

大鼠不同发育时期胰腺相关蛋白的差异表达*

周锦勇¹⁾ 胡静静¹⁾ 仲燕¹⁾ 刘超²⁾ 柴伟栋²⁾ 袁栋¹⁾ 滕丽萍¹⁾ 德伟¹⁾**

(¹⁾江苏省生殖医学重点实验室, 南京医科大学生物化学与分子生物学系, 南京 210029; ²⁾江苏省人民医院内分泌科, 南京 210029)

摘要 探讨大鼠胰腺不同发育时期相关蛋白的差异表达, 应用显微技术分离了大鼠孕 15.5 天, 孕 18.5 天胚胎胰腺和新生鼠及成年鼠的胰腺, 提取其蛋白质后, 用固相 pH 梯度双向聚丙烯酰胺凝胶电泳和质谱分析等蛋白质组学方法, 得到了 4 个不同发育时期的蛋白质表达谱. 对其中的 6 个在孕 18.5 天胚胎胰腺中有高丰度表达, 而在成年鼠胰腺中缺失的蛋白质点, 4 个在成年胰腺中特异表达的蛋白质点, 8 个在成年胰腺中表达明显下调的蛋白质点和 1 个在成年中表达上调的点, 进行了肽质量指纹分析和蛋白质鉴定, 共获得 18 个点的肽质量指纹图. 经 BIOWORK 等软件搜索大鼠非冗余蛋白质数据库来鉴定其身份, 发现其中 7 个点为小鼠甲胎蛋白 (AFP)、5 个点为胰脂酶相关蛋白 1 前体、1 个点为微管蛋白 β 、2 个点为蛋白二硫异构酶、1 个为 FLN29 基因产物的类似物、1 个为胰蛋白酶 V-A 前体、1 个为过氧化物氧化还原酶 4. 其中 AFP 为特异表达于大鼠胚胎期及新生儿期胰腺的蛋白质, 在孕 18.5 天的胰腺中表达量最高, 在成年胰腺中极低表达. 对它们的功能和与胚胎胰腺代谢调节功能完善过程的可能关系进行了初步探讨.

关键词 大鼠胰腺, 发育, 双向凝胶电泳, 质谱分析, 肽质量指纹图, 蛋白质组学

学科分类号 Q51

大鼠胚胎胰腺来源于内胚层, 孕 8.5 天时, 内分泌细胞开始分化, 孕 9.5 天及 10.5 天时, 背侧及腹侧胰腺胚芽形成. 孕 16.5 天时, 腺泡和导管出现, 至孕 18.5 天时, 典型的胰腺结构形成. 大鼠胚胎 15.5 天至 18.5 天是胚胰细胞增生分化以及胰腺结构形成的关键阶段, 其中 β 细胞激增, α 细胞形成套索样围绕在其周围, δ 细胞也开始出现^[1,2]. 另外, 本实验室应用基因芯片技术分析孕 15.5 天和孕 18.5 天大鼠胚胎胰腺, 发现, 该阶段主要为功能细胞代谢调节开始完善的阶段. 而对于参与其胚胎胰腺发育的蛋白质目前却未见报道, 为此本实验针对 4 个不同发育时期的胰腺进行研究.

蛋白质双向凝胶电泳 (two-dimensional electrophoresis, 2DE) 和质谱 (mass spectrophoresis, MS) 技术是近些年来出现的研究蛋白质组学的两大重要技术. 蛋白质组学是“后基因组时代”蓬勃发展的技术体系, 其特点是采用高通量、高分辨率的蛋白质鉴定技术, 全景式地研究在特定条件下的蛋白质表达谱^[3], 并由此在蛋白质水平上获得对组织发育、疾病发生、细胞代谢等过程整体而全面的认识^[4]. 本文用蛋白质组学技术, 从整体水平上比较观察大鼠胚胎胰腺在不同发育时期蛋白质表达的差异, 有助于差异表达谱的建立, 从而有利于进一步寻找其胚胎胰腺发育过程中特异性的分子标志.

1 材料与方法

1.1 材料

固相 pH 梯度干胶条 IPG strip (pH 4~7L, 13 cm)、immobilized pH gradient (IPG) 缓冲液 (pH 4~7 L) 为 Amersham 公司产品. 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、尿素为 Promega 公司产品. CHAPS、二硫苏糖醇 (DTT) 为 BioRad 公司产品. PMSF、蛋白酶抑制剂 cocktail 为 Sigma 公司产品. 胰蛋白酶、 α 氨基-4-羟基肉桂酸 (CCA)、三氟乙酸 (TFA) 为 Roche 公司产品. 其余试剂为国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 组织分离: 成年 SD 大鼠 30 只, 雌性 20 只, 雄性 10 只, 于 18:00, 将雌雄以 1:2 合笼, 次日检测有阴栓者, 定为受精第 0.5 天 (E0.5). 取 E15.5, E18.5 母鼠, 引颈处死, 分离出胚胎, 按照 George 等方法显微解剖镜下用显微镊子取出胰腺^[5]. 新生鼠的取材为新生第一天的乳鼠胰腺, 成年鼠为 2 月龄大, 所有的胰腺取出后均用 PBS 洗

* 江苏省科委应用基础资助项目 (BZ2001046).

