

水牛卵泡液差异蛋白质双向电泳方法的建立及质谱分析

黄愉淋, 黄德伦, 官俊良, 潘秋庄, 付强, 黄凤玲, 张明*, 卢克焕

(广西大学, 动物繁殖研究所, 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 南宁 530004)

摘要: 旨在研究沼泽型水牛成熟前后卵泡内差异表达蛋白质的变化规律。采用双向凝胶电泳技术分离成熟卵泡液和未成熟卵泡液总蛋白质, 建立和优化了卵泡液的双向电泳体系, 并使用质谱鉴定差异表达蛋白点。结果显示, 丙酮沉淀法处理得到的总蛋白质样品后, 在 24 cm(pH 4~7) 胶条且上样量 350 μ g 时得到分辨率较好的双向电泳图谱。软件分析得到 11 个差异蛋白点, 以成熟卵泡液作为对照, 5 个蛋白点表达上调, 3 个蛋白点表达下调, 1 个蛋白点缺失, 2 个蛋白点在未成熟卵泡液中特异性表达。质谱成功鉴定出 4 个蛋白质: 过氧化氢酶-2、醛糖还原酶、牛纤维蛋白原的晶体结构、转甲状腺素蛋白。该研究建立了良好的卵泡液双向电泳体系, 分析并鉴定一批水牛卵泡液差异蛋白质, 对于研究水牛卵母细胞的发育微环境和成熟机制提供了新的研究线索。

关键词: 水牛; 卵泡液; 蛋白质组; 双向电泳; 质谱鉴定

中图分类号: S823.8⁺3.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)08-1244-07

Establishment of Two Dimensional Electrophoresis Method and Mass Spectrometry Analysis of the Differential Proteins of Buffalo Follicular Fluid

HUANG Yu-lin, HUANG De-lun, GUAN Jun-liang, PAN Qiu-zhuang, FU Qiang, HUANG Feng-ling, ZHANG Ming*, LU Ke-huan

(State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-Bioresources, Animal Reproduction Institute, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract: This study was undertaken to evaluate protein expression differences between mature and immature follicular fluids of swamp buffalo in Guangxi. The research used two-dimensional gel electrophoresis (2DE) coupled to Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Tandem Mass Spectrometry (MALDI-TOF/TOF) to analyze the different proteins, and the establishment of a suitable 2DE system for separating buffalo follicular fluid proteins was described. The results indicated that acetone precipitation in a loading volume of 350 μ g in 24 cm IPG strips (pH 4-7) improved resolution and the quality of the 2DE maps, and 11 different expression protein spots were found with Image Master 2D platinum software. Compared with the mature follicular fluid 2DE map, 5 of these proteins were up-regulated in immature buffalo follicular fluid, 3 were down-regulated, 1 deleted and 2 proteins specifically expressed. Finally, 4 proteins were successfully identified by mass spectrometry; these are peroxiredoxin-2, aldose reductase, fibrinogen gamma-B chain precursor, and transthyretin precursor. In conclusion, an appropriate 2DE system for separating buffalo follicular fluid proteins was established and optimized. Different expression proteins from mature and immature buffalo follicular fluids were successfully

收稿日期: 2013-01-30

基金项目: 广西自然科学基金(2011GXNSFB018028); 国家自然科学基金(30860192); 高等学校博士点科研基金(20104501110001)

作者简介: 黄愉淋(1988-), 女, 壮族, 广西大化人, 硕士, 主要从事动物蛋白质组学研究, E-mail: huangyulin1016@163.com

* 通信作者: 张明, 教授, E-mail: mingzhang@gxu.edu.cn

analyzed and identified to provide new research insight into the developmental microenvironment and maturation mechanism for buffalo oocytes.

