

## 青年和老年人结肠上皮的比较蛋白质组学研究\*

郑杰<sup>1)\*\*</sup> 朱果<sup>1,2)\*\*</sup> 陈主初<sup>1,2)</sup> 李明<sup>1,2)</sup> 程爱兰<sup>1)</sup>  
阮林<sup>1)</sup> 刘迎福<sup>1,2)</sup> 袁伟键<sup>3)</sup> 张鹏飞<sup>1)</sup> 肖志强<sup>1)\*\*\*</sup>

(<sup>1)</sup>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 410078; <sup>2)</sup>中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410008;

<sup>3)</sup>中南大学湘雅医院消化科, 长沙 410008)

**摘要** 衰老的大肠上皮不仅多种生理功能下降, 而且对大肠癌在内的多种衰老相关的肠道疾病易感性显著增加, 但结肠上皮衰老及衰老的结肠上皮对癌症易感的分子机制仍然不清楚. 为此, 应用双向凝胶电泳(2-DE)技术分离青年人及老年人的正常结肠上皮的总蛋白质, 图像分析识别差异表达的蛋白质点, 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)对差异表达的蛋白质点进行鉴定, 免疫组化和实时定量(real-time quantitative) PCR 检测部分差异蛋白, 在青年人和老年人结肠上皮中的表达水平. 得到了分辨率较高、重复性较好的青年人和老年人结肠上皮的 2-DE 图谱, 质谱分析鉴定了 17 个结肠上皮衰老相关的蛋白质, 免疫组化和 real-time quantitative RT-PCR 证实了部分差异蛋白质的表达水平. 研究结果提示, 线粒体功能受伤、抗氧化能力下降是结肠上皮衰老的重要原因, 4 个差异蛋白质即 guanine nucleotide-binding protein beta subunit-like protein(Rack1)、stress-70 protein、40S ribosomal protein SA 和 chloride intracellular channel protein1 可能与衰老的结肠上皮对癌症易感有关.

**关键词** 结肠上皮, 衰老, 蛋白质组, 肿瘤易感性, 双向凝胶电泳, 质谱, 免疫印迹, 实时定量 PCR

**学科分类号** R735.35

大肠上皮的衰老是一个渐进性、多基因参与的复杂过程, 随着衰老的发生发展, 一方面大肠上皮的多种生理功能均下降, 另一方面包括大肠癌在内的多种肠道疾病的发病率也显著升高. 流行病学调查和临床资料均显示, 年龄因素(衰老)在结直肠癌的发病中具有重要作用, 在 50 岁以后结直肠癌的发病率显著上升<sup>[1]</sup>. 国内外已开展许多结直肠上皮衰老相关的研究, 如 Lopes 等<sup>[2]</sup>观察到老年大鼠结肠的平滑肌线粒体的形态和功能都发生了改变, Ono 等<sup>[3]</sup>发现, 随着年龄的增加, 消化道上皮的 DNA 突变频率增加, 而以小肠和结肠的突变频率最高, Tsurudome 等<sup>[4]</sup>发现, 老年人结肠癌组织中 8-羟基脱氧鸟嘌呤(8-hydroxydeoxyguanosine)水平升高, 提示氧自由基对结肠上皮细胞 DNA 的损伤程度增加. 笔者所在研究组先前的研究发现老年大鼠结肠上皮细胞 G1/S 期限限制点加速, 细胞周期加快, 细胞增生活跃<sup>[5]</sup>, 同时衰老结肠上皮细胞的凋亡受到抑制<sup>[6]</sup>, 另外, 衰老结肠上皮 DNA 的甲基化水平也会发生改变, 如部分抑癌基因和 DNA 修复基因的甲基化水平增高而表达下降<sup>[8]</sup>.

以往的研究虽然揭示了一些结肠上皮衰老以及衰老结肠上皮对癌症易感的机制, 但是这些研究多数是从某个或某几个基因出发, 而且这些研究多集中在 DNA 和 RNA 水平, 由于 DNA 和 RNA 水平的变化并不能完全反映蛋白质水平的变化, 况且蛋白质翻译后的修饰加工、蛋白质的相互作用等信息是仅通过基因组研究所无法获知的<sup>[9]</sup>. 因此, 有必要从蛋白质整体水平对结肠上皮的衰老机制进行研究.

蛋白质组学的出现及其研究技术的发展和完善, 为从蛋白质整体水平研究结肠上皮衰老以及衰老相关的结肠疾病成为可能. 因此, 我们在建立青年人与老年人结肠上皮组织的蛋白质双向凝胶电泳图谱的基础上, 比较两者蛋白质表达谱的差异, 采

\*国家自然科学基金资助项目(30240056, 30370642).

\*\* 共同第一作者.

\*\*\* 通讯联系人. Tel: 0731-4327239, Fax: 0731-4327332

E-mail: zqxiao2001@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-06-12, 接受日期: 2006-08-26

用质谱技术鉴定差异表达的蛋白质, 结果识别了 17 个结肠上皮衰老相关的蛋白质, 其中 4 个差异表达的蛋白质可能与衰老的结肠上皮对大肠癌的易感性有关. 据我们所知, 这是首次采用蛋白质组学技术筛选结肠上皮衰老相关蛋白质, 研究结果有助于揭示结肠上皮衰老以及衰老结肠上皮对肿瘤易感的分子机制.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 组织.** 40 例成人男性正常结肠黏膜均取自中南大学湘雅医院肠镜室, 活检部位均为降结肠, 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, 且结肠活检的钳夹深度只能至黏膜层, 以保证组织的纯度. 活检样本用生理盐水反复冲洗去除血液等污染后立即置于液氮中保存. 标本按年龄分为青年组(25~30 岁)和老年组(60~65 岁), 每组各 20 例.

