

文章编号: 1005-8982(2015)23-0046-06

·临床论著·

利用基质辅助激光解析电离飞行时间串联质谱 分析胆囊结石中非黏性蛋白的组成*

殷和平¹, 曾骥孟², 胡鹏², 李志明², 潘耀振³, 孙诚谊³

(1. 贵阳医学院, 贵州 贵阳 550004; 2. 厦门大学 药学院, 福建 厦门 361000;

3. 贵阳医学院附属医院 肝胆外科, 贵州 贵阳 550004)

摘要:目的 探讨胆固醇结石和胆色素结石中是否存在非黏性蛋白并鉴定蛋白质的组成。方法 选取 30 例行保胆取石术患者的胆囊结石, 男性 11 例, 女性 19 例。采用肉眼观察并结合三酰甘油检测试剂盒(GPO-PAP)测定胆固醇含量的方法对胆结石进行分类, 分为 20 例胆固醇型和 10 例胆色素型。应用组织裂解法(RIPA)提取胆囊结石蛋白, 并用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)与基质辅助激光解析电离飞行时间串联质谱(MALDI-TOF-TOF)分析相结合的方法对该蛋白进行鉴定分析。通过 DAVID 工具对上述基因进行基因本体(GO)功能富集分析本图及京都基因、基因组百科全书(KEGG)信号转导通路富集分析。结果 胆固醇结石和胆色素结石中出现特异性蛋白, 经质谱鉴定为转铁蛋白前体蛋白(TRFE)、白蛋白(ALB)、抗胰蛋白酶 1(SERPINA1)、免疫球蛋白 γ -1(IGHG1)、 α 血红蛋白(HBA1)、 β 血红蛋白(HBB), 其中 IGHG1 不存在于胆色素结石中。结论 TRFE、ALB、SERPINA1、HBA1、HBB 等蛋白共同存在于胆固醇和胆色素结石中, 而 IGHG1 只存在于胆固醇结石中, 可见 IGHG1 蛋白或其对应基因是参与不同胆结石类型成因的重要元素及生物标志物。KEGG 分析结果表明, SERPINA1 参与补体和凝血级联反应。鉴定和分析胆囊结石中非黏性蛋白的成分及利用资料库的模拟对阐明胆结石的发病机制有重要的意义。

关键词: 胆囊结石; 非黏性蛋白; 基质辅助激光解析电离飞行时间串联质谱

中国分类号: R575.62

文献标识码: A

Analysis of non-mucin protein in human gallstones by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry*

He-ping YIN¹, Ji-meng ZENG², Peng HU², Zhi-ming LI²,Yao-zhen PAN³, Cheng-yi SUN³

(1. Guiyang Medical College, Guiyang, Guizhou 550004, P.R. China; 2. School of

Pharmaceutical Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361000, P.R. China;

3. Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital, Guiyang

Medical College, Guiyang, Guizhou 550004, P.R. China)

Abstract: **[Objective]** To examine the presence of non-mucin proteins in the cholesterol calculi and pigment gallstones, and to further identify the type of proteins. **[Methods]** Gallstones were obtained from 30 patients at endoscopic minimally invasive cholecystolithotomy, including 11 males and 19 females. The classification of gallstones was applied by visual observation and measurement of concentration of cholesterol through GPO-PAP method. There were 20 cases of cholesterol gallstones and 10 cases of pigment gallstones. The proteins in gallstones were extracted by RIPA, separated by SDS-PAGE and deciphered by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF-TOF) mass spectrometry. DAVID was used to analyze the GO (gene ontology) function annotation and the KEGG signal pathway of the targeted genes. **[Results]**

收稿日期: 2015-03-17

* 基金项目: 贵州省省长基金临床应用课题专项研究项目[No. 黔省专合字(2012)94 号]; 国家国际科技合作项目(No. 2014DFA31420)

