

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CNBT94-03

計畫名稱：快速抽煙者唾液蛋白質體學技術之建立及與不抽煙者之
比較

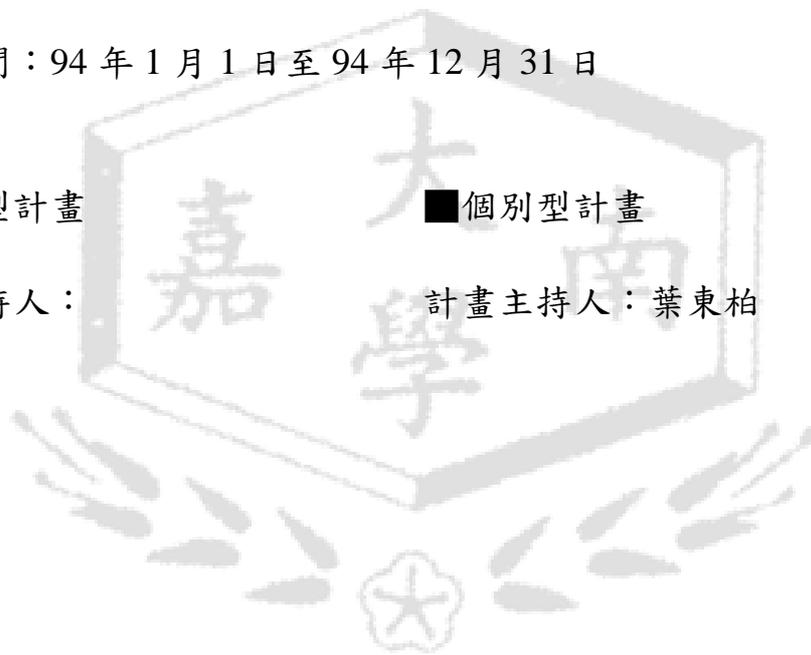
執行期間：94年1月1日至94年12月31日

整合型計畫

個別型計畫

計畫主持人：

計畫主持人：葉東柏



中華民國 95 年 2 月 28 日

一、中英文摘要

關鍵詞：唾液蛋白質、二維電泳、蛋白質體圖譜、抽煙人類的唾液富含的蛋白質，具有潤滑口腔組織、消化及破壞或抑制口腔中微生物或病毒的作用中，因此利用唾液當檢體作為臨床上或是流行病學上的診斷。本實驗利用高效二維膠體電泳技術來分離抽煙和非抽煙個體及男女生之間唾液內蛋白質圖譜的呈現，希望能作為臨床上診斷的工具。本研究採非刺激方式收集健康個體的唾液蛋白質，經離心後和含尿素-Triton-兩極離子(Urea-Triton-ampholyte)的溶液混合，進行超音波震盪處理後再於毛細管中凝膠。第一維(等電聚焦，IEF)的分析使用毛細管膠體電泳，接著進行十二烷基磺酸鈉-聚丙烯醯胺膠體電泳(SDS-PAGE)做第二維的分析。膠體的染色可使用硝酸銀(Silver nitrate)來呈現，再進一步由 Image-Master 軟體進行比對分析。我們發現唾液在低溫下會產生凝集使蛋白質沉澱在電泳過程中會無法聚集需藉由新發展出的步驟來預防此情形。使用此套程序可以在 8 小時內完成 12 個以上的蛋白質體圖譜，一般情況下只需 10-30 μ l 的唾液就可以分析，設備簡單且花費相當低。結果我們發現在非抽煙個體唾液的蛋白質圖譜沒有明顯的差異；另一方面在抽煙和非抽煙的個體中唾液的蛋白質圖譜有明顯的差異，經比對初步判定有 Parotid secretory protein、Lipocalin-1、cystatin SN、lysozyme 及 carbonic anhydrase 等，不過還需進一步鑑定與確認。

二、研究計畫之背景及目的

根據 2003 年衛生署的最新統計資料顯示，九十二年全國因肺癌及口腔癌死亡的人數已達一萬人。[1] 而多年來的研究，一直多証明了抽菸與上述兩種癌症息息相關，因此了解抽菸對於唾液的影響，並進行疾病的早期檢測與適當防治應是刻不容緩的重要課題。

