

[24] 周婷婷,张建鹏,张振伟,等. 电压门控钠离子通道 β 亚基的研究[J]. 生命的化学, 2010, 30(4): 540-544.

[25] 丁超,何振山,齐书英,等. 兔急性心肌梗死后二月心肌细胞钠离子通道活性的变化[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志, 2003, 17(2): 134-136.

[26] 姚金朋,高尔. 心脏氯离子通道研究进展[J]. 医学综述, 2007, 13(22): 1688-1691.

[27] 薄冰. 氯离子通道在心脏起搏活动中的作用研究进展[J]. 科技资讯, 2014, 12(14): 210.

[28] Ao Mei, Venkatasubramanian J, Boonkaewwan C, et al. Lubiprostone activates Cl^- secretion via cAMP signaling and increases membrane CFTR in the human colon carcinoma cell line, T84[J]. Digest Dis Sci, 2011, 56(2): 339-351.

[29] Middleton LM, Harvey RD. PKC rCFTR Cl^- channel function in guinea pig ventricular myocytes[J]. Am J Physiol, 1998, 275(1): 293-302.

[30] 丁铭格,王晓明. 容积敏感性外向整流氯离子通道的研究进展[J]. 国际老年医学杂志, 2010, 31(6): 250-253.

[31] 郑雪冰,王蕊,杨海玲. 氯离子通道及其阻滞剂对家兔心肌缺血再灌注心律失常的影响[J]. 中华医学杂志, 2013, 93(15): 1168-1173.

[32] Zhou SS. Cl^- channels: what role do they play in mammalian heart[J]. Acta physiologica Sinica, 2006, 58(2): 104-109.

[33] 薄冰. ClC-2 氯离子通道在心脏起搏活动中的作用研究进展[J]. 科技创新导报, 2014, 11(15): 25.

[34] 薄冰. 心脏 ClC-3 容积感受性氯离子通道研究进展[J]. 科技资讯, 2014, 12(15): 223-224.

[35] Duan DY, Liu LL, Bozeat N, et al. Functional role of anion channels in cardiac diseases[J]. Acta Pharmacol Sin, 2005, 26(3): 265-278.

(收稿日期: 2015-06-25 修回日期: 2015-09-15)

• 综 述 •

酶原颗粒蛋白 16 在消化系统中的表达部位及功能研究进展*

朱义芳^{1,2}, 郭元彪²综述, 陶传敏^{1△}审校(1. 四川大学华西医院实验医学科, 成都 610041; 2. 四川省成都市第三人民医院实验医学研究部 610031)

【关键词】 酶原颗粒蛋白 16; 结构; 表达部位; 功能
DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2016. 05. 051 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)05-0698-03

酶原颗粒蛋白 16(ZG16)是 1994 年在胰腺酶原颗粒中发现的一种分泌性糖蛋白,该蛋白主要位于胰腺的腺泡细胞、肝细胞以及从胃到直肠的整个消化道的杯状细胞内,且表达部位不同的蛋白发挥的功能也不同。截至目前,对该蛋白的功能认知甚少,现有的功能研究主要指向调控蛋白分选、真菌识别、离子传导。酶原颗粒蛋白 16 在胰腺、肝脏、胃肠道等部位的正常组织高表达,而在肿瘤发生后检测到表达降低或缺失,该蛋白在正常组织中的功能及是否调控肿瘤的发生与演进仍是亟待解决的难题。虽然在胚胎干细胞及诱导多功能干细胞中也有不同程度表达,但该蛋白是否与多功能干细胞的免疫原性有关仍存在极大争议。本文就其发现与结构、在消化系统中的表达部位、可能的功能等方面的研究进展做一阐述。

1 ZG16 的发现与结构

胰腺腺泡细胞内存在大量的酶原颗粒,用于储存内质网合成、高尔基体包装的各种酶类。ZG16 最初即发现位于大鼠胰腺酶原颗粒膜上,蛋白相对分子质量为 16×10^3 ^[1]。分离获取大鼠胰腺酶原颗粒膜,ZG16 蛋白印迹可获得一条强带(单体)和一条弱带(二聚体)^[2]。其他研究通过液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)和同位素相对标记与绝对定量(iTRAQ)技术也在酶原颗粒蛋白中检测到 ZG16^[3-4]。但 ZG16 非膜蛋白,没有跨膜结构域,该蛋白通过糖类识别结构域与酶原颗粒膜上的糖蛋白结合^[2]。用 ZG16 抗体预先处理酶原颗粒膜,可使结合到膜