[通信作者] 孙诚谊, E-mail: chengyisun@medmail.com.cn; Tel: 0851-6771326

· 46 ·

Non-mucin proteins, transferrin (TRFE) precursor protein, ALB, SERPINA1, HBA1 and HBB were found and identified in cholesterol stones and pigment stones; while IGHG1 was only observed in cholesterol stones. **【Conclusions】** The six proteins have been first figured out to exist in human gallstones. Interestingly, IGHG1 and its associated genes, solely present in cholesterol gallstones may play a novel role in the classification and/or development of gallstone as a biomarker. In KEGG pathway, SERPINA1 is involved in pathway of complement and coagulation cascades. It is important to further study the origin and the functions of these non-mucin proteins for understanding the pathogenesis of gallstones.

Key words: gallstone; non-mucin protein; matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry

胆石症是一种常见的消化系统疾病,欧美成年人的发病率为 10%~15%^[1-4],中国人群发病率为 3%~11%^[5]。随着中国居民生活水平的提高,胆石症的发病率也呈逐年升高的趋势^[6]。国内外有学者采用各种不同的仪器和方法,对胆囊结石的成分进行研究^[7-12],大量的实验证明胆囊结石中含有胆固醇、胆色素、蛋白或多肽及一些金属矿物质等。早期,LEE 等^[13-14]发现在胆汁和胆固醇结石中存在黏蛋白,且胆囊分泌大量黏蛋白,可能是固醇结晶成核化的原因及胆固醇型结石形成的早期特征。近年来,蛋白在胆汁中作为重要的促成核因子已得到广泛的研究,而随后 MURRAY 等^[15]研究表明,胆固醇型结石除含有黏蛋白外,还含有大量的小分子非黏蛋白,其中最大的蛋白可能是白蛋白(albumin, ALB),并推测非黏蛋白有可能参与胆固醇结石的形成,但对胆结石中非黏蛋白的成分并未研究清楚。至今,国内外依然没有人能够阐明胆固醇和胆色素结石中非黏蛋白的信息。因此,本研究采用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)与基质辅助激光解析电离飞行时间串联质谱(MALDI-TOF-TOF)相结合的方法,对胆囊结石中存在的蛋白进行鉴定分析并阐述其具体信息,以期为后续研究蛋白在结石形成中可能发挥的重要作用奠定基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选自 2013 年 5 月-2014 年 2 月因胆囊结石在贵阳医学院附属医院行保胆取石术患者 30 例,选取其肉眼观典型的结石样本,其中胆固醇结石 20 例,胆色素结石 10 例(见图 1)。所有患者签署知情同意书。应用三酰甘油检测试剂盒(GPO-PAP)测定胆固醇含量,对选取的胆囊结石样本进行鉴定。胆固醇含量 $\geq 70\%$ 为胆固醇型结石,胆固醇含量 $\leq 30\%$ 为胆色素型结石^[16]。胆囊结石取出后均立即用 4℃ PBS 水冲洗,37℃干燥 6 h 后,置于 -80℃冰箱冷冻备用。

1.2 试剂

总胆固醇(total cholesterol, T-CHO)试剂盒购自南京建成生物工程研究所,BCA 蛋白定量分析试剂盒购自美国 Thermo 公司,氯仿、甲醇、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、三羟甲基氨基甲烷、甘氨酸、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、组织裂解液(radio-immunoprecipitation assay, RIPA)、考马斯亮蓝 R-250、硝酸银、冰醋酸、乙醇、氨水、醋酸钠、戊二醛、硫代硫酸钠、碳酸钠、乙二胺四乙酸二钠购自上海生工生物工程有限公司

