

亚健康便秘人群结肠黏膜蛋白质组的筛选 鉴定与临床应用*

邓辉^{1)**} 张运丽^{1)**} 钟白云^{1)***} 刘蔚东²⁾ 晏群¹⁾ 冯斯斯¹⁾ 肖志强³⁾

¹⁾中南大学湘雅医院检验科, 长沙 410008; ²⁾中南大学湘雅医院卫生部肝胆肠外科研究中心, 长沙 410008;

³⁾中南大学湘雅医院, 卫生部肿瘤蛋白质组学重点实验室, 长沙 410008)

摘要 筛选亚健康便秘人群结肠黏膜变化的分子标志物, 为亚健康便秘人群的结肠黏膜改变机制提供理论依据. 采用双向凝胶电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)对亚健康便秘人群及健康志愿者结肠黏膜组织进行蛋白质分离, ImageMaster 2D Elite 分析软件进行图像分析, 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)得到相应的肽质量指纹图(peptide mass fingerprint, PMF), 搜索数据库鉴定差异蛋白. 建立了亚健康便秘人群及健康志愿者结肠黏膜组织 2-DE 图谱, 分析出其凝胶的平均蛋白质点数(501.00 ± 37.16 , 536.00 ± 41.63), 两者平均差异蛋白质点数为 46.00 ± 7.82 , 取 20 个表达量明显改变的蛋白质点进行质谱分析, 鉴定出 17 个蛋白质. 其中 7 个蛋白质点表达下调, 10 个蛋白质点表达上调. 差异蛋白质点包括蛋白质合成与分解、分子伴侣、氧化还原调节及信号传导等相关蛋白质. 随即应用免疫印迹(Western blot)技术分析差异蛋白 β -actin、YWHAZ 及 PBP- I (phosphatidylethanolamine-binding protein I) 在两类组织中的表达水平及临床意义. 结果表明, 亚健康便秘人群和健康志愿者的结肠黏膜组织蛋白表达存在差异, β -actin、YWHAZ 表达下调及 PBP- I 上调参与了亚健康便秘的发生, 对此状态进行合理干预, 可使身体向健康转化.

关键词 结肠黏膜, 亚健康, 便秘, 蛋白质组, 免疫印迹

学科分类号 R 446.1, R 574.6

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00341

亚健康是机体处于健康和疾病之外的一种状态, 据世界卫生组织一项全球性调查结果表明, 全世界真正健康的人仅占 5%, 经医生检查、诊断有病的人也只占 20%, 75% 的人处于亚健康状态. 中国约有 60% (约 7 亿) 的人处于亚健康状态. 亚健康状态处理得当, 身体可向健康转化; 反之, 则患病. 因此, 对亚健康状态的研究, 是本世纪生命科学的重要组成部分. 目前研究涉及神经、免疫、内分泌、心理精神等诸多方面^[1-2], 但其确切的发生机制尚不清楚. 其消化道主要表现为便秘、大便不成形等. 便秘是消化道常见症状, 发病率高, 主要表现为排便困难, 便质干燥、坚硬, 伴排便不尽感, 常伴有腹胀或腹痛, 肛门阻塞感, 甚至需要手法帮助排便, 严重影响人们身体健康和生活质量. 本研究应用双向凝胶电泳技术(2-DE)对亚健

康便秘患者和健康志愿者的结肠黏膜组织进行分析, 以期发现其蛋白质表达的差异, 为揭示亚健康人群便秘及结肠相关疾病的发病机制及治疗提供依据.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 结肠黏膜组织. 亚健康人群便秘组 49 例(10

* 国家高技术研究发展计划(863)亚健康专题项目(2006AA02Z437, 2007AA02Z422).

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人.

Tel: 0731-84327438, Fax: 0731-88881468

E-mail: byzhong88@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-07-21, 接受日期: 2011-09-26

例用于蛋白质组, 39 例用于免疫印迹), 诊断均符合罗马 III 有关便秘的诊断标准, 病程均为 2 到 3 个月. 健康志愿者对照组共 47 例(10 例用于蛋白质组, 37 例用于免疫印迹), 肠镜下肠黏膜基本正常, 无息肉、溃疡性结肠炎和其他肠道疾病, 且结肠活检钳的钳夹深度只能至黏膜层, 以保证组织的纯度. 每例分别于回盲部、直肠、乙状结肠各部位取活检组织 2 块, 共 6 块, 于冰盐水(含 0.1 mmol/L PMSF)中清洗干净, 滤纸吸去多余的液体, 立即置液氮中速冻保存备用, 此过程在组织离体 10min 内完成. 经中南大学湘雅医院医学伦理委员会批准, 所有组织均取自中南大学湘雅医院.