** 通讯联系人.

Tel: 025-86862728, Fax: 025-86862728

E-mail: dewei_98@yahoo.com

收稿日期: 2004-07-28, 接受日期: 2004-09-30

3 次后迅速在液氮中冷冻。

1.2.2 提取胰腺组织蛋白: 分别取 E15.5 的胰腺 100 只、E18.5 的胰腺 20 只、新生鼠的胰腺 6 只和成年鼠的胰腺 6 只 (雌雄各 3 只), 按照 1:5 的比例加入蛋白质裂解液 (7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 20 g/L CHAPS, 65 mmol/L DTT, 2% IPG 缓冲液, 1% 蛋白酶抑制剂 cocktail)^[6], 蛋白质提取后用 Bradford 法测蛋白质浓度, 分装于 -70℃ 冰箱备用。

1.2.3 双向聚丙烯酰胺凝胶电泳: 第一向固相 pH 梯度 (immobilized pH gradient, IPG) 等电聚焦主要按 Gorg 等^[7]方法和 IPGphor™ 等电聚焦指南进行, 50 μg 胰腺总蛋白质与水化液充分混合, 总体积 250 μl, 采用 PH 4~7, 13 cm 干胶条。水化和聚焦在 20℃ 自动进行, 总电压时间为 16 000 Vh, 其中低电压水化 30 V, 6 h; 60 V, 6 h; 聚焦 500 V, 1 h; 8 000 V, 2 h。等电聚焦结束后, 将每根 IPG 干胶条分别放入 10 ml 平衡液 A (含 1% DTT) 和 10 ml 平衡液 B (含 2.5% 碘乙酰胺) 中, 各平衡 15 min, 然后进行第二向进行垂直 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。

1.2.4 考马斯亮蓝染色和银染: 考马斯亮蓝染色取出凝胶, 在染色液 (含 0.16% 磷酸, 8% 硫酸铵, 20% 甲醇, 0.1% 考马斯亮蓝 G250) 染色 24 h 后, 去离子水漂洗 3 次后显出蛋白质点。银染则参

照文献 [8] 进行。

1.2.5 图象采集和分析: 将染色后的凝胶置于 Image Scanner 上透射扫描, 运用图象分析软件 Image Master 2D Elite 4.90 进行分析。该分析过程包括蛋白质点的检测, 量化和点的匹配。软件对扫描到的原始图象进行自动点检测, 选择 2 块凝胶之一作为参考胶, 进行匹配, 建立匹配点。

1.2.6 蛋白质斑点肽质量指纹谱的制备: 切取考马斯亮蓝染色的 2D 胶上目标蛋白质点, 用含 50% 乙腈, 25 mmol/L 碳酸氢钠振荡 20 min, 脱去胶中蓝色, 胶粒真空离心干燥, 加入胰酶 (0.05 g/L) 10 μl, 37℃ 保温反应 20 h, 5% 三氟乙酸溶液 120 μl 于 40℃ 保温 1 h, 吸出上清液, 2.5% 三氟乙酸, 50% 乙腈溶液 120 μl 于 30℃ 保温 1 h, 吸出上清液, 合并上清液冰冻干燥。

1.2.7 肽混合物的质谱分析: 冻干样品管中加 5 μl 0.5% 三氟乙酸溶液, 与基质混匀后取 1 μl 点于靶上做质谱分析。图 2b, c 中所示的蛋白质点 8~15 采用 ESI-MS 鉴定, 其余蛋白质点采用 MALDI-TOF-MS 鉴定。

2 结 果

2.1 大鼠不同发育时期胰腺的取材

取材时的显微照片见图 1。

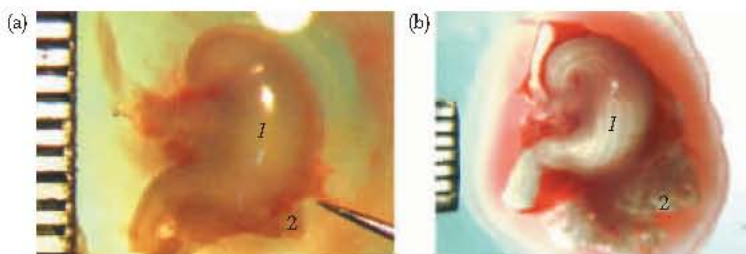


Fig. 1 Microgram of E15.5 and E18.5 rat stomach and pancreas

(a) E15.5 ($\times 40$), (b) E18.5 ($\times 25$). 1: Stomach; 2: Pancreas.