全唾液(whole saliva) 是來自三對主要的唾液腺(即腮腺、顎下腺及舌下腺；約[2]占流體中的 90%)，以及其它較次要的唾液腺或血液的成分所滲入者。唾液中的黏蛋白能潤滑口腔組織，使口腔能夠表現吃，講話及吞嚥等功能；大量的 α -amylase 則具有初步分解澱粉的功能。除外，唾液中的許多組成分(例如 lysozyme, cystatins, 免疫球蛋白, lactoferrin 和 histatins 等)能破壞或抑制口腔中微生物或病毒的存活與成長，因此對於牙齒和黏膜表面具有保護作用[3-5]。多項實驗顯示，當口腔相關組織或身體的某些部分發生異常或老化時，唾液腺的分泌(包括流量及內容物)會出現明顯的變化。[6] 例如，數種醣基化形式的唾液 mucins 已經在囊性纖維變性病患被發[7] [8] 現。糖尿病的病患會呈現較高濃度的澱粉和 secretory IgA。

牙周病 (periodontitis) [9] 人比控制組的健康人在全唾液中澱粉和 cystatin C 的含量明顯偏高。因此，確認唾液的生物標記(salivary biomarkers) 作為監控大眾健康的方法，或作為病毒(如 HIV、HPV 等)以及其它針對導致影響唾液腺功能的系統性疾病等的檢測，越來越引起廣泛的興趣[9-10]。

以唾液當做檢體乃基于下列幾個優點；例如，樣品收集較血清或尿液簡單，有足夠的蛋白質含量可直接分析，和血清或尿液相比，貯存與裝運的費用更低。分析唾液另一個潛在的優勢是可進行非侵略性的藥物動力學研究[11]。唾液研究的一種可行的方法是使用蛋白質體學(proteomics) 技術進行蛋白質組成的鑑定。而且，在健康者與患病者樣品之間的比較可用於追蹤濃度增減的特定蛋白質，並作為生物標記(biomarkers)。

截至目前，有關唾液蛋白質表現圖譜的調查報告仍然相當有限，特別是與疾病的相關性；更重要的是，穩定性與檢測速度仍有很大的改進空間。

1991 年，Beeley 等人[10] 開始嘗試以二維電泳法比較正常與結締組織異常個體之唾液蛋白質差異，並鑑定了唾液中幾種主要的蛋白質。Yao [12] 等人報告，利用 2-D 電泳分離和質譜分析比較人的唾液腺分泌物、後天琺瑯層(enamel pellicle, EP) 及全唾液(WS) 的蛋白質圖譜差異，結果顯示唾液腺分泌物與 EP 及 WS 間有相當大的差異，進而鑑定出 13 種唾液蛋白質。而利用相似的方法，Ghafouri 等人[7]更進一步分析了二維電泳凝膠上 150 個呈色點，並鑑定出彼等分屬於 20 種的唾液蛋白質，著者等同時指出，人類唾液中含有多種與發炎及免疫有關的蛋白質，值得深入探討。

[13]Rui Vitorino 等人利用 2-D 電泳配合 MALDI-TOF 及 MS/MS 質譜分析。將得到的數據再利用 Mascot 軟體進行蛋白質資料庫搜尋。90 個呈色點

被鑑定具有高統計可靠性。而且，在被鑑定的蛋白質中，有 11 種是第一次使用蛋白質體學技術自唾液分離與確認的。另外，以前在唾液裡從未被論及的三種蛋白質，PLUNC, cystatin A, 和 cystatin B 也被鑑定出來。而中山大學黃俊銘教授透過蛋白質體學技術，建立了一套[14] 全唾液參考蛋白質體圖譜，在單一個 2-D 聚丙烯醯胺(polyacrylamide) 凝膠分析中能夠決定超過 200 個蛋白質點。使用 N-端序列的鑑定，質譜分析，和/或有蛋白質資料庫的電腦比對，54 個蛋白質斑點，包括 26 種不同蛋白質已被定出。進一步的分析顯示，其中十種蛋白質，當口腔出血發生時其濃度會出現明顯的變化。