1.3 仪器

Victor 3V 多功能酶标仪、4800 Plus MALDI TOF/TOF™ Analyzer 购自美国 ABI 公司,电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司,电热恒温水浴箱、水平脱色摇床购自厦门合力信仪器仪表有限公司,PowerPac 系列 Bio-Rad 电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司,Mini Pro-tean 3 Cell 小型垂直电泳槽购自美国 Bio-Rad 公司,Geno Sens 1860 凝胶成像系统购自上海勤翔科学仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 胆囊结石的胆固醇提取 切取部分胆结石放入预冷的研钵中磨成粉末,每个样本精确称取 10 mg,盛于 15 ml 离心管中,加入氯仿、甲醇混合液(体积比 2:1)14 ml,充分振摇 1~2 min 后,避光常温室内存放 20 min,再振摇 1~2 min 后,6 000 r/min 离心 10 min,取上清液,按照 T-CHO 试剂盒说明书,采用单试剂 GPO-PAP 法测定胆固醇含量。

1.3.2 RIPA 法提取胆囊结石蛋白 每份取等量的胆固醇结石和胆色素充分混合后,分别称取 100 mg 的胆固醇和胆色素结石粉末转入 1.5 ml 离心管。每管分别加入 400 μ l 组织裂解液(radio-immunoprecipitation assay, RIPA),4℃冰箱孵育 1 h,12 000 g,4℃离心 30 min,上清液即为提取的蛋白,转上清液于新管中置于 -80℃冰箱冷冻保存。按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书进行操作,测定蛋白浓度。

1.3.3 SDS-PAGE 电泳分离蛋白 将胆固醇和胆色素结石蛋白,加入 6×loading buffer,95℃,5 min。两种结石分别取 600、300、120 和 100 ng,上样。采用 5%的聚丙烯酰胺浓缩胶和 15%的聚丙烯酰胺分离胶进行电泳,分离蛋白。

1.3.4 蛋白质考马斯染色和银染并质谱鉴定 考马斯染色:采用考马斯亮蓝 R-250 染色液染色 15 min 后再用考马斯脱色液脱色 4 次,每次 10 min,最后一次脱色过夜。蛋白质银染:把胶片置于无菌的盘中,25 ml 固定液固定 30 min,25 ml 左右增敏液孵育 30 min,去离子水洗脱 3 次,每次 10 min,硝酸银染色液 25 ml 染色 40 min,25 ml 的显影液显影 15 min,25 ml 左右的终止液终止 10 min,去离子水洗 3 次,每次 5 min,采用 Geno Sens 1860 凝胶成像系统成像(见图 3)。将染色后清晰出现的蛋白质条带切割下来,进行胶内酶解提取肽段,并采用 MALDI-TOF-TOF 对样品条带进行分析,激光源为 355 nm 波长的 Nd:YAG 激光器,加速电压为 2 kV,采用正离子模式和自动获取数据模式采集数据,PMF 质量扫描范围 800~4 000 Da,选择信噪比 >50 的母离子进行二级质谱(MS/MS)分析,每个样品点上选择 8 个母离子,二级 MS/MS 激光激发 2 500 次,碰撞能量 2 kV,CID 关闭。

1.3.5 生物信息学分析 采用在线数据分析软件 Mascot 数据库(<http://www.matrixscience.com>)进行二级质谱离子(MS/MS Ions Search)检索分析对应的蛋白质信息,Mascot 数据库打分算法是分子量检索(molecular weight search,MOWSE)算法的改进,基于非冗余蛋白质数据库中肽分布频率及可能性对所得数据进行综合打分。所用检索条件见表 1,最终得出的蛋白质进一步进行基因本体(gene ontology,GO)、京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclope-

表 1 Mascot 数据库检索条件

搜索类型	串联质谱检索
酶	胰蛋白酶
固定修饰	半胱氨酸碘乙酰胺化
可变修饰	N-乙酰化,去酰胺基化,双氧化,甲硫氨酸氧化(M)
质量	单一同位素质量
蛋白质量	无限制
母离子质量容差	± 100 ppm
碎片离子质量容差	± 0.5 Da
允许最大未被酶切位点数	1
仪器型号	MALDI-TOF-TOF

dia of genes and genomes,KEGG)分析。

2 结果

2.1 胆囊结石类型

应用 GPO-PAP 法测定肉眼选取的 30 例胆囊结石的胆固醇含量,其中胆固醇结石 20 例(66.7%),胆色素结石 10 例(33.3%)。见图 1 和表 2。



