药学院药物分析研究室,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立 2 型糖尿病患者唾液蛋白质双向电泳图谱,观察 2 型糖尿病患者与正常人唾液蛋白质差异表达情况。方法:以优化的双向电泳技术分离唾液蛋白质,银染后用专业软件进行分析,建立 2 型糖尿病患者与正常人唾液蛋白质双向电泳图谱,并采用二维电泳图谱专用软件对所得结果进行图谱分析。采用基质辅助激光解吸电离 - 飞行时间质谱法对两组间比较所得目标蛋白质点进行质谱鉴定。结果:分别建立了正常人和 2 型糖尿病患者唾液蛋白质双向电泳图谱。结论:对比正常人和 2 型糖尿病患者唾液蛋白质图谱,鉴定出 7 种差异蛋白,为进一步研究其发病机制及治疗手段提供实验基础。

【关键词】2 型糖尿病;唾液蛋白质组;双向电泳;基质辅助激光解吸附 / 离子化飞行时间

【中国图书分类法分类号】R387.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-11-26

Establishment and analysis of saliva two dimensional gel electrophoresis profiles of Type 2 diabetes patients

SHEN Lin-lin, et al

(*Department of Pharmaceutical Analysis, College of Pharmacy, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: The purpose of this study was to establish two dimensional gel electrophoresis(2-DE) profiles of saliva of Type 2 diabetes patients, and to identify the differential proteomic expressions between normal persons and Type 2diabetes patients. *Methods*: Samples of saliva protein were separated by two dimensional electrophoresis with optimization. Differential proteomic expressions between the Type 2diabetes patients and the normal control persons were identified by two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, silver staining, image master 2-DE software analysis, peptide mass fingerprinting based on matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS), Bioworks and NCBI software database searching. *Results*: The two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis profiles of saliva proteins were successfully established by 2-DE. twenty of the significant differential proteins were selected and identified by MALDI-TOF-MS. seven of them were finally identified. *Conclusions*: The 2-DE profiles of saliva proteins were established and the differential proteomic expressions were identified by proteome technique in our study. This can be an experimental basis for further research of the pathogenesis and treatment of Type 2 diabetes.

【Key words】 Type 2 diabetes; Salivary proteomics; 2-DE electrophoresis; MALDI-TOF-MS

近年来,唾液的临床诊断价值逐渐为人们所认识。唾液可以简单而安全地通过非入侵方式获得[1]。已有多项研究证明,唾液成分的改变与许多临床病理过程有关,例如,唾液中蛋白质成分的改变已用于临床 HIV 和一些癌症的诊断,而且也开始用于关节炎和心脏病的诊断[2]。因此,有越来越多的临床工作者关注唾液腺及其分泌物的研究,而将蛋白质组学的策略应用于生理和病理状态下唾液蛋白质种类和功能的研究正在形成一个新的领域 - 唾液蛋白质组学,其旨在从唾液中发现和鉴定具有生物标志物意义的功能蛋白质,以有助对疾病的早期诊断、病变和进程的监控,以及药物作用的效果和毒理机制进行更为深入的研究[1]。

有关研究工作表明,糖尿病可导致唾液腺分泌功能紊乱,从而增加患者口腔的易感染性[3]。已有对 1 型糖尿病患者唾液蛋白质组改变情况进行研究的工作报道[4]。

该实验以比较蛋白质组学研究策略,通过建立 2 型糖尿病患者和正常人唾液总蛋白质的双向电泳

作者介绍:申琳琳(1982-),女,硕士,研究方向:唾液蛋白质组学。

通讯作者:李惠芝,女,副教授,E-mail:sweety1125@163.com。

维普资讯 http://www.cqvip.com

图谱，以 MALDI-TOF-MS 对有明显差异性表达的蛋白进行分析、鉴定，为进一步研究 2 型糖尿病发病机制和诊断治疗提供新的实验基础。

1 材料和方法

1.1 主要仪器设备及试剂

1.1.1 主要仪器设备 Bio-Rad protein IEF cell 型等电聚焦仪(美国 Bio—Rad 公司)，Bio-Rad protein Ⅱ XI cell 型垂直电泳槽(美国 Bio—Rad 公司)，PDQuest(7.4.0)图象分析软件(美国 Bio—Rad 公司)，图象扫描仪(上海中晶科级有限公司)，高速冷冻离心机(德国 HERAUS)，752 分光光度计(上海分析仪器总厂)。