显微分离得到的 E15.5 的大鼠胰腺已初步显示出腺泡样结构, 本实验室应用 RT-PCR 的方法已证明 E15.5 和 E18.5 的大鼠胰腺 mRNA 中有胰岛素、胰高血糖素和胰多肽的表达 (结果未显示)。故在取材的准确性上得到了保证。

2.2 大鼠不同发育时期胰腺蛋白质组的 2D 电泳图谱

通过 2D 技术分别分离得到大鼠 E15.5、

E18.5、新生鼠和成年鼠的胰腺蛋白质图谱, 经过计算机的分析后, 4 组蛋白质双向电泳图谱重复性高, 随机选取 18 个在 E18.5 和成年胰腺中互相匹配的点进行重复性分析, 发现第一向偏差为 (4.81 ± 0.59) mm, 第二向偏差为 (4.50 ± 1.57) mm。在分子质量 14~200 ku, pH 4.0~7.0 的范围内分别分离出 (562 ± 13), (597 ± 10), (584 ± 12) 和 (583 ± 14) 个蛋白质点。

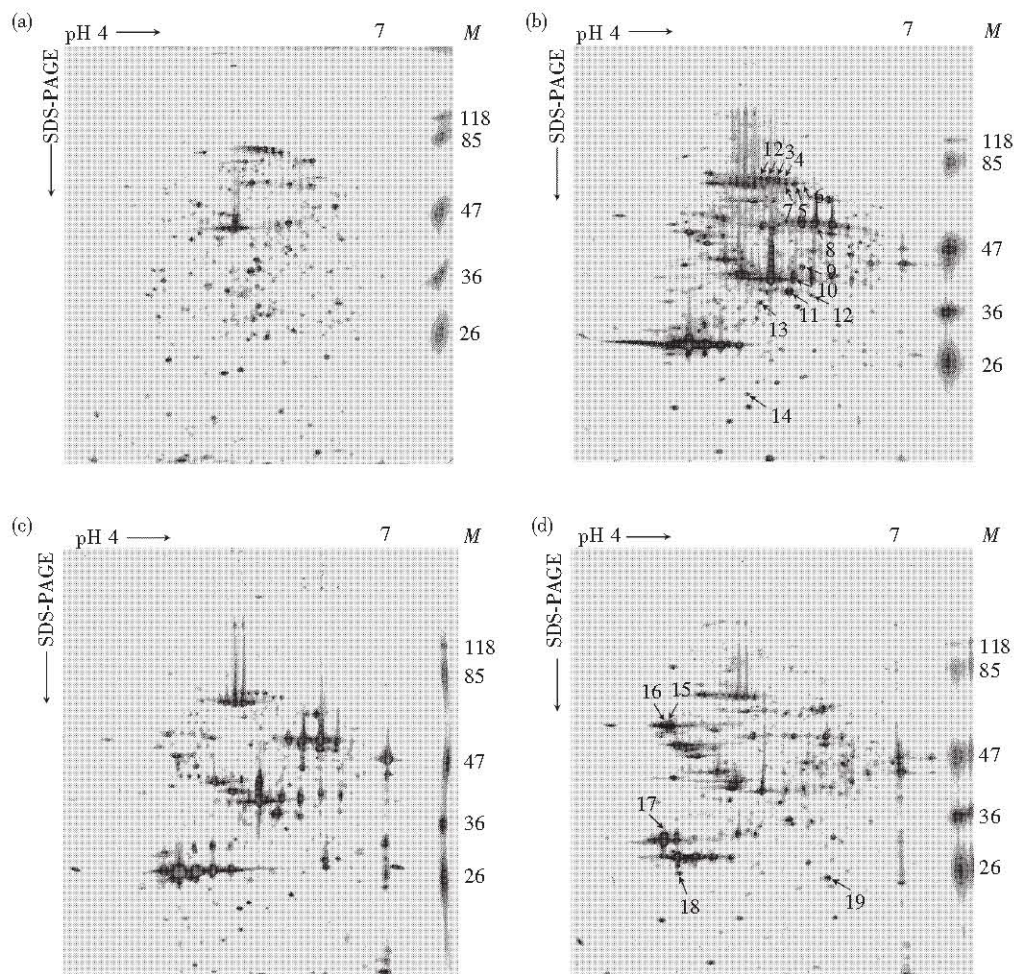


Fig. 2 2-D map of rat pancreas in different developmental stages performed with 50 μ g protein sample
(a) E15.5, (b) E18.5, (c) Newborn, (d) Adult. The first dimension was carried out on IPG strip (13 cm pH 4~7 L).
The second dimension was run on a homogenous SDS-polyacrylamide gel (12.5%). The proteins were detected by silver-staining.

2.3 不同发育时期大鼠胰腺蛋白质表达差异的分析
比较不同时期的胰腺蛋白质图谱,并用 Image Master 4.9 分析,在大鼠胚胎 18.5 天的胰腺和成年胰腺的图谱中,有 331 个点相匹配,达总数的 59%。从总体上看,孕 18.5 天、新生和成年胰腺的蛋白质表达谱较为一致,而孕 15.5 天的胰腺蛋白质表达谱与它们则有较显著的差异,主要表现在分子质量 26 ku、pH 5.0 左右的范围内,分子质量 42 ku、pH 5.6 左右的范围内,分子质量 80 ku、pH 5.2 左右的范围内,蛋白质表达量显著降低,有的甚至缺失。我们选出了 19 个在各组间有明显差异的点,其中点 2, 3, 5, 6, 7, 14 相对于成年胰腺是特异表达于胚胎期及新生期的胰腺中。而点 1, 4, 8, 9, 10, 11, 12, 13 为胚胎期高表达,而成年低表达。点 15, 16, 18, 19 为成年期特异