Key words: buffalo; follicular fluid; proteome; two-dimensional electrophoresis; mass spectrometry identification

卵泡中包含卵泡液、卵母细胞及颗粒细胞^[1], 卵泡液中的物质主要从血浆-卵泡屏障渗透而来, 因此卵泡液成分与血浆极为相似。卵泡液和颗粒细胞共同为卵母细胞的成熟和提供微环境, 颗粒细胞通过分泌蛋白和激素对卵母细胞发育起到调节作用^[2], 卵泡液作为卵母细胞发育成熟的重要场所, 包含着供给卵母细胞成熟、有丝分裂、排卵及受精等活动的相关物质^[3], 其中存在的多种蛋白质对于卵泡和卵母细胞的发育成熟也起着重要调控作用^[4]。C. Mendoza 等^[5]和 Y. Kawano 等^[6]已经验证了某些生长因子和蛋白质(生长激素(GH)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、巨噬细胞炎性蛋白(MIP-3))参与了卵母细胞的生长发育, 并在一定程度上对卵母细胞和卵泡的成熟起到重要的调节作用。

双向电泳(Two-dimensional electrophoresis, 2-DE)技术是蛋白质组学分析的经典技术^[7]。近年来, 已有报道应用双向电泳结合质谱技术鉴定出一些卵泡液差异蛋白, 如 T. Anahory 等^[8]通过 2-DE 技术在人的成熟卵泡中获取了 4 个差异蛋白点, 质谱鉴定对应 3 种蛋白: 甲状腺素运载蛋白、硫氧还蛋白及视黄醇结合蛋白。D. Spitzer 等^[9]应用双向电泳技术研究人成熟和未成熟卵泡液之间的蛋白表达情况, 结果表明两者间的蛋白表达差异显著。本研究采用双向电泳-质谱(2DE-MS)技术分析并鉴定水牛卵巢中成熟与未成熟卵泡液蛋白质表达的差异, 有助于揭示水牛卵母细胞发育成熟的相关机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 卵巢样本 卵巢均取自沼泽型水牛, 沼泽型水牛的细胞染色体核型 $2n=48$, 耐粗饲, 耐湿热, 适应性强, 主要分布于中国南方和东南亚等地。从本地屠宰场取材后, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 生理盐水中保存。

1.1.2 主要试剂 固相 pH 梯度胶条、IPG Buffer、碘乙酰胺 (IAA)、二硫苏糖醇 (DTT) 购于 GE 公司; 尿素 (Urea)、硫脲 (Thiourea)、CHAPS、胰蛋白酶、Tris、丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、TEMED、过硫酸铵和甘油均购于 Sigma 公司; 甲醇、甲醛、冰

醋酸、硫代硫酸钠、碳酸钠及硝酸银均为进口分装或国产分析纯。

1.1.3 主要仪器设备 IPGphor III 等电聚焦系统、Ettan DALTsix 垂直电泳系统、凝胶扫描仪 (美国 GE 公司), DU800 紫外分光光度计 (美国 Beckman 公司), 5804R 型冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司), A-10 型 Milli-Q 超纯水仪 (美国 Millipore 公司), 4800 型 MALDI-TOF/TOF 质谱仪 (美国 AB-Sciex 公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 卵泡液的收集与纯化 在无菌条件下, 用 10 mL 注射器分别抽取成熟卵泡和未成熟卵泡的卵泡液, $5\ 000\ \text{g}$ 离心 15 min, 取上清后于 $12\ 000\ \text{g}$ 再离心 10 min, 完全去除细胞碎片后, 将纯化后卵泡液分装于 1.5 mL EP 管中, 每管 $200\ \mu\text{L}$, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存备用。

1.2.2 卵泡液蛋白样品制备

1.2.2.1 丙酮沉淀法: 每 $200\ \mu\text{L}$ 卵泡液样品中加入 $800\ \mu\text{L}$ 预冷丙酮, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置 2 h, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $12\ 000\ \text{g}$ 离心 30 min, 弃上清, 预冷丙酮洗涤沉淀 2~3 次, 室温放置 5 min, 使残余丙酮完全挥发。加入裂解液 ($7\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素, $2\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫脲, 4% CHAPS, 1% DTT) 复溶, Bradford 法测定蛋白质浓度, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。SDS-PAGE 电泳预检测总蛋白样品。

1.2.2.2 2-D clean-up kit 法: 根据 2-D clean-up kit 试剂盒的操作步骤处理上述丙酮沉淀得到的卵泡液总蛋白样品, 将处理后的蛋白样品置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存备用。