1.1.2 材料. 超纯尿素(urea)、硫脲(sulfocarbamide)、丙烯酰胺(acrylamide)、甲叉 - 双丙烯酰胺(N, N'-methylenebisacrylamide)、十二烷基磺酸钠(SDS)、过硫酸铵(APS)、碘乙酰胺(indoacetamide)均为 Sigma 公司产品; 蛋白质定量试剂盒(2D Quant Kit)、固相 pH 梯度干胶条(IPG strip pH3-10NL, 24 cm)、IPG 缓冲液(pH3-10NL)、两性电解质(pharmalyte, pH3-10)、覆盖液、双向凝胶电泳标准蛋白质、二硫苏糖醇(DTT)、甘氨酸(glycine)、Tris、CHAPS、TEMED、溴酚蓝、化学发光自显影试剂盒、聚偏二氟乙烯(PVDF)膜和蛋白质小分子质量 Marks 为美国 Amersham 公司产品; 兔抗人 β -actin 抗体、兔抗人 YWHAZ 抗体、兔抗人 PBP- I 抗体、鼠抗人 Tublin 抗体和辣根过氧化物酶标记山羊抗兔(抗鼠)二抗等为美国 Santa Cruz Biotechnology 公司产品; 其余为国产分析纯.

1.1.3 仪器. IPGphor 等电聚焦仪(Pharmacia Biotech 公司); Ettan DALT 垂直电泳槽(Amersham Biosciences 公司); Imagescanner 扫描仪(Amersham Biosciences 公司); 低温高速离心机(Beckman 公司); 电泳仪与转移仪(美国 Bio-Rad 公司).

1.1.4 计算机分析软件. Amersham Biosciences 公司的 ImageMaster 2D version 5.0 软件.

1.2 方法

1.2.1 结肠黏膜组织蛋白质的提取. 按 40 mg 样品加 300 μ l 组织裂解液的比例加入裂解液(8 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 4% CHAPS, 4% TritonX-100, 40 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, 65 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF), 振荡混合均匀后置 4 $^{\circ}$ C 在匀浆器中手工匀浆, 冰上孵育 2 h, 然后于 15 000 g、4 $^{\circ}$ C

离心 1 h, 吸取上清液即为结肠上皮组织的总蛋白质. 同时用蛋白质定量试剂盒(2D Quant Kit)测定蛋白质浓度.

1.2.2 第一向固相 pH 梯度(IPG)等电聚焦. 操作步骤主要参照 IPGphor 等电聚焦系统使用指南及本课题组前期研究方法进行^[9], 组织总蛋白质提取液加入水化液(8 mol/L 尿素, 4% CHAPS, 40 mmol/L Tris, 65 mmol/L DTT, 0.5% IPG 缓冲液 pH3~10, 痕量溴酚蓝), 1.75 μ l IPG 缓冲液, 1 μ l 两性电解质, 充分混合, 使上样总体积控制在 350 μ l. 将样本均匀吸入胶条槽中, 胶面向下放入 IPG 干胶条, 与电极紧密接触, 避免气泡产生. 然后滴加覆盖液 600 μ l, 置于 IPGphor 等电聚焦仪上. 确定胶条槽的电极与聚焦仪面板接触正确, 关上安全盖. 设置程序, 使水化和聚焦均在 20 $^{\circ}$ C 下进行, 总电压时间积为 69 900Vh, 其中于 30V 低电压水化 10 h, 然后经过 100V 1 h、500V 1 h、1 000V 1 h, 最后稳定在 8 000V 下进行等电聚焦 8.5 h. 等电聚焦后, IPG 胶条分别在平衡液 A(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8, 6 mol/L 尿素, 30%甘油, 20 g/L SDS, 痕量溴酚蓝, 10g/L DTT)和平衡液 B(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8, 6 mol/L 尿素, 30%甘油, 20 g/L SDS, 痕量溴酚蓝, 25 g/L 碘乙酰胺)中各平衡 15 min.

1.2.3 第二向垂直 SDS-PAGE. 将平衡后的胶条移至 12.5%的 PAGE 分离胶上端. 胶条一端加低分子量电泳标准蛋白质, 排净气泡后用琼脂糖封胶. 电泳参数: 16 mA 恒定电流电泳 15 min, 待溴酚蓝前沿移入 PAGE 胶时, 以 32 mA 恒定电流电泳, 直至溴酚蓝前沿抵达胶边缘处, 停止电泳.

1.2.4 蓝银染色. 将凝胶在固定液(甲醇 400 ml/L, 冰乙酸 100 ml/L, 去离子水 500 ml/L)中固定 40 min, 脱色液(乙醇 250 ml/L, 冰乙酸 80 ml/L, 去离子水 670 ml/L)中脱色 2 min, 0.2 g/L 蓝银染色液中染色 60 min, 然后在脱色液中分别脱色 10 min、20 min 后, 更换脱色液过夜. 亚健康人群便秘组与健康志愿者对照组各 10 例分别进行双向凝胶电泳.