表达。点 17 为成年期高表达。
对于点 1, 2, 3, 4, 5, 7, 我们取其局部图像进行比较(图 3),并用所有点的吸光度 A 与其

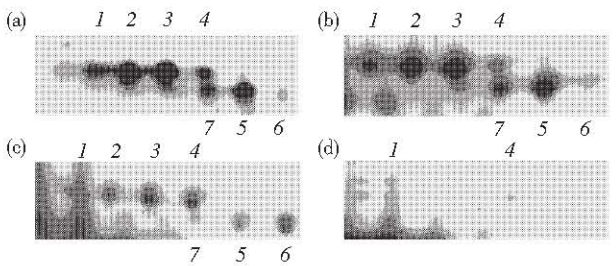


Fig. 3 Local 2-D map of rat pancreas in different developmental stages
(a) E15.5, (b) E18.5, (c) Newborn, (d) Adult.

面积值乘积的和来代表这些蛋白质点的表达水平 (表 1). 我们可以发现, E18.5 的表达水平是 E15.5 中的 1.4 倍, 而成年中的表达水平则很低.

Table 1 The relative abundance of the protein spots in the rat pancreas of different developmental stages

Spot NO.	E15.5	E18.5	Newborn	Adult
1	369.35	741.96	144.84	119.33
2	912.60	891.57	171.81	0
3	724.43	1 377.18	652.62	0
4	466.25	321.10	612.39	80.69
5	230.55	432.50	53.20	0
7	546.48	880.46	460.56	0
Total	3 249.66	4 644.77	2 095.42	200.02

The relative abundance of the protein spots is presented by the product of the A value and area value.

2.4 用质谱法鉴定蛋白质点

对于这 19 个差异蛋白质点进行 MALDI-TOF-MS 和 ESI-MS 质谱分析, 获得了 18 张质谱指纹图 (图 4 ~ 图 6). 图 4 是图 2b 中标号为 1 的蛋白质点

的 MALDI-TOF 质谱图. 图 5, 图 6 分别是图 2b 中标号为 8 的蛋白质点的高效液相图谱和酶解后片段的电喷雾质谱图.