1.2.3 双向电泳分离

1.2.3.1 一向等电聚焦 (IEF): 根据蛋白质定量结果, 在蛋白质裂解液中加入适量的水化液、IPG Buffer 和 DTT, 混合均匀至总体积达 $450\ \mu\text{L}$ 。将上样总蛋白样品加入胶条槽中, IPG 胶条胶面朝下轻轻盖住样品混合液, 避免产生气泡。最后加入矿物油覆盖防止溶液挥发。按照如下程序进行等电聚焦: $30\ \text{V}\ 6\ \text{h}$, $60\ \text{V}\ 6\ \text{h}$, $200\ \text{V}\ 1\ \text{h}$, $500\ \text{V}\ 1\ \text{h}$, $1\ 000\ \text{V}\ 1\ \text{h}$, $8\ 000\ \text{V}\ 10\ \text{h}$ (总计 $40\ 000\ \text{Vh}$)。

1.2.3.2 将等电聚焦后的 IPG 胶条放入 15 mL 平衡液 I 中(6 mol · L⁻¹ 尿素,2% SDS,1.5 mol · L⁻¹ Tris-HCl,87% 甘油,1% DTT),于摇床上平衡 15 min,再使用平衡液 II(6 mol · L⁻¹ 尿素,2% SDS,1.5 mol · L⁻¹ Tris-HCl,87% 甘油,4% IAA)平衡 15 min。

1.2.3.3 第二向 SDS-PAGE 电泳:平衡后的胶条转移至 12.5% 的 SDS-PAGE 凝胶顶端进行电泳,以恒流 15 mA · gel⁻¹ 电泳 15 min 后,增大电流到 25 mA · gel⁻¹,直至溴酚蓝指示剂迁移至凝胶底部停止电泳。

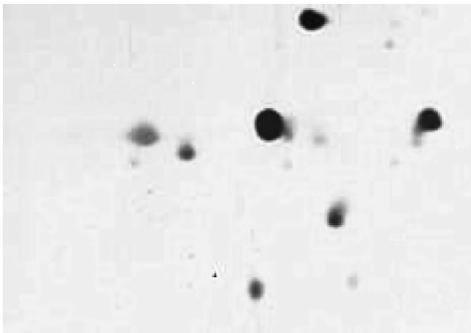
1.2.4 凝胶染色及图像分析 电泳结束后,取出玻璃板,将凝胶剥离后放入染色液中进行染色,银染程序参考 J. X. Yan 等^[10] 提供的方法进行。待染色结束后,使用 Image Scanner 扫描仪扫描凝胶图像,应用 Image Master 2D platinum 软件分析图像,光密度值差异 3 倍以上视为差异蛋白质点。

1.2.5 酶解及质谱鉴定 切取凝胶上差异蛋白质斑点,对胶粒进行漂洗、脱色、脱水、干燥、胰酶酶切、萃取处理后在 384 孔质谱靶上点样。用 4 800 MALDI-TOF/TOF 质谱仪采集一级、二级质谱数据。使用 Mascot 软件对一级、二级质谱数据进行综合分析。