1.2.5 凝胶图像分析. 凝胶经 Imagescanner 扫描仪及 LabScan 扫描软件扫描, 获取图像应用 Amersham Biosciences 公司的 ImageMaster 2D 软件进行图像分析. 在相同的实验条件和参数设置条件

下, 当便秘组凝胶中的蛋白质表达较健康志愿者组凝胶明显增强或降低(校正后蛋白质点的表达量相差 2 倍以上), 并在不少于 50% 的该组凝胶图谱中表达, 视为差异蛋白质点。

1.2.6 Western blot 验证分析. 抽提蛋白质后经 Bradford 法测定蛋白质浓度. 每孔上样 30 μg 蛋白质, 电泳分离胶浓度为 12%, 积层胶浓度为 5%, SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳. 凝胶中的蛋白质电转至 PVDF 膜, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 PVDF 膜, 用热合机密封塑料袋口 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜; 洗膜加一抗(β -actin 1 : 2 000、YWHAZ 1 : 1 500、PBP- I 1 : 2 000、Tublin 1 : 2 000)37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h; 加入羊抗兔或抗鼠的第二抗体, 同样用封闭液稀释, 稀释比为 1 : 2 000, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h; 化学发光自显影进行蛋白质信号检测. 利用 EAGLE EYE™ II 图像分析仪对 X 光胶片上的条带进行吸光度扫描定量, 分析测定面积的积分吸光度值(I_A), 各靶蛋白的表达量以同一样本靶蛋白与对照 Tublin 两条带信号强度比值衡量, 按公式计算目的蛋白表达的相对水平。

$$\text{靶蛋白的相对表达量}(I_A \text{ 比值}) = \frac{\text{靶蛋白片段的 } I_A}{\text{对照 Tublin 的 } I_A}$$

1.2.7 统计学分析. 应用 SPSS17.0 软件对 Western blot 数据进行处理, 采用独立样本 t 检验 (independent samples t test) 或配对 t 检验 (paired samples t test), $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 亚健康便秘组和健康志愿者组结肠黏膜蛋白质组 2-DE 图谱

经图像分析显示, 在相同设定值条件下获取的蛋白质点, 以其中一块胶为参考胶进行 3 块胶间的蛋白质点匹配. 图 1a 所示为健康志愿者对照组结肠黏膜组织双向凝胶电泳平均胶图谱, 图 1b 所示为便秘组结肠黏膜组织双向凝胶电泳平均胶图谱. 健康志愿者对照组平均胶蛋白质斑点数为 536.00 ± 41.63 , 便秘组平均胶蛋白质斑点数为 501.00 ± 37.16 , 两者平均差异蛋白质点数为 46.00 ± 7.82 。

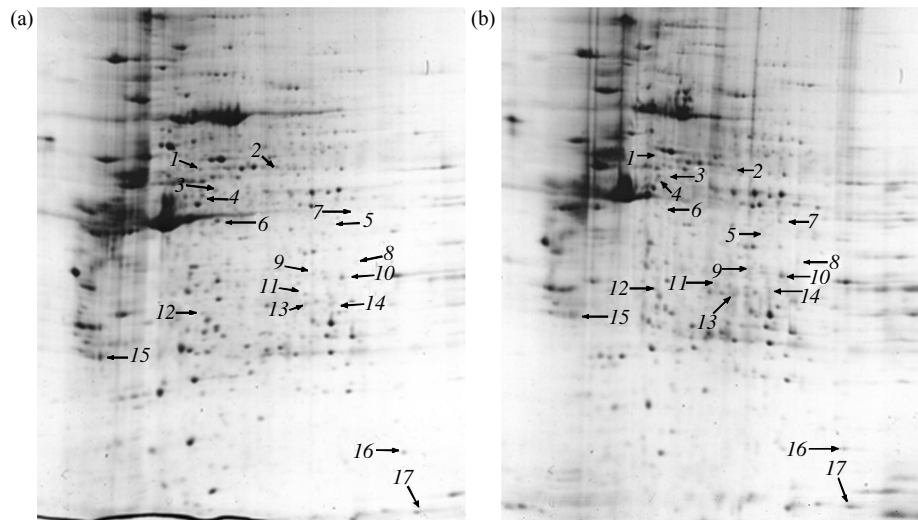


Fig.1 2-DE map of intestinal mucosa from healthy controls(a) and sub-healthy people with constipation(b)

The gel was visualized by silver staining. 17 differential expression protein spots are labeled with arrows.

2.2 差异蛋白质点的质谱鉴定

比较两组平均胶, 选取 20 个表达有明显差异蛋白质点做质谱鉴定. 经 MALDI-TOF 质谱鉴定获取肽质量指纹图谱, 采用 Mascot 搜索数据库, 20

个差异蛋白质点中有 17 个得到鉴定, 其中有 7 个蛋白质点表达水平明显下调, 10 个蛋白质点表达水平明显上调. 15 号蛋白质点质谱鉴定结果见图 2, 17 个质谱鉴定蛋白质点的详细信息见表 1。