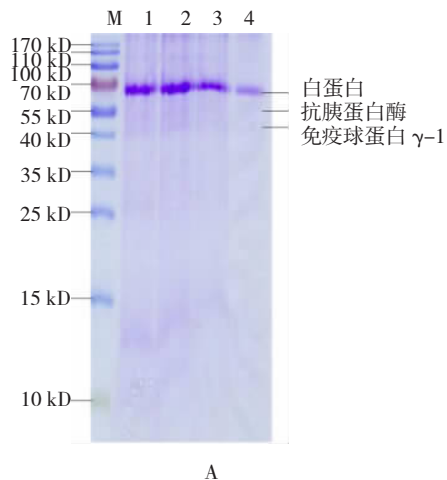
A 胆色素结石 B 胆固醇结石
图 1 典型的色素型结石及胆固醇型结石

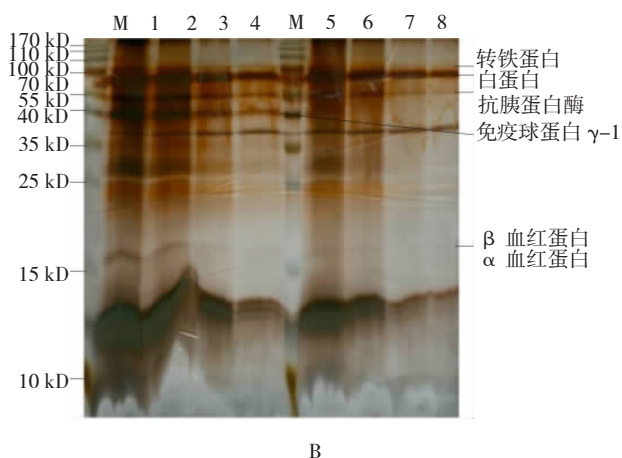
表 2 结石类型与胆固醇含量

结石类型	性别	例数	胆固醇含量/(%, $\bar{x} \pm s$)
胆固醇结石	男	4	82.3 ± 11.5
	女	16	80.6 ± 10.3
胆色素结石	男	7	15.4 ± 4.3
	女	3	16.2 ± 3.7

2.2 胆固醇和胆色素结石中的蛋白质

对比两种凝胶染色方法发现,两种染色的蛋白谱大体类似,银染灵敏度较高,能显示更多的条带,两种类型结石中所含蛋白大小基本相同,含量最大的蛋白都出现于 70 kD 左右,所不同的是固醇型结石 40 kD 出现明显蛋白条带,而色素型结石却不存在。其余蛋白条带分别出现在 55、35、25 和 15 kD 附近。





A: 考马斯染色(M:Marker;1~4:胆囊结石上样蛋白);B:银染, (M:Marker;1~4:胆固醇结石上样蛋白;5~8:胆色素结石上样蛋白)

图 2 SDS-PAGE 考马斯染色、银染分析及取样来源

见图 2。

2.3 质谱鉴定及生物信息学分析

SDS-PAGE 胶上蛋白条带经过质谱鉴定得到优质的肽段质量指纹图谱, 以 70 kD 为例 (见图 3A), 对 70 kD 条带中肽段 RHPDYSVLLLR (分子量 1 467.833 1) 进行二级质谱分析 (见图 3B), 结果 y 离子全序列匹配, 得到较高分数鉴定结果。将所得肽段分子量数据导入 Mascot 数据库进行分析, 并根据 SDS-PAGE 胶上蛋白条带所显示的分子量最终分析这些蛋白结果 (见表 3)。SDS-PAGE 胶上蛋白

