

吸烟对肺组织 D4-GDI 表达的影响及其与慢性阻塞性肺疾病相关性的蛋白质组学研究*

欧阳卿^{1, 2)} 胡瑞成^{1)**} 戴爱国¹⁾ 谭双香¹⁾ 肖志强³⁾ 汤参娥³⁾

¹⁾ 湖南省老年医院 - 湖南省老年医学研究所呼吸疾病研究室, 长沙 410016; ²⁾ 南华大学研究生院, 衡阳 421001;

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 慢性阻塞性肺疾病(COPD)是环境因素与遗传因素共同作用的结果, 而吸烟是导致 COPD 发生的最主要危险因素, 然而, 吸烟导致 COPD 的机制及 COPD 的遗传易感机制目前尚未完全阐明. 蛋白质组学研究方法具有高效和信息含量丰富的特点, 为 COPD 研究提供了有力的帮助, 被认为在 COPD 的研究领域具有广阔的前景. 运用二维凝胶电泳和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱蛋白质组学研究方法结合生物信息学技术, 对不吸烟者、非 COPD 吸烟者和吸烟 COPD 患者的肺组织进行蛋白质组比较, 共鉴定出 24 种表达差异蛋白. 研究发现, 非 COPD 吸烟者肺组织 ρ -GDP 解离抑制因子 2(D4-GDI)表达水平为不吸烟者的 1.7 倍, 吸烟 COPD 患者肺组织 D4-GDI 表达水平接近非 COPD 吸烟者的 2 倍. 通过免疫组织化学染色和 Western-blotting 检测对肺组织 D4-GDI 表达水平进行验证, 获得了与蛋白质组学研究相一致的结果. 结果首次说明: 吸烟能够导致肺组织 D4-GDI 表达水平升高, D4-GDI 参与了 COPD 的发病机制而且可能与 COPD 易感性相关.

关键词 慢性阻塞性肺疾病, 蛋白质组学, 二维凝胶电泳, 质谱分析, ρ -GDP 解离抑制因子 2(D4-GDI)

学科分类号 Q81, R56

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00240

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)具有发病率高、致残率高、致死率高的特征, 严重危害全球中老年人群的身心健康. 吸烟是导致 COPD 的最主要原因, 而个体的遗传易感性在很大程度上决定吸烟者是否发生 COPD^[1]. 但是, 吸烟引起 COPD 的机制以及个体的遗传易感机制目前尚未完全阐明. 近年来, 研究人员利用蛋白质组学技术对 COPD 患者的支气管肺泡灌洗液、血清、痰液等进行了研究, 寻找到一些新的疾病标志物, 为进一步研究 COPD 的发病机制提供了新的线索^[2]. 本研究通过蛋白质组学技术、免疫组织化学染色和免疫印迹技术, 首次研究发现, 吸烟者肺组织 ρ -GDP 解离抑制因子 2(Rho GDP-dissociation inhibitor 2, D4-GDI)表达增高, 而吸烟 COPD 患者肺组织 D4-GDI 表达水平高于非 COPD 吸烟者.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象与肺组织标本收集. 研究对象包括不吸烟者(对照组)、非 COPD 中重度吸烟者(吸烟组)、中重度吸烟 COPD 患者(COPD 组)各 24 例, 所有对象均被告知本研究项目内容并自愿参与本研究. 研究对象因患早期周围型肺癌于 2007 年 6 月~2009 年 3 月在湖南省老年医院胸外科行肺叶

* 湖南省自然科学基金(06JJ4056), 湖南省科技厅科研基金(2007FJ3016, 2008FJ4206, 2009JT3054)和湖南省卫生厅科研基金(B2003-130, B2008-026)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0731-84747306, E-mail: huruicheng@hotmail.com

收稿日期: 2010-05-05, 接受日期: 2010-06-14

切除术,术前均未经放疗、化疗,术后经病理学检查均诊断为鳞癌。根据患者的吸烟史和术前的肺功能检查、支气管镜检查、肺部 CT 扫描、心电图检查对患者进行分组,按照中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组 2007 年制定的诊断标准^[1]进行 COPD 诊断。术中取距离肿块 4 cm 以上的边缘肺组织,用灭菌生理盐水洗净血液后-80℃ 保存备用。对照组男 19 例、女 5 例,平均年龄(61.9±6.7)岁,第一秒用力呼气容积(FEV1)占预计值百分比(85.8±6.7)%, FEV1/FVC(用力肺活量)(82.3±5.4)%,行左下肺叶切除 16 例、右下肺叶切除 8 例。吸烟组患者男 17 例、女 7 例,年龄(60.7±6.3)岁,吸烟指数为(867±132)支每年,FEV1 占预计值百分比(83.4±5.2)%, FEV1/FVC(81.0±6.3)%,行左下肺叶切除 15 例,右下肺叶切除 9 例。COPD 组男 16 例、女 8 例,年龄(63.7±5.4)岁,吸烟指数为(842±146)支每年,其中轻度 COPD 6 例,中度 COPD 18 例,FEV1 占预计值百分比为(65.7±8.6)%, FEV1/FVC (57.9±6.8)%,行左下肺叶切除 14 例,右下肺叶切除 10 例。统计分析表明,3 组患者的年龄、性别结构(χ^2 检验)、标本取材部位(χ^2 检验)均无显著性差异($P>0.05$),吸烟组与 COPD 组的吸烟指数无显著性差异($P>0.05$)。

