

## · 2 型糖尿病的外科治疗 ·

# 腹腔镜胃肠手术治疗 2 型糖尿病的血清蛋白质组学初步研究

丁丹 陈丹磊 胡旭光 印慨 柯重伟 郑成竹

**【摘要】** 目的 探讨腹腔镜胃肠手术前后 2 型糖尿病患者血清蛋白质表达的差异。方法 收集 2008 年 6 月至 2010 年 9 月第二军医大学附属长海医院行腹腔镜胃肠手术治疗的 12 例 2 型糖尿病患者的血清标本,双向凝胶电泳分离 2 型糖尿病患者术前、术后 1 周及术后 1 个月的血清总蛋白,对手术前后差异表达明显的蛋白点进行质谱鉴定及生物信息学分析。结果 建立了稳定、重复性好的血清凝胶蛋白图谱。筛选出 2 型糖尿病患者胃肠手术前后血清中差异表达明显的 20 个蛋白点,并成功鉴定出 8 个蛋白点,其中术后表达增高的有 5 个,分别是 Rho GDP-dissociation inhibitor 1、Prohibitin、Alpha-1-antitrypsin precursor、Serotransferrin precursor 和 Fibrinogen gamma chain precursor;术后表达降低的有 3 个,分别是 MAP3K12-binding inhibitory protein 1、Coronin-1A 和 Isovaleryl-CoA dehydrogenase。结论 2 型糖尿病患者行腹腔镜胃肠手术后的血清蛋白质与术前比较,存在着明显的差异。共成功鉴定出 8 个蛋白点。

**【关键词】** 糖尿病, 2 型; 胃肠手术; 腹腔镜检查; 蛋白质组学; 双向凝胶电泳

**Serum proteomic analysis after laparoscopic gastrointestinal surgery for the treatment of type 2 diabetes mellitus** DING Dan, CHEN Dan-lei, HU Xu-guang, YIN Kai, KE Chong-wei, ZHENG Cheng-zhu. Department of Minimally Invasive Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China Corresponding author: ZHENG Cheng-zhu, Email: fredzhengzz@hotmail.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the impact of laparoscopic gastrointestinal surgery on serum protein expression in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM). **Methods** Twelve patients with T2DM received gastrointestinal surgery at Changhai Hospital of the Second Medical University from June 2008 to September 2010. Their serum samples were collected at different time points (before surgery, 1 week and 1 month after surgery). Total proteins were separated by two-dimensional (2D) gel electrophoresis. The differentially expressed proteins were analyzed by mass spectrometry and bioinformatics. **Results** Protein extracts of the serum samples were separated on 2D gels successfully. Twenty differentially expressed proteins in the serum after surgery were screened out. Eight proteins were successfully identified, in which the expression of 5 proteins (Rho GDP-dissociation inhibitor 1, Prohibitin, Alpha-1-antitrypsin precursor, Serotransferrin precursor and Fibrinogen gamma chain precursor) was increased after operation, and the expression of 3 proteins (MAP3K12-binding inhibitory protein 1, Coronin-1A and Isovaleryl-CoA dehydrogenase) was decreased. **Conclusions** The expression of 20 proteins have been changed significantly in serum samples after laparoscopic gastrointestinal surgery in patients with T2DM, and 8 proteins were successfully identified.

**【Key words】** Diabetes mellitus, type 2; Gastrointestinal surgery; Laparoscopy; Proteome; Two-dimensional gel electrophoresis

糖尿病已经成为严重威胁人类健康甚至生命的慢性疾病之一。有研究结果显示,胃肠手术能有效减轻糖尿病患者的体质量,改善大部分患者的血糖代谢紊乱,而且对体质量正常的糖尿病患者也有很好的疗效<sup>[1-2]</sup>。本研究收集 2008 年 6 月至 2010 年 9 月在我科成功行腹腔镜胃肠手术治疗的 12 例 2 型糖尿病患者的血清标本,运用双向凝胶电泳和基质

辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)技术,分离并鉴定 2 型糖尿病患者术前、术后 1 周及术后 1 个月血清标本中的蛋白点,旨在探讨腹腔镜胃肠手术前后 2 型糖尿病患者血清蛋白质表达的差异。