**1.1.2 组织切片.** 用于免疫组化染色的 40 例正常结肠黏膜上皮组织蜡块, 由中南大学湘雅医院病理科提供, 青年组(25~30 岁)和老年组(60~65 岁)各 20 例.

**1.1.3 试剂.** 组织研磨试剂盒(Sample Grinding Kit)、蛋白质定量试剂盒(2D Quant Kit)、尿素(urea)、硫脲(thiourea)、NP-40、Triton X-100、二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺、固相 pH 梯度干胶条(IPG strip pH3~10NL, 24 cm)、IPG 缓冲液(pH 3~10NL)、两性电解质(pharmalyte, pH 3~10)、覆盖液、二维凝胶电泳标准蛋白质均为 Amersham Biosciences 产品; 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、甘氨酸、Tris、CHAPS、SDS、硫代硫酸钠( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ )、碳酸氢铵( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )、甲苯磺酰苯丙氨酸甲-酮-胰蛋白酶(TPCK-Trypsin)、铁氰化钾[ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ]、三氟乙酸(TFA)和基质  $\alpha$ - 氰基 -4- 羟基肉桂酸(CHCA)均为 Sigma-Aldrich 公司产品; 甘油、乙醇、乙酸、碳酸钠、硝酸银( $\text{AgNO}_3$ )、甲醛、戊二醛、EDTA 以及 EDTA- $\text{Na}_2$  均为国产分析纯; 鼠抗人 Rack1 单克隆抗体、兔抗人 Thiosulfate sulfurtransferase (Rhodanese)多克隆抗体和鼠抗人 Elongation factor Tu (EF-Tu)单克隆抗体均购自美国 Santa Cruz 公司; 免疫组织化学 S-P 染色试剂盒购自福州迈新生物技术公司; Trizol RNA 抽提试剂盒购自 GIBCO 公司; 逆转录试剂盒和 SYBR Green I 混合染料购自日本 Takara 公司.

**1.1.4 仪器.** IPGphor 等电聚焦仪、Ettan DALT 垂直电泳槽、Imagescanner 扫描仪均为 Amersham Biosciences 公司产品; Voyager-DE STR 4307 MALDI-TOF-MS 质谱仪为 Applied Biosystem 公司产品; PDQuest 7.0 凝胶图像分析软件为 Bio-Rad 公司产品; 实时定量 PCR(real-time quantitative PCR)仪(Light Cycler)为德国 Roche Diagnostics 公司产品.

### 1.2 方法

**1.2.1 组织总蛋白质的提取.** 青年组和老年组结肠黏膜组织各 10 例用于抽提蛋白质. 20 mg 组织样品与 300  $\mu\text{l}$  组织裂解液(7 mol/L Urea, 2 mol/L Thiourea, 2% NP-40, 1% Triton X-100, 100 mmol/L DTT, 5 mmol/L PMSF, 4% CHAPS, 0.5 mmol/L EDTA, 40 mmol/L Tris, 2% pharmalyte)混合后, 用组织研磨试剂盒充分研磨裂解组织样本, 置室温下 1 h, 间断涡旋混匀, 15 000 g、10 $^\circ\text{C}$  离心 1 h, 吸取上清液即为提取的组织总蛋白. 用蛋白质定量试剂盒(2D Quant Kit)测定蛋白质的浓度.

**1.2.2 双向凝胶电泳.** 第一向等电聚焦(IEF): 主要参照 IPGphor 等电聚焦系统使用指南进行. 组织总蛋白质提取物与水化液(8 mol/L Urea, 4% CHAPS, 40 mmol/L Tris, 40 mmol/L DTT, 0.5% IPG 缓冲液 pH 3~10NL, 痕量溴酚蓝)充分混合, 使上样总体积为 450  $\mu\text{l}$  (含总蛋白质 400  $\mu\text{g}$ ). 30 V 水化 12 h 后, 依次经 500 V 1 h, 1 000 V 1 h, 8 000 V 8.5 h 进行等电聚焦, 水化和聚焦均在 20 $^\circ\text{C}$  进行, 总电压时间积为 69 920 Vh. 平衡: 等电聚焦后迅速取出 IPG 胶条分别置于 10 ml 平衡 A 液(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8, 6 mol/L Urea, 30% 甘油, 1% SDS, 0.2% DTT, 痕量溴酚蓝)和 10 ml 平衡 B 液(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8, 6 mol/L Urea, 30% 甘油, 1% SDS, 3% 碘乙酰胺, 痕量溴酚蓝)中各平衡 15 min. 第二向垂直 SDS-PAGE 电泳: 将平衡后的 IPG 胶条转移至 12.5% 的凝胶上端, 使 IPG 胶条与凝胶上端紧密贴合, 在一端加入凝胶电泳蛋白质标准品, 排尽气泡后, 用含痕量溴酚蓝的 0.5% 琼脂糖封顶. 电泳条件为: 每胶 2.5 W 电泳 30 min 后再以每胶 12 W 恒功率电泳, 直至溴酚蓝指示线到达凝胶底边处停止电泳.

**1.2.3 银染显色.** 40%乙醇+10%冰乙酸固定 30 min. 30%乙醇+5%硫代硫酸钠+6.8%醋酸钠敏化 60 min. 蒸馏水洗涤 2 次, 每次 5 min. 2.5%硝酸银银染 20 min. 蒸馏水洗涤 2 次, 每次 1 min. 2.5%无水碳

酸钠+0.074%甲醛显影至蛋白质斑点清晰为止。EDTA-Na<sub>2</sub> 10 min 中止反应, 蒸馏水洗 10 min. 30%乙醇 + 4.6%甘油保存。

**1.2.4 图像分析.** Imagescanner 扫描仪扫描银染的凝胶, PDQuest 图像分析软件依次进行点检测、背景消减、匹配、量化比较从而获取斑点的相关信息. 所有统计数据分析均由 Excel 2000 软件完成。

**1.2.5 MALDI-TOF-MS 质谱分析.** 将蛋白质点从凝胶上切割下来后置 1.5 ml Eppendorf 管中, 经脱色工作液 (100 mmol/L Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 和 30 mmol/L K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 以 1:1 用前混合) 脱色, 再用水洗数遍直至黄色消失, 乙腈脱水直至胶块变为白色, 冷冻真空干燥仪抽干, 加入 TPCK-Trypsin (100 ng/ 蛋白质点) 37°C 酶解 12 h. 然后吸取上清至另一 0.5 ml Eppendorf 管中, 剩下胶块再用萃取液 (50%乙腈+2.5%三氟乙酸) 萃取 2 次, 合并上清及 2 次萃取液, 冷冻真空干燥仪浓缩样品至 5  $\mu$ l. 取 0.5  $\mu$ l 样品与等体积饱和的 CHCA 基质液混合, 点样于不锈钢点样板上, 空气中干燥, 然后用 0.1% 的三氟乙酸于板上脱盐. 制备好的样品在 Voyager-DE STR 4307 MALDI-TOF-MS 质谱仪上分析, 采用反射模式, 正离子谱测定, 真空度  $4 \times 10^{-7}$  Torr, 离子源加速电压为 20 000V, 反射电压比为 1.12, N<sub>2</sub> 激光波长为 337 nm, 脉冲宽度为 3 ns, 离子延迟提取时间为 100 ns, 质谱信号单次扫描累加 50 次, 使用 ACTH 作为外部标准, 胰蛋白酶自切降解峰作为内部标准校正, 获得肽质量指纹图谱(PMF). Mascot 软件检索 SWISSPROT 数据库鉴定蛋白质。

