文章编号:1000-5404(2007)17-1663-03

论著

便秘大鼠结肠黏膜上调蛋白质的分离及鉴定

汪兴伟[1],刘海峰[2],房殿春[1],何俊堂[1],王国安[1],陈 刚[1] ([1]第三军医大学西南医院全军消化内科中心,重庆 400038;[2]武警总医院消化内科,北京 100039)

提 要:目的 观察慢传输型便秘大鼠结肠黏膜上调蛋白质的变化特性,并对明确的蛋白质组进行功能分析。**方法** 利用复方苯乙哌啶建立大鼠慢传输型便秘模型,利用高分辨双向电泳(2-DE)对STC大鼠结肠黏膜组织进行蛋白质分离,ImageMaster 2D Elite图像分析软件进行分析,应用生物质谱、蛋白质库及文献分析等技术对差异蛋白质中的上调蛋白质组进行鉴定、功能和临床意义分析。**结果** 慢传输型便秘在其发生过程中有显著的蛋白质表达差异。主要差异表达的蛋白质有:类肌钙蛋白Calponin(CaP)(A1),组蛋白H2B(A2),鼠醛酮还原酶蛋白类似物(RAKb蛋白类似物)(A3),A1、A2、A3在便秘大鼠的胶图中表达明显上调。**结论** CaP与胃肠道的运动状态密切相关,它在胃肠道运动中具有调节作用,可能介导了复方苯乙哌啶的抑制胃肠动力作用,通过表达量的变化来实现对胃肠道运动的调节。

关键词:大鼠;结肠黏膜;慢传输型便秘;双向凝胶电泳;蛋白质组
中图法分类号:R322.45;R394.3;R442.2 **文献标识码**:A

Separation and identification of up-regulated proteins in colonic mucosa from chronic slow transit constipation rats

WANG Xing-wei[1], LIU Hai-feng[2], FANG Dian-chun[1], HE Jun-tang[1], WANG Guo-an[1], CHEN Gang[1] ([1]Gastroenterology Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of Gastroenterology, The General Hospital of Armed Police, Beijing 100039, China)

Abstract: **Objective** To investigate the general changes of up-regulated proteins in colonic mucosa from chronic slow transit constipation rats and analyze the function of the specified proteins. **Methods** An experimental rat model of chronic slow transit constipation (STC) was established by diphenoxylate and used for separating proteins from colonic mucosa by two-dimensional electrophoresis (2DE). ImageMaster 2DElite, mass spectrometry, protein bank and bibliometrics were applied to identify the up-regulated proteins and analyze their clinical significance and function. **Results** Obvious distinction was observed in the genesis of STC, such as calponin (CaP, A1), histone H2B (A2), rat aldoketo-reductase analog (A3). The expression of A1, A2, and A3 up-regulated in the gel graph of STC rats. **Conclusion** Calponin plays a vital role in regulating the gastrointestinal movement by amount alteration and mediates the effect of gastrointestinal dynamia of diphenoxylate.

Key words: rats; colonic mucosa; chronic slow transit constipation; two-dimensional gel electrophoresis; proteomics

慢传输型便秘(slow transit constipation, STC)亦称特发性慢传输型便秘(idiopathic slow transit constipation),是1986年由Preton和Lennard-Joners提出,临床指以便秘、结肠通过时间延长和对纤维素、缓泻剂治疗反应差为特征,伴有腹痛、腹胀、恶心等症状,并排除全身性基础疾病和盆底肌功能失调的慢性便秘,即由结肠运动功能紊乱所致的,以结肠通过时间延长和结肠动力下降为特征的顽固型便秘,其发病率呈逐年上升趋势,但因发病机制尚不清楚,所以,一直是临床治疗的难题。我们采用复方苯乙哌啶建立大鼠慢传输型便秘模型,利用高分辨双向电泳(2-DE)对STC大鼠肠黏膜组织进行蛋白质分离,ImageMaster 2D Elite图像分析软件进行分析,应用生物质谱、蛋白质库及文献分析等技术对差异蛋白质中的上调蛋白质进行鉴定,并对其功能进行分析,从蛋白质水平研究便秘的