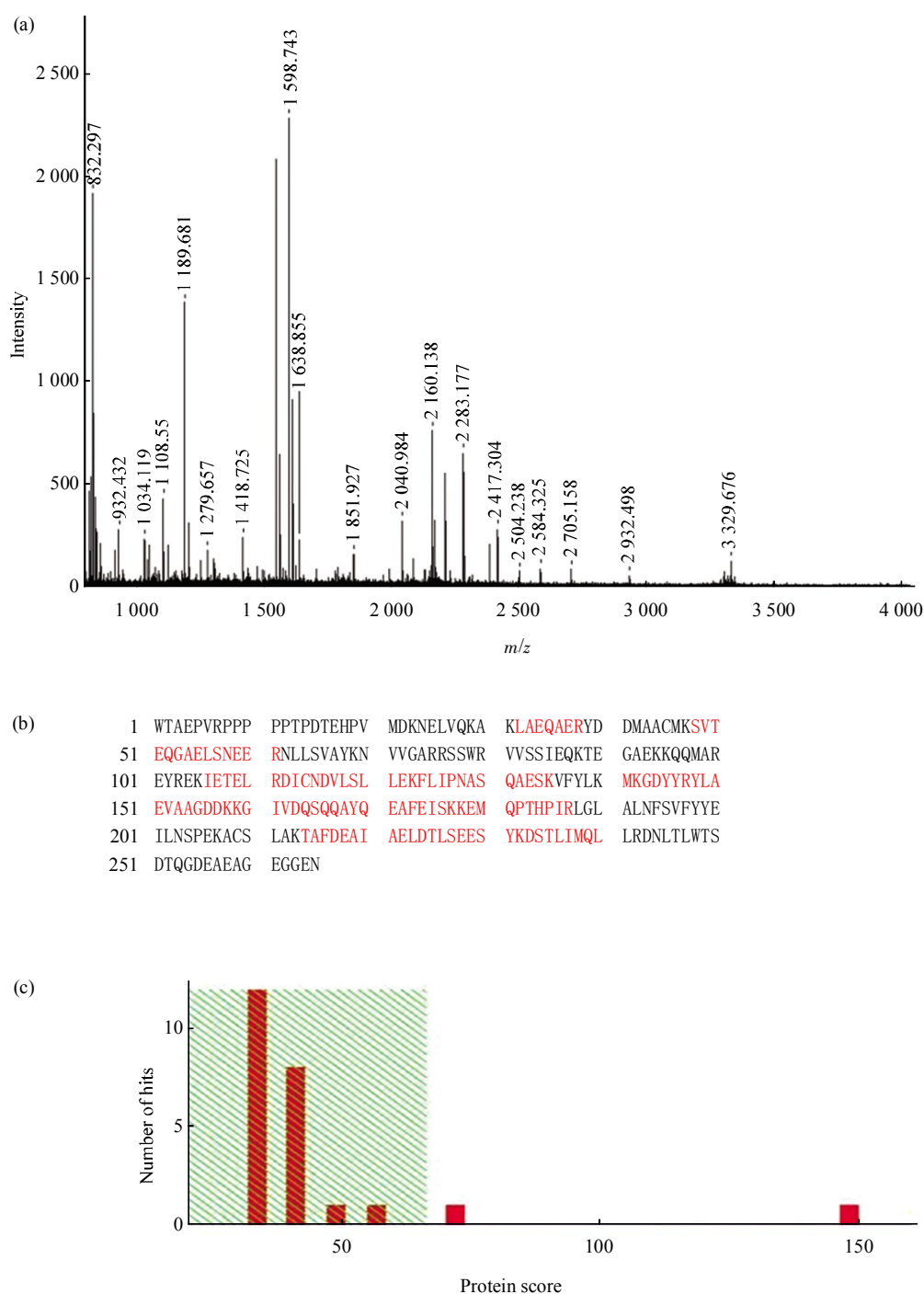


Fig. 2 MALDI-TOF-MS analysis of differential protein spot 15

(a) The MALDI-TOF-MS mass spectrum of spot 15, which is identified as YWHAZ protein according to the matched peaks. (b) Protein sequence of YWHAZ protein shows, and matched peptides is indicated in bold red. (c) The top score of YWHAZ protein is shown, and the top score is 146.

Table 1 MALDI-TOF-MS identified proteins in constipation group vs. healthy controls group

Spot No.	Swiss-Prot AC	Protein name	Score	pI	M/u	Expression in constipation group ¹⁾	Protein function
1	P05787	Keratin, type II cytoskeletal 8Cytokeratin-8	183	5.52	53 500	↓	Cytoskeleton
2	P00352	Aldehyde dehydrogenase 1 A1	80	6.30	55 500	↓	Metabolism
3	gi 223460206	ZNF658 protein	65	8.91	97 362	↓	Protein synthesis
4	Q8NBS9	Thioredoxin like protein p46	75	5.63	48 300	↓	Adjust oxidoreduction
5	Q9NR45	Sialic acid synthase	113	6.29	40 700	↑	Adjust oxidoreduction
6	gi 14250401	β-Actin	111	5.56	41 321	↓	Cytoskeleton
7	Q15365	Poly(rC) - binding protein 1	98	6.66	38 000	↑	Molecular chaperones
8	P04406	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase GAPDH	74	8.22	35 700	↑	Metabolism
9	P10768	Esterase D	79	6.54	32 000	↑	Metabolism
10	gi 4502517	Carbonic anhydrase I	93	6.59	28 909	↑	pH regulation
11	Q15661	Tryptase beta 1	95	6.85	29 900	↑	Signal transduction
12	Q9UL46	Proteasome activator complex subunit 2	92	5.44	27 500	↑	Signal transduction
13	P30039	MAWD binding protein	97	6.06	32 100	↑	Unknown function
14	gi 17402865	Thiosulfate sulfurtransferase	131	6.77	33 636	↓	Protein metabolism
15	gi 49119653	YWHAZ protein	146	4.72	30 100	↓	Signal transduction
16	gi 4505621	Phosphatidylethanolamine-binding protein I	121	7.01	21 158	↑	Signal transduction
17	gi 10863927	Peptidyl-prolyl cistrans isomerase A	120	7.68	18 229	↑	Signal transduction

¹⁾ ↑ show that spot intensity ≥ 2 -fold increased in constipation group in comparison to healthy controls group; ↓ show that spot intensity ≥ 2 -fold decreased in constipation group in comparison to healthy controls group.