雖然，最近一兩年利用蛋白質體學技術中的二維電泳法於唾液蛋白質分析已有相當程度的進展。然而，Ghafouri 等人[7]在分析唾液的二維電泳凝膠上，雖能夠分離出 150 個呈色點，但其中大部份的呈色點經鑑定後，確定僅分別屬於 20 種的唾液蛋白質而已，因為大部份是蛋白質的片斷；這種結果顯示，蛋白質在處理或電泳的過程中，有明顯裂解的現象。而 Rui Vitorino 等人在報告的討論中亦指出[13]，雖然，由 2-DE 所建造的圖譜包含了可鑑定的 101 個蛋白質點，然而，許多已知的唾液蛋白質(例如 lactoferrin, cystatin C, mucins, histatins, peroxidase 以及 carbonic anhydrase) 卻仍無法找到，再再顯示此項技術應用在唾液蛋白質體學研究上還有相當大的改進空間。

傳統蛋白質體學研究的重要關鍵在於第一向的等電聚焦電泳程序。然而，以目前的標準流程，完成一次實驗所需的電壓很大且時間過於冗長（約 50 KV-小時，相當於 12-24 小時），雖能獲得不錯的結果卻無法提供即時訊息，以致經常緩不濟急；甚至於蛋白質檢體經常呈現裂解現象，導致蛋白質的二維圖譜複雜化並欠缺再現性，造成比對或解析上的困難。另外，由文獻記載顯示來自口腔的不同腺體 [17-18]，採樣方式、時間、性別、生理狀況及藥物或補充劑的使用等所分泌的唾液分泌量及蛋白質成分與濃度各異，[8-9, 14, 19-20] 而某些蛋白質在低溫下會有凝聚現象。[18, 21-22] 本研究係根據既有的學理基礎與實作經驗，探討如何應用蛋白質體學技術中的迷你二維電泳程序於體液（唾液）蛋白質的分析，希望能藉由改善現有 IEF 的缺點與瓶頸。基於上述理由，申請人乃提出利用本研究室新近開發中的高效二維電泳技術，期能藉此研究計畫，進一步利用更多的唾液檢體，找出最理想的採樣時段，分別建立不同年齡、性別等族群的唾液蛋白質之二維電泳圖譜。期能應用此項技術的簡便與快速的優點，在疾病誘因的分析與探討及早期檢測與追蹤上做出貢獻。

本計畫首先將就唾液收集與處理的方式作比較與探討，將建立屬於不同年齡、性別等族群的國人在無臨床狀況下及吸菸者唾液蛋白質體的二維電泳圖譜，並探討檢體間蛋白質相對濃度的差異，做為進行質譜儀分析以鑑定各主要蛋白質的先置作業。

三、研究方法、進行步驟

1. 樣本採集

樣本的採集使用非刺激而自然的方式，取樣對象包括不同年齡與性別之健康(未嚼食檳榔，酗酒和吸煙)成年人在不同時間點，採樣前先說明實驗目的及程序。

每人在定點採坐姿，並以自然流出的方式連續收集 2 分鐘，[20] 收集後置於冰槽中。

收集到的唾液檢體加入的 protease inhibitor cocktail(Sigma, 1 μ /ml)於 13,000 rpm 及 4°C 的條件下離心 20 分鐘。吸取各樣本之上清液做蛋白質濃度測定。取 300 ng 蛋白質平均分裝於小離心，並進行冷凍乾燥。樣本除當天分析外，其餘的保存於-80°C 冷凍庫備用。

2. 雙向電泳

A. 一維(IEF) 電泳基本依廠商(Bio-Rad)提供的程序[23]進行。先將樣本加入 20 μ l 的水回溶，再加入 50 μ l 的單體之溶液 (內含 ampholytes, Triton 及 urea 等)，用細胞破碎機作用 2 分鐘後脫氣 10 分鐘，之後加入 APS 和 TEMED 溶液，混合均勻並於毛細管中成膠，然後在 250-500V 的條件下進行 IEF 電泳 3-4 小時。每一個樣本至少進行兩重複，以確定其再現性。

