

乳腺增生组织蛋白质组的凝胶内差异显示电泳分析^{*}

卢德赵¹ 沃兴德¹ 沃立科¹ 唐利华¹ 李 毅¹ 楼丽华² 赵 虹²

(1 浙江中医药大学生命科学院 浙江 杭州 310053 2 浙江省中医院乳腺病中心 浙江 杭州 310006)

摘要 目的:建立具有高分辨率和稳定性的乳腺增生组织蛋白质组的双向电泳图谱,并对其进行差异蛋白质组分析。方法:取乳腺增生病患者增生部位及正常部位乳腺组织,匀浆提取乳腺组织总蛋白,分别用 Cy3 或 Cy5 标记,每一对 Cy3 和 Cy5 标记样品都与一个 Cy2 标记的内标等量混合,上样于同一胶中进行电泳分离,经不同光激发下扫描得到不同样品的蛋白质组图谱。所获得的图谱经 DeCyder 软件进行分析。结果:在乳腺增生病增生的组织中,有 12 个蛋白质表达水平显著增加,另外 3 个蛋白质表达水平显著下降。结论:利用 DIGE 技术可以作胶内对比分析,也可以根据内标消除胶与胶之间的差异,提高统计的可信度;分析所得的 15 个差异蛋白质可能与乳腺增生疾病的发生与发展有关。

关键词: 乳腺增生;蛋白质组;凝胶内差异显示电泳

中图分类号: R271.44 **文献标识码:** A

Proteome study of hyperplasia of mammary glands by two - dimensional difference gel electrophoresis

LU De - Zhao¹, WO Xing - de¹, WO Li - ke¹, TANG Li - hua¹, LI Yi¹, LOU Li - hua², ZHAO Hong²

(1. College of Life Science, Zhejiang Chinese Medical university, Hangzhou 310053, china;

2 Research center of Mammary gland, Zhejiang hospital of Traditional Chinese medicine, Hangzhou, 310006)

ABSTRACT **Objective:** To establish and analysis maps of two - dimensional difference gel electrophoresis for proteomic study of hyperplasia of mammary glands. **Methods:** Normal mammary glands and surgically resected hyperplasia of mammary glands constitution were homogenized with lysis solution. The extracts were labeled with Cy3 or Cy5 randomly. Each Cy3 - labeled sample and Cy5 - labeled sample were mixed on the same 2 - D gel along with a Cy2 - labeled mixture of all samples as an internal standard. The gels were respectively imaged by Typhoon 9400 using different emission filter and spot - features were analyzed by DeCyder software in each paired normal/disease comparison. **Result:** 12 unique proteins that were changing in abundance more than 1.4 folder up while 3 proteins decreased more than 1.4 folder down between normal mammary glands and surgically resected hyperplasia of mammary glands constitution. **Conclusions:** using DIGE technology with internal standard, statistically significant quantitative comparisons of each protein abundance change could be made across multiple samples simultaneously without interference due to gel - to - gel variation. And these 15 proteins might be involved in the process of hyperplasia of mammary glands.

Key words: Proteome; hyperplasia of mammary glands; DIGE

乳腺增生病是以乳腺泡、导管的上皮细胞及结缔组织增生为主要病理变化的一类疾病的总称。临床上以乳房疼痛和肿块为特征,并随月经周期和情绪变化而出现变化,属中医“乳癖”范畴^[1]。其发病率在我国呈逐年增长的趋势,高居各种乳腺疾病之首^[2],也是乳腺癌主要危险因素之一。本研究利用凝胶内差异显示电泳(differential in - gel electrophoresis, DIGE)技术,以 4 个乳腺增生病患者手术切除的乳腺增生组织和非增生的乳腺组织作为研究对象,建立双向电泳图谱并进行差异蛋白质组分析,直接从差异表达的蛋白质水平来探讨乳腺增生的发病机理,获得特异性高、敏感性强的疾病标志蛋白,为乳腺增生疾病的防治提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床组织的处理:临床外科手术切下乳腺增生病患者增生部位和非增生部位乳腺组织,用剪刀稍作修剪,迅速用生理盐水冲洗数三次(冲去基质和血渍),滤纸轻轻吸干残余液滴,放入无菌细胞管,迅速置于液氮中保存。