2 结果与分析

2.1 不同蛋白提取方法的电泳结果

丙酮沉淀法和 2-D clean-up kit 法分别处理卵



A. 2-D clean-up kit 法;B. 丙酮沉淀法

A. 2-D clean-up kit method;B. Acetone precipitation method

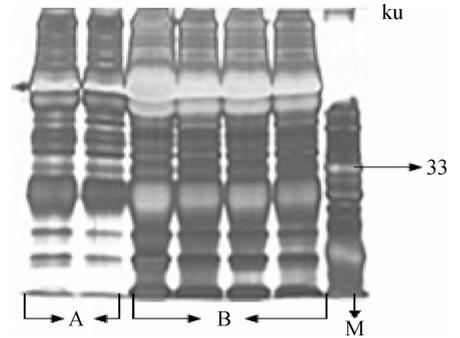
图 2 2 种不同蛋白提取方法的局部 2-DE 电泳图

Fig. 2 Amplified maps of 2-DE of differential two protein extraction methods

2.2 不同 pH 范围的 IPG 胶条电泳比较

丙酮沉淀法制备的等量蛋白质样品分别采用 pH 3~10 和 pH 4~7 的 24 cm IPG 胶条进行双向

电泳,电泳图谱如图 3 所示。从电泳图谱可以看出,pH 3~10 范围的胶条上蛋白质点分布较密集,分布不均,蛋白质斑点数量较少,一些低丰度蛋白未能呈

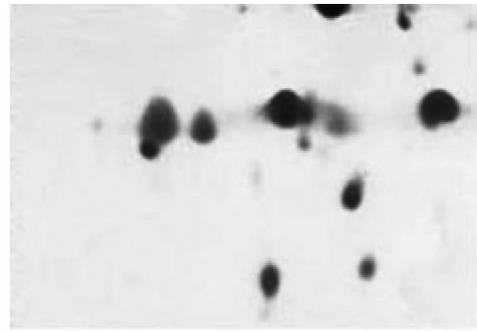


A. 2-D Clean-up kit 法;B. 丙酮沉淀法;M. 相对分子质量标准为 14.4~97.4 ku 的蛋白质 marker

A. 2-D Clean-up kit method;B. Acetone precipitation method;M. Protein marker (14.4 - 97.4 ku)

图 1 2 种样品处理方法的 mini SDS-PAGE 电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis maps of mini SDS-PAGE derived from two protein extraction methods

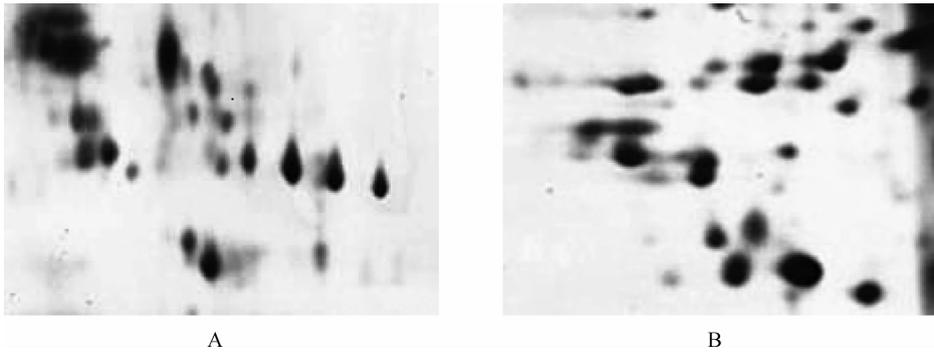


B

电泳,电泳图谱如图 3 所示。从电泳图谱可以看出,pH 3~10 范围的胶条上蛋白质点分布较密集,分布不均,蛋白质斑点数量较少,一些低丰度蛋白未能呈

现,pH 4~7 范围的 IPG 胶条双向电泳图谱具有较高的分辨率。因此,pH 4~7 范围的 IPG 胶条更适

用于卵泡液总蛋白质的分离。



A. pH 3~10 的 IPG 胶条 B. pH 4~7 的 IPG 胶条

A. IPG strips(pH 3-10) B. IPG strips(pH 4-7)

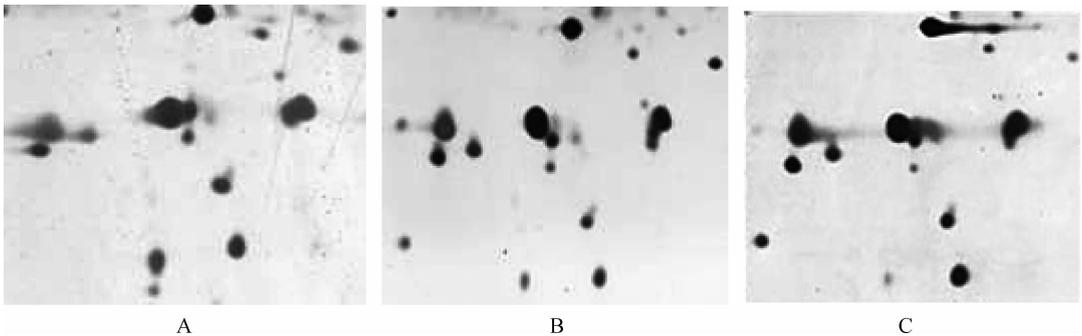
图 3 不同 pH 范围 IPG 胶条 2-DE 局部电泳图谱

Fig. 3 Amplified maps of differential pH range of IPG strips

2.3 不同上样量的 2-DE 图谱比较

使用 24 cm pH 4~7 的 IPG 胶条比较上样量分别为 250、350、450 μg 的 2-DE 电泳图谱,如图 4 所示,上样量为 250 μg 时,得到的蛋白质斑点较模糊,低丰度蛋白质显现较少;上样量为 350 μg 时,电泳图谱的蛋白质斑点较为清晰,整体分辨率更高。