2.3 部分差异表达蛋白质 Western blot 验证与临床应用

为了验证比较蛋白质组学的结果及了解部分差异表达蛋白质的临床应用, 采用蛋白质印迹检测 β-actin、YWHAZ 及 PBP- I 在亚健康便秘组和健康志愿者结肠黏膜中的表达水平. 利用 EAGLE EYE™ II 图像分析仪对 X 光胶片上的条带进行吸光度扫描定量, 分析测定面积的积分吸光度值(I_A), 各靶蛋白的表达量以同一样本靶蛋白与对照 Tublin 两条带信号强度比值衡量, 计算出目的蛋白 β-actin、YWHAZ 及 PBP- I 表达的相对水平(表 2,

图 3), 亚健康便秘组的 β-actin 与 YWHAZ 表达量与 Tublin 表达量相对比值较健康志愿者组明显下降, 而 PBP- I 表达量与 Tublin 表达量相对比值较健康志愿者组表达上调. 对 39 例亚健康便秘者进行心理疏导、饮食调理及运动指导等干预, 2 个月后, 便秘症状得到明显改善的为 34 例(87.18%), 其中有 23 位同意肠镜下取标本进行检测, 结果显示干预后亚健康便秘者(intervened sub-health) β-actin 与 YWHAZ 表达水平上调, 而 PBP- I 下调, 基本与健康志愿者组一致(表 2, 图 3).

Table 2 Relative expression of β -actin, YWHAZ and PBP- I in healthy controls and sub-health people ($\bar{x} \pm s$)

	<i>n</i>	β -Actin	<i>t</i>	<i>P</i>	YWHAZ	<i>t</i>	<i>P</i>	PBP- I	<i>t</i>	<i>P</i>
Healthy controls	37	0.93 \pm 0.08			0.78 \pm 0.06			0.45 \pm 0.06		
Sub-health constipation	39	0.43 \pm 0.06	9.27	0.00*	0.37 \pm 0.04	7.83	0.00*	0.91 \pm 0.08	-8.62	0.00*
Sub-health constipation	23	0.41 \pm 0.06	-8.34	0.00**	0.39 \pm 0.05	-7.67	0.00**	0.90 \pm 0.08	9.09	0.00**
Intervened sub-health	23	0.88 \pm 0.07	1.24	0.22*	0.72 \pm 0.07	0.94	0.35*	0.43 \pm 0.05	0.15	0.89*

* *P* value by independent samples *t* test, healthy controls *vs* sub-health constipation and intervened sub-health; ***P* value by paired samples *t* test, sub-health constipation *vs* intervened sub-health.

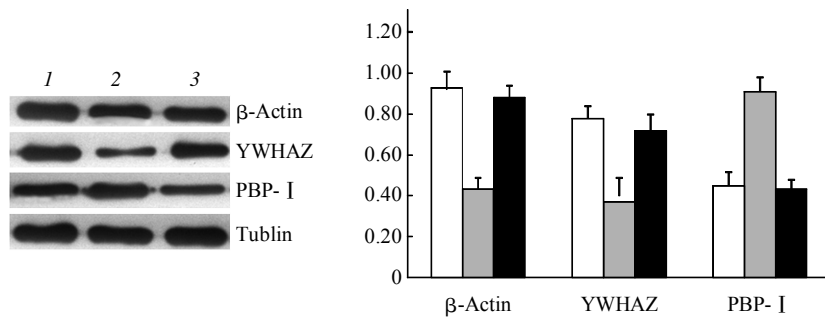


Fig. 3 A representative Western blot analysis of β -actin, YWHAZ and PBP- I in healthy control group(lane 1)、sub-health people with constipation(lane 2) and intervened sub-health(lane 3)

Compared with healthy control group, sub-health people with constipation have an obvious down-regulation of β -actin and YWHAZ, and a marked up-regulation of PBP- I, and intervened sub-health almost the same. □: Healthy controls; ■: Sub-health constipation; ■: Intervened sub-health.