上的 ZG16 蛋白量降低约 50%^[2]。Schmidt 等^[5]也证实了 ZG16 结合到酶原颗粒膜上,用碳酸氢钠处理后可使 ZG16 从膜上脱离,从而增加该蛋白的检测量,用碳酸氢钠处理酶原颗粒内容物也能在其中检测到少量该蛋白。

ZG16 糖类识别区域的氨基酸序列与植物凝集素 Jacalin 序列相似,因而归属于 Jacalin 凝集素家族。ZG16 具有核心凝集素结构域(氨基酸残基 21~159),两个半胱氨酸残基(cys164, cys167)紧随其后,可能形成分子内二硫键。ZG16 形成 β 折叠结构(3 个 β 折叠片段,片段 1: β_1 、 β_2 、 β_{11} 、 β_{12} , 片段 2: β_3 、 β_4 、 β_6 , 片段 3: β_7 ~ β_{10}),还具有一个 α 螺旋结构位于 β_2 和 β_3 链之间。ZG16 的糖结合位点由三个环组成,包括位于 β_1 、 β_2 之间的 GG 环,位于 β_7 、 β_8 之间的识别环,位于 β_{11} 、 β_{12} 之间的结合环。ZG16 通过糖结合位点与甘油分子结合,也可通过 lys102、lys106、lys122 形成的空间结构在其蛋白表面形成阳性正电荷通道,与阴性负电荷的糖胺聚糖结合^[6]。

2 ZG16 与消化系统

胰腺是人体重要的消化腺,能形成并分泌酶原颗粒内的多种蛋白酶。目前研究表明,ZG16 位于胰腺的酶原颗粒膜上,在胰腺出现病理性改变时,ZG16 水平也会随之改变。Borta 等^[7]的研究发现碳酸氢钠可将 ZG16 从酶原颗粒膜上洗下来。胰腺酶原颗粒膜提取的胆固醇-鞘磷脂微区能检测到 ZG16 蛋白,提示分泌性凝集素 ZG16 可能通过与膜微区上的糖脂或糖

* 基金项目:成都市卫计委科学研究基金资助项目(2014133)。
△ 通讯作者, E-mail: 53113072@qq. com。

蛋白结合来附着到酶原颗粒膜上^[8]。用胆囊收缩素和蛙皮素处理大鼠可引起酶原颗粒的大量释放,引发胰腺炎,同时可检测到大鼠胰腺中 ZG16 mRNA 水平降低^[1]。而用地塞米松处理胰腺 AR42J 细胞系可明显上调 ZG16 mRNA 水平^[1]。Neuschwander-Tetri 等^[9]的研究也证实蛙皮素引发的胰腺炎大鼠模型可引起 ZG16 mRNA 水平急剧降低,随时间推移又能逐渐恢复至正常水平。

肝脏是人体另一重要的消化腺,能分泌多种蛋白质,调控脂肪和胆固醇的代谢。肝细胞排列分布特殊,不能形成类似胰腺的腺泡。Northern 印迹及斑点印迹法显示 ZG16 在成人肝脏高表达,而 RT-PCR、northern 印迹和免疫组化显示,在肝细胞肝癌患者组织中表达下调^[10]。Tateno 等^[11]采用 RT-PCR 检测 24 种人类组织后发现,ZG16 在肝脏、胰腺、小肠高表达,在胎肝中低表达,在骨髓、脾脏、胸腺等组织中无表达;免疫组化发现胰腺的腺泡细胞,盲肠、小肠、阑尾、结肠、直肠等部位的杯状细胞均存在大量 ZG16;血清经免疫沉淀后蛋白印迹也可检测到少量 ZG16,说明 ZG16 作为分泌蛋白,还能分泌到血液中,到达全身各个部位,因而其具体的功能更成为谜团。