上样量增加到 450 μg 时,因上样量过大导致图谱背景加深,高丰度蛋白质斑点拖尾严重,蛋白质斑点较多重叠或融合,不利于后续电泳图谱分析。因此,350 μg 的上样量时的电泳图谱较好,更适于卵泡液这类富含高丰度 BSA 或 IgG 的样品。



A. 上样量 250 μg ; B. 上样量 350 μg ; C. 上样量 450 μg

A. Sample loading volume of 250 μg ; B. Sample loading volume of 350 μg ; C. Sample loading volume of 450 μg

图 4 不同上样量的 2-DE 局部电泳图谱

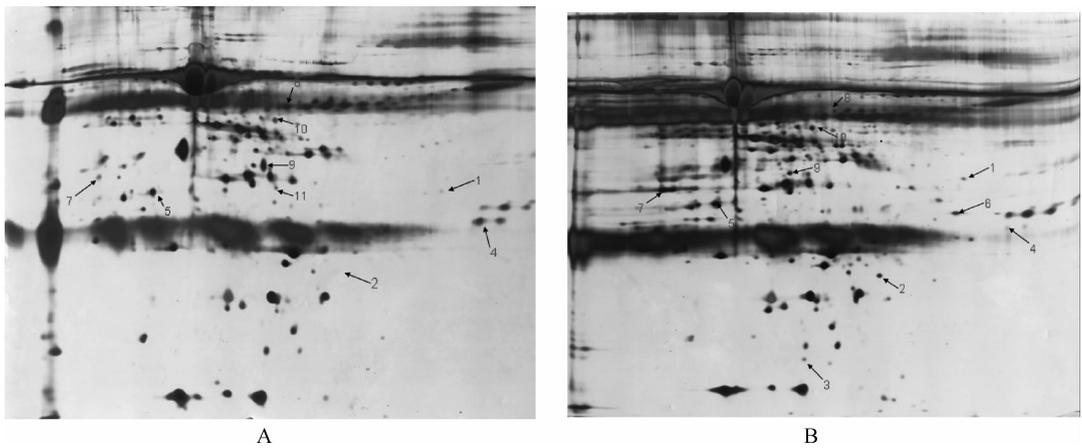
Fig. 4 Amplified maps of differential sample loading volume

2.4 差异表达蛋白的获取和鉴定

采用以上优化后的参数,对成熟卵泡液和未成熟卵泡液的总蛋白质进行双向电泳分离,试验重复 3 次,结果如图 5 所示。用 ImageMaster 2D platinum 软件对 6 张凝胶图谱分析匹配,共筛选出光密度值差异倍数在 3 倍以上的差异表达蛋白点 11 个。以成熟卵泡液作为对照组,5 个蛋白质表达上调(蛋白质点编号:1、2、5、7、10);3 个蛋白质表达下调(蛋

白质点编号 4、8、9),1 个蛋白质缺失(蛋白质点编号 11),2 个蛋白点在未成熟卵泡液中特异性表达(蛋白质点编号 3、6)。

将 11 个蛋白质表达差异点切取后胶内酶解并用于质谱鉴定,成功鉴定其中 4 个蛋白质(表 1),其中,过氧化物酶-2、醛糖还原酶在未成熟卵泡液中表达上调,纤维蛋白原晶体结构及转甲状腺素蛋白在未成熟卵泡液中表达下调。