1.1.2 主要的试剂:丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、尿素、硫脲、甘氨酸、TRIS、CHAPS、SDS、碘乙酰胺、固相 pH 干胶条(IPG strip pH3 - 10, NL, 24cm)、Ampholyte pH 3 - 10、2 - D clean up 试剂盒和蛋白质定量试剂盒均为 Amersham 公司产品。硫代硫酸钠(Na₂S₂O₃)、无水乙酸钠为国产分析纯,所有溶液均用 MilliQ 水配制。

1.1.3 主要仪器:Ettan™ IPCphor™ 等电聚焦电泳仪, Ettan™ DALTSix 垂直板电泳仪, Typhoon 9400 多功能荧光扫描成像系统, DeCyder Image Quant™ V5.0 凝胶图像分析软件, 均为

• 基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(Y204329 \ Y205276)

作者简介:卢德赵,男,(1977 -),讲师,博士生,主要研究方向:中西医结合基础

Tel: 057186613626; Email: ludeshao@zj.com, 13588769151

(收稿日期:2006 - 07 - 07 接受日期:2006 - 08 - 30)

Amersham 公司产品。P80MX 超速冷冻离心机为日本日立公司产品,UV8200 分光光度计为 HITACHI 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 乳腺组织蛋白质的提取与纯化:称取 100mg 增生和非增生组织,加入 200μl 组织裂解液(30mmol/L Tris, 8mol/L Urea, 4% CHAPS, pH8.5),用 grinding kit 中小研棒研磨 5min。于 4℃,12 000g 离心 10min,取上清用 2-D clean up kit 去杂质,并用 2-D Quant kit 测定蛋白质浓度,分装成 10μg/μL, - 80℃ 保存。

1.2.2 荧光标记蛋白质:将 CyDye(Cy2、Cy3 和 Cy5)从 - 20℃ 取出,室温放置 10min,加入 25μl 二甲基甲酰胺(DMF),涡旋混匀。12000g 离心 0.5min,取出 2μl 配成 200pmol/μL 的工作液。每样品各取 50μg 蛋白质,调节 pH 至 8.5,分别加入 400pmol 相应的染料,振荡混匀,冰上避光孵育 30min,后加入 1μL 10mmol/L 赖氨酸中止反应。剧烈振荡并冰上避光放置 10min,加入等体积的 2 倍缓冲液(8mol/L 尿素,130mmol/L DTT,4% (W/V) CHAPS,2% (V/V) Pharmalyte 3 - 10),冰浴 10min。

1.2.3 双向凝胶电泳:将分别由 Cy2, Cy3, Cy5 标记的三个样品混合(Table 1),用水化液(8mol/L 尿素,2% CHAPS,13mmol/L DTT,0.5% IPG buffer, 0.002% 溴酚蓝)定溶到 450μL,制成第一向等电聚焦体系,采用胶内泡胀的方法上样。这样,八个样品被加到四条 pH3 - 10 的线性胶条中,每一胶内含分别有 Cy3、Cy5 标记的乳腺增生组织或乳腺正常组织的蛋白质。另外每一胶条中含 Cy2 标记的内标(由所测定的所有样品各取等量混合而成),以此消除胶与胶这间的误差。等电聚焦的参数:30V,12h;500V,1h;1000V,1h;8000V,8h。等电聚焦后,胶条于平衡液 1(1% DTT,50mmol/L Tris,6mol/L 尿素,30%甘油,2% SDS,0.002% 溴酚蓝)、平衡液 2(4% 碘乙酰胺,50mmol/L Tris,6mol/L 尿素,30%甘油,2% SDS,0.002% 溴酚蓝)中各平衡 15min,后转移到第二向已制好的 12.5% SDS - PAGE 胶上,用 0.5% 琼脂糖封顶,进行第二向电泳,二向电泳的参数设定为:20W,45min;60W,8h。直到溴酚蓝染料迁移至胶的底部边缘结