1.1.2 主要试剂和材料 IPG 线性干胶条 (pH4～7，17cm)，两性电解质(Pharmalyte，pH4~7)，碘乙酰胺 iodoaertamide 购自美国 Bio—Rad 公司；矿物油，过硫酸胺(AP)，乙二胺四乙酸(EDTA)，四甲基乙二胺(TEMED)，丙基硫酸盐(CHAPS)，肽蛋白酶抑制剂购自德国 Sigma 公司；尿素(Urea)，硫脲(Thiourea)，十二烷基硫酸钠(SDS)，三羟甲基氨基甲烷(Tris)，甘氨酸(Glycine)，丙烯酰胺，甲叉双丙烯酰胺购自上海生物工程有限公司；二硫苏糖醇(DTT)购自 BBI 公司；蛋白质分子量标准(宽)Maker 购自大连宝生生物有限公司，其余试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 样本收集 患者唾液来自 2007 年就诊于重庆医科大学附属医院的住院患者。测试血糖尿糖，葡萄糖耐受量，糖化血红蛋白确诊为糖尿病[5]，每日口服磺脲类降糖药控制血糖。无其他全身系统性疾病，正常人唾液取自同时期健康志愿者。唾液收集时间为上午 9：00～12：00，收集前 2h 开始禁食水。用清水漱口后静坐于牙椅上。前 5min 内的唾液自然吞下后开始收集，口腔唾液积聚至一定量后，吐入置于冰浴中的 50ml 离心管内，共采集唾液样品 5ml，采集时间为 20～30 min，-80℃冰箱冷冻保存备用[5]。

1.2.2 样本处理 收集的样品放入冰壶后，立即转送实验室，离心 15min(4℃，800×g)吸取上清，再次离心 60min(4℃，14 000×g)，吸取上清液，取预冷至 4℃的丙酮，按照 4：1 的比例(丙酮：样品)，倒入样品中。混合后，将样品分装于 1ml 的 EP 塑料离心管中，-20℃保存 20～30h 后，取出样品，离心 60min(4℃，14 000×g)，可见离心管底部有白色绵絮状物质。采用考马斯亮蓝法进行蛋白质定量，据此计算上样量，确定上样体积[6]。

1.2.3 双向电泳

1.2.3.1 等电聚焦 自 -20℃ 取出的胶条，室温下平衡 10 min，300μg 蛋白样品溶于 450μl 上样缓冲液(尿素 7mol/L，硫脲 2mol/L，CHAPS 4%，DTT 65mmol/L(现加)，Bio-Lyte4～6，5～70.2%(w/v)(现加)，溴酚蓝 0.001%(现加)加矿物油覆盖。程序设置如下：50V 14h，125V 1h，250V 1h，500V 1h，1 000V 1h，1 000V 5h，10 000V 6h。恒温 17℃。将聚焦后的胶条在 SDS 平衡液(6mol/L 尿素，2%SDS，1.5mol/L Tris-HCl，pH8.8，30%甘油)中平衡 2 次(摇床上振荡)，每次 15min。其中，第一次平衡液中加入 20mmol/L DTT，第二次平衡液中加入 100mmol/L 碘乙酰胺。

1.2.3.2 SDS～PAGE 垂直电泳 采用 12.5%的均匀 SDS 聚丙烯酰胺凝胶(水 23.2ml，30%丙烯酰胺溶液 32.46ml，1.5mol/L Tris-HCl pH 8.8 缓冲液 20ml，10%SDS 0.8ml，10% APS 0.4ml，TEMED 3.76μl，胶总体积 80ml)进行凝胶电泳。初始电流为每块胶 5mA，电泳 50min，然后以每块胶电流 25mA 进行电泳，直至溴酚蓝前沿跑出胶块。