基金项目:杨森科学研究基金(JRC14)
Supported by the Science Research Foundation of YangSen(JRC14)
作者简介:汪兴伟(1977-),男,湖北省黄梅县人,博士研究生,主治医师,主要从事便秘的发病机制及其防治方面的研究。电话:(023)68765191,E-mail:wxw1977@126.com
通讯作者:刘海峰,电话:(010)88276549
收稿日期:2006-09-25;修回日期:2006-12-26

发生机制，旨在为慢传输型便秘肠黏膜损害的发病机制和临床防治慢传输型便秘提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物及试剂材料来源

成年健康 Wistar 大鼠50只，体质量100～120 g，雌雄各半，由第三军医大学实验动物中心提供，复方苯乙哌啶购自河南省常乐制药厂，二硫苏糖醇、尿素、十二烷基硫酸钠、甘氨酸、琼脂糖、甘油、溴酚蓝、IPG 缓冲液、IPG 干胶条、丙烯酰胺、Tris、碘代乙酰胺均购于美国 Sigma 公司。过硫酸铵、TEMED 和2-D 的标准蛋白购于美国 Bio-Rad 公司。所用溶液均用去离子水配制。BL-410 生物机能实验系统（成都泰盟科技有限公司），质谱仪；垂直板电泳仪；PAGE 电泳槽；复方苯乙哌啶；还原型辅酶Ⅱ（β-NADPH）；考马斯亮蓝染料；线性固相 pH 梯度干胶条（pH3～10，13 cm）。

1.2 大鼠模型的建立

选取健康成年 Wistar 大鼠50只，采用随机数字表分为正常对照组与便秘模型组，每组25只，分别饲喂普通饲料及含复方苯乙哌啶的饲料[1]，给药剂量为8 mg/（kg·d），每5天记录1次大鼠大便粒数、大便干重及大鼠质量。饲养时间为120 d[2]。

1.3 IPG-DAL T 双向凝胶电泳

IPG-DAL T 双向凝胶电泳主要采用 Gorg 等和 Sanchez 等[3]的方法以及 IP Gphor 等电聚焦系统指南进行，将电泳参数适当调整，蛋白上样量为2 000 μg，等电聚焦（50 000 Vhr），凝胶在自动染色仪进行考马斯亮蓝染色。

1.4 图像分析

图像扫描仪经强度矫正，透视扫描2-DE 凝胶后所得的图谱借助图像分析软件 ImageMaster 2D Elite 进行详细分析和比较蛋白质斑点差异。图像分析时首先将同组的3张2-DE 凝胶拟合成1张平均胶，即正常大鼠的肠黏膜平均胶和便秘大鼠的肠黏膜平均胶，然后以前者为参考胶，将后者与之比较，根据斑点的位置、大小、形状等参数，图像分析软件自动将不同图谱中的相同蛋白质点匹配，不能匹配的蛋白质斑点视为差异蛋白质[4]。

1.5 差异蛋白点的处理及质谱分析

参照文献[5]的方法进行。需要分析的蛋白点用手术刀挖出，放入试管中，经过退色后用含有胰岛素的液体使蛋白点消化为肽链，孵育24 h，消化后的肽链用体积分数为5 %的三氟乙酸（TFA）萃取，用质谱分析仪进行肽段分析[6]。

1.6 蛋白质鉴定和功能分析

质谱分析后获得的纯质谱数据经 ProFound 的 NCBInr 蛋白数据库（http://129.85.19.192/pro2found- bin/WebPro-Found.exe? FORM=1）进行分析，鉴定后的蛋白质用 PubMed（www.ncbi.nlm.nih.gov/ent-rez/query.fcgi? CMD = search&DB = PubMed）进行蛋白质功能的文献分析。

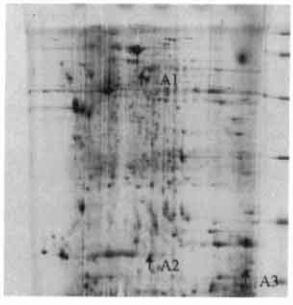
1.7 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行重复测量数据的方差分析。

2 结果

2.1 2-DE 蛋白质图谱的整体特征分析

慢传输型便秘大鼠结肠黏膜的蛋白质点和正常对照组的蛋白质点比，从整体看有蛋白质表达增加的趋势，正常对照组的蛋白质点为（256±23），便秘组大鼠的蛋白质点为（293±21），具体分析检测到的差异蛋白点，便秘组明确上调并能检测出为何种蛋白质的点数为3，差异蛋白点见图1。