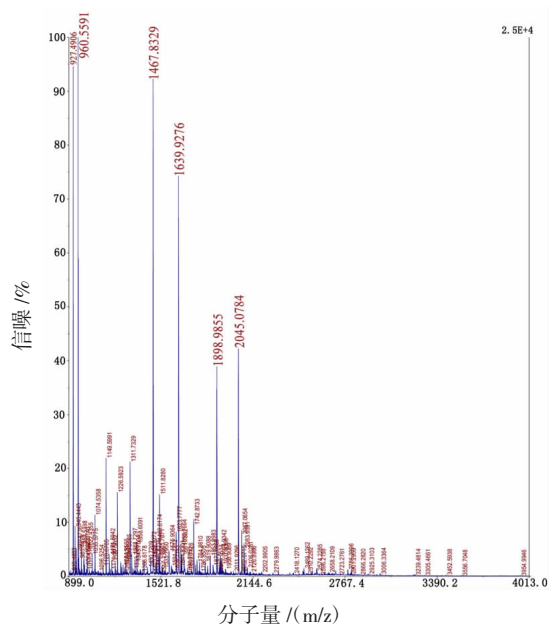
条带所对应的蛋白分别为转铁蛋白前体蛋白 (sero transferrin precursor, TRFE)、白蛋白 (albumin, ALB)、抗胰蛋白酶 1 (alpha-1-antitrypsin, SERPINA1)、免疫球蛋白 γ -1 (ig gamma-1 chain C region, IGHG1)、 α 血红蛋白 (hemoglobin subunit alpha, HBA1) 和 β 血红蛋白 (hemoglobin subunit β , HBB)。一般认为当搜索结果匹配分数 (score) ≥ 55 分时, 待测蛋白质的氨基酸序列与数据库中某种已知蛋白质的氨基酸序列覆盖率较高, 认为匹配的可能性很大, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)^[17]。结果中除 TRFE 外其余匹配分数 > 55 分。

2.4 生物信息学分析

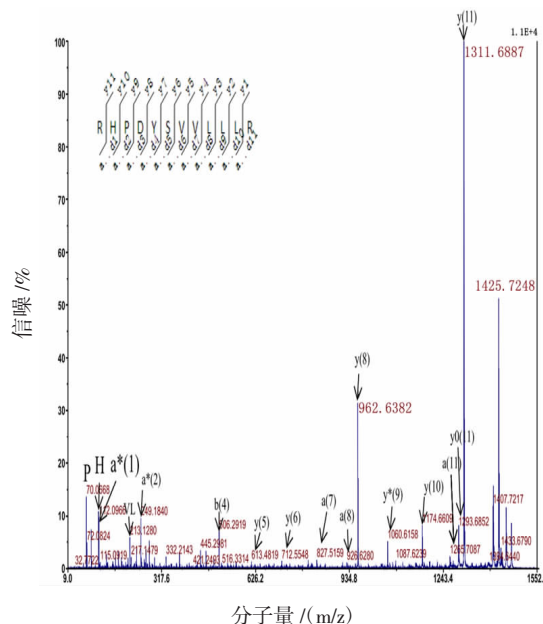
用 DAVID 数据库 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) 对质谱鉴定的基因进行 GO 注释描述和分类, 使用 KEGG 公共数据库 (<http://www.genome.jp/>) 对这些基

表 3 非黏性蛋白 MALDI-TOF-TOF 质谱鉴定结果

基因 ID	蛋白名称	分子量大小 /kD	基因位置	得分	匹配肽段	种属
3 500	IGHG1	36.10	14q32.33	57	1	人类
5 265	SERPINA1	46.73	14q32.1	197	3	人类
7 018	TRFE	77.06	3q22.1	39	1	人类
3 039	HBA1	15.25	16p13.3	186	2	人类
3 043	HBB	15.99	11p15.5	411	8	人类
213	ALB	69.36	4q13.3	585	17	人类



