

# 以蛋白質體技術分析大鼠暴露於油霧滴後其肺沖提液中的蛋白質變化

李永珊<sup>1</sup>, 陳邦維<sup>1</sup>, 蔡朋枝<sup>1</sup>, 蘇淑惠<sup>2</sup>, 廖寶琦<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>國立成功大學環境醫學研究所

<sup>2</sup>國立成功大學生理醫學研究所

E-mail: liaopc@mail.ncku.edu.tw

Proteomics. 2006, 6, 2236-2250.

## 油

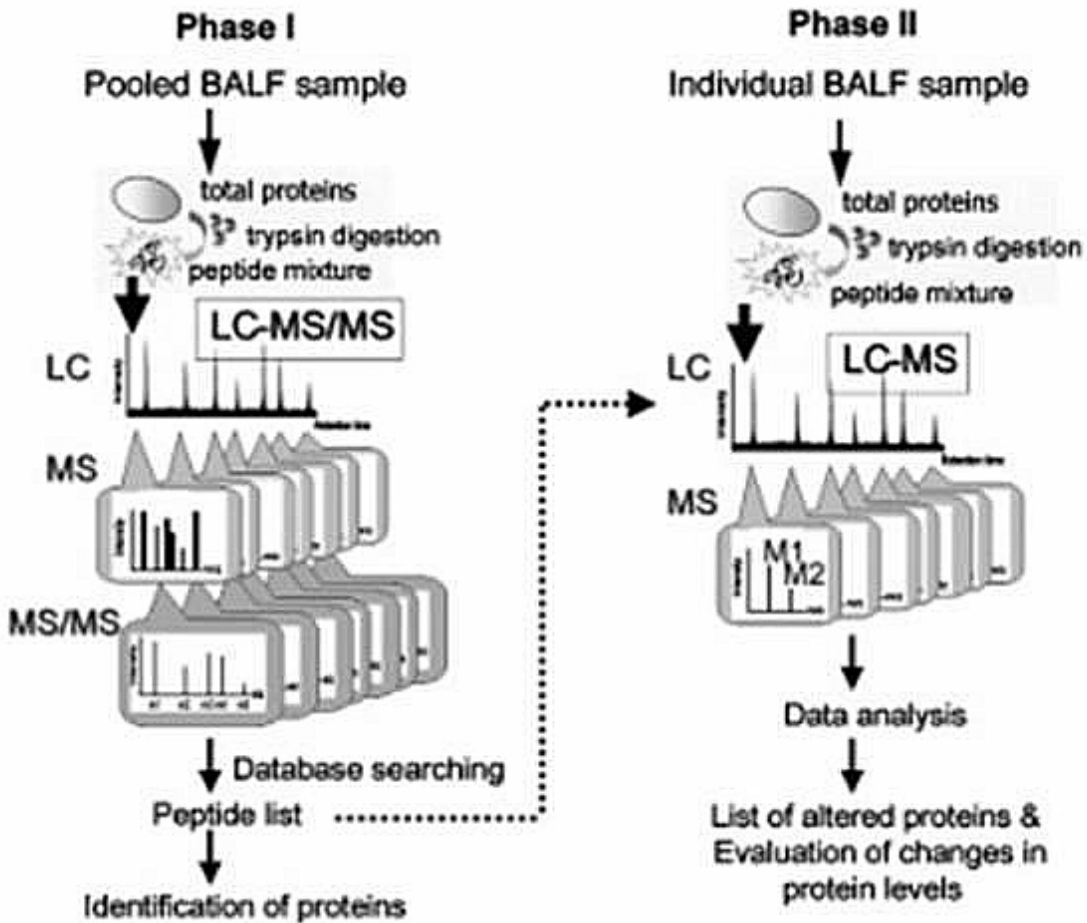
霧滴的暴露所造成的健康危害現近來漸受到重視，過去的研究發現台灣女性中暴露於廚房油霧滴