**1.2.6 Real-time quantitative PCR 分析.** 青年组和老年组结肠黏膜组织各 10 例用于抽提总 RNA. 用 Trizol 试剂盒抽提结肠黏膜组织的总 RNA. 2  $\mu$ g 总 RNA 按照反转录试剂盒(Takara 公司产品)说明在 20  $\mu$ l 的反应体系合成 cDNA. 用 primer premier 5.0 软件设计 40 S ribosomal protein SA 基因的引物 (上游引物: 5' tcacggaggcatctta 3'; 下游引物: 5' catccaccatcaaac 3') 和看家基因 GAPDH 的引物 (上游引物: 5' aatcccatcaccatcttcc 3'; 下游引物: 5' catcagccacagtttcc 3'). Real-time quantitative PCR 反应在 LightCycler system 荧光 PCR 仪上进行, 使用荧光染料 SYBR Green I 与双链的 DNA 结合. 反应体系如下: 2  $\mu$ l cDNA, 2  $\mu$ l SYBR Green 1 混合染料, 0.5  $\mu$ l 10  $\mu$ mol/L 上游引物, 0.5  $\mu$ l 10  $\mu$ mol/L 下游引物, 1  $\mu$ l 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 和 14  $\mu$ l H<sub>2</sub>O. 实验结果自动以 CT 值给出, 相对表达量计算按照

Livak 等<sup>[10]</sup>的  $2^{-\Delta\Delta CT}$  方法进行计算。

**1.2.7 免疫组化染色.** 20 例青年人和 20 例老年人的石蜡包埋结肠黏膜上皮组织连续切片, 按福州迈新生物技术公司的 S-P 染色试剂盒说明进行免疫组化染色. Rack1 抗体、Rhodanese 抗体以及 EF-Tu 抗体分别按 1:300、1:350 和 1:200 稀释, 用 PBS 代替一抗为阴性对照. 随机选取至少 5 个高倍镜视野( $\times 200$ ), 至少记数 1 000 个细胞. 以积分法<sup>[11]</sup>计算结果, 即根据每张切片的染色强度和阳性细胞比例记分. 着色强度: 无色 0 分; 浅黄色 1 分; 棕黄色 2 分; 棕褐色 3 分. 着色细胞比例: 无着色为 0 分; 着色 1%~25% 为 1 分; 着色 26%~50% 为 2 分; 着色 51%~75% 为 3 分; 着色 >75% 为 4 分. 两者相加 0 分为-, 1~3 分为+, 4~5 分为++, 6~7 分为+++。每张切片观察 5 个高倍镜视野, 取其平均数。

**1.2.8 统计学分析.** 应用 SPSS 10.0 版统计软件对实验结果进行统计学分析, 对于 real-time quantitative PCR 实验结果中的计量资料用 *t* 检验, 对于免疫组织化学实验结果中所得的等级资料用秩和检验,  $P < 0.05$  即 2 组差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 青年人和老年人的结肠上皮 2-DE 图谱的建立及其差异蛋白质点的识别

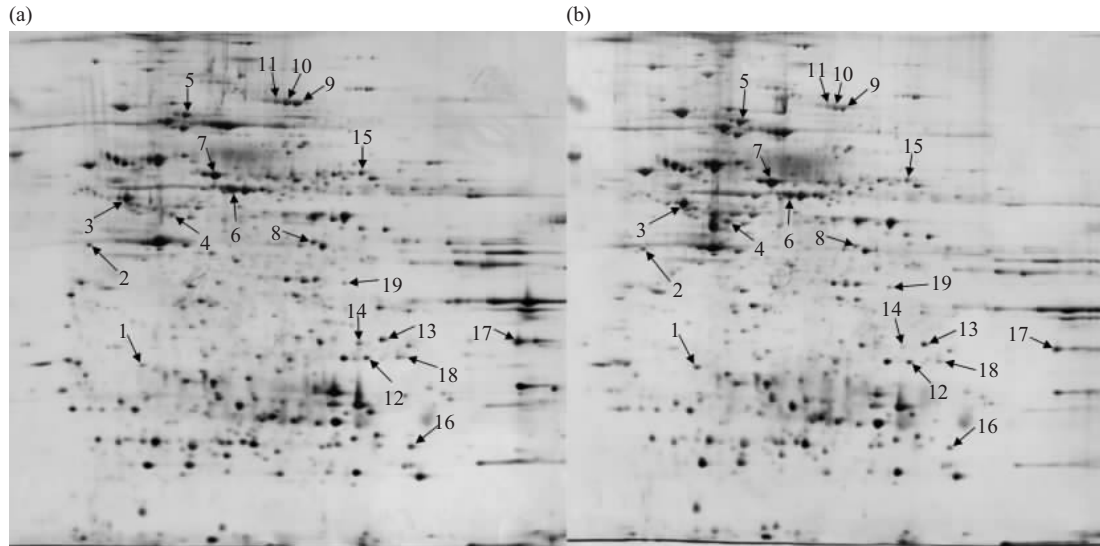
结肠黏膜上皮总蛋白质经二维凝胶电泳分离, 银染显色后得到青年组和老年组 2-DE 图谱各 10 张. PDQuest 软件分析显示: 20 块 2-D 凝胶的平均点数为  $(1\ 020 \pm 50)$ , 平均匹配率为  $(93 \pm 2)\%$ . 采用 PDQuest 软件建立同组内 10 张 2-D 凝胶的平均胶, 即计算同组内所有凝胶上的同一蛋白质点的平均表达量, 某个蛋白质点的表达量是其在胶上的灰度体积 (面积  $\times$  灰度). 比较两组平均胶的差异 (均数进行成组比较的 *t* 检验,  $P < 0.05$ ), 得到老年组与青年组结肠黏膜上皮表达差异大于 2 倍的蛋白质点共 32 个 (图 1), 图 1 标出得到鉴定的 19 个差异表达蛋白质点。

### 2.2 差异表达蛋白质点的质谱鉴定

32 个差异表达蛋白质点经质谱分析得到 PMF 图谱后, 查询 SWISSPROT 数据库, 19 个蛋白质点得到鉴定, 共 17 种非冗余蛋白质. 图 2 为得到鉴定的 18 号差异表达蛋白质点的肽质量指纹图谱, 检索 SwissProt 数据库显示为 Rack1 蛋白. 其余 13 个点由于丰度较低未能获得 PMF 图谱, 或由于数