## 1 材料与方法

### 1.1 血清标本

收集我科行腹腔镜胃肠手术且治疗有效的 12 例 2 型糖尿病患者术前、术后 1 周及术后 1 个月的血清标本。其中男 9 例,女 3 例;年龄 26 ~ 64 岁,平均

年龄 41.3 岁。体质指数为 26.7 ~ 36.5 kg/m<sup>2</sup>, 平均 33.7 kg/m<sup>2</sup>。行腹腔镜下“Y”型胃肠短路术 3 例, 行腹腔镜下改良简易型胃肠短路术 9 例。所有患者的术前准备、术中操作及术后处理等按标准进行<sup>[3]</sup>。

## 1.2 主要试剂及仪器

ProteoExtract™ 白蛋白/免疫球蛋白 G 去除试剂盒和 ProteoExtract™ 蛋白沉淀试剂盒均购自 MERCK 公司。IPGphor 等电聚焦仪、Ettan DALT II 垂直平板电泳系统、ImageMaster™ 2D Platinum 软件、Imagescanner 扫描仪等均为 Amersham Biosciences 公司产品。Reflex IV 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪购自德国 Bruker 公司。

## 1.3 蛋白样品制备

收集患者各时相点血清标本。得到的血清标本先用 ProteoExtract™ 白蛋白/免疫球蛋白 G 去除试剂盒去除其中的白蛋白/免疫球蛋白 G 组分, 再使用 ProteoExtract™ 蛋白沉淀试剂盒进一步沉淀浓缩蛋白及去除各种可能影响后续结果的缓冲液组分, 所有步骤均根据说明书操作。提纯浓缩的标本用 Bradford 法进行蛋白浓度测定后, 分装于 EP 管中, -80 °C 保存备用。

## 1.4 双向凝胶电泳

选择 24 cm、pH 3 ~ 10 的 IPG 胶条, 上样量为 80 μg, 上样总体积为 450 μl。等电聚焦程序设置为 30 V 6 h、60 V 6 h、500 V 1 h、1000 V 1 h、8000 V 10 h, 总电压时间乘积约为 80 000 Vh。等电聚焦结束后, 胶条分别用 DTT 和 IAA 缓冲液平衡 15 min, 并用 12.5% SDS 凝胶行第二向电泳。

电泳结束后, 将凝胶行银染显色, 染色方法参照文献<sup>[4]</sup>优化进行。每份蛋白样品重复电泳 3 次。

## 1.5 二维凝胶蛋白图谱的分析

利用 ImageMaster™ 2D Platinum 软件对凝胶图像进行强度校正、蛋白点检测、点配对。分别将术后 1 周、术后 1 个月的血清蛋白图谱与术前血清蛋白图谱进行比较, 每两组图谱中蛋白质的表达量相差两倍及以上的点视为有差异的点。选取明显升高或明显下降的蛋白点行 MALDI-TOF-MS 鉴定分析。

## 1.6 MALDI-TOF-MS 分析及数据库查询

选择凝胶上的差异表达蛋白点, 依次进行切割、脱色、还原、烷基化、胰酶酶解、萃取。脱盐后的样品与 α-HCCA 充分混合, 加样至不锈钢点样板上, 待其自然风干后, 置于 Reflex IV 质谱仪上, 按照文献<sup>[4]</sup>方法操作、分析。在获得肽片段质量指纹图谱后, 用

Mascot 搜索引擎在 SwissProt 数据库进行查询。蛋白质匹配分数 > 54 分, 并综合评估其分子量和等电点的匹配程度后, 确定蛋白名称。

## 2 结果

### 2.1 双向凝胶电泳结果

电泳后的各凝胶图谱可辨识 1300 ~ 2000 个蛋白点, 并显示出良好的重复性与稳定性。蛋白点的平均匹配率达到 72.5%。

术后 1 周血清蛋白凝胶与术前比较, 差异蛋白点有 63 个; 术后 1 个月血清蛋白凝胶与术前比较, 差异蛋白点有 71 个。术后 1 周及术后 1 个月与术前比较, 均显示出明显相同变化的蛋白点为 20 个, 其中 13 个蛋白点上调, 7 个蛋白点下降。