束电泳。

Table 1 2D - DIGE experimental design for biological variation analysis

胶条号	Cy2 标记样品	Cy3 标记样品	Cy5 标记样品
Gel 1	内标	乳腺正常组织	乳腺增生组织
	(internal standard)	(control)	(disease)
Gel 2	内标	乳腺正常组织	乳腺增生组织
	(internal standard)	(control)	(disease)
Gel 3	内标	乳腺增生组织	乳腺正常组织
	(internal standard)	(disease)	(control)
Gel 4	内标	乳腺增生组织	乳腺正常组织
	(internal standard)	(disease)	(control)

1.2.4 荧光标记双向电泳凝胶的图像扫描:荧光标记的蛋白经凝胶电泳后,MilliQ 冲洗数次,用 Typhoon 9400 荧光扫描仪在不同激发光下扫描成像,所使用的滤光片和 PTM 电压如下: Cy2:Blue2(488)/600; Cy3:Green(530)/680; Cy5:Red(633)/590。所得的蛋白质组图谱用 DeCyder Image QuantTM V5.0 图像分析软件进行点识别、背景消除、点匹配及差异蛋白质分析。

2 实验结果

2.1 差异蛋白质分析

双向电泳结束后,每块 SDS - PAGE 胶用 488nm、530nm 和 633nm 3 种波长的激发光进行扫描,获得内标图谱,乳腺正常组织蛋白质组图谱和乳腺增生组织蛋白质组图谱。四块胶扫描所得的蛋白质组图谱用分析软件(DeCyder5.0)进行批量分析,Gel 2 中被检测到的蛋白质点最多有,有 1150 个点;所有胶中平均检测到有 1060 个点,其中相匹配(所有图谱共有的)有 806 个,占匹配蛋白质总数的 76%。不能相匹配的检测点被认为是杂质微粒或者由实验所带来的随机误差。图 1 显示了 Gel 2 中扫描得到的蛋白质组图谱,由 Cy3 标记的乳腺正常组织(control)蛋白质组图谱位于左边,而 Cy5 标记的乳腺增生组织(disease)蛋白质组图谱位于右边。

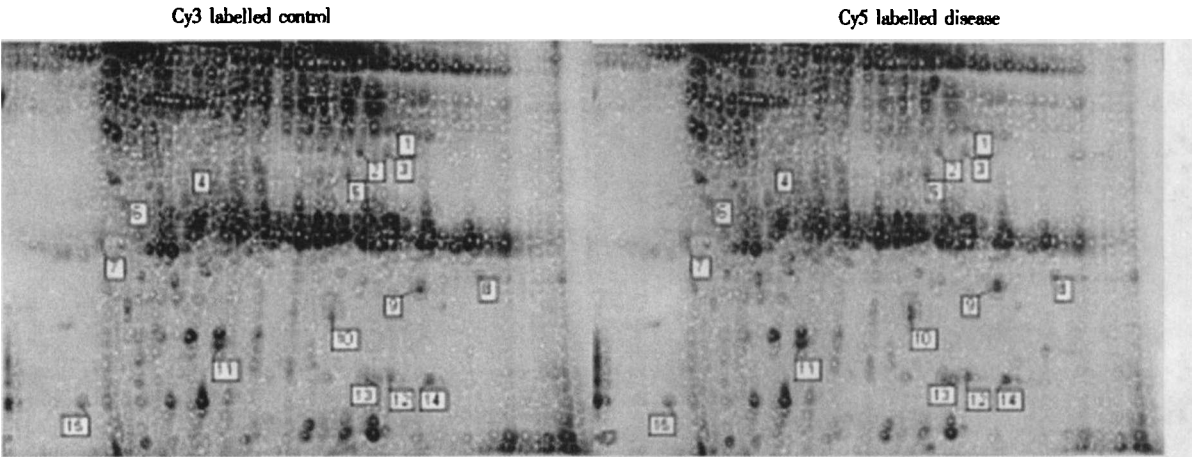


Figure 1 Full image of the master gel

图谱中 3 和 12 号蛋白质点的三维图像见图 2,在 Gel 2 的胶内差异分析中,3 号蛋白质点在乳腺增生病患者乳腺增生组织中表达量下降 1.42 倍,而 12 号蛋白质点在乳腺增生病患者乳腺增生组织中,其表达量提高了 2.16 倍。