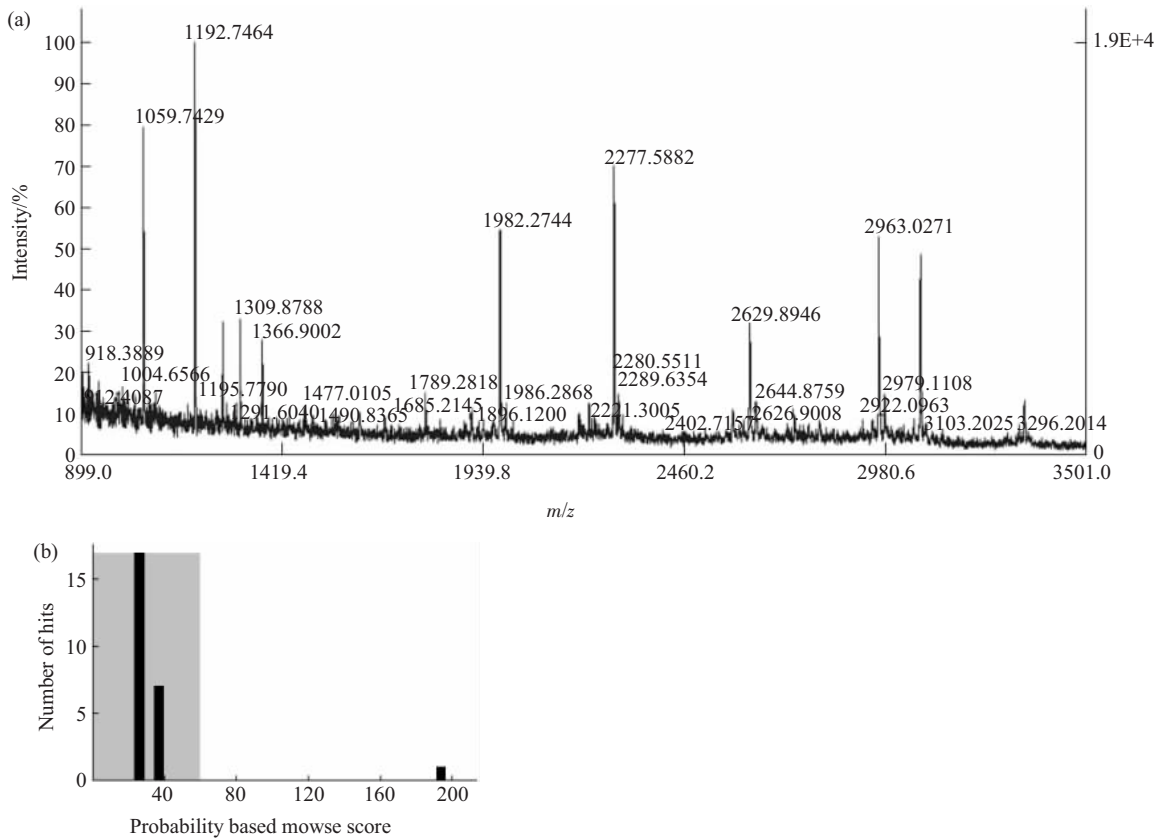
数据库搜索未能达到具有统计学意义的分数而未得到鉴定. 根据 SWISSPROT 数据库(www.expasy.org)提供的亚细胞定位及功能信息, 在鉴定的 19 个蛋白

质点中, 3、12、14、15、16、17、19 号点 (ATP synthase beta chain、electron transfer flavoprotein alpha-subunit、rhodanese、UDP-



**Fig. 1 Two dimensional electrophoretic map of human colonic epithelial and nineteen differential expressed protein spots identified by MALDI-TOF-MS (a) Young group; (b) Old group**

Total 400  $\mu\text{g}$  proteins of human colon mucosal proteins was separated by 2-DE, the 2-D gel was stained by silver. The identified differential expressed proteins were labeled with figures.



**Fig. 2 MALDI-TOF-MS analysis of spot 18 (Rack1)**

(a) Peptide mass fingerprinting of protein spot 18. (b) Database query result and scores of spot 18.

glucose 6-dehydrogenase、flavin reductase、short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase、3-hydroxyisobutyryl-coenzyme A hydrolase) 主要参与物质代谢, 2、5、7、8号点(40 S ribosomal protein SA、stress-70 protein、protein disulfide-isomerase A3、EF-Tu)主要参与蛋白质的翻译、翻译后修饰或辅助蛋白质折叠, 6、9、10、11号点(selenium-binding protein 1、transferrin)参与物质转运, 1、13号点(chloride intracellular channel

protein 1、voltage-dependent anion-selective channel protein 2)是离子通道蛋白, 4号点 thioredoxin-like protein p46 是重要的抗氧化蛋白, 18号点 Rack1 是重要的胞内信号转导蛋白. 19个鉴定的差异表达蛋白质点的名称、变化的倍数以及蛋白质的亚细胞定位信息见表 1. 从表 1 中还可看到定位于线粒体的有 3、5、8、12、13、14、17号蛋白质, 在这 7 个差异表达的线粒体蛋白质中, 6 个蛋白质在老年组的结肠黏膜上皮中表达下调.

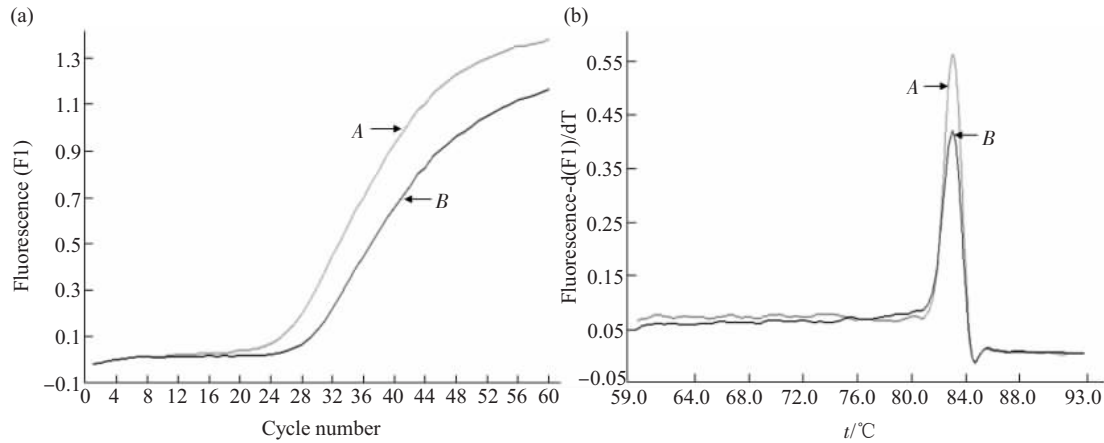
**Table 1 Differential expressed proteins of colonic epithelium identified by MALDI-TOF MS between young and old man**