1.3 银染色

电泳结束后，采用硝酸银染色法，通过固定，敏化，硝酸银染色，显影，停显及脱色，至背景清晰[8]。

1.4 图象分析

每个样品进行 2 次双向电泳，凝胶采用 GS-800 Calibrated ImagingDensitometer(BIO-RAD，美国)扫描成 TIFF 格式图像(分辨率为 300 dpi)，然后用 PD-quest7.4 软件对图像进行背景消减、蛋白质点检测和校正，获取蛋白质点的位置坐标和表达量等分析。选取 Ratio≥2 的蛋白质点认为有差异。

1.5 酶切和质谱

选取斑点体积差异比值大于 2 的差异蛋白点，用手术刀切点后，脱色，37℃酶解过夜(约 22h)，与饱和基质溶液 α-氰基-4-羟基肉桂酸(α-cyano-4-hydroxy-cmnamic acid，α-CCA)充分混匀后点靶，进行质谱分析[9]。

1.6 数据库搜索

将质谱鉴定所得的肽质量指纹谱(Peptide mass fingerprinting，PMF)数据于 MS-Fit 在 UCSF 软件搜索相应的库。搜索使用的数据库为 SwissProt.2007 蛋白库。检索参数为 trypsin；氨基酸固定修饰方式为 carboxmethylation；模式为单同位素峰；肽片断最大误差控制在 ± 50ppm；肽片断最大分子量误差为 ± 0.5u；每个肽允许有 1 个不完全裂解位点。

2 结 果

2.1 2 型糖尿病患者唾液双向电泳图谱的建立和分析

实验经 2-DE 技术及银染色后，得到了两组唾液的双向凝胶电泳图，并于相同条件下重复实验 3 次，得到的唾液蛋白 2-DE 图像显示：大部分唾液蛋白分布在相对分子量 25～97ku 及 pH 值 4～7 范围内，极酸性和极碱性蛋白很少。高丰度蛋白质主要分布在相对分子量 95ku 和 50～66ku 处。另外，在相对分子量 25～40ku 范围内也可见高丰度蛋白质。观察正常对照组唾液蛋白质组电泳图谱可得到(389 ± 17)个蛋白点，而 2 型糖尿病组可见到(403 ± 9)个蛋白点。见图 1、2。