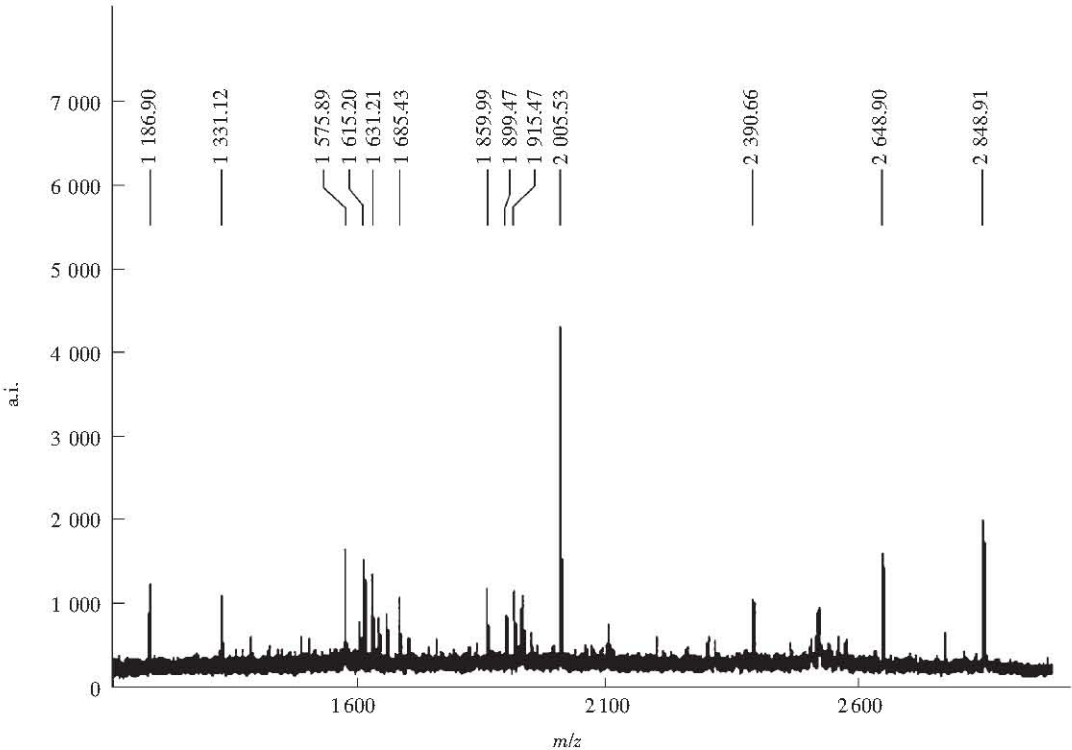


Fig. 4 Mass spectrum of the digest of protein 1 in the Figure 2b

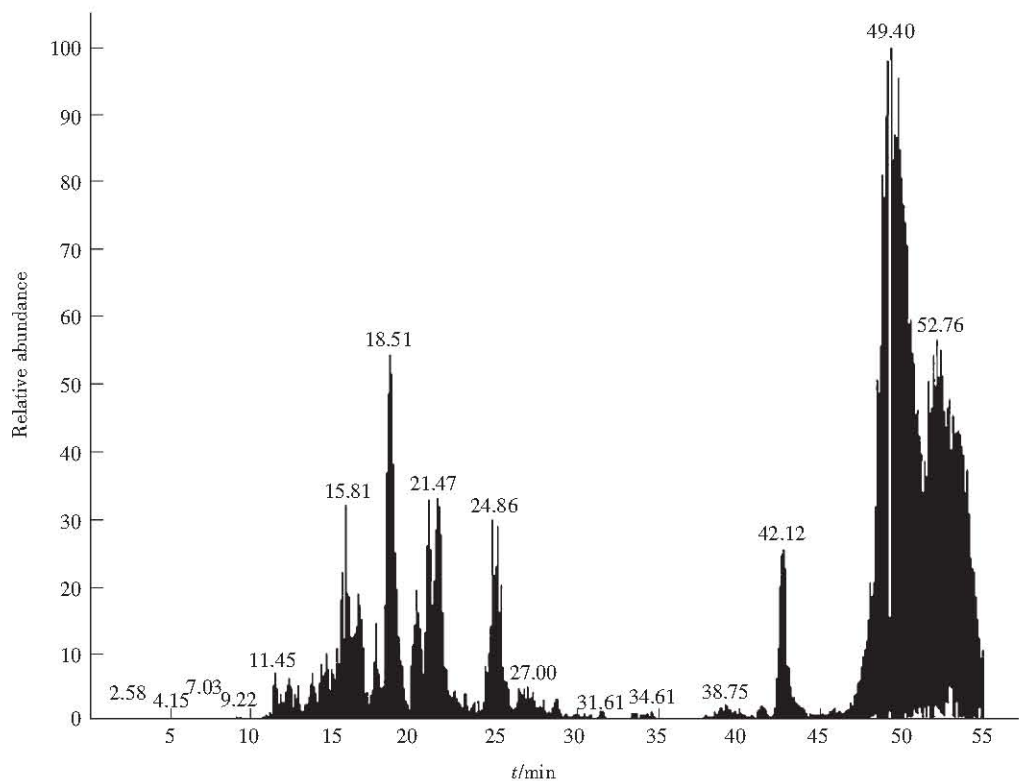


Fig. 5 HPLC result of the digest of protein 8 in the Figure 2b

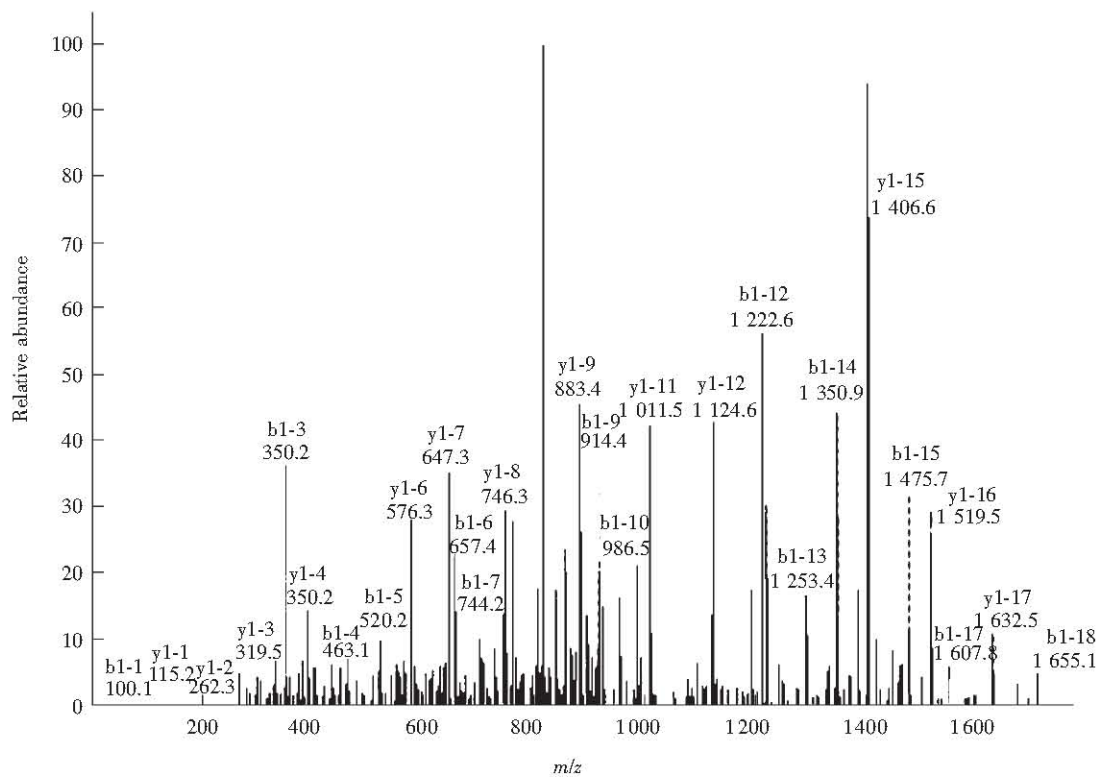


Fig. 6 Mass spectrum of the digest of protein 8 in the Figure 2b by ESI-MS

2.5 质谱结果的查询

将由 MALDI-TOF-MS 和 ESI-MS 得到的数据用 Biowork 软件进行网上查询, 主要是搜索大鼠蛋白

质非冗余数据库, 在数据库中匹配到符合结果要求的蛋白质 (表 2).