對於肺癌來說是一重要的危險因子[1]。在工作場所也有油霧滴暴露，在金屬加工作業環境下的工人，對於機械運轉時所產生的油霧滴會藉由吸入方式進入人體，導致各種急性或慢性的呼吸道疾病與症狀，例如：慢性支氣管炎、過敏性肺炎、氣喘、急性呼吸道發炎、甚至損害肺功能[2]。肺沖提液技術的發展超過二十年之久，利用此技術可用來收集下呼吸道中細胞和呼吸道中可溶解物質成分。若將肺沖提液樣本離心後便能有效的將細胞由肺沖提液中分離出，而在肺沖提液上清液中的水溶性蛋白質便能成為我們研究呼吸道疾病的樣本，現階段已有研究者利用二維電泳膠結合質譜儀的技術，來研究肺沖提液中的蛋白質成分。

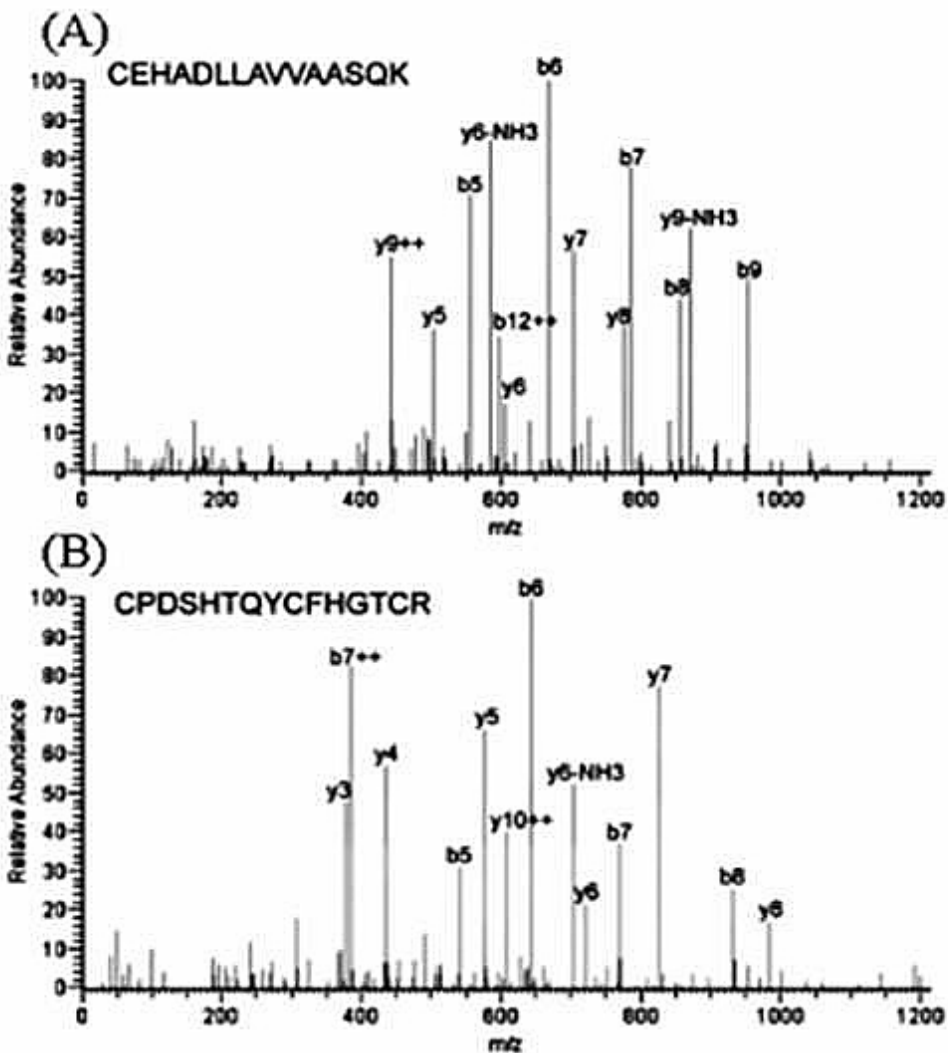


本研究利用大鼠暴露於使用切削油過程中所產生出來的油霧滴，再以高效能液相層析電噴灑串聯式質譜儀，來對大鼠肺沖提液中蛋白質的變化做進一步分析。由於肺沖提液的採樣方式為侵入性，因此以老鼠作為動物模式來評估肺臟受到油霧滴暴露後的影響。作法是將大鼠暴露於製程中會因輾牙過程產生切削油油霧滴的螺絲製造工廠二十一天，而對照組則放置在相同螺絲製造工廠中幾乎沒有油霧滴的庫存區；暴露組與對照組的大鼠肺沖提液樣本取出後，利用高效能液相層析電噴灑式質譜儀來對兩組蛋白質體做定性以及定量上的分析。