对大鼠的多器官组织进行 Northern 杂交分析,发现大鼠的盲肠和结肠分泌黏液的杯状细胞中也存在 ZG16 mRNA^[1]。基因芯片结果显示 ZG16 选择性表达于回肠,可能作为该肠段的标志物^[12]。Rodríguez-Pineiro 等^[13]用 LC-MS 法检测到大鼠胃及各个肠段都能检测到 ZG16,其中胃表达量最低,近端结肠表达量最高,分层聚类分析显示 ZG16、CLCA1 与肠道黏液中的主要成分黏蛋白 MUC2 相关,组织免疫荧光显示三者表达部位一致。Wang 等^[14]发现人 ZG16 mRNA 在正常结肠组织中表达,而在结肠肿瘤组织中缺失。基因芯片筛查^[15]、大规模并行测序分析及 RT-PCR^[16]证实人结肠肿瘤组织中 ZG16 表达明显下调。2013 年的一项研究获得的基因芯片结果提到,ZG16 在原发结直肠癌组织与腹腔转移组织基因表达水平存在差异,提示 ZG16 可能作为结肠癌预后指标^[17]。Kim 等^[18]获得的基因芯片的结果显示溃疡性结肠炎患者组织 ZG16 mRNA 水平升高 6.3 倍,表明炎症状态和肿瘤状态 ZG16 表达截然不同。这些研究提示,ZG16 可能作为肠道生理及病理情况下诊断及预后的指标。

3 ZG16 可能的功能

3.1 调节胰腺酶原颗粒的浓缩分选 胰腺腺泡细胞具有分泌蛋白酶原的功能,其蛋白酶原产物首先在内质网上合成,然后在反向高尔基体网络进行包装,形成酶原颗粒,分泌蛋白经分选受体识别,聚集到酶原颗粒的膜上,酶原颗粒从高尔基体网络分离出来,储存在腺泡细胞的顶端,最后分泌到细胞外。分泌蛋白能准确地被分选并送达靶细胞,分选受体是关键。Kleene 等^[2]研究表明,ZG16 是位于胰腺酶原颗粒膜上的蛋白分选受体。该研究组采用体外的浓缩分选模型,发现:(1) ZG16 主要位于酶原颗粒膜上,少量位于酶原颗粒内容物中;(2)酸性条件下 ZG16 可促进酶原颗粒内容物中的分泌蛋白聚集到酶原颗粒膜上,碱性条件下 ZG16 从酶原颗粒膜上洗下来;(3)用 ZG16 抗体预处理酶原颗粒膜可抑制 50%~60% 的浓缩分选。该研究还发现,ZG16 通过糖胺聚糖与酶原颗粒膜上的糖蛋白结合,高浓度半乳糖可竞争性地与 ZG16 糖类识别区域结合,抑制该识别区域的浓缩分选功能;水解硫酸化糖苷键的硫酸软骨素酶 ABC 预处理酶原颗粒膜也可明显抑制蛋白浓缩分选。进一步研究发现,胰腺腺泡细胞酶原颗粒膜上富含胆固醇和鞘磷脂,可形成不被去垢剂溶解的富含糖脂的复合

体,ZG16 结合到该复合体上,抑制这些成分与膜上糖脂复合体的结合会引起新合成蛋白聚集在高尔基体和内质网上,不能进一步组装并分泌到细胞外^[8]。

3.2 糖蛋白分泌的运输载体 就胰腺而言,酶原颗粒形成后,需要到达腺泡细胞的顶端进行膜融合,再通过融合孔以胞吐形式将酶原颗粒内的糖蛋白分泌出去。ZG16 可能还参与蛋白浓缩分选后的分泌过程。Zhou 等^[10]的研究证实,将 ZG16 转染到 Hela 细胞后,通过脉冲追踪实验可在细胞培养液中检测到相对分子质量大于 110×10^3 的 4 种糖蛋白。进一步检测 ZG16 是否通过调节蛋白糖基化来调控糖蛋白的分泌,发现在加入糖蛋白 N-糖基化抑制剂衣霉素或在葡萄糖缺失的情况下,ZG16 的分泌量不受影响,提示 ZG16 可能仅仅是糖蛋白分泌过程所需的运输载体^[10]。