Table 2 Differentially-expressed protein identified by mass spectrometry

Spot ID	Swissprot ID	Theoretical Pi/M	Observed Pi/M	Sequence covered	Protein name
1	P02773	5. 77/68. 38	5. 39/77	16%	Alpha fetoprotein (AFP)
2	P02773	5. 77/68. 38	5. 46/76	27%	Alpha fetoprotein (AFP)
3	P02773	5. 77/68. 38	5. 54/76	26%	Alpha fetoprotein (AFP)
4	P02773	5. 77/68. 38	5. 61/76	25%	Alpha fetoprotein (AFP)
5	P02773	5. 77/68. 38	5. 69/74	31%	Alpha fetoprotein (AFP)
6 ¹⁾	(-)				
7	P02773	5. 77/68. 38	5. 61/74	29%	Alpha fetoprotein (AFP)
8	P54316	5. 79/52. 38	5. 88/57	69%	Pancreatic lipase related protein 1 precursor
9	P02773	5. 77/68. 38	5. 75/44	40%	Alpha fetoprotein (AFP)
10	P54316	5. 79/52. 38	5. 68/42	57%	Pancreatic lipase related protein 1 precursor
11	P54316	5. 79/52. 38	5. 64/39	54%	Pancreatic lipase related protein 1 precursor
12	P54316	5. 79/52. 38	5. 84/39	63%	Pancreatic lipase related protein 1 precursor
13	P05218	4. 78/49. 67	5. 38/37	55%	Tubulin beta 5
14	P54316	5. 79/52. 38	5. 30/22	22%	Pancreatic lipase related protein 1 precursor
15	P04785	4. 82/56. 95	4. 84/58	40%	Protein disulfide isomerase, pancreatic
16	P04785	4. 82/56. 95	4. 76/58	35%	Protein disulfide isomerase, pancreatic
17	Q8CFI8 ²⁾	5. 27/63. 88	4. 76/31	14%	Similar to FLN29 gene product
18	P32821	4. 93/26. 90	4. 91/25	49%	Trypsin V-A precursor
19	Q9Z0V5 ²⁾	6. 18/31. 21	6. 05/25	46%	Peroxiredoxin 4

¹⁾The mass spectrum was not obtained because of low protein abundance. ²⁾TrEMBL number because they are not in the Swiss Prot.

3 讨 论

本课题组应用芯片技术研究 E15. 5 和 E18. 5 胚胎胰腺的基因表达情况, 提取了它们的 mRNA, 并用基因芯片^[9]和 RT-PCR 的方法进行检测, 已证明 E15. 5 和 E18. 5 的大鼠胰腺 mRNA 中有胰岛素、胰高血糖素和胰多肽的表达 (结果未显示), 提示取出的组织为胰腺标本. 我们用质谱鉴定出的 7 种不同的蛋白质中, 有 5 种蛋白质的 mRNA 在芯片结果中均有表达. 所以从核酸和蛋白质两个水平证明了这些蛋白质的存在.

本实验一开始采用的胶条为 pH 3 ~ 10, 但从图谱上来看, 发现各组间的蛋白质表达差异集中于 pH 4 ~ 7 之间, 故后来采用了 pH 4 ~ 7 的胶条. 经过 3 次独立实验的重复, 得到的差异点是可靠的.

经数据库搜索到 18 个有意义的蛋白质点中, 1 ~ 7 号 (6 号除外) 蛋白质初步鉴定为大鼠的甲胎蛋白 (alpha fetoprotein). 它是胚胎期血浆蛋白的主要成分^[10,11]. AFP 是一个分子质量约为 66 ~ 72 ku 的糖蛋白, 由 590 个氨基酸组成的单多肽链. 1972 年, Gitlin 等^[12]首先发现 AFP 是由卵黄囊和胎肝合成, 随后通过组织培养的方法又发现了哺乳动物的许多组织都能合成 AFP, 尤其是那些消化道来源的组织. 前人已经发现小鼠 AFP 的 mRNA 表达于孕 9. 5 天的胚胎肝芽中, 并从这个时期到孕 13. 5 天, 其 mRNA 也表达于前肠和后肠的内胚层^[13]. 从鼠的胚胎胰腺发育来看, 其来源于前肠内胚层. 所以, 我们认为大鼠胚胎胰腺也是合成 AFP 的场所之一. 从本实验室前期所做的大鼠胚胎胰腺 E15. 5 和 E18. 5 的基因芯片中寻找有关 AFP 的 mRNA 表达