No	Swissprot ID number	Names	Changing folds (Old/Young)	Subcelluar locations
1	O00299	Chloride intracellular channel protein 1	3.4	nuclear(majority and cytoplasmic)
2	P08865	40 S ribosomal protein SA	2.2	cytoplasmic
3	P06576	ATP synthase beta chain	0.44	mitochondrial
4	Q8NBS9	Thioredoxin-like protein p46	2.2	endoplasmic reticulum
5	P38646	Stress-70 protein, mitochondrial	2.3	mitochondrial
6	Q13228	Selenium-binding protein 1	0.38	cytoplasmic
7	P30101	Protein disulfide-isomerase A3	0.40	endoplasmic reticulum
8	P49411	Elongation factor Tu(EF-Tu), mitochondrial	0.45	mitochondrial
9			0.45	
10	P02787	Transferrin	0.41	extracellular
11			0.47	
12	P13804	Electron transfer flavoprotein alpha-subunit	0.46	mitochondrial
13	P45880	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	0.47	mitochondrial
14	Q16762	Thiosulfate sulfurtransferase (Rhodanese)	0.30	mitochondrial
15	O60701	UDP-glucose 6-dehydrogenase	0.46	undefined
16	P30043	Flavin reductase	0.47	cytoplasmic
17	Q16836	Short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	0.46	mitochondrial
18	P63244	Guanine nucleotide-binding protein beta subunit-like protein (Rack1)	0.43	undefined
19	Q6NVY1	3-hydroxyisobutyryl-coenzyme A hydrolase, isoform 1	0.47	undefined

### 2.3 40 S ribosomal protein SA 在青年和老年人结肠黏膜上皮中的表达

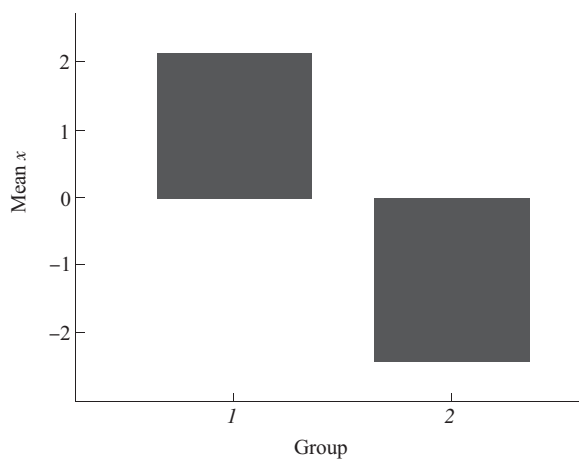
为了验证比较蛋白质组学的结果, 应用 real-time quantitative PCR 检测 40S ribosomal protein SA 在青年人和老年人结肠黏膜上皮中的表达. 图 3 为在上样量一致情况下具有代表性的 real-time quantitative PCR 结果. 图 4 为 10 例青年人和 10 例老年人中各例 40 S ribosomal protein SA 的

mRNA 水平  $CT$  值与其看家基因 (GAPDH) mRNA 水平  $CT$  值差值平均值变化的条形图, 差值越小代表 mRNA 的表达水平越高, 两组差值经  $t$  检验有显著性差异 ( $P = 0.001$ ). 然后根据 Livak 等<sup>[10]</sup>的  $2^{-\Delta\Delta CT}$  方法进行计算, 结果显示, 40 S ribosomal protein SA 在老年组结肠黏膜上皮中的表达水平较青年组高 9.8 倍. real-time RT-PCR 结果与比较蛋白质组学研究结果一致.



**Fig. 3 A representative real-time RT-PCR analysis for the mRNA level of 40 S ribosomal protein SA in the normal colonic mucosa from young and old people**

(a) Graph showed that mRNA level of 40 S ribosomal protein was higher in the normal colonic mucosa from old people than from young people. (b) Graph showed the melting curve of representative PCR products of 40 S ribosomal protein SA. A: Old group; B: Young group.

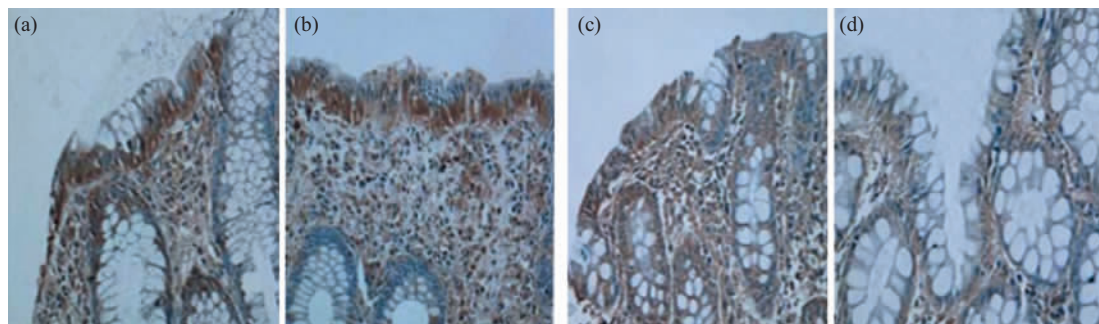


**Fig. 4 A statistic analysis for the result of real-time quantitative RT-PCR**

Bar of mean ( $\bar{x}$ ) by group from SPSS10.0. In the graph “X” showed the difference of CT between 40 S ribosomal protein SA mRNA and GAPDH mRNA, respectively. 1: Young group; 2: Old group.