3.3 参与调控 K^+ 传导 胰腺的腺泡细胞分泌蛋白酶原还需要 K^+ 、 Cl^- 传导的参与。二氢吡啶是常用的钙拮抗剂,能调节 K^+ 、 Cl^- 传导,早期研究发现二氢吡啶通过高亲和力和结合并反向调控 Mdr1 蛋白发挥作用^[19]。但 Braun 等^[20]运用人工合成的二氢吡啶衍生物 $[3H]BZDC-DHP$,通过光亲和纯化及其后的测序发现,该衍生物标记的蛋白为 ZG16,同时该衍生物能特异的阻断酶原颗粒中的 K^+ 传导,因而提示 ZG16 可能参与调控酶原颗粒膜上的 K^+ 传导。

3.4 识别病原性真菌 通过糖结合物芯片和正向亲和层析法发现 ZG16 通过糖结合位点 Asp151 高选择性结合甘露糖,Asp151 位点突变明显阻碍与甘露糖的结合,进一步检测发现 ZG16 可识别细胞壁富含甘露糖的病原性念珠菌和马拉色拉菌及非病原菌酿酒酵母菌,但这种结合并未抑制真菌的生长及与肠上皮细胞的结合,因而它们之间的结合仅仅是物理的结合还是会发挥作用尚不得知^[11]。

4 结 语

从目前的研究来看,比较明确的是 ZG16 能与酶原颗粒结合调控离子传导从而促进蛋白酶原的分泌,与甘露糖结合可能发挥抗真菌作用。但关于 ZG16 在肝细胞中的功能,在肠道杯状细胞中的功能却缺乏相关研究,特别是结直肠部位几乎不合成和分泌除黏蛋白外的其他蛋白,而 ZG16 却在该部位高表达,该蛋白存在的意义更令人匪夷所思。杯状细胞相关的研究主要集中其分泌的黏蛋白能作为肠道固有免疫第一防线,而肠道组织中 ZG16 与黏蛋白的表达部位一致,作为分泌蛋白的 ZG16 能否像黏蛋白一样分泌到肠腔,参与维持肠黏膜的动态平衡、调控微生物-宿主免疫反应^[21]。在消化道肿瘤中,ZG16 的缺失已有较多文献证实,但其实质是由于肿瘤细胞蛋白合成功能紊乱引起的还是 ZG16 免疫监视功能的缺失引起,还需要进一步的研究。胃壁组织中不存在杯状细胞,但仍表达少量 ZG16,也有许多值得探究的问题。因此,深入详尽地研究 ZG16 在消化系统生理病理状态下的表达水平及发挥的作用途径,或许对于预防消化细胞疾病、阻断疾病的演进、改变疾病转归具有重要意义。

参考文献

- [1] Cronshagen U, Volland P, Kern HF. cDNA cloning and characterization of a novel 16 kDa protein located in zymogen granules of rat pancreas and goblet cells of the gut [J]. Eur J Cell Biol, 1994, 65(2): 366-377.
- [2] Kleene R, Dartsch H, Kern HF. The secretory lectin ZG16p mediates sorting of enzyme proteins to the zymo-

gen granule membrane in pancreatic acinar cells[J]. Eur J Cell Biol, 1999, 78(2): 79-90.

[3] Rindler MJ, Xu CF, Gumper I, et al. Proteomic analysis of pancreatic zymogen granules; identification of new granule proteins[J]. J Proteome Res, 2007, 6(8): 2978-2992.

[4] Chen X, Ulintz PJ, Simon ES, et al. Global topology analysis of pancreatic zymogen granule membrane proteins[J]. Mol Cell Proteomics, 2008, 7(12): 2323-2336.

[5] Schmidt K, Dartsch H, Linder D, et al. A submembranous matrix of proteoglycans on zymogen granule membranes is involved in granule formation in rat pancreatic acinar cells[J]. J Cell Sci, 2000, 113 (Pt12): 2233-2242.

[6] Kanagawa M, Satoh T, Ikeda A, et al. Crystal structures of human secretory proteins ZG16p and ZG16b reveal a Jacalin-related beta-prism fold[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 404(1): 201-205.