维普资讯 http://www.cqvip.com

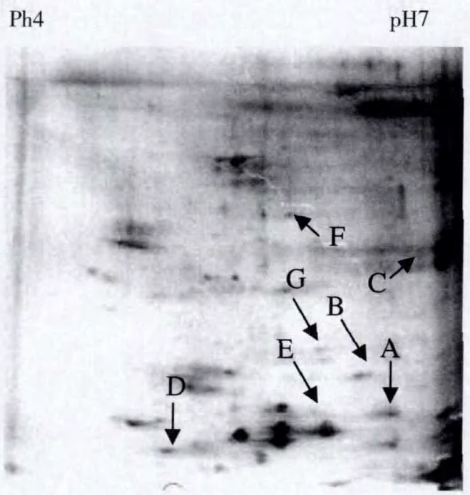


图 1　2 型糖尿病人唾液蛋白质图谱

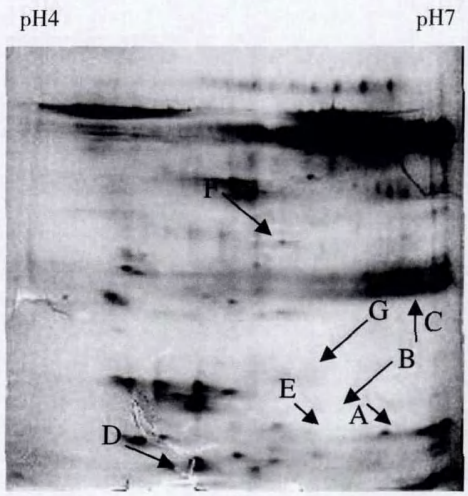


图 2　正常人唾液蛋白质图谱

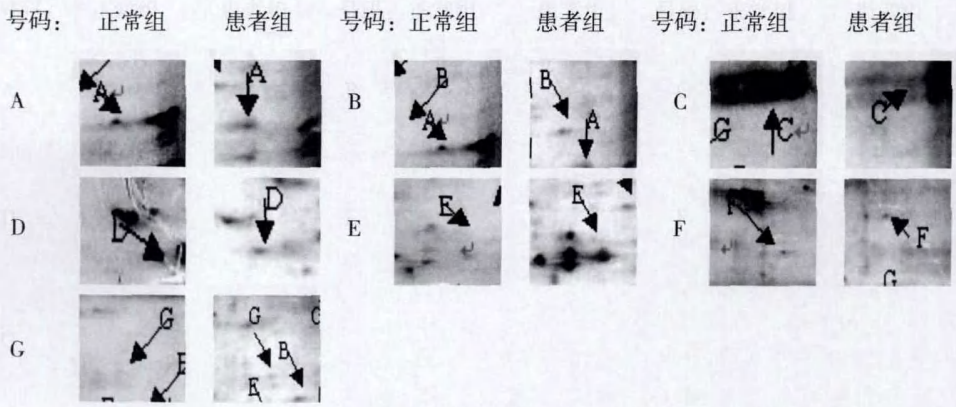


图 3　正常人和 2 型糖尿病人唾液蛋白差异性比较局部放大图

表 1　7 个差异蛋白点一览表

编号	质谱检索	相对分子量 /ku	等电点	表达变化
A	α-3- 半乳糖转移酶	26 744	6.6	上升
B	醛 - 酮还原酶家族 1,4 号蛋白	37 067	6.5	上升
C	锌指蛋白 655	57 393	6.7	下降
D	Ig 蛋白重链可变区,VH3 家族	13 051	5.0	下降
E	β - 内啡肽	28 385	6.1	下降
F	激素原转化酶	70 566	6.0	上升
G	生育酚相关蛋白	46 644	6.2	下降

2.2　差异蛋白质点的鉴定和功能分析

通过对 2-DE 凝胶上差异表达的 20 个蛋白质斑点进行切割，用胰蛋白酶消化后进行 MALDI-TOF-MS 检测获得了 11 张 PMF，在数据库中匹配符合结果要求的已知蛋白质，鉴定出 7 个质点，它们分别为 A：α-3- 半乳糖转移酶；B：醛 - 酮还原酶家族 1,4 号蛋白；C：锌指蛋白 655；D：Ig 蛋白重链可变区，VH3 家族；E：β - 内啡肽；F：激素原转化酶；G：生育酚相关蛋白。其中 3 个蛋白点在 2 型糖尿病患者组上调，另外 4 个相反，见表 1。

3　讨　论

维普资讯 http://www.cqvip.com

本研究通过双向电泳技术,成功建立了 2 型糖尿病患者唾液 2-DE 图谱,并且对比分析了正常人的唾液蛋白质图谱,发现了 20 个差异表达蛋白。结合飞行时间 - 质谱系统对蛋白质或多肽进行质谱分析鉴定,最后从 20 张肽指纹图谱中,匹配到符合结果要求的 7 个已知蛋白质。其中 3 种蛋白表达上调,四种下调。具体而言,即 2 型糖尿病患者的激素原转化酶,α-3- 半乳糖转移酶,醛 - 酮还原酶家族 1,4 号蛋白成分均高于正常人,而锌指蛋白 655,Ig 蛋白重链可变区,VH3 家族,生育酚相关蛋白和 β- 内啡肽则较正常人偏低,类似工作尚未见有关文献报道。

激素原转化酶(Prohormone convertase,PC)前体被神经内分泌蛋白 7B2 激活生成激素原转化酶,它是一种神经内分泌前体加工内切蛋白酶,可作用于胰岛 B 细胞分泌的胰岛素原(去除部分肽段)形成胰岛素[10]。若 PC 功能异常可能导致胰岛素原及其代谢产物的不适当分泌,引起胰岛素缺乏。PC 有多种同工酶,主要为 PC2 和 PC3,其中 PC2 主要存在于胰腺和垂体前叶,在调节人的能量代谢中起主要作用。2 型糖尿病的特征之一,就是胰岛素原和(或)胰岛素原 / 胰岛素比值上升,基因突变如果造成 PC2 或 PC3 功能异常,都将导致 2 型糖尿病的发生。PC2 基因第 2 号内含因子存在 7 种多态性,分别由 15-21 个(CA)组成,这种串联重复序列(CA)21 等位基因频率在 2 型糖尿病患者中明显高于正常人群[11,12]。