3 讨 论

亚健康是机体处于健康和疾病之外的一种状态，前苏联 Berkman 以及后来的学者研究发现，人体除了健康状态(第一状态)和疾病状态(第二状态)外，尚存在一种介于这二者间的状态，称为第三状态，即亚健康^[4]。便秘发生原因十分复杂，可以是结肠的传输功能受损(运动失调)，也可因肛管括约肌功能失调引起^[5]。在绝大多数情况下，诊断便秘时肠道并无器质性改变^[6]。其发生机制有神经递质作用机制、cajal 间质细胞作用机制、胃肠激素作用机制、肠神经系统作用机制，还有精神心理因素参与其中^[7-11]。这些研究都为便秘的发生机制提供了细胞分子生物学的基础，但以上机制均不能完全诠释便秘的发生机制。蛋白质组学能从组织脏器整体水平上研究蛋白质的属性(表达水平、翻译后修饰、相互作用等)，并由此在蛋白质水平上获得对疾病过程、细胞生理生化过程和调控网络的广泛而完整的认识^[12]。运用蛋白质组学双向凝胶电泳的研究方法，通过比较健康志愿者组和亚健康便秘

组结肠黏膜组织电泳图谱，得到蛋白质在表达数量上的差异，这些存在表达差异的蛋白质为认识便秘发生机制提供线索。

本文结果显示，亚健康便秘组较健康对照组有 7 个蛋白质点表达明显下调，即细胞角蛋白 8、乙醛脱氢酶 1、锌指蛋白 658、硫氧还蛋白样蛋白、 β -actin、硫代硫酸硫转移酶、YWHAZ 蛋白。乙醛脱氢酶 1 位于胞浆内，是一类以多种醛类为底物的酶类，健康志愿者结肠黏膜组织中有较低表达甚至无表达。研究发现，乙醛脱氢酶 1 在膀胱癌组织中有高表达^[13]。锌指蛋白 658 的锌指结构由多个半胱氨酸和 / 或组氨酸组成，通过锌离子来维持结构的稳定性。锌指通过与目的基因的 DNA 或 RNA 结合，或锌指之间的相互作用来调控基因表达，以调控蛋白质的表达。锌指蛋白通过与神经元一氧化氮合酶(nNOS)启动子结合来调控 NO 的表达^[14]，NO 作为胃肠道的抑制介质，能激活鸟苷酸环化酶，使 cGMP 生成增多，改变细胞膜功能，使肠道平滑肌松弛，NO 的过多或过少分布及活动异常都将使胃肠功能发生障碍^[15]。 β -actin 是一类高度保守的蛋白

质, 存在于肌细胞中, 参与运动、迁移等重要生理活动. Kondrikov 等^[16]研究发现, β -actin 表达下调能抑制 NOS- β -actin 相互作用, 从而调控 NO 的表达. 但本研究发现 β -actin 表达下调, 可能导致结肠运动功能紊乱和调节 NO 的表达变化而引起便秘. 硫代硫酸硫转移酶, 是体内的一种酶, 参与蛋白质代谢, 能将硫从硫代硫酸盐或硫代硫酸酯转移至氧化物或 H_2S . 硫代硫酸硫转移酶缺乏或减少导致肠道 H_2S 过高, 在一些慢性肠道疾病中起着重要作用^[17]. 硫代硫酸硫转移酶表达下调在便秘中的作用还有待进一步的研究. YWHAZ 蛋白是高度保守的 14-3-3 蛋白家族的成员, 14-3-3 蛋白可通过和不同含磷酸丝氨酸位点的蛋白质结合介导信号转导, 参与许多细胞生命过程, 包括氧化还原的调节、代谢途径的调节、RNA 转录、蛋白质合成、折叠及降解、细胞增殖、分化、凋亡及衰老、细胞黏附等^[18-23]. Rodriguez 等^[24]发现肌动蛋白参与细胞骨架和细胞运动, 而 14-3-3 蛋白在肌动蛋白合成的连接信号通路中有多重调节作用. YWHAZ 蛋白表达下调可能与细胞能量代谢和运动有关, 导致结肠运动功能紊乱而引起便秘.

10 个蛋白质点的表达明显上调, 即唾液酸酶、多聚胞嘧啶结合蛋白 1, 3- 磷酸甘油醛脱氢酶、脂酶 D、碳酸酐酶 I、类胰蛋白酶 β -1、蛋白酶体激活复合物亚基 2、MAWD 结合蛋白、磷脂结合蛋白 I (PBP- I) 和肽基脯氨酰顺反异构酶. 蛋白质序列中的丝氨酸 / 苏氨酸 - 脯氨酰键的磷酸化, 是控制细胞周期循环、调节细胞增殖和分化的关键性信号调节机制. 肽基脯氨酰顺反异构酶能使蛋白质中磷酸化的丝氨酸 / 苏氨酸 - 脯氨酰键异构化, 由顺式变为反式, 调节磷酸化蛋白质活性. 这种复杂信号机制的失调可导致细胞转化和肿瘤, 在人类疾病发生中起关键作用. Magli^[25]的研究表明, 高表达的肽基脯氨酰顺反异构酶能抑制肌肉分化. Bao 等^[26]研究了人类 60 种类型的肿瘤组织中表达, 结果显示在最常见的肿瘤如前列腺癌、乳腺癌、宫颈癌、脑瘤、肺癌、结肠癌中均存在过度表达. 钙磷脂结合蛋白 I 是表皮生长因子受体酪氨酸激酶的磷酸化底物, 在多种肿瘤早期发现钙磷脂结合蛋白 I 的表达水平发生变化. 钙磷脂结合蛋白 I 作为表皮生长因子受体酪氨酸激酶底物, 磷脂酶 A2 的抑制剂, 在细胞生长、分化、中性粒细胞游出、神经分泌、神经变性、细胞内信号转导等多方面均有重要调节作用. 近年来, 它在肿瘤组织中的表达及其作

用机制成为研究的热点. 碳酸酐酶 I 是一种含锌的金属酶, 主要分布在红细胞和消化道, 碳酸酐酶催化的底物 CO_2 及 HCO_3^- 和 H^+ 与人体多种生理和病理活动关系密切. 随着碳酸酐酶同工酶的不断发现, Rasheed 等^[27]发现碳酸酐酶通过调节肿瘤微环境 pH 和 O_2 浓度参与肿瘤发展过程. 这可能解释了长期慢性便秘患者导致大肠癌的发生几率增加的原因.