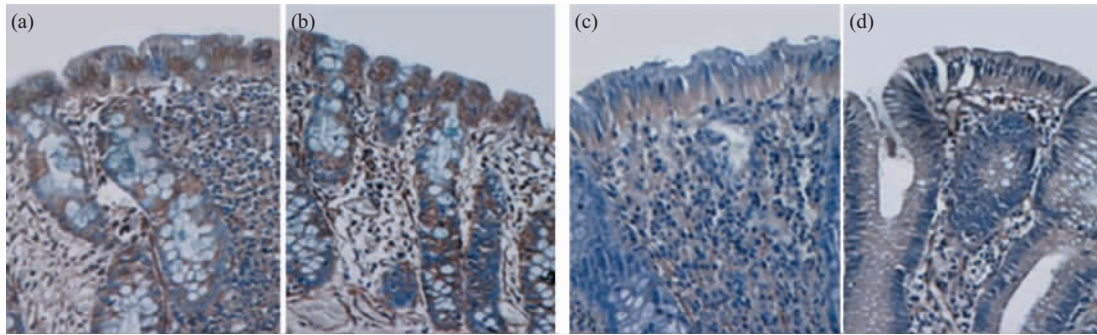
**2.4 免疫组化检测 Rack1、EF-Tu、Rhodanese 在青年人和老年人结肠黏膜上皮中的表达**

为了验证比较蛋白质组学的结果，采用免疫组化方法检查 Rack1、EF-Tu 和 Rhodanese 在 20 例青年人和 20 例老年人结肠黏膜上皮中的表达。结果显示：结肠黏膜上皮和结肠腺上皮有 Rack1、EF-Tu 和 Rhodanese 表达，主要定位于细胞浆，阳性细胞弥漫性分布于上皮中(图 5, 6, 7)。对青年组和老年组免疫组化的结果以积分法<sup>[11]</sup>计算，3 个蛋白质在 20 例青年人和 20 例老年人结肠黏膜上皮中的表达情况见表 2，统计分析表明：Rack1、EF-Tu 和 Rhodanese 在结肠黏膜上皮的表达水平在青年组显著高于老年组 ( $P < 0.05$ )。免疫组化结果与比较蛋白质组学研究结果一致。



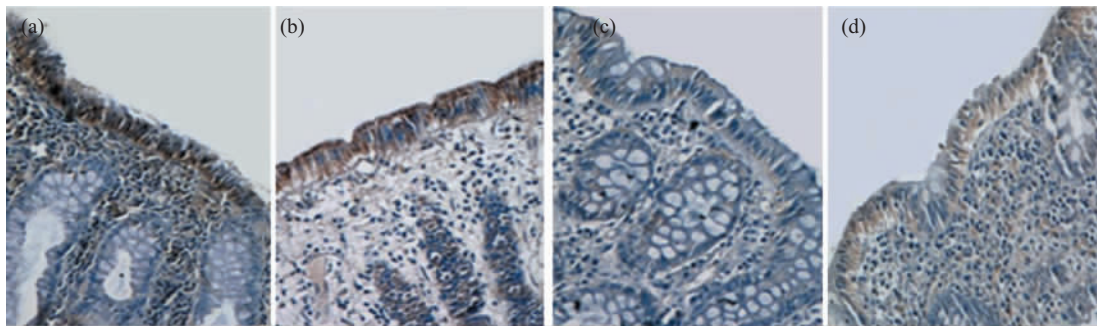
**Fig. 5 A representative immunohistochemical staining of Rack1 expression in the normal colonic mucosa from young (a, b) and old (c, d) people**

Hematoxylin counterstain. Original magnification:  $\times 200$ .



**Fig. 6 A representative immunohistochemical staining of EF-Tu expression in the normal colonic mucosa from young (a, b) and old (c, d) people**

Hematoxylin counterstain. Original magnification:  $\times 200$ .



**Fig. 7 A representative immunohistochemical staining of Rhodanese expression in the normal colonic mucosa from young (a, b) and old (c, d) people**

Hematoxylin counterstain. Original magnification:  $\times 200$ .

**Table 2 Expression of three differential proteins in the normal colonic mucosa from young and old people**

Protein	Group	-	+	++	+++	<i>P</i>
Rack1	Young	2	2	6	10	0.015
	Old	3	6	9	2	
EF-Tu	Young	2	4	8	6	0.036
	Old	1	13	4	2	
Rhodanese	Young	1	2	10	7	0.001
	Old	3	8	9	0	

The expression levels of three differential proteins were significantly higher in the colonic mucosal epithelium in young group than in old group ( $P < 0.05$  or  $0.01$ ) by Wilcoxon rank sum test.

### 3 讨 论

本研究以青年人和老年人的正常结肠黏膜上皮为研究对象, 首次采用蛋白质组学技术鉴定了 17 种结肠黏膜上皮衰老相关的蛋白质, 这些蛋白质的功能涉及物质代谢、能量产生、物质转运、抗氧化以及蛋白质的翻译、修饰和折叠等。

在这 17 种差异表达的蛋白质中, 定位于线粒体的蛋白质有 7 个(表 1), 约占 41%, 这提示线粒体蛋白质与结肠黏膜上皮的衰老有密切的关系. 自由基学说认为, 人体内的内源性和外源性的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 会攻击细胞, 引起 DNA、蛋白质和脂类, 尤其是不饱和脂肪酸等大分子物质变性和交联, 损伤 DNA、生物膜、重要的结构蛋白和功能蛋白, 从而引起衰老的发生<sup>[12]</sup>. 线粒体不仅是人体内源性 ROS 产生的主要场所, 同时也是 ROS 攻击的首要目标, 这也部分解释了本研究的差异表达蛋白质中线粒体蛋白质的比例较高的问题. 在 7 个差异表达的线粒体蛋白质中, 6 个蛋白质在老年组的结肠黏膜上皮中表达下调. 已有研究表明, 年龄相关的线粒体功能衰退是细胞、组织或器官衰老的一个重要原因, 而且衰老又会导致线粒体功能的进一步下降, 从而形成一个恶性循环<sup>[13]</sup>, 这些线粒体蛋白质在老年人的结肠黏膜上皮中表达下调, 说明线粒体功能衰退是结肠黏膜上皮衰老的一个重要原因。

本研究有 2 个抗氧化蛋白即 Selenium-binding protein 1 和 Flavin reductase 在老年人的结肠黏膜上皮中表达下调. 硒是机体中起抗氧化作用的含硒酶如磷脂氢谷胱甘肽过氧化物酶(Se-PHGPx)等的重要组成部分<sup>[14]</sup>, selenium-binding protein 1 具有结合硒的作用, 其表达下调影响硒的供应, 进而影响细胞抗氧化酶的活性. flavin reductase 具有保护细胞免于氧化破坏的功能, 其表达下调削弱细胞的抗氧化能力. selenium-binding protein 1 和 flavin reductase 在老年人的结肠黏膜上皮中表达下调, 说明细胞抗氧化功能下降是结肠黏膜上皮衰老的原因之一.