目前科學家要精確定量複雜蛋白質體仍有其困難處，傳統的二維膠電泳方式在定量的比對上會面臨到以下主要兩種問題。首先是膠片蛋白質染色後的訊號變異過大，另外是同時在膠片上定量濃度差異大的各種蛋白質十分困難，這會使得在定量上無法確切知道比較對象之間真實蛋白表現量的差異。要達到準確的定量方式目前主要是採用同位素內標標定法結合質譜儀分析，然而，這種藉由同位素內標標定的方法卻是花工夫且十分昂貴的。因此我們提出了一個不需使用到昂貴同位素內標標定的分析策略來做比較性的蛋白質體定量方法，這個「不需使用同位素內標標定」相對性蛋白表現定量方法，它的實驗設計如圖一。以變形生長因子 $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) 為例，它是一個利用我們發展出的分析策略證實在暴露油霧滴後表現會明顯上升的蛋白質；在實驗設計的第一階段，我們將所有大鼠肺沖提液樣本分取部份後合併成混合樣本，以高效能液相層析電噴灑式串聯式質譜儀做定性上的分析，可鑑定到TGF- $\alpha$ 的兩段胜肽序列，證實大鼠肺沖提液樣本中含有TGF- $\alpha$ ，圖二為TGF- $\alpha$ 兩段胜肽序列的質譜訊號圖。在實驗設計的第二階段，則不做串聯式質譜分析，只利用一般的液相層析質譜分析；利用藉由前階段中液相層析質譜分析結果所提供的層析時間以及質荷比，便可將訊號對應至第二階段分析所得的數據，並得到此兩段TGF- $\alpha$ 所屬之胜肽片段的訊號強度。然而這樣的設計卻存在著一個潛在問題，即訊號可能會飄移，訊號飄移會造成不正確訊號定量。代表TGF- $\alpha$ 的兩段胜肽片段在對照組與實驗組中其統計結果發現變異係數介於29~47%，這個統計結果顯示訊號飄移是不容被忽視的，尤其在這樣的定量方法下訊號被常態化是有其必要性。

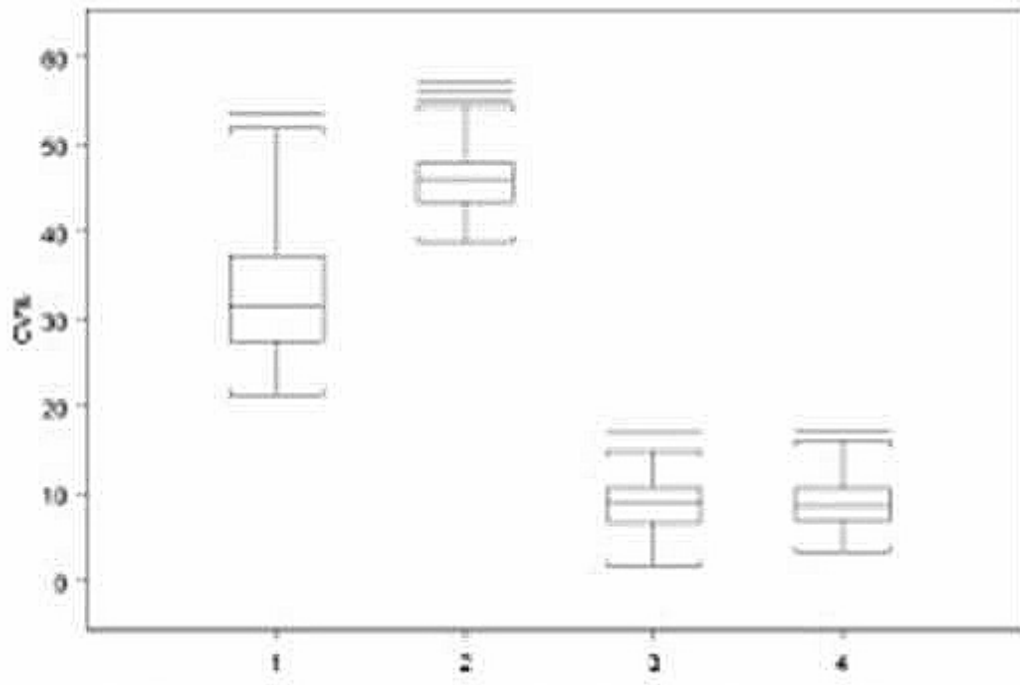


圖一、蛋白質體定量暨定性分析技術之流程圖，第一階叢：蛋白質種類鑑定，第二階叢：蛋白質定量。



圖二、TGF- $\alpha$ 所屬之胜肽片段訊號質譜圖，(A)為胜肽片段序列為CEHADLLAWAASQK的質譜圖(B)為胜肽片段序列為CPDSHTQYCFHGTCR的質譜圖。