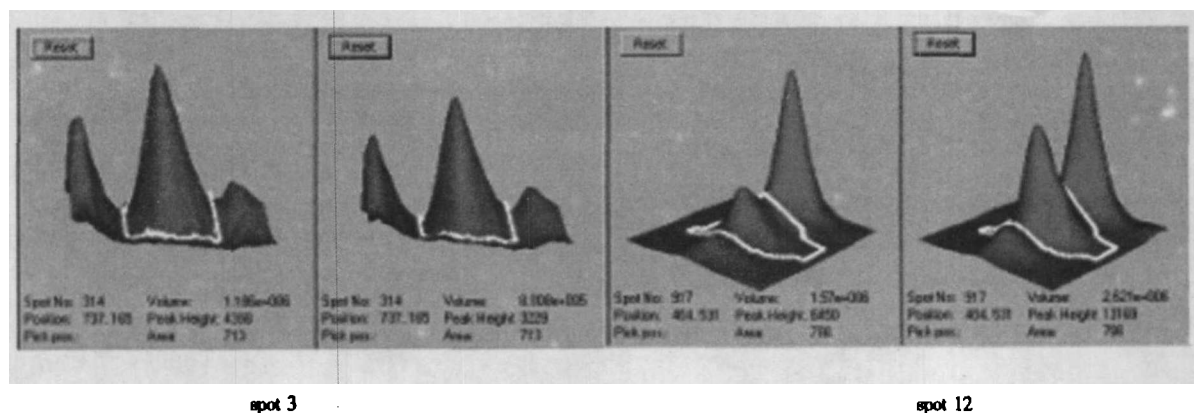


Figure 2 3-D intensity charts of spot

图 3 显示了全部乳腺增生病患者乳腺增生组织和乳腺正常组织中 1 号蛋白质表达量的变化曲线,如果四块胶中蛋白质表达量变化的趋势相一致,则说明该蛋白质表达量的差异是由疾病所引起,而不是样品材料和操作过程所带来的实验误差。

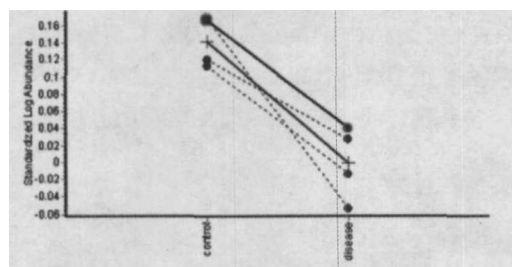


Figure 3 Graph of standard log abundance (y-axis) against the two groups (control and disease) for the spot 1 in the four gels.

通过对 4 块胶,12 张蛋白质组谱中相匹配的 806 个点进行统计学分析有 85 个蛋白质点的体积差异超过 20%,其中有 12 个蛋白质表达量增加了 1.4 倍以上,3 个蛋白质表达量下降超过了 1.4 倍,并在所有的胶中表现出相同的趋势(增加或降低),它们的详细信息列于表 2,其在图谱上的位置见于图 1。这些蛋白质可能与乳腺增生病发病有关。

Table 2 Targeted proteins for hyperplasia of mammary glands

Spot No.	control	disease	Av. Ratio	Spot No.	control	disease	Av. Ratio
1	16.00 ± 1.90		8.67 ± 2.10	9		7.87 ± 2.44	12.46 ± 0.621.58
2	19.15 ± 2.85		10.88 ± 3.31	10		6.56 ± 1.08	12.08 ± 3.85 1.84
3	15.20 ± 2.00		8.86 ± 1.90	11		7.28 ± 0.86	10.54 ± 0.79 1.45
4	3.94 ± 0.46		9.63 ± 0.37	12		3.56 ± 0.13	7.66 ± 0.21 2.16
5	5.06 ± 1.41		8.78 ± 2.18	13		5.82 ± 1.44	10.19 ± 1.61 1.75
6	6.31 ± 0.94		9.62 ± 1.16	14		3.61 ± 0.12	6.72 ± 0.18 1.86
7	8.01 ± 1.16		13.91 ± 3.00	15		6.23 ± 0.87	9.12 ± 1.44 1.46
8	6.50 ± 1.12		10.70 ± 1.21				