↑：差异蛋白质点；A1、A2、A3为检测出的便秘组明确上调的3个蛋白质点的序号

图1 正常大鼠、便秘大鼠结肠黏膜组织差异蛋白质点（MALDI-TOF-MS 鉴定）

2.2 慢传输型便秘大鼠结肠黏膜中上调蛋白质的特性

2.2.1 蛋白点 A1 经 MALDI-TOF 质谱鉴定/数据库搜索 Mascot，结果提示蛋白点 A1 为类肌钙蛋白 Calponin（CaP）。

2.2.2 蛋白点 A2 经 MALDI-TOF 质谱鉴定/数据库搜索 Mascot，结果提示蛋白点 A2 为组蛋白 H2B。

2.2.3 蛋白点 A3 经 MALDI-TOF 质谱鉴定/数据库搜索 Mascot，结果提示蛋白点 A3 为鼠醛酮还原酶蛋白类似物（RAKb 蛋白类似物）。

3 讨论

STC 是一类以胃肠动力减弱为主要特点的顽固性便秘，约占便秘的16%～40%，主要表现为大便次数减少、无便意、排便困难、排便不尽感等。STC 的发病机制较为复杂，可能为一种病因产生多种机制所致，也可能由多种因素协同所致，结肠黏膜屏障功能损害在 STC 的发生、发展中起着重要的作用。

我们应用临床上常用的止泻剂复方苯乙哌啶经口服的方法首次成功的建立了大鼠慢传输型便秘模型[7]。该模型大鼠排便次数减少，肠道传输减慢，与便秘患者具有相同的临床症状和病理生理改变。复方苯乙哌啶具有显著的抑制大鼠排便作用，其机制主要是直接作用于肠道平滑肌，通过抑制肠黏膜感受器，消除局部肠黏膜的蠕动反射而使肠道蠕动减慢，使肠内容物通过延迟，致使大鼠排便减少或难排便，与便秘临床症状及诊断对比相同。本模型属非特异性便秘模型，实验动物处于正常的生理活动条件下，无需特殊的

喂养条件，符合动物正常状态的生理活动规律；饲喂方法简单，经济易行，可以充分的模拟慢传输型便秘结肠的功能状态，为慢传输型便秘的研究提供良好的平台，对深入研究慢传输型便秘的病因及发病机制具有重要意义。

结肠黏膜屏障功能损害是多蛋白多基因参与调控的病理生理改变 。蛋白质组学能从组织脏器整体水平上研究蛋白质的属性，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[8]，对于研究结肠黏膜屏障功能损害的变化特性及防治有非常重要的意义。运用蛋白质组双相凝胶电泳的研究方法，通过比较正常大鼠和 STC 大鼠结肠黏膜蛋白质组电泳图谱，得到蛋白质在表达数量、表达位置和修饰状态上的差异，这些蛋白质，为认识疾病发病机制提供线索，也可能作为疾病诊断的分子标记，还可以作为治疗和药物开发的靶点[9]。我们采用复方苯乙哌啶建立大鼠慢传输型便秘模型，检测了 STC 大鼠结肠黏膜蛋白质组的变化，对上调的蛋白质的特性和功能进行分析。