A. 成熟卵泡液; B. 未成熟卵泡液

A. Mature follicular fluid; B. Immature follicular fluid

图 5 水牛成熟卵泡液和未成熟卵泡液蛋白质的 2-DE 图谱

Fig. 5 2-DE maps from buffalo mature and immature follicular fluid

表 1 差异蛋白质谱鉴定结果

Table 1 MS identification results of differential expression proteins

编号 Number	登录号 Bovine proteome No.	Uniprot 登录号 No.	蛋白质名称 Protein name	分子量/u Molecular weight	等电点 pI	表达规律 Eexpress rule
2	BT10759-PA	Q9BGI3	过氧化物酶-2 Peroxiredoxin-2	21 946	5.37	上调
7	BT29904-PA	P16116	醛糖还原酶 Aldose reductase	35 919	5.76	上调
8	BT19804-PA	P12799	纤维蛋白原晶体结构 Fibrinogen gamma-B chain precursor	59 115	5.54	下调
9	BT15087-PA	P02766	转甲状腺素蛋白 Transthyretin precursor	47 715	5.40	下调

3 讨论

差异蛋白质组学是将处于不同生理状态的样品进行蛋白质表达比较,筛选并鉴定出差异常表达蛋白质,根据这些蛋白质表达的变化规律揭示某些生物学现象或规律^[11]。本研究利用双向电泳-质谱技术对成熟和未成熟的水牛卵泡液总蛋白质比较分析,目的是寻找可能与卵母细胞成熟有关的蛋白质,阐明卵母细胞核质成熟微环境内的蛋白质变化规律,为提高卵母细胞体外成熟率和胚胎质量奠定理论依据。

在本试验中,共发现 11 个差异蛋白质斑点,并成功鉴定了其中的 4 个。过氧化物酶-2(Peroxiredoxin-2, PRDX2)在酵母中首次被发现,PRDX2 存在于多种组织如胎盘、肾上腺、胰腺、睾丸及生殖系

统中^[12-13]。牛的 PRDX2 蛋白质由 199 个氨基酸组成,分子量为 21 946 u,此蛋白质参与细胞的氧化还原调节,主要通过清除生物代谢过程中活性氧族类(Reactive oxygen species, ROS)中的 H_2O_2 来调节细胞生长发育和信号转导。S. Yang 等^[14]通过在小鼠卵巢研究中发现,PRDX2 基因在卵泡发育不同阶段均有表达,随着颗粒细胞发育阶段的推进,其表达量逐渐增强,但在卵母细胞中的表达量差异不显著。R. Romar 等^[15]研究发现,PRDX2 基因在母牛青春前期卵母细胞表达量低于青春期,表明该基因可能在青春期卵泡发育中发挥作用。而杨书红等^[16]通过对小鼠激素处理后促使卵泡大量发育后发现,PRDX2 mRNA 表达显著降低,其蛋白水平上也存在一定程度的下调。在本研究中,过氧化物酶-2(PRDX2)的蛋白表达量在未成熟卵泡液中高

于成熟卵泡液,PRDX2 在成熟卵泡液中的低表达降低了对 H_2O_2 的清除作用,保持了较高的 H_2O_2 水平行使信号分子作用,用以促进细胞的增殖分化。

醛糖还原酶(Aldose reductase, AR)是醛酮还原酶超家族的重要成员,在肾脏、心脏、血管、睾丸、胎盘、视网膜、骨骼肌及肺等多种组织中广泛存在^[17-18]。以烟酰胺腺嘌呤二核苷磷酸(NADPH)作为辅酶催化醛、酮类物质还原为醇类,是多元醇通路中关键的限速酶之一^[19]。H. G. Hers^[20]首次发现醛糖还原酶催化葡萄糖产生果糖,从而为精子的获能提供能量。A. H. Kaynard 等^[21]在大鼠饲料中添加过量的半乳糖后,大鼠排卵数减少且卵母细胞发育延迟。还有研究显示,使用醛糖还原酶抑制剂处理大鼠后,可在一定程度上防止卵母细胞退化缺损,AR 转基因鼠不孕或无法妊娠^[22];N. Iwata 等^[23]对小鼠卵巢的研究表明,AR 在间情期内表达量达到峰值,发情后浓度逐渐降低,4 h 内达到最低值,在表达量改变的同时,表达位置也从颗粒细胞迁移至卵泡内膜。本研究的结果表明,AR 在水牛未成熟卵泡液中表达较高,在成熟卵泡中表达量偏低,揭示了 AR 的表达量不仅和发情周期有关,而且在卵泡的各个发育阶段也存在类似的变化。AR 是多元醇代谢通路的限速酶,其表达量的下降意味着能量代谢水平的升高,有助于卵母细胞成熟和增殖。以上研究结果都证实了 AR 对雌性配子的发育存在负调节机制,在卵巢和胎盘中起重要作用。关于 AR 的作用机理仍不清楚,下一步的研究需要利用 Western blot 验证 AR 在卵泡液中的表达规律,并对颗粒细胞的醛糖还原酶基因 mRNA 定量分析。