3 讨论

双向凝胶电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)的基本原理是蛋白质首先根据其等电点在 pH 梯度胶中等电聚焦,然后按照分子量大小进行 SDS-PAGE 第二次电泳分离。2D 胶中的蛋白质点需要经过染色成像后才能进行进一步的分析应用,银染是目前最常用的 2D 胶染色方法,其灵敏度为 0.5-1.2ng,在窄线性范围内可以半定量。但在电泳条件、操作过程和凝胶染色程度等无法完全一样,用软件来选点,边缘控制、背景过滤和匹配与比较时人为因素较多,其结果稳定性和重复性受到了很大局限^[3]。最近发展的荧光染料标记的双向电泳技术即凝胶内差别电泳技术(differential in-gel electrophoresis, DIGE)极大避免了使用不同凝胶时在操作上的偶然性和不平行性。其主要特点是三色荧光染料(Cy2、Cy3 和 Cy5)

标记的三个样品可以在同一块胶上进行电泳,实验具有较好的重复性,另外 Cy2、Cy3 和 Cy5 染料灵敏度高,可以检测低丰度的蛋白质。其相应的分析软件能自动进行图像处理与分析,消除了人为因素的干扰以增加实验的准确性与重复性^[4,5]。

在本实验中,我们将所有的实验样品等量混合而组成内标,用 Cy2 标记。电泳时与一组 Cy3、Cy5 标记的乳腺正常组织样品和乳腺增生组织样品等量混合,加样于同一胶条中。电泳后胶经荧光扫描后可以获得内标图谱,乳腺正常组织和乳腺增生组织蛋白质组图谱。这方法不但保证每一胶中都有一对乳腺正常组织和乳腺增生组织蛋白质组图谱可以作胶内对比分析,而且 3 种荧光标记的相同蛋白质点在凝胶上表现为一个蛋白质点,所以蛋白质的匹配率高。而且在作胶间生物学差异分析时,图谱中任何蛋白质点先经过内标的校正(即样

品中的蛋白质点的值等于该点的测定值与同一块胶的内标中所有蛋白质测定总值的比值),再进行相互比较。因此,可以消除胶与胶之间的差异和部分实验误差,提高统计的可信度。

乳腺增生病以乳房疼痛、肿块为主症,有时可伴有乳头溢液,中医古代文献与“乳癖”的描述相符合。现代医学认为乳腺是多种激素的靶器官,正常乳房的生长、发育和分泌都受大脑皮层和丘脑下部的调节,多种内分泌激素发挥重要的作用,尤以垂体-性腺激素对乳腺的影响最大^[6]。但影响病理的因素很多,其机理也相当复杂,一些确切的发病机制尚不十分清楚。有研究表明,乳腺增生病患者黄体期雌二醇(E2)水平显著高于正常妇女,而孕酮(P)水平偏低,黄体期P与E2的比率(PEL)明显低于正常妇女,存在着黄体功能不足的特征^[7]。席玉洁的研究表明,乳腺增生病与黄体期的催乳素(PRL)增高密切相关,同时下丘脑-垂体-卵巢轴的综合调控功能失常也是原因之一^[8]。楼丽华等人进一步对乳腺增生病中医证型与排卵期E2、PT、TT、PRL、FSH和LH的关系进行分析研究,由此探索现代医学的诊断技术与中医证型的关系,应用于中药的疗效评判及临床指导用药^[9]。