最常被利用的常態化方法是將所有胜肽的質譜訊號總值當分母，一般稱為「常態化因子」，個別訊號除以常態化因子後，所得到的百分比來作為各胜肽在質譜分析的訊號強度。然而，這樣常態化因子也會包含了因油霧滴暴露而造成的明顯胜肽訊號改變，這意味著這個方法可能會造成低估或是高估暴露的影響。為了避免以上問題，在本研究中常態化的執行必須以統計方法為根據，首先需先選擇出此胜肽片段訊號的明顯改變並非由暴露影響所造成，因此我們使用無母數分析方法Wilcoxon rank-sum test來檢定每個肺沖提液樣本三重複中的中位數，藉此檢驗出在對照組與實驗組中每一個胜肽片段訊號的差異性( $p < 0.05$ 視為具統計上意義)，扣除掉在對照組與實驗組中有明顯差異的訊號( $p < 0.05$ )，其餘的胜肽片段訊號強度總和在本研究中會被當成常態化因子，接著每個胜肽的訊號強度會藉由常態化因子來獲得校正過的胜肽訊號強度，舉TGF- $\alpha$ 為例來說，兩段TGF- $\alpha$ 所屬之胜肽片段訊號在校正後其變異係數便會由29~47%降至6~14%。一般而言藉由將訊號常態化，在對照組與實驗組之間的胜肽片段訊號強度其變異係數會被明顯的降低20-60%，如圖三，在本研究中，這個常態化方法能有效的降低不同批儀器實驗之間訊號飄移所造成定量上的干擾。



圖三、對照組與實驗組一質譜層析峰積分數據在原訊號強度與校正後個別的變異系數值箱型品，1：實驗組、原訊號強度，2：業照組原訊號強度，3：實驗組、校正後訊號強度，4：業照組、校正後訊號強度。

在數據分析的最後階段中，Wilcoxon rank-sum test 會被用來再一次的檢驗對照組與實驗組中被校正後的胜肽訊號強度的差異 ( $p < 0.05$  視為有統計上意義)，TGF- $\alpha$  所屬的兩段胜肽片段，其胜肽片段暴露對照比的幾何平均表現量分別為 5.05 及 3.93，接著，再將此兩胜肽片段所得之幾何平均加以加總平均來代表在暴露後蛋白質 TGF- $\alpha$  表現量上的改變，依循這個方法 TGF- $\alpha$  在油霧滴暴露後其表現量相較於對照組高出 4.46 倍。

利用液相層析質譜儀串聯式質譜分析，可在混合大鼠肺沖提液樣本中鑑定到了 69 個蛋白質 (圖一中描述的第一階段分析流程)，以本研究發展出不需同位素內標標定的相對定量的策略分析個別樣本 (圖一中描述的第二階段分析流程)，證實大鼠在暴露切削油霧滴後，大鼠肺沖提液樣本中有 29 個蛋白有明顯量上的變化，其中 22 個蛋白表現量為增加、7 個蛋白表現量為減少。這些在暴露後表現量改變的蛋白可大略分為以下幾類：表面相關蛋白、免疫蛋白、生長因子、鈣結合蛋白以及其他類。在現有的文獻中，本研究為首次探討在暴露油霧滴後肺沖提液中蛋白質表現的改變，本研究亦獲得了相當有用的資訊，可提供未來進一步研究油霧滴影響肺功能的機制探討。

#### 參考文獻

- [1] Ko, Y. C., Cheng, L. S., Lee, C. H., Huang, J. J. et al., Am. J. Epidemiol. 2000, 151, 140–147.
- [2] Simpson, A. T., Stear, M., Groves, J. A., Piney, M. et al., Ann. Occup. Hyg. 2003, 47, 17–30.