纤维蛋白原是由肝脏合成的一种具有止血凝血功能的蛋白质,主要通过凝血酶的作用转变成纤维蛋白而发挥其功能^[24]。有研究表明 1972 年首次获得牛纤维蛋白原 X 片段结晶体,20 年后获得了 285 ku 的牛纤维蛋白原晶体结构。研究表明牛纤维蛋白原 γ 链 C-末端可直接作用于内皮细胞,从而导致内皮细胞发生功能性障碍。另有临床研究显示,体内纤维蛋白原含量的增加常表现为血栓形成倾向^[25]。本研究中牛纤维蛋白原晶体结构在水牛成熟卵泡液中呈上调趋势,与卵泡的发育成熟是否有关联,还有待进一步研究证实。

转甲状腺素蛋白(Transthyretin, TTR)又称前白蛋白,主要在肝脏、胰腺及脉络丛等部位合成^[26]。它作为一种运载蛋白,主要以四聚体形式运输甲状

腺素和视黄醇蛋白。因 TTR 代谢周期较短而能够敏锐的反映出机体的营养状况,通常在营养不良、感染或其它应激性疾病下 TTR 水平会下降^[27]。本研究结果显示,转甲状腺素蛋白(TTR)在水牛成熟卵泡液中表达上调,这可能是由于随着卵泡的不断生长发育,需要更多的营养成分来维持和保证其成熟,因此 TTR 水平会相应有所上升。同时由于排卵前需要大量的促黄体素(LH),而 TTR 能够转运甲状腺素来刺激颗粒细胞产生 LH 受体,因此在成熟卵泡液中需要更多的转甲状腺素蛋白(TTR)来促进排卵的过程。

4 结 论

本研究建立了水牛卵泡液的双向电泳体系,分析成熟和未成熟卵泡液的差异蛋白质并用于质谱鉴定。结果表明,丙酮沉淀法处理得到的蛋白质样品用于 24 cm、pH 4~7 胶条上样 350 μ g 时,可以得到分辨率较好的 2DE 图谱。经软件分析得到 11 个差异蛋白质点,质谱成功鉴定出 4 个,分别是:过氧化物酶-2、醛糖还原酶、牛纤维蛋白原的晶体结构、转甲状腺素蛋白。这些差异蛋白质在成熟前后卵泡液中起着的调节作用,对卵泡的成熟发育产生重要影响,差异蛋白质的表达规律与其功能吻合,其具体作用机制还有待进一步研究探讨。

参考文献:

- [1] FORTUNE J E. Ovarian follicular growth and development in mammals [J]. *Biol Reprod*, 1994, 50(2): 225-232.
- [2] HESS K A, CHEN L, LARSEN W J. The ovarian blood follicle barrier is both charge- and size-selective in mice [J]. *Biol Reprod*, 1998, 58(3): 705-711.
- [3] EPPIG J J, PENDOLA F L, WIGGLESWORTH K, et al. Mouse oocytes regulate metabolic cooperativity between granulosa cells and oocytes: amino acid transport [J]. *Biol Reprod*, 2005, 73(2): 351-357.
- [4] ANDERSEN M M, KROLL J, BYSKOV A G, et al. Protein composition in the fluid of individual bovine follicles [J]. *J Reprod Fertil*, 1976, 48(1): 109-118.
- [5] MENDOZA C, RUIZ-REQUENA E, ORTEGA E, et al. Follicular fluid markers of oocyte developmental potential [J]. *Hum Reprod*, 2002, 17(4): 1017-1022.
- [6] KAWANO Y, FUKUDA J, NASU K, et al. Production of macrophage inflammatory protein-3 α in human