β-EP 能抑制胰岛内细胞生长抑素的分泌,刺激胰岛素和胰高血糖素的分泌,降低肝和肾的鸟氨酸脱羟化物活动,使胰岛素分解代谢减慢。当 β-EP 水平降低时,胰岛素分泌减少,对血糖反应不敏感,出现血糖升高。β-EP 测定可作为判断糖尿病病情的一个指标。当胰腺内分泌的 β-EP 量降低或持续降低时,提示糖尿病病情加重[13]。β-EP 参与了糖尿病发病系统三元论学说中胰岛素、胰高血糖素、生长抑制素之间的相互调节,在糖尿病发病和血糖调节中起了重要作用[14]。

2 型糖尿病发病是由胰岛素(INS)分泌功能或 INS 外周作用受损所致,胰岛素分泌缺陷和胰岛素抵抗(包括两者相互作用)是其发病机制的两个基本环节和特征。它的发生到出现临床症状可能要经过一个漫长的过程。有研究表明,从血糖升高到出现糖尿病的临床症状平均可长达 7 年[15],如果能够在没有出现临床症状就及时的诊断治疗早期 2 型糖尿病,那么 2 型糖尿病的治愈率将会有很大的提高。本实验通过对比正常人和 2 型糖尿病患者的唾液蛋白质电泳图谱,发现了 7 个表达差异明显的蛋白质,为寻找早期 2 型糖尿病的临床生物标记物提供了实验基础。

参 考 文 献

[1] Streckfus CF, Bigler LR. Saliva as a diagnostic fluid[J]. Oral Dis, 2002; 8(6): 69-76.

[2] Wong, David T. Salivary diagnostics powered by nanotechnologies[J]. Proteomics and Genomics Journal of the American Dental Association, 2006; 137(3): 313-321.

[3] Mata AD, Marques D, Rocha S, et al. Effects of diabetes mellitus on salivary secretion and its composition in the human[J]. Cell Biochem, 2004; 26(1): 137-142.

[4] Christophe H, François C, Nicolas S, et al. Salivary protein profiling in type 1 diabetes using two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry[J]. Clinical Proteomics, 2006; 2(1-2): 117-128.

[5] Vitorino R. Identification of human whole saliva protein components using proteomics[J]. Proteomics, 2004; 4(4): 1109-1115.

[6] Angelika Gorg. Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients for proteome analysis[J]. Electrophoresis, 2000; 2(1): 1037-1053.

[7] Herbert B. Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis[J]. Electrophoresis, 1999; 2(1): 660-663.

[8] Denise A, Brian S. Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: A method for the removal of silver ions to enhance sensitivity[J]. Electrophoresis, 1999; 2(5): 601-605.

[9] Patrick H, O'farrell. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1975; 250(10): 4007-4021.

[10] 王 瞳, 贾竹青. Ⅱ型糖尿病的病因遗传基础综述[EB/OL]. http://age.bjmu.edu.cn/old/progress/pb/2006.pdf, 2006-03-12.

[11] 李会芳, 宋滇平, 张 敏. Ⅱ型糖尿病的分子遗传学新进展[J]. 昆明医学院学报, 2003; 4(4): 64-67.

[12] 珠海福尼亚科技集团. 胰岛素泵在初诊 2 型糖尿病的应用[EB/OL]. http://www. rfornia.com/ DataView.asp, 2005-04-07.

[13] Sabine Z, Achim S, Stefan E. A novel human tocopherol-associated protein[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2000; 8(33): 25672-25680.

[14] 钟历勇. 氧化应激与糖尿病. 中国医学论坛报[EB/OL]. http://tnb.39.net/079/7/122479.html, 2007-09-04.

[15] 亓 建, 张时娟. 糖尿病患者血 β- 内啡肽的放免测定及其临床意义[J]. 中华医药杂志, 2003; 8(3): 8-10.

(责任编辑: 冉明会)