[7] Borta H, Aroso M, Rinn C, et al. Analysis of Low Abundance Membrane-Associated Proteins from Rat Pancreatic Zymogen Granules [J]. J Proteome Res, 2010, 9 (10): 4927-4939.

[8] Schmidt K, Schrader M, Kern HF, et al. Regulated apical secretion of zymogens in rat pancreas. Involvement of the glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoprotein GP-2, the lectin ZG16p, and cholesterol-glycosphingolipid-enriched microdomains [J]. J Biol Chem, 2001, 276 (17): 14315-14323.

[9] Neuschwander-Tetri BA, Fimmel CJ, Kladney RD, et al. Differential expression of the trypsin inhibitor SPINK3 mRNA and the mouse ortholog of secretory granule protein ZG-16p mRNA in the mouse pancreas after repetitive injury[J]. Pancreas, 2004, 28(4): 104-111.

[10] Zhou YB, Cao JB, Yang HM, et al. hZG16, a novel human secreted protein expressed in liver, was down-regulated in hepatocellular carcinoma[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 355(3): 679-686.

[11] Tatenno H, Yabe R, Sato T, et al. Human ZG16p recognizes pathogenic fungi through non-self polyvalent mannose in the digestive system[J]. Glycobiology, 2012, 22 (2): 210-220.

[12] Comelli EM, Lariani S, Zwahlen MC, et al. Biomarkers of human gastrointestinal tract regions[J]. Mamm Genome, 2009, 20(8): 516-527.

[13] Rodríguez-Pineiro AM, Bergström JH, Ermund A, et al. Gastrointestinal mucus proteome reveals Muc2 and Muc5ac accompanied by a set of core proteins-2. Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2013, 305 (5): 348-356.

[14] Wang L, Hahnloser D, Boardman LA, et al. Loss of expression of zymogen granule protein 16 in colorectal cancer[J]. Cancer Res, 2005, 2005(1): 452.

[15] Mojica W, Hawthorn L. Normal colon epithelium: a dataset for the analysis of gene expression and alternative splicing events in colon disease[J]. BMC Genomics, 2010, 11(1): 1-14.

[16] Alves PM, Levy N, Stevenson BJ, et al. Identification of tumor-associated antigens by large-scale analysis of genes expressed in human colorectal cancer[J]. Cancer Immun, 2008, 8: 11.

[17] Tan F, Liu F, Liu H, et al. CTHRC1 is associated with peritoneal carcinomatosis in colorectal cancer; a new predictor for prognosis[J]. Med Oncol, 2013, 30(1): 1-7.

[18] Kim M, Lee S, Yang SK, et al. Differential expression in histologically normal crypts of ulcerative colitis suggests primary crypt disorder[J]. Oncol Rep, 2006, 16 (4): 663-670.

[19] Boer R, Dichtl M, Borchers C, et al. Reversible labeling of a chemosensitizer binding domain of p-glycoprotein with a novel 1,4-dihydropyridine drug transport inhibitor[J]. Biochemistry, 1996, 35(5): 1387-1396.

[20] Braun M, Thevenod F. Photoaffinity labeling and purification of ZG-16p, a high-affinity dihydropyridine binding protein of rat pancreatic zymogen granule membranes that regulates a K⁺-selective conductance[J]. Mol Pharmacol, 2000, 57(2): 308-316.

[21] Johansson ME, Larsson JM, Hansson GC. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(Suppl 1): 4659-4665.

(收稿日期: 2015-06-28 修回日期: 2015-09-18)

• 综 述 •

尿红细胞形态及其相关参数的研究进展

平牧野 综述, 丛玉隆[△] 审校(解放军总医院南楼检验科, 北京 100853)

【关键词】 尿红细胞形态; 红细胞位相; 自动化尿沉渣分析仪
DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2016. 05. 052 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)05-0700-04

尿红细胞形态学检查不仅是尿液常规检查的内容, 而且对泌尿系统疾病的定位诊断、鉴别诊断和预后同样具有重要意义。本文详细阐述了尿红细胞形态学的发展进程与应用现状, 在此基础上对自动化尿沉渣分析仪中红细胞形态相关参数进

[△] 通讯作者, E-mail: yulongc@263. net。