另外 2 个蛋白质即 EF-Tu 和 Rhodanese 亦在老年人结肠黏膜上皮细胞中表达下调. EF-Tu 参与蛋白质翻译过程中肽链延长过程, 它在生长代谢功能旺盛的组织中表达较高, 而在代谢功能较低的组织中表达较低<sup>[15]</sup>. 本文比较蛋白质组学研究和免疫组化染色均显示, EF-Tu 在老年人结肠黏膜上皮细胞中表达下调, 这与老年人结肠黏膜上皮功能降低一致. Rhodanese 是一种重要的解毒酶, 参与铁硫蛋白的合成、硫化物的解毒及含硫基蛋白酶的修饰. 硫化氢对结肠黏膜上皮有很强的毒性作用, 它通过络合氧化磷酸化的酶而阻断能量的合成<sup>[16]</sup>, 而 rhodanese 是硫化氢解毒的关键酶, 具有保护肠黏膜的作用. 本文比较蛋白质组学研究和免疫组化染色均显示, rhodanese 在老年人结肠黏膜上皮中表达下调, 说明老年人对硫化氢等有毒物质的解毒能力降低, 从而对许多疾病产生易感.

流行病学调查和临床资料均显示, 年龄因素(衰老)在结直肠癌的发病中具有重要作用, 在 50 岁以后结直肠癌的发病率显著上升<sup>[1,2]</sup>. 为揭示老年人对大肠癌易感性的分子机制, 本研究采用蛋白质组学技术比较青年人与老年人结肠黏膜上皮蛋白质表达谱的差异, 试图筛选与结肠黏膜上皮癌变有关的衰老相关蛋白质. 本研究鉴定的 17 个结肠黏膜上皮衰老相关蛋白质中, 有 4 个蛋白质即 Rack1、stress-70 protein、40 S ribosomal protein SA 和 chloride intracellular channel protein1 可能与癌变有关.

Rack1(receptor of activated C kinase 1)是 protein kinase C 的接头蛋白(adaptor protein), 具有调节 PKC 信号传导通路活性的作用. 研究表明<sup>[17, 18]</sup>, Rack1 是衰老相关蛋白质, 其表达下调与多种器官衰老密切相关. 同时有研究显示: Rack1 具有抑癌

作用, 它通过抑制 Src 激酶信号传导通路, 进而抑制 Rho GTPases、Stat3 和 Myc 癌蛋白的功能, 下调 cyclin D1、CDK4 和 CDK2 的活性, 导致细胞周期阻滞于 G(1)/S 期<sup>[19]</sup>. 本研究比较蛋白质组学研究和免疫组化染色均显示, Rack1 的表达水平在老年人结肠黏膜上皮中显著降低, 提示 Rack1 不仅在结肠黏膜上皮衰老过程中起着重要的作用, 并且可能与老年人对结肠癌易感有关. 40 S ribosomal protein SA 也称为 laminin-binding protein, 介导层黏蛋白的生物学作用如肿瘤细胞黏附和转移等<sup>[20]</sup>, 它在结肠癌组织中其 mRNA 呈高表达<sup>[21]</sup>, 而且其高表达与结肠癌的转移相关<sup>[22]</sup>. 本研究比较蛋白质组学研究和 real-time PCR 检测均显示, 40S ribosomal protein SA 在老年人结肠黏膜上皮中表达增加, 可能也是其对癌症易感的原因之一. Stress-70 protein 也称 Grp75 或 mortalin, 属于 HSP70 家族, 在细胞中承担多种功能, 包括应激反应、抗原处理、调控细胞增殖、分化以及参与肿瘤的发生等. 研究显示, mortalin 在结直肠癌中过表达<sup>[23]</sup>, 下调 mortalin 的表达可使永生化的细胞的生长受到抑制<sup>[24]</sup>, 而共转染 mortalin 和 hTERT 基因, 使其高表达, 则可以显著延长人成纤维母细胞的寿命<sup>[25]</sup>. 本研究中发现, mortalin 在老年组结肠黏膜上皮中的表达增加, 这提示衰老的结肠黏膜上皮对癌症的易感可能与 mortalin 的高表达有关. chloride intracellular channel protein 1 是位于核膜上的氯离子通道, 也称为 NCC27, 它参与细胞周期调节、刺激细胞增殖, Valenzuela 等<sup>[26]</sup>研究发现, NCC27 只在中国仓鼠卵巢细胞系 CHO-K1 的细胞周期的 G2/M 期表达, 用氯离子通道阻滞剂阻滞 NCC27 的作用后, 细胞出现 G2/M 期阻滞. 本研究中 NCC27 在老年人的结肠黏膜上皮中表达上调, 可能会导致发生 DNA 突变等损伤的衰老结肠黏膜上皮细胞 G2/M 期的速度加快, 使其对癌症易感. 关于 Rack1、stress-70 protein、40 S ribosomal protein SA 和 chloride intracellular channel protein 1 4 个蛋白质与结肠癌变的相关性有待实验研究进一步证实.

## 参 考 文 献

- 1 Fante R, Benatti P, Gregorio C, *et al.* Colorectal carcinoma in different age groups: a population-based investigation. *Am J Gastroenterology*, 1997, **92** (2): 1505~1509
- 2 Atillasoy E, Holt P R. Gastrointestinal proliferation and aging. *J Gerontol*, 1993, **48** (2): B43~49