A



B

A: 70 kD 蛋白条带一级肽段指纹图谱; B: 肽段 1 467.833 1 的二级肽段指纹图谱

图 3 利用 MALDI-TOF/TOF 分析由胶内提取蛋白条带的肽段指纹

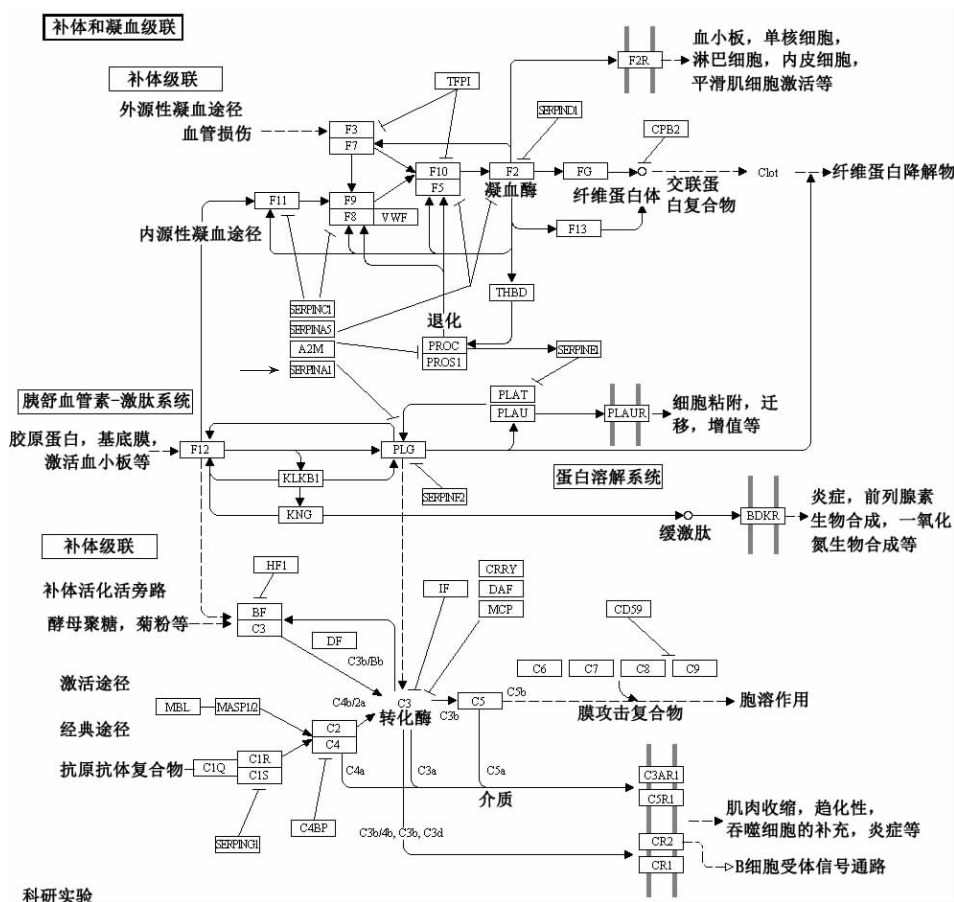


图 4 SERPINA1 在补体和凝血级联反应中的作用

因进行 GO 和 KEGG 信号通路富集分析。GO 分析得知这些蛋白免疫先关蛋白,抑制酶类蛋白。KEGG 表明, SERPINA1 参与补体和凝血级联反应,其不仅是一种代谢酶类抑制剂,同时还参与先天免疫的调控(见图 4)。