但乳腺增生病病程长、易复发,现有资料多缺乏对乳腺增生病系统的研究。特别是在重度乳腺增生、非典型乳腺增生等癌前病变阶段,能否在基因和蛋白质水平上体现疾病的诊断和治疗的客观化是探索的新方向,从而提供新的客观化的乳腺增生病及病变程度在检测指标,并为乳腺增生疾病的防治提供理论基础。蔡学敏等探讨原癌基因c-erbB-2基因在乳腺癌发生早期的作用,表明c-erbB-2基因扩增发生于不典型增生阶段,在增生病向乳腺癌进展中起重要作用,可作为预测乳腺癌的辅助分子标记物^[10]。杨举伦等人研究表明不典型增生中存在P53基因第6外显子突变,该突变可能在乳腺不典型增生发展到乳腺癌过程中起重要作用,可作为早期诊断乳腺癌的辅助指标^[11]。但未见有从基因组或从蛋白质角度研究乳腺增生病物质基础的文献。

在本实验中,我们通过凝胶内差异显示电泳(DIGE)建立了乳腺增生组织与相应乳腺正常组织蛋白质组图谱,并进行差异蛋白质组分析。结果发现在所获得的蛋白质组图谱中,最多可检测到的1150个蛋白质点,平均有1060个点,其中所有图谱共有的相匹配的点有806个,匹配率为76%。通过对4

块胶12张蛋白质组图谱中相匹配的806个点进行统计学分析,在乳腺增生组织中有15个蛋白表达量发生了显著的变化,其中12个蛋白质表达量增加了1.4倍以上,3个蛋白质表达量下降超过了1.4倍。这些蛋白质可能与乳腺增生病发生与发展有关。我们下一步将对这些蛋白进行质谱鉴定,获得其肽指纹图谱,经数据库获得此蛋白质的序列,结构和功能信息,并从中筛选新的具有诊断潜能的生物分子靶标,同时加深对乳腺增生病病变机理的了解,这将有助于乳腺病的诊断与治疗,为新药的开发和利用提供了理论依据。

参考文献

- [1] 杨素清.乳腺增生病的研究进展[J].中医药信息,2004,21(4):23-24
- [2] 林毅,唐汉钧.现代中医乳房病学[M].北京:人民卫生出版社,2003,107-109
- [3] Vihinen M. Bioinformatics in proteomics[J]. Biomol Engineering, 2001,18:241-248
- [4] Karp N A, Kreil D P, Lilley K S. Determining a significant change in protein expression with DeCyder™ during a pair-wise comparison using two-dimensional difference gel electrophoresis[J]. Proteomics, 2004,4:1421-1432
- [5] Alban A, David S O, Bjordesten L. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: Two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard[J]. Proteomics, 2003,3:36-44
- [6] Plate K H, Breier G, Risau W. Molecular mechanisms of development and angiogenesis[J]. Brain Pathol, 1994,4:20-26
- [7] 李琳,宋爱莉.肝郁脾虚证与乳腺增生病的相关性探讨[J].山东中医杂志,2000,19(1):6-7
- [8] 席玉洁.疏肝消核方治疗乳腺增生症43例临床观察[J].新中医,1990,12(8):36-38
- [9] 楼丽华,沃兴德,陈英,等.乳腺纤维囊性病性激素周期节律的变化[J].中华内分泌代谢杂志,1996,12(4):25-29
- [10] 蔡学敏,杨举伦,普苹,等.乳腺增生病与乳腺癌p185蛋白表达及c-erbB-2基因扩增[J].中国体视学与图像分析,2001,6(3):145-148
- [11] 杨举伦,蔡学敏,普苹,等.乳腺增生病P53基因第6外显子突变检测[J].西南国防医药,2002,12(3):207-210

·本刊最新信息·

根据2006年版《中国科技期刊引证报告》,本刊影响因子0.910。

2006年10月27日,国家科技部信息所在北京国际会议中心发布了2005年中国科技论文统计结果。

根据《2006年版中国科技期刊引证报告》(核心版),本刊(生物医学)影响因子0.910,在本学科(生物学)排名列第7位,在1652种统计源核心期刊总排名列第119位。

刊名变更是本刊的自然过渡,已经国家新闻出版总署新出报刊[2006]4号文批准。