B. 二維(SDS-PAGE) 電泳

IEF 分離結束後的毛細管再置於 12.5% (或 5-15% 間梯度)的 SDS-PAGE 上，加入含有乙基硫醇 (β -Mercaptoethanol, β -ME) 的平衡溶液反應 15 分鐘，隨後進行第二向的電泳程序，在每片電流為 20 mA 的條件下進行約 1 小時。

C. 染色與比對

以 Silver nitrate 進行染色。染色後之層析圖譜利用掃描儲存於電腦中，再以 Pharmacia 公司提供的軟體 (ImageMaster 2D Platinum) 分析比較之，以建立健康人之唾液蛋白質二維電泳圖譜，並據以了解不同採樣性別及個體間可能的差異。

D. 吸菸者唾液蛋白質圖譜分析

為瞭解吸菸對於唾液蛋白質的影響，分別在吸菸前、吸菸後立刻及 30-60 分鐘後進行採樣。二維電泳條件、圖譜的分析與比對，原則上與上述程序相同。

四、結果與討論

1. 唾液之二維電泳圖譜的建立

A. 電泳的時間

11 hr

2 3 1

2 hr

2 3 1

2.5 hr

2 3

一般而言，IEF 約需 3 小時(如上圖)，而 SDS-PAGE 則需 1 小時即可。

B. 樣品離心與否的影響

a

b

由上圖顯示樣品經離心(a)較未經離心(b)者圖譜較為清晰，原因可能是離心

可去除高分子且具黏性的 mucin 所造成的結果。

C. 形成 pH 梯度之 Ampholite 組成的影響 改變兩極離子(Ampholyte)組成，包括將 3-10 ampholyte 與 4-6 ampholyte 比例加以改變，由 1:4(a)、1:1(b)至 4:1(c)，結果(下圖)顯示對於電泳圖譜有明顯的影響。一般而言，4-6 ampholyte 比例較高，唾液蛋白質的分離較為理想。

a

b

c

2. 個體間的差異

A.

青年女性 (二位)

女 1 (E) 女 2 (G)

B. 青年男性 (二位)

)

男 1 (d3) 男 2 (i)

由上圖顯示，不論是性別或是個體間唾液蛋白質的電泳圖譜大致相識，但或多或少均有部分的差異。不過如使用同一種樣品在不同時間進行分析所得的結果卻相當一致，顯示這種差異乃檢體間本身的特性，而非操作上的問題。

3. 抽煙對於唾液蛋白質體的影響

初步以女生抽煙者為對象。下兩圖係抽煙前(左)、後(中) 唾液蛋白質體的比較，由結果顯示，兩者有明顯的差異。進而藉由現有的分析軟體

ImageMaster (Amersham-Pharmacia) 進行比對可以看出兩者(藍色為抽煙前、紅色為抽煙後)的不[13-14] 同處。經經

與現有文獻比對初步判定有 parotid secretory protein、lipocalin-1、cystatin SN、lysozyme 及 carbonic anhydrase 等，不過還需進一步鑑定與確認，其生理意義也有待進一步探討。	0.667 0.912
	0.201 0.493
	MSD
	0.995
	0.366
	0.287
A	0.371
B	0.173
C	0.208
D	UP ↑
E	Down
F	↓ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑
C	71 0.497 0.898 0.195
A	↑
B	C
D	D
E	E
F	FLipocalin-1cystatin SN
Table 1 Quantitative analysis of the changes in the proteome of whole saliva from female before and after smoking	cystatin SN lysozyme lysozyme carbonic anhydrase
Region	0.718 .
A	1.425 .
BProtein(s) assigned*	1.762 .
Or spot ID	1.585 0.022
Parotid secretory protein	1.293
Parotid secretory protein	.
Parotid secretory protein	0.109 1.144
Parotid secretory protein	0.508
Parotid secretory protein	1.00
72	1.246
Protein level	1.105
Before After	0.914
0.341 1.748	0.731
1.683 1.163	↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↑
1.202 1.608	
0.830 1.355	

*Protein was tentatively assigned

according the literatures references by Rui Vitorinol (2004) and Chun-Ming Huang (2004), it was needed to be further identified and confirmed.