- follicular fluid and cultured granulosa cells [J]. *Fertil Steril*, 2004, 82(Supplement 3):1206-1211.
- [7] GRANIER F. Extraction of plant proteins for two-dimensional electrophoresis [J]. *Electrophoresis*, 1988, 9(11):712-718.
- [8] ANAHORY T, DECHAUD H, BENNES R, et al. Identification of new proteins in follicular fluid of mature human follicles [J]. *Electrophoresis*, 2002, 23(7-8):1197-1202.
- [9] SPITZER D, MURACH K F, LOTTSPREICH F, et al. Different protein patterns derived from follicular fluid of mature and immature human follicles [J]. *Hum Reprod*, 1996, 11(4):798-807.
- [10] 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 [J]. *Electrophoresis*, 2000, 21(17):3666-3672.
- [11] 何大澄, 肖雪媛. 差异蛋白质组学及其应用 [J]. 北京师范大学学报(自然科学版), 2002, (4):558-562.
- [12] CHAE H Z, KIM H J, KANG S W, et al. Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin [J]. *Diabetes Res Clin Pr*, 1999, 45(2):101-112.
- [13] GODOY J R, FUNKE M, ACKERMANN W, et al. Redox atlas of the mouse: Immunohistochemical detection of glutaredoxin-, peroxiredoxin-, and thioredoxin-family proteins in various tissues of the laboratory mouse [J]. *BBA-General Subjects*, 2011, 1810(1):2-92.
- [14] YANG S, LUO A, HAO X, et al. Peroxiredoxin 2 inhibits granulosa cell apoptosis during follicle atresia through the NFkB pathway in mice [J]. *BiolReprod*, 2011, 84(6):1182-1189.
- [15] ROMAR R, DE SANTIS T, PAPILLIER P, et al. Expression of maternal transcripts during bovine oocyte *in vitro* maturation is affected by donor age [J]. *Reprod Domest Anim*, 2011, 46(1):e23-e30.
- [16] 杨书红, 王 硕, 袁 明, 等. Prdx2 在促性腺激素预处理的小鼠卵巢中的表达 [J]. 实用医学杂志, 2012, 28(5):708-711.
- [17] LEE K W Y, KO B C B, JIANG Z, et al. Overexpression of aldose reductase in liver cancers may contribute to drug resistance [J]. *Anti-cancer Drug*, 2001, 12(2):129-132.
- [18] LEFRANOIS-MARTINEZ A M, BERTHERAT J, VAL P, et al. Decreased expression of cyclic adenosine monophosphate-regulated aldose reductase (AKR1B1) is associated with malignancy in human sporadic adrenocortical tumors [J]. *J Clin Endocr Metab*, 2004, 89(6):3010-3019.
- [19] 李增玉, 张焕萍. 醛糖还原酶与炎症性疾病 [J]. 中国当代医药, 2012, 19(16):17-18.
- [20] HERS H G. The mechanism of the transformation of glucose in fructose in the seminal vesicles [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1956, 22(1):202.
- [21] KAYNARD A H, PERIMAN L M, SIMARD J, et al. Ovarian 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and sulfated glycoprotein-2 gene expression are differentially regulated by the induction of ovulation, pseudopregnancy, and luteolysis in the immature rat [J]. *Endocrinology*, 1992, 130(4):2192-2200.
- [22] 郝 丽, 李树峰, 严云勤. 哺乳动物卵巢中的细胞凋亡及其调节 [J]. 东北农业大学学报, 2003, 34(4):469-473.
- [23] IWATA N, HARA S, NISHIMURA C, et al. Hormonal regulation of aldose reductase in rat ovary during the estrous cycle [J]. *Eur J Biochem*, 2004, 235:444-448.
- [24] GUO M, DAINES D, TANG J, et al. Fibrinogen- γ C-terminal fragments induce endothelial barrier dysfunction and microvascular leak via integrin-mediated and rhoa-dependent mechanism [J]. *Arterioscl Thromb Vas*, 2009, 29(3):394-400.
- [25] 王永先, 包 斌, 宋瑞瑞, 等. 纤维蛋白原的空间结构特征 [J]. 生理科学进展, 2012, 43(5):397-400.
- [26] BECK F K, ROSENTHAL T C. Prealbumin: a marker for nutritional evaluation [J]. *Am Fam Physician*, 2002, 65(8):1575-1580.
- [27] 白晓苏, 龚莉琳, 张素华, 等. 肥胖患者转甲状腺素蛋白水平的研究 [J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(10):970-972.