本研究建立了亚健康便秘人群及健康志愿者结肠黏膜组织蛋白质二维电泳图谱, 发现亚健康便秘人群和健康志愿者的结肠黏膜组织蛋白质表达存在差异, 亚健康便秘人群 β -actin 与 YWHAZ 蛋白表达下调, 而 PBP- I 蛋白表达上调, 通过对 39 例亚健康便秘者进行心理疏导、饮食调理及运动指导等干预, 2 个月后, 34 例便秘症状得到明显改善, 其中 23 例再次肠镜下取标本复检, 发现 β -actin、YWHAZ 及 PBP- I 蛋白表达水平基本达到健康志愿者水平, 证明了亚健康状态处理得当, 则身体可向健康转化, 在此状态是最佳干预及治疗点. β -actin、YWHAZ 及 PBP- I 参与了便秘的发生, 可望作为诊断便秘的潜在标志物.

参 考 文 献

- [1] Levine A M, Whitsett J A, Hartshorn K L, *et al.* Surfactant protein D enhance clearance of influenza A virus from the lung *in vivo*. *J Immunol*, 2001, **167**(10): 5868-5873
- [2] Ahmed M, Vellani C W, Awiti A O. Medical education: meeting the challenge of implementing primary health care in sub-saharan Africa. *Infect Dis Clin North Am*, 2011, **25**(2): 411-420
- [3] 钟白云, 范学工, 刘蔚东, 等. 外周血单个核细胞二维凝胶电泳图谱的建立. *中南大学学报(医学版)*, 2007, **32**(2): 299-303
Zhong B Y, Fan X G, Liu W D, et al. J Central South University (Medical Sciences), 2007, **32**(2): 299-303
- [4] Ma J H. 21 century self-help manual for health. Beijing: China Light Industry Press, 2001: 231-235
- [5] Gourley G R, Yang L, Higgins L, *et al.* Proteomic analysis of biopsied human colonic mucosa. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2010, **51**(1): 46-54
- [6] Rasquin A, Di Lorenzo C, Forbes D, *et al.* Childhood functional gastrointestinal disorders: Child/adolescent. *Gastroenterology*, 2006, **130**(5): 1527-1537
- [7] 包云光, 舒小莉, 李小兵, 等. 肠神经系统递质和 Cajal 间质细胞在大鼠慢传输型便秘中的作用. *中国当代儿科杂志*, 2009, **11**(6): 481-485
Bao Y G, Shu X L, Li X B, et al. Chin J Contemporary Pediatrics, 2009, **11**(6): 481-485
- [8] Geramizadeh B, Hayati K, Rahsaz M, *et al.* Assessing the interstitial cells of Cajal, cells of enteric nervous system and neurotransmitters