3 讨论

人体胆结石的主要成分为黏蛋白、胆固醇、胆色素、钙离子。胆石症常可引起严重的并发症,因此,必须从根本上研究胆石症的成石原因,为预防和治疗胆石症提供理论基础,而对胆结石的形态、结构、成分、含量等进行确切的分析是认识胆结石形成的重要基础。目前,研究表明某些蛋白通过调控胆固醇代谢在胆结石的形成中发挥重要作用。但最近胆结石发病机制的研究一直局限于胆汁和胆囊组织及黏膜中蛋白的研究,这些蛋白可能仅仅只是胆结石在胆囊内形成后的一种的反应,并不能准确地反映胆结石形成的机制。更令人感兴趣的是,这些蛋白是否存在于结石本身呢,这些蛋白到底是什么蛋白,

其在胆囊结石的形成中扮演什么样的角色,是促进胆囊结石的形成还是抑制形成?这些都是未知的。早期 LEE 等^[13-14]研究证明,胆结石中存在蛋白质,同时推测这些蛋白质可能反映胆结石在胆囊内形成时胆囊胆汁的理化状态,但并没有给出这些蛋白的具体信息。因此,鉴定这些蛋白质会使人们更加深入地理解胆囊结石形成的发病机制。

MURRAY 等^[15]利用高效液相色谱法证明胆固醇结石中不仅有黏蛋白,而且还含有非黏蛋白,其主要成分可能是人血清 ALB。但是常见的胆色素结石并没有纳入研究中,而且这种方法存在着一定的局限性,其只能根据标准品分子量大小来推测可能的蛋白质。目前,质谱 MALDI-TOF/TOF 技术以其操作简便、分析速度快、敏感度高及丰富的数据库资源等优点成为蛋白质组学研究中强有力的工具之一。其依靠蛋白质分子量和氨基酸与蛋白质的匹配率来精确鉴定蛋白质。对于串联质谱检索,蛋白得分并不是严格意义的统计学结果,只是对蛋白质匹配排序的依据。当得分 <55 分时,匹配的可能性较小,此

时有 3 种可能:①可能是该蛋白类似物;②与该蛋白 cDNA 同源,但为不成熟蛋白;③可能是某种新的未知蛋白或不成熟蛋白。虽然 TRFE 得分仅 39 分,但是 TRFE 为血清 TRFE,其在核糖体内尚未装配和修饰完善,属不成熟蛋白,因此并不表示胆结石中不存在该蛋白,需要进一步验证。与 MURRAY 不同的是,实验发现人血清 ALB 不但存在于胆固醇结石中,而且存在于胆色素结石,与此同时,笔者还发现 IGHG1、SERPINA1、TRFE、HBA1、HBB 等蛋白同样存在于两种胆囊结石中。人血清 ALB 中钙离子、脂肪酸、胆红素等有良好的结合能力,其大量存在很可能与胆结石组成有重要联系^[15]。另外,KEUL-EMANS 等^[18]发现,人血清 ALB、免疫球蛋白、氨肽酶 N 和黏蛋白在 36% 的胆固醇结石患者的胆汁标本中升高,并认为局部炎症导致黏蛋白、免疫球蛋白的产生,再通过疏水性作用俘获 ALB。KEGG 是基因组破译方面的数据库,后基因时代一个重大挑战是如何通过计算机完整地表达和演绎细胞和有机体,利用基因信息对更高层次和更复杂的细胞活动和生物体行为做出推测,建立一个网络推测工具。其可以对蛋白质交互网络在各种细胞活动中起的作用做出预测,通过 GO 分析可知 IGHG1、HBB 是免疫相关蛋白,而胆结石形成又与炎症互为因果,因此这两种蛋白很可能通过参与炎症反应调控胆结石的形成与发展。另外 SDS-PAGE 银染结果显示,固醇型结石比色素型结石多出一条蛋白条带,经鉴定该蛋白是 IGHG1,表明固醇型结石很可能与炎症反应有关。可见 IGHG1 蛋白或其对应基因是参与不同胆结石类型成因的重要元素及生物标志物。深入研究该蛋白将对胆结石的预防和治疗带来极大的帮助。SERPINA1 和胆固醇脂质有关,且是代谢酶类的抑制分子,那么其很可能以某种机制通过调节胆固醇代谢参与胆结石的形成。

总之,胆囊结石的成因是多因素且复杂的,进一步在胆囊组织或者胆汁中研究这些蛋白的起源及其在胆结石形成中的作用,可能为胆结石形成的发病机制提供新线索。本研究为进一步实验提供技术和理论支持。

参 考 文 献:

[1] CHEN LY, QIAO QH, ZHANG SC, et al. Metabolic syndrome and gallstone disease[J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(31):

4215-4220.