情况, 结果也发现 AFP 的 mRNA 均有表达, 并且 E18.5 中的表达水平为 E15.5 中的 2.8 倍 (结果未报道). 而蛋白质水平中, E18.5 的表达水平是 E15.5 中的 1.4 倍, 它们具有一致的趋势. AFP 向来被认为是诊断肝癌的一个重要指标, 并且其浓度的升高常与某些肿瘤的细胞增生或细胞修复相联系^[14,15]. AFP 具有运输物质的功能, 特别是能运输各种脂肪酸进入细胞为细胞分裂提供必要的物质. 另有研究证明 AFP 能加快细胞从 G1 期进入 S 期, 显著促进 DNA 的合成^[16]. 同时, 也有实验证明, AFP 促进 HeLa 细胞增殖的作用是通过影响细胞内的 cAMP, Ca^{2+} 以及 PKA 的活性, 进而促进一些原癌基因的表达来实现的^[17]. 因为在我们的结果中发现, AFP 在胚胎期中高表达, 而在成年期中极低表达, 所以认为大鼠胚胎胰腺合成的 AFP 对其细胞的增殖有促进作用, 以完善胚胎胰腺的功能, 促进其功能成熟. 我们在结果中也发现 AFP 在胚胎期和新生期有 6 个亚型, 前人通过等电聚焦的实验发现, 在 pH 4.5 ~ 5.2 的范围内出现了 AFP 的 9 个亚型^[18]. 我们认为这可能与 AFP 是糖蛋白有关, 由于糖基化过程中的差异, 导致糖结构的不均一性. 另一种可能就是 AFP 经过了磷酸化的修饰, 究竟是何种原因造成的, 还有待进一步的研究.

另一个被鉴定出来的蛋白质是胰脂酶相关蛋白 1 的前体, 胰脂酶相关蛋白 1 (pancreatic lipase related protein 1, PLRP1) 是脂肪酶家族的成员之一, 另外与之同源的还有胰甘油三酯脂肪酶 (PTL) 和胰脂酶相关蛋白 2 (PLRP2). 前人已有实验证明, PLRP1 和 PLRP2 均表达于大鼠胚胎胰腺, 而 PTL 则是待新生鼠出生后几周才表达^[19]. 由此可见, PLRP1 可能在新生鼠的脂肪吸收中起到一定的作用. 何延政等^[20]对 26 例不同胎龄的胎儿胰蛋白酶和脂肪酶的分泌功能进行了研究, 发现小于 21 周龄的胎儿胰腺不能合成胰蛋白酶和脂肪酶, 而 22 周胎儿的胰腺组织中开始出现上述两个酶. 结合我们的结果, 点 14 的匹配率较低, 加之它的分子质量较小, 可能是 PLRP1 前体的降解片段. 而点 10 ~ 12 其分子质量小于点 8, 但也被鉴定为 PLRP1 前体, 可能是 PLRP1 前体经过剪接后的产物. PLRP1 前体在胚胎期胰腺中高表达, 而在成年胰腺中低表达, 则说明 PLRP1 前体在胰腺外分泌功能完善中起到一定的作用.

蛋白二硫键异构酶 (protein disulfide

isomerase, PDI) 也是鉴定出的蛋白质之一, 它是一种折叠酶, 主要存在于内质网管腔中, 具有显著的非特异性多肽结合能力. 它主要是催化蛋白质分子中巯基与二硫键的交换反应, 并被普遍认为是催化细胞内蛋白质生物合成过程中天然二硫键形成的酶. 它在成年胰腺中出现而胚胎期缺失, 表明了胚胎期胰腺还没有完全成熟, 功能有待于进一步的完善.

总而言之, 通过质谱技术鉴定出的这些差异和特异表达的蛋白质, 在大鼠胚胎胰腺的功能完善过程起到一定的作用. AFP 特异表达于胚胎期及新生期的胰腺, 可能对胰腺发育后期的细胞增殖有着特殊的作用. PLRP1 前体在胚胎期及新生期的高表达说明其可能参与了外分泌功能的完善. 其他在成年中高表达的酶和酶原也充分说明了虽然 E18.5 胰腺从形态上看典型胰腺结构已经形成, 但功能仍有待完善. 我们鉴定出来的只是整个蛋白质表达谱中的一小部分, 为了进一步明确这些蛋白质的改变对于大鼠胚胎胰腺的成熟与功能完善的作用, 有必要对其他差异表达的蛋白质点也进行质谱分析, 并可借助免疫标记等技术对单个的蛋白质进行特征分析和细胞定位.

参 考 文 献

- 1 Stonge L, Wehr R, Gruss P. Pancreas development and diabetes. *Curr Opin Genet*, 1999, **9** (3): 295 ~ 300
- 2 Stack J M. Developmental biology of the pancreas. *Development*, 1995, **121** (6): 1569 ~ 1580
- 3 Wasinger V C, Cordwell S J, Cerpa-Poljak A, *et al.* Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*, 1995, **16** (7): 1090 ~ 1094
- 4 Blackstock W P, Weir M P. Proteomics: Quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Tren in Biot*, 1999, **17** (3): 121 ~ 127
- 5 Gittes G K, Galante P E. A culture system for the study of pancreatic organogenesis. *J Tiss Cult Meth*, 1993, **15** (6): 23 ~ 28
- 6 Hu L, Evers S, Lu Z H, *et al.* Two-dimensional protein database of human pancreas. *Electrophoresis*, 2004, **25** (3): 512 ~ 518
- 7 Gorg A, Obermaier C, Boguth G, *et al.* The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 2000, **21** (6): 1037 ~ 1053
- 8 Yan J X, Wait R, Berkelman T, *et al.* A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis*, 2000, **21** (17): 3666 ~ 3672
- 9 仲 燕, 袁 栋, 袁庆新, 等. 大鼠胚胎胰腺外分泌功能基因的表达调控. *世界华人消化杂志*, 2004, **12** (8): 1988 ~ 1990
- 10 Zhong Y, Yuan L, Yuan Q X, *et al.* *World J Gastroenterol*, 2004, **12** (8): 1988 ~ 1990
- 11 Bergstrand C G, Czar B. Demonstration of a new protein fraction in