### 2.2 质谱结果及生物信息学分析

将这 20 个蛋白点进行 MALDI-TOF-MS 分析, 共有 8 个蛋白点被成功鉴定(表 1)。其中在术后血清中表达升高的有 5 个, 分别是 Rho GDP-dissociation inhibitor 1、Prohibitin、Alpha-1-antitrypsin precursor、Serotransferrin precursor 和 Fibrinogen gamma chain precursor。在术后血清中表达降低的有 3 个, 分别是 MAP3K12-binding inhibitory protein 1、Coronin-1A 和 Isovaleryl-CoA dehydrogenase。这些蛋白点在二维凝胶图谱中的局部表现见图 1。

## 3 讨论

近年来, 欧美等西方国家大量的临床资料证实, 许多类型的手术具有治疗肥胖合并代谢紊乱综合征的效果, 特别是对血糖的控制效果甚佳, 甚至可以治愈糖尿病<sup>[1]</sup>。国内也有一些单位逐渐尝试利用胃肠手术治疗糖尿病, 取得了一定的效果。

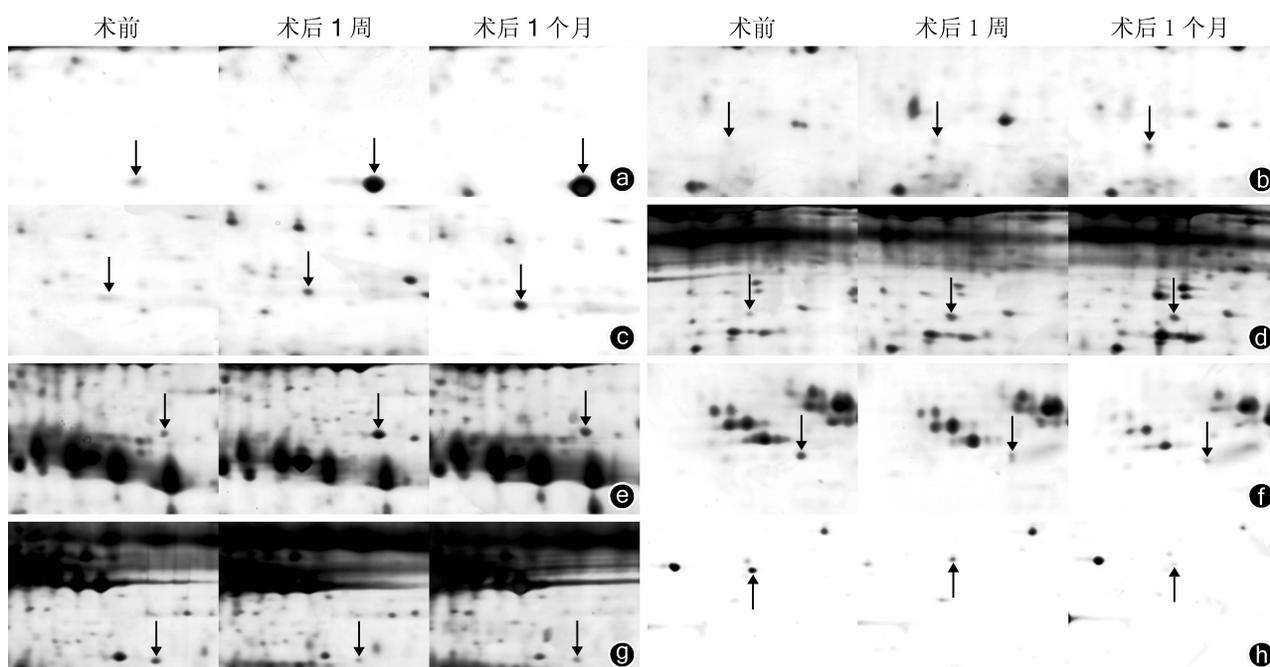
有研究表明, 胃肠道重建后, 一些肠道激素发生改变并产生了一些具有生物活性的肽以及其他一些未被发现的物质, 这些物质通过一系列的机制影响糖代谢<sup>[5]</sup>。然而, 现有的资料尚不能完整总结出确切的机制。