- 3 Lopes G S, Mora O A, Cerri P, *et al.* Mitochondrial alterations and apoptosis in smooth muscle from aged rats. *Biochim Biophys Acta*, 2004, **1658** (3):187~194
- 4 Ono T, Ikehata H, Pithani V P, *et al.* Spontaneous mutations in digestive tract of old mice show tissue-specific patterns of genomic instability. *Cancer Res*, 2004, **64** (19): 6919~6923
- 5 Tsurudome Y, Hirano T, Hirata K, *et al.* Age-associated increase of 8-hydroxydeoxyguanosine in human colotrectal tissue DNA. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2001, **56** (11): B483~485
- 6 Xiao Z Q, Jaszewski R, Majumdar A P. Aging enhances G(1) phase in the colonic mucosa of rats. *Mech Ageing Dev*, 2000, **116** (1): 1~14
- 7 Xiao Z Q, Moragoda L, Jaszewski R, *et al.* Aging is associated with increased proliferation and decreased apoptosis in the colonic mucosa. *Mech Ageing Dev*, 2001, **122** (15): 1849~1864
- 8 Toyota M, Itoh F, Kikuchi T, *et al.* DNA methylation changes in gastrointestinal disease. *J Gastroenterol*, 2002, **37** (Suppl 14): 97~101
- 9 Gygi S P, Rochon Y, Franz B R, *et al.* Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol*, 1999, **19** (3): 1720~1730
- 10 Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C</sup> (T) method. *Methods*, 2001, **25** (4): 402~408
- 11 Wu W J, Zeng J, Lu Y F, *et al.* Impact of preoperative lymphatic chemotherapy on relapse and metastasis of breast cancer and its mechanism. *Ai Zheng*, 2005, **24** (12): 1537~1541
- 12 Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*, 1956, **11** (3): 298~300
- 13 Shigenaga M K, Hagen T M, Ames B N. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (23): 10771~10778
- 14 Patrick L. Selenium biochemistry and cancer: a review of the literature. *Altern Med Rev*, 2004, **9** (3): 239~258
- 15 He H P, Chen M, Scheffler N K, *et al.* Phosphorylation of mitochondrial elongation factor Tu in ischemic myocardium: basis for chloramphenicol mediated cardioprotection. *Circ Res*, 2001, **89** (5): 461~467
- 16 Picton R, Eggo M C, Merrill G A, *et al.* Mucosal protection against sulphide: importance of the enzyme rhodanese. *Gut*, 2002, **50**(2): 201~205
- 17 Battaini F, Pascale A. Protein kinase C signal transduction regulation in physiological and pathological aging. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, **1057**: 177~92
- 18 Battaini F, Pascale A, Paoletti R, *et al.* The role of anchoring protein RACK1 in PKC activation in the ageing rat brain. *Trends Neurosci*, 1997, **20** (9): 410~415
- 19 Mamidipudi V, Zhang J, Lee K C, *et al.* RACK1 regulates G1/S progression by suppressing Src kinase activity. *Mol Cell Biol*, 2004, **24** (15): 6788~6798
- 20 Liotta L A, Rao C N, Wewer U M, *et al.* Biochemical interactions of tumor cells with the basement membrane. *Annu Rev Biochem*, 1986, **55**: 1037~1057
- 21 Yow H K, Wong J M, Chen H S, *et al.* Increased mRNA expression of a laminin-binding protein in human colon carcinoma: complete sequence of a full-length cDNA encoding the protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85** (17): 6394~6398
- 22 Mafune K, Ravikumar T S, Wong J M, *et al.* Expression of a *M<sub>t</sub>* 32 000 laminin-binding protein messenger RNA in human colon carcinoma correlates with disease progression. *Cancer Res*, 1990, **50** (13): 3888~3891
- 23 Dundas S R, Lawrie L C, Rooney P H, *et al.* Mortalin is over-expressed by colorectal adenocarcinomas and correlates with poor survival. *J Pathol*, 2005, **205** (1): 74~81
- 24 Wadhwa R, Takano S, Taira K, *et al.* Reduction in mortalin level by its antisense expression causes senescence-like growth arrest in human immortalized cells. *J Gene Med*, 2004, **6** (4): 439~444
- 25 Kaul S C, Yaguchi T, Taira K, *et al.* Overexpressed mortalin (mot-2) /mthsp70/GRP75 and hTERT cooperate to extend the *in vitro* lifespan of human fibroblasts. *Exp Cell Res*, 2003, **286** (1): 96~101
- 26 Valenzuela S M, Mazzanti M, Tonini R, *et al.* The nuclear chloride ion channel NCC27 is involved in regulation of the cell cycle. *J Physiol*, 2000, **529** ( Pt 3): 541~552

## Comparative Proteomics Analysis of Normal Colonic Epithelium in Young and Old People\*

ZHENG Jie<sup>1)\*\*</sup>, ZHU Guo<sup>1,2)\*\*</sup>, CHEN Zhu-Chu<sup>1,2)</sup>, LI Ming<sup>1,2)</sup>, CHENG Ai-Lan<sup>1)</sup>,  
RUAN Lin<sup>1)</sup>, LIU Ying-Fu<sup>1,2)</sup>, YUAN Wei-Jian<sup>3)</sup>, ZHANG Peng-Fei<sup>1)</sup>, XIAO Zhi-Qiang<sup>1)\*\*\*</sup>

<sup>1)</sup>Key Laboratory of Cancer Proteomics of Ministry of Health of China, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China;

<sup>2)</sup>Cancer Research Institute, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China;

<sup>3)</sup>Department of Gastroenterology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

**Abstract** The aging process of human colonic epithelium involves a slow decline in physiological vigor and an increasing susceptibility to age-related diseases, especially, colon cancer, but the molecular mechanisms of the aging and susceptibility of aged colonic epithelium to carcinogenesis is still unclear. Identification of aging related proteins in colonic epithelium will help to reveal the molecular mechanisms of colonic epithelial aging and age-related colonic diseases. Therefore, the total proteins of human normal colonic epithelial tissues from 10 young and 10 old men were separated by two-dimensional gel electrophoresis(2-DE), respectively. PDQuest software was applied to analyze 2-DE images, the differentially expressed protein spots of colonic epithelium between young and old groups were identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS), and the expression levels of partial identified proteins were determined by real-time quantitative PCR and immunohistochemistry. Well-resolved, reproducible 2-DE maps of human colonic epithelial tissues from young and old men were established, 17 aging related proteins were identified by MALDI-TOF-MS, and the differential expression levels of partial identified proteins were confirmed by real-time quantitative PCR and immunohistochemistry. The results indicate that injury of mitochondrial function and decline of antioxidant capability are important reasons for the aging of human colonic epithelium, and four differential proteins (guanine nucleotide-binding protein beta subunit-like protein, stress-70 protein, 40 S ribosomal protein SA and chloride intracellular channel protein1) may be involved in susceptibility of aged colonic epithelium to carcinogenesis.

**Key words** colonic epithelium, ageing, proteomics, cancer susceptibility, two-dimensional gel electrophoresis, mass spectrometry, immunohistochemistry, real-time quantitative PCR

\*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30240056, 30370642).

\*\*ZHENG Jie and ZHU Guo contributed equally to this work.

\*\*\*Corresponding author . Tel: 86-731-4327239, Fax: 86-731-4327332, E-mail: zqxiao2001@yahoo.com.cn

Received: June 12, 2006 Accepted: August 26, 2006