- serum from the human fetus. *J Clin Lab Invest*, 1956, **8** (2): 174
- 11 Ruoslahti E, Seppala M. Alpha-fetoprotein in normal human serum. *Nature*, 1972, **235** (5334): 161 ~ 162
 - 12 Gitlin D, Perricelli A, Gitlin G M. Synthesis of Alpha-feto protein by liver, yolk sac, and gastrointestinal tract of the human conceptus. *Cancer Res*, 1972, **32**: 979 ~ 982
 - 13 Jones E A, Clement-Jones M, Oliver F W J, *et al.* Differences between human and mouse alpha-fetoprotein expression during early development. *J Anat*, 2001, **198** (Pt 5): 555 ~ 559
 - 14 Wang X W, Xu B. Stimulation of tumor cell growth by Alpha-fetoprotein. *Int J Cancer*, 1998, **75** (4): 596 ~ 599
 - 15 Wang X W, Xie H. Alpha-fetoprotein enhance the proliferation of human hepatoma cells *in vitro*. *Life Sci*, 1999, **64** (1): 17 ~ 23
 - 16 Li M S, Li P F, He S P, *et al.* The promoting molecular mechanism of alpha-fetoprotein on the growth of human hepatoma Bel 7402 line. *World J Gastroenterol*, 2002, **8** (3): 469 ~ 475
 - 17 李孟森, 李平凤, 李 刚, 等. 甲胎蛋白对Hela细胞增殖的促进作用. *生物化学与生物物理学报*, 2002, **34** (6): 769 ~ 774
 - Li M S, Li P F, Li G, *et al.* *Atac Biochem Biophys*, 2002, **34** (6): 769 ~ 774
 - 18 Sittenfeld A, Moreno E. A sensitive blotting system for detection of alpha-fetoprotein variants with monoclonal and polyclonal antibodies. *J Immuno Methods*, 1988, **106** (1): 19 ~ 26
 - 19 Payne R M, Sims H F, Jennens M L, *et al.* Rat pancreatic lipase and two related proteins: enzymatic properties and mRNA expression during development. *Am J Physiol*, 1994, **266** (5): 914 ~ 921
 - 20 何延政, 姚榛祥. 胎膜外分泌功能研究 II. *重庆医科大学学报*, 1995, **20** (1): 17 ~ 18
 - He Y Z, Yao Z X. *Bullet Chongqin Med Univ*, 1995, **20** (1): 17 ~ 18

Differentially Expressed Rat Pancreas Protein Profiles in The Different Developmental Stages *

ZHOU Jin-Yong¹⁾, HU Jing-Jing¹⁾, ZHONG Yan¹⁾, LIU Chao²⁾,
CAI Wei-Dong²⁾, YUAN Li¹⁾, TENG Li-Ping¹⁾, DE Wei¹⁾ **

(¹⁾ *Jiangsu Province Key Laboratory of Reproductive Medicine, Department of Biochemistry and Molecular Biology,
Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China;*

²⁾ *The Endocrine Department of The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)*

Abstract In order to reveal proteins differentially expressed in the process of rat pancreas development, two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry were performed on rat pancreas at different stages. After rat pancreas microseparated, protein extracted from of four stages: 15.5 embryonic days (E15.5), E18.5, newborn and adult were separated by immobilized pH gradient two-dimensional gel electrophoresis. Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and ESI-MS were performed with the proteins which were found to be significantly different presented in these four maps, 8 of which were down-expressed and 1 of which up-expressed at the adult stage, 4 of which specially expressed at adult stage while 6 of which specially expressed in E18.5 stage. All together 18 protein spots were identified. 7 spots were identified as alpha fetoprotein (AFP). 5 spots were pancreatic lipase related protein 1 precursor. 1 spot was tublin beta 5.2 spots were protein disulfide isomerase. The other 3 spots were similar to FLN29 gene product, Trypsin V-A precursor, and Peroxiredoxin 4. Among them, AFP specially expressed in new born and E18.5 stage. The development of pancreas gave rise to the changes of the protein expression patterns. This helps to understand the molecular mechanisms of rat embryonic pancreatic development.

Key words rat pancreas, development, two-dimensional gel electrophoresis, mass spectrometry, peptide mass fingerprinting, proteomics

* This work was supported by a grant from The Applied Basic Research Programs of Science and Technology Commission Foundation of Jiangsu Province (BZ2001046).

** Corresponding author. Tel: 86-25-86862728, Fax: 25-86862728, E-mail: dewei_98@yahoo.com

Received: July 28, 2004 Accepted: September 30, 2004