綜合以上的數據，我們發現唾液在低溫下會產生凝集使蛋白質沉澱在電泳過程中會無法聚集需藉由新發展出的步驟來預防此情形。使用此套程序可以在 8 小時內完成 12 個以上的蛋白質體圖譜，一般情況下只需 10-30 μ l 的唾液就可以分析，設備簡單且花費相當低。在累積更多的樣品與圖譜後，在臨床的應用上將更具潛力。

五、參考文獻

- [1] 衛生署公告 92 年台灣地區男性主要癌症死亡率。
- [2] Humphrey, S. P., Williamson, R. T., *Prosthet. Dent.* 2001, 85, 162–169.
- [3] Tenovuo, J., *Acta Odontol. Scand.* 1998, 56, 250–256.
- [4] Lenander-Lumikari, M., Loimaranta, V., *Adv. Dent. Res.* 2000, 14, 40–47.
- [5] Lawrence, H. P., *J. Can. Dent. Assoc.* 2002, 68, 170–174.
- [6] Dawes, C., Kubieniec, K., *Archives of Oral Biology*, 2004, 49, 665 – 669.
- [7] Ghafouri, B., Stahlbom, B., Tagesson, C., Lindahl, M., *Proteomics* 2003, 3, 003-1015.
- [8] Hagewald, S. J., Fishel, D. L., Hristan, C. E., Bernimoulin, J. P., Kage, A., *Eur. J. Oral Sci.* 2003, 111, 203-8.
- [9] Henskens, Y. M., Veerman, E. C., Mantel, M. S., van der Velden, U., Nieuw Amerongen, A. V., *J. Dent. Res.* 94, 73, 1606 - 14.
- [10] Beeley, J. A., Khoo, K. S., Lamey, P. J., *Electrophoresis* 1991, 12, 493–499.
- [11] Banks, R. E., Dunn, M. J., Hochstrasser, D. F., Sanchez, J. C., *Lancet* 2000, 356, 1749–1756.
- [12] Yao, Y., Berg, E. A., Costello, C. E., Troxler, R. F., Oppenheim, F. G., *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 5300–5308.
- [13] Vitorinol, R., Lobo, M. J. C., et al, *Proteomics* 2004, 4, 1109-1115.
- [14] Huang, C. M., *Archives of Oral Biology*. 2004,
- [15] Hasnis, E., Reznick, A. Z., Pollackc, S., Klein, Y., Nagler, R. M., *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2004, 36, 826 – 839.
- [16] Basseto, A. P., Neves, F. T. A., Toledo, S. F., da Silva, T. L., Buzalaf, M. A. R., Faria, F. A. C., Granjeiro, de J. M., *Rev. FOB* 2001, 9, 49 - 54.
- [17] Ko, Y. C., Huang, Y. L., & Lee, C. H., *Journal of Oral Pathology and Medicine* 1995, 24, 450 – 453.
- [18] Francis, C.A., Hector, M. P., Proctor, G. B., *Arch. Oral Biol.* 2000, 45 (7) 601 - 606.
- [19] Shori, D.K., Genter, T., Hansen, J., Koch, C., Wyatt, H., Kariyawasam, H.H., et al. *Pflugers Arch.* 2001, 443, S55-61.
- [20] Rantonen, P., *Doctorate dissertation, University of Helsinki*, 2003.
- [21] Iontcheva et al., 1997. *J. Dent. Res.* 76:734-743.
- [22] Soares, R. V., Lin, T., Siqueira, C.

C., Bruno, L. S., Li, X. J., Oppenheim, F. [23] Bulletin 9022 (Bio-Rad mini-gel
G., Offner, G., Troxler, IEF)
R. F., Archives of Oral Biology 2004, 49, 9
337 – 343.