- in slow transit constipation, using immunohistochemistry for CD117, PGP9.5 and serotonin. *Hepatogastroenterology*, 2009, **56**(96): 1670-1674
- [9] Tomita R. Regulation of the peptidergic nerves (substance P and vasoactive intestinal peptide) in the colon of women patients with slow transit constipation: An *in vitro* study. *Hepatogastroenterology*, 2008, **55**(82-83): 500-507
- [10] Tomita R, Igarashi S, Fujisaki S, *et al.* The effects of neurotensin in the colon of patients with slow transit constipation. *Hepatogastroenterology*, 2007, **54**(78): 1662-1666
- [11] Devanarayana N M, Rajindrajith S. Association between constipation and stressful life events in a cohort of Sri Lankan children and adolescents. *J Trop Pediatr*, 2010, **56**(3): 144-148
- [12] Ding Y, Lu B, Chen D, *et al.* Proteomic analysis of colonic mucosa in a rat model of irritable bowel syndrome. *Proteomics*, 2010, **10**(4): 2620-2630
- [13] Su Y, Qiu Q, Zhang X, *et al.* Aldehyde dehydrogenase 1 A1-positive cell population is enriched in tumor-initiating cells and associated with progression of bladder cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2010, **19**(2): 327-337
- [14] Dieter S, Barbara S, Heidi P, *et al.* Complex regulation of human neuronal nitric-oxide synthase exon 1c gene transcription. Essential role of Sp and ZNF family members of transcription factors. *J Biol Chem*, 2002, **277**(28): 25798-25814
- [15] 林进汉, 李仲荣, 徐 辉, 等. Cajal 间质细胞、CGRP 和 nNOS 在慢性便秘儿童乙状结肠中的表达. *中华小儿外科杂志*, 2008, **29**(9): 526-528
Lin J H, Li Z R, Xu H, *et al.* *Chin J Pediatr Surg*, 2008, **29** (9): 526-528
- [16] Kondrikov D, Elms S, Fulton D, *et al.* eNOS-beta-actin interaction contributes to increased peroxynitrite formation during hyperoxia in pulmonary artery endothelial cells and mouse lungs. *J Biol Chem*, 2010, **285**(46): 35479-35487
- [17] Levine J, Ellis C J, Furne J K, *et al.* Fecal hydrogen sulfide production in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*, 1998, **93**(1): 83-87
- [18] Aitken A. 14-3-3 proteins: A historic overview. *Semin Cancer Biol*, 2006, **16**(3): 162-172
- [19] Shikano S, Coblitz B, Wu M, *et al.* 14-3-3 proteins: regulation of endoplasmic reticulum localization and surface expression of membrane proteins. *Trends Cell Biol*, 2006, **16**(7): 370-375
- [20] Pozuelo R M, Geraghty K M, Wong B H, *et al.* 14-3-3-affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation and trafficking. *Biochem J*, 2004, **379**(2): 395-408
- [21] Satoh J, Nanri Y, Yamamura T. Rapid identification of 14-3-3 binding proteins by protein microarray analysis. *J Neurosci Methods*, 2006, **152**(1-2): 278-288
- [22] Hermeking H. 14-3-3 proteins and cancer biology. *Semin Cancer Biol*, 2006, **16**(3): 161
- [23] 谭双香, 李 君, 肖志强, 等. 基因甲基化导致鼻咽癌组织 14-3-3 σ 表达下调. *生物化学与生物物理进展*, 2009, **36**(6): 743-749
Tan S X, Li J, Xiao Z Q, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2009, **36**(6): 743-749
- [24] Rodriguez L G, Guan J L. 14-3-3 regulation of cell spreading and migration requires a functional amphipathic groove. *J Cell Physiol*, 2005, **202**(1): 85-94
- [25] Magli A, Angelelli C, Ganassi M, *et al.* Proline isomerase Pin1 represses terminal differentiation and myocyte enhancer factor 2C function in skeletal muscle cells. *J Biol Chem*, 2010, **285** (45): 34518-34527
- [26] Bao L, Kimzey A, Sauter G, *et al.* Prevalent overexpression of prolyl isomerase Pin1 in human cancers. *Am J Pathol*, 2004, **164**(5): 1727-1737
- [27] Rasheed S, Harris A L, Tekkis P P, *et al.* Assessment of microvessel density and carbonic anhydrase-9 (CA-9) expression in rectal cancer. *Pathol Res Pract*, 2009, **205**(1): 1-9

Clinical Application and Identification of Proteomics in Colonic Mucosa of Sub-healthy People With Constipation*

DENG Hui^{1)**}, ZHANG Yun-Li^{1)**}, ZHONG Bai-Yun^{1)***}, LIU Wei-Dong²⁾,
YAN Qun¹⁾, FENG Si-Si¹⁾, XIAO Zhi-Qiang³⁾

¹⁾ Department of Clinical Laboratory, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China;

²⁾ National Hepatobiliary and Enteric Surgery Research Center, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China;

³⁾ Key Laboratory of Cancer Proteomics of Ministry of Health of China, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract This paper intends to find out the molecule marker of the progress of proteomics in colonic mucosa from sub-healthy people with constipation, so as to provide theoretical basis for the pathological changes of colonic mucosa in sub-healthy people with constipation. Two-dimensional electrophoresis (2-DE) was used to separate the total proteins of sub-healthy people with constipation and those of the healthy volunteers. ImageMaster 2D Elite soft was applied to analyze 2-DE images. Finally, the differential protein spots between the two groups were identified by peptide mass fingerprint (PMF), based on matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and searching in database. A reproducible 2-DE pattern in colonic mucosa of sub-healthy people with constipation and the healthy volunteers was established. There were 501.00 ± 37.16 in the average gel of people with constipation, and 536.00 ± 41.63 in the healthy volunteers. There were 46.00 ± 7.82 differentially expressed protein spots in average between the two groups. Then 20 spots, that were significantly differentially expressed, were picked for identification, and 17 proteins were identified by mass spectrometry, in which seven decreased significantly while ten increased significantly. Some of those proteins participated in protein synthesis and degradation, or chaperone, or adjust oxidoreduction, while some were involved in signal transduction. Some differentially expressed proteins: β -actin, YWHAZ and PBP- I (phosphatidylethanolamine-binding protein I) were further confirmed by Western blot analysis and researched for clinical application. The proteomic expression in colonic mucosa of people with constipation is significantly different from that of the healthy volunteer controls. β -Actin and YWHAZ protein are down-regulated, and PBP- I protein is up-regulated, which may be associated with the pathogenesis of constipation. Proper intervention on this stage can promote the transition from sub-healthy status to healthy status.

Key words colonic mucosa, sub-healthy, constipation, proteomics, Western blot

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00341

*This work was supported by a grant from Hi-Tech Research and Development Program of China (2006AA02Z437, 2007AA02Z422).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-731-84327438, Fax: 86-731-88881468, E-mail: byzhong88@yahoo.com.cn

Received: July 21, 2011 Accepted: September 26, 2011