- [2] SANDLER RS, EVERHART JE, DONOWITZ M, et al. The burden of selected digestive diseases in the united states[J]. *Gastroenterology*, 2002, 122(5): 1500-1511.
- [3] WANG DQ, AFDHAL NH. Genetic analysis of cholesterol gallstone formation: searching for lith (gallstone) genes[J]. *Curr Gastroenterol Rep*, 2004, 6(2): 140-150.
- [4] PORTINCASA P, MOSCHETTA A, PALASCIANO G. Cholesterol gallstone disease[J]. *Lancet*, 2006, 368(9531): 230-239.
- [5] QIAO T, MA RH, LUO XB, et al. The systematic classification of gallbladder stones[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e74887.
- [6] HOU L, SHU XO, GAO YT, et al. Anthropometric measurements, physical activity, and the risk of symptomatic gallstone disease in Chinese women[J]. *Ann Epidemiol*, 2009, 19(5): 344-350.
- [7] 罗振亮, 乔铁, 马瑞红, 等. 38 例泥巴样胆结石红外光谱分析报告[J]. *中国现代医学杂志*, 2015, 25(3): 36-40.
- [8] 曹密, 陈逸珺, 戴乐美. 人体胆结石成分及无机元素的分析探讨[J]. *光谱实验室*, 2006, 23(6): 1278-1281.
- [9] 吴自强, 曹建华, 吴可夫, 等. 宁夏地区胆结石成分分析[J]. *现代预防医学*, 2007, 34(3): 487-489.
- [10] HUSSAIN SM, AL-JASHAMY K. Determination of chemical composition of gallbladder stones and their association with induction of cholangiocarcinoma[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14(11): 6257-6260.
- [11] RAZMAKHININ EV, KHYSHIKTUEV BS, KICHIGINA VA, et al. The atomic emission analysis under examination of composition of gallstones[J]. *Klin Lab Diagn*, 2014, 4: 11-13.
- [12] SHARMA R, SOY S, KUMAR C, et al. Analysis of gallstone composition and structure in Jharkhand region[J]. *Indian J Gastroenterol*, 2015, 34(1):29-37.
- [13] LEE SP. Hypersecretion of mucus glycoprotein by the gallbladder epithelium in experimental cholelithiasis[J]. *J Pathol*, 1981, 134(3): 199-207.
- [14] LEE SP, LAMONT JT, CAREY MC. Role of gallbladder mucus hypersecretion in the evolution of cholesterol gallstones[J]. *J Clin Invest*, 1981, 67(6): 1712-1723.
- [15] MURRAY FE, SMITH BF. Non-mucin proteins in the matrix of human cholesterol gallstones[J]. *Scand J Gastroenterol*, 1991, 26(7): 717-723.
- [16] 苏文博, 董晨光, 王世明. 胆结石分类研究的新进展[J]. *中国当代医药*, 2015, 10: 18-20.
- [17] PERKINS DN, PAPPIN DJC, CREASY D, et al. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data[J]. *Electrophoresis*, 1999, 20(18): 3551-3567.
- [18] KEULEMANS YC, HO-MOK KS, WIT LTD, et al. Hepatic bile versus gallbladder bile: a comparison of protein and lipid concentration and composition in cholesterol gallstone patients[J]. *Hepatology*, 1998, 28(1): 11-16.

(申海菊 编辑)