慢传输型便秘大鼠结结肠黏膜上调蛋白质的变化特性研究结果表明，便秘和对照大鼠两组明确上调并能检测出为何种蛋白质的点数为 3，即 CaP，组蛋白 H2B，鼠醛酮还原酶蛋白类似物（RAKb 蛋白类似物）。CaP 是近几年发现的在平滑肌中具有调节功能的蛋白质分子，它们参与平滑肌细胞收缩的自身调控。CaP 存在于血管、气管和结肠平滑肌中，是一种热稳定蛋白质，表观分子量为 34 000 ~ 35 000。CaP 有 3 种异型（同工）蛋白，h1CaP、h2CaP 和酸性 CaP，h1CaP 是其中最重要的调节蛋白质。在体外重组收缩蛋白质体系中，CaP 可抑制肌球蛋白 MgATP 酶活性，抑制平滑肌磷酸化肌球蛋白所引发的肌动蛋白丝的移动；增加 CaP 浓度，则平滑肌收缩的力度下降[10]。本实验结果显示，便秘大鼠结肠组织中 CaP 含量均明显增多，表明 CaP 与胃肠道的运动状态密切相关，胃肠运动增强，它们的含量下降，反之则升高，CaP 可能介导了复方苯乙哌啶的抑制胃肠动力作用，通过表达量的变化来实现对胃肠道运动的适应性调节。因此，CaP 有望成为反映胃肠运动状态的标志，或成为治疗胃肠道动力障碍疾病的靶点，具有重要的临床意义。组蛋白 H2B 在 DNA 双螺旋结合中起重要作用，细胞核内组蛋白 H2B 可通过转录促进因子 1（Transcrptional activating factor 1，TAF1）进而磷酸化其自身 Serine 33 的位置，此举可启动细胞核内的转录作用并促进细胞周期的进行以及细胞生长。组蛋白 H2B 在慢传输型便秘大鼠结肠组织中表达上调，提示 H2B 在 STC 的发生过程中可能具有一定的意义。但是文献检索未见相关报道，目前难以对其可能的意义进行进一步的讨论分析，具体机制有待今后进一步研究。鼠醛酮还原酶蛋白是醛酮还原酶超家族的成员之一，为一种与肿瘤相关的蛋白。Zeindl-Eberhart 等在研究癌基因依赖的肿瘤相关蛋白变体蛋白质组时发现，在致癌物诱导的肿瘤中，几种肿瘤相关变体代表即是醛糖-酮类还原酶超家族的成员，其中最主要的如鼠醛酮还原酶蛋白-c（Rak-c，一种新的肿瘤相关变体），鼠醛糖还原酶-类似蛋白-1（rARLP-1）以及 rARLP-13 亚型[11]。本研究表明，在慢传输型便秘大鼠结肠组织中鼠醛酮还原酶的表达上调，是否提示慢传输型便秘与消化系肿瘤的发生发展有一定的联系？目前难以对其可能的意义进行进一步的讨论分析，有待深入研究。

参考文献：

[1] 何俊堂，刘海峰，房殿春，等. 慢传输型便秘大鼠结肠肌间神经丛胆碱能神经及氮能神经的组化研究[J]. 解放军医学杂志，2004，29（10）：854 - 856.

[2] 刘海峰，何俊堂，汪兴伟，等. 大鼠慢传输型便秘模型的建立及其结肠肌电变化检测[J]. 武警医学，2004，15（12）：887 - 891.

[3] Smoukov S K，Davydov R M，Doan P E，*et al*. EPR and ENDOR evidence for a 1-His，hydroxo-bridged mixed-valent diiron site in Desulfovibrio vulgaris rubrerythrin[J]. Biochemistry，2003，42（20）：6201 - 6208.

[4] 张立勇，赵晓航，吴　旻，等. 表面增强激光解吸电离质谱芯片在蛋白质组学研究中的应用[J]. 生命的化学，2002，22（5）：478 - 480.

[5] 丁勤学，刘　进，胡潇华，等. 不同上样方式对蛋白质组双向电泳图谱质量的影响比较[J]. 中国生物化学与分子生物学报，2006，22（3）：239 - 242.

[6] Giorgianni F，Desiderio D M，Beranova-Giorgianni S. Proteome analysis using isoelectric focusing in immobilized pH gradient gels followed by mass spectrometry[J]. Electrophoresis，2003，24（1 - 2）：253 - 259.

[7] 汪兴伟，刘海峰，房殿春，等. 大黄对慢传输型便秘大鼠结肠肌电影响的实验研究[J]. 消化外科，2005，4（2）：108 - 112.

[8] 王晓军，孙永华，丁勤学，等. 烫伤大鼠肠粘膜下调蛋白质组的分离及鉴定[J]. 中华烧伤杂志，2003，19（5）：275 - 278.

[9] 王晓军，孙永华，丁勤学，等. 大鼠烫伤后肠黏膜上调蛋白质组的分离鉴定及其功能分析[J]. 中华创伤杂志，2004，20（10）：609 - 612.

[10] 王　新，吴开春，张宗友，等. 类肌钙蛋白和钙调蛋白结合蛋白在胃肠运动及其病理适应性调节中的作用[J]. 中华内科杂志，2001，40（7）：459 - 462.

[11] Jungblut P R，Zimny-Arndt U，Zeindl-Eberhart E，*et al*. Proteomics in human disease：cancer，heart and infectious diseases[J]. Electrophoresis，1999，20（10）：2100 - 2110.

（编辑　王小寒）