本研究运用双向凝胶电泳和 MALDI-TOF-MS 技术成功筛选并鉴定了 8 个在腹腔镜胃肠手术前后患者血清中有显著性差异表达的蛋白点, 其中在术后血清中表达升高的有 5 个, 分别是 Rho GDP-dissociation inhibitor 1、Prohibitin、Alpha-1-antitrypsin precursor、Serotransferrin precursor 和 Fibrinogen gamma chain precursor; 在术后血清中表达降低的有 3 个, 分别是 MAP3K12-binding inhibitory protein 1、Coro-

表 1 2 型糖尿病患者腹腔镜胃肠手术后血清中差异表达蛋白点的质谱鉴定结果

| 点号 | 数据库 ID | 蛋白质指纹匹配分数 | 序列覆盖率(%) | 等电点/相对分子质量 | 蛋白名称                                 |
|----|--------|-----------|----------|------------|--------------------------------------|
| 1  | P52565 | 72        | 30       | 5.03/23119 | Rho GDP-dissociation inhibitor 1     |
| 2  | P35232 | 75        | 55       | 5.57/29843 | Prohibitin                           |
| 3  | P01009 | 132       | 47       | 5.37/46878 | Alpha-1-antitrypsin precursor        |
| 4  | P02787 | 324       | 50       | 6.81/79280 | Serotransferrin precursor            |
| 5  | P02679 | 81        | 25       | 5.37/52106 | Fibrinogen gamma chain precursor     |
| 6  | Q9NS73 | 55        | 33       | 6.58/39497 | MAP3K12-binding inhibitory protein 1 |
| 7  | P31146 | 103       | 26       | 6.25/51547 | Coronin-1A                           |
| 8  | P26440 | 58        | 12       | 8.45/46803 | Isovaleryl-CoA dehydrogenase         |

注:蛋白质指纹匹配分数 > 54 分为差异有统计学意义



a:1 号蛋白点(↓), Rho GDP-dissociation inhibitor 1; b:2 号蛋白点(↓), Prohibitin; c:3 号蛋白点(↓), Alpha-1-antitrypsin precursor; d:4 号蛋白点(↓), Serotransferrin precursor; e:5 号蛋白点(↓), Fibrinogen gamma chain precursor; f:6 号蛋白点(↓), MAP3K12-binding inhibitory protein 1; g:7 号蛋白点(↓), Coronin-1A; h:8 号蛋白点(↑), Isovaleryl-CoA dehydrogenase

图 1 2 型糖尿病患者腹腔镜胃肠手术前后血清中差异表达蛋白点在二维凝胶图谱中的局部表现

nin-1A 和 Isovaleryl-CoA dehydrogenase, 这为我们进一步的研究奠定了基础。

综上所述,利用蛋白质组学筛选 2 型糖尿病患者手术前后血清差异表达蛋白点是有其可行性和可能性的。Rho GDP-dissociation inhibitor 1、Prohibitin 等手术前后表达发生明显改变的蛋白点的发现,为进一步寻找胃肠外科手术治疗糖尿病的机制提供了可能。我们将进一步利用免疫印迹、ELISA 等方法验证这些蛋白点在手术前后血清中的差异表达,并研究它们是否在血糖代谢的分子网络中起了某些作用以及这些蛋白点与 2 型糖尿病发生、发展的关系,为寻找胃肠手术治疗糖尿病的机制,发现药物治疗新靶点奠定基础。

#### 参考文献

- [1] Ferchak CV, Meneghini LF. Obesity, bariatric surgery and type 2 diabetes—a systematic review. *Diabetes Metab Res Rev*, 2004, 20(6):438-445.
- [2] 李心翔,郑成竹, Rosenthal RJ. 腹腔镜 Roux-en-Y 胃分流术治疗病态性肥胖合并 2 型糖尿病. *中华消化外科杂志*, 2009, 8(1):24-26.
- [3] 郑成竹,丁丹. 肥胖症及代谢疾病的外科手术治疗. *中国实用外科杂志*, 2010, 30(3):173-175.
- [4] Zhu YF, Cui YG, Guo XJ, et al. Proteomic analysis of effect of hyperthermia on spermatogenesis in adult male mice. *J Proteome Res*, 2006, 5(9):2217-2225.
- [5] Rubino F, Marescaux J. Effect of duodenal-jejunal exclusion in a non-obese animal model of type 2 diabetes: a new perspective for an old disease. *Ann Surg*, 2004, 239(1):1-11.

(收稿日期: 2010-11-21)

(本文编辑: 张辉)