1.1.2 主要仪器. IPGphor 等电聚焦仪、Ettan DALT II 二维电泳系统、Imagescanner 扫描仪、Labscan 扫描控制和分析前处理软件、Applied Biosystem Voyager-DETM STR BiospectrometryTM workstation System 4307 质谱仪为美国 Amersham Biosciences 公司产品;低温高速冷冻离心机为德国 Hettich 公司产品(16R 型);真空冷冻干燥仪为美国 Savant speed Vac & UVS400 公司产品;恒温水浴箱为英国 Grant 公司产品;Elx800 自动酶标仪购自美国 Bio-Tek 公司;一维蛋白电泳系统、PDQUEST 2D 凝胶图像分析软件为美国 Bio-Rad 公司产品;光学显微镜及照相系统购自日本 Olympus 公司。

1.1.3 主要试剂. Sample grinding kit 组织研磨试剂盒、2D-Quant Kit 蛋白定量试剂盒、硫脲、十二烷基硫酸钠(SDS)、丙烯酰胺(Arc)、甲叉双丙烯酰胺、二硫苏糖醇(DTT)、溴酚蓝、甘氨酸、过硫酸铵、碘乙酰胺、蛋白质分子质量标准、硫代硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)、碳酸氢铵(NH_4HCO_3)、乙腈(ACN)、胰蛋白酶、三氟乙酸(TFA)、基质 α -氰基-4-羟基肉桂酸(CCA)、鼠抗 β -actin 抗体均为美国 Sigma-Aldrich 公司产品;IPGstrip pH 3~10 L 固相 pH 梯

度等电聚焦胶条、等电聚焦缓冲液(pH 3~10)、两性电解质(pharmalyte, pH 3~10)、增强化学发光试剂盒 ECL、苯甲基磺酰氟化物、三羟甲基氨基甲烷、考马斯亮蓝为美国 Amersham Biosciences 公司产品;鼠抗 D4-GDI 单克隆抗体购自美国 SantaCruz 公司;辣根过氧化物酶标记羊抗鼠二抗购自武汉博士德生物工程有限公司;即用型免疫组织化学超敏检测试剂盒(UltraSensitive™ SP)和 DAB 显色剂购自福州迈新生物技术开发公司;PVDF 膜购自 Millipore 公司;磷酸、甘油、乙醇、EDTA 二钠、NaOH、甲醇为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 组织总蛋白的制备. 按照作者报道的方法^[4]制备总蛋白提取物。取 60 mg 组织于液氮下充分研磨,置于 400 μl 裂解液(7 mol/L 脲, 2 mol/L 硫脲, 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)冰上裂解 1 h, 12 000 r/min、4℃ 离心 1 h, 吸取上清即为组织总蛋白溶液, -80℃ 保存备用, 取 5 μl 上清液用 2D Quant Kit 蛋白定量试剂盒测定蛋白质的浓度。

1.2.2 固相 pH 梯度二维电泳与凝胶图像分析. 按照作者报道的方法^[4]。每一组对象随机分为 4 个小组, 每小组 6 例样本, 从 6 例样本的蛋白质制备物中取 200 μg 蛋白质混匀构建一个蛋白质池, 然后从每个蛋白质池中取 800 μg 蛋白质, 按照 IPGphor 等电聚焦系统指南, 将蛋白质提取物与水化液(80 mol/L 尿素, 4% CHAPS, 40 mmol/L Tris, 18 mmol/L DTT, 0.5% IPG pH 3~10 缓冲液, 痕量溴酚蓝)混合至总体积为 450 μl 。蛋白质样本于 IPGphor 等电聚焦仪上 30V 水化 14 h 后, 经 500V 1 h, 1 000V 1 h、8 000V 10 h 进行等电聚焦, 等电聚焦结束后分别于平衡 A 液(50 mmol/L Tris-HCl、pH 8.8, 6 mmol/L 尿素, 30%甘油, 0.2% DTT, 痕量溴酚蓝)和平衡 B 液(50 mmol/L Tris-HCl、pH 8.8, 6 mmol/L 尿素, 30%甘油, 3%碘乙酰胺, 痕量溴酚蓝)各平衡 15 min。平衡后的 IPG 胶条转移至 12% SDS-PAGE 胶上端, 在 Ettan DALT II 垂直电泳槽上进行第二向垂直电泳, 电泳结束后, 2-D 胶进行考马斯亮蓝染色。每一蛋白质池进行 2 次二维电泳。染色后的 SDS-PAGE 凝胶经 Imagescanner 扫描仪以及 LabScan 扫描仪控制软件进行图像扫描以获取二维电泳图谱, 采用 PDQuest 图像分析软件对二维电泳图谱进行分析, 根据蛋白质斑点的吸

光度值计算蛋白质表达水平, 选取表达水平相差 1.5 倍以上的蛋白质斑点进行质谱分析。

1.2.3 质谱分析与蛋白质鉴定. 按照作者报道的方法^[4], 从凝胶中切取目标蛋白斑点, 经乙腈和碳酸氢铵脱色、冷冻抽干后加入 5 μ l TPCK 处理的胰蛋白酶(0.1 mg/L)37 $^{\circ}$ C 消化 18 h, 用乙腈和三氟乙酸萃取蛋白酶解产物, 真空冷冻浓缩至约 5 μ l. 取 0.5 μ l 样品与 0.5 μ l CCA 基质液混合, 进行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)分析. 质谱信号单次扫描累加 50 次, 使用胰蛋白酶自降解峰 m/z 842.50 和 m/z 2211.10 作为内校正, 获得肽质量指纹图谱. 根据肽质量指纹图谱用 Mascot 软件检索 SwissProt 数据库进行蛋白质鉴定(数据库选择为 NCBI nr 数据库, 肽片段容差选择为 100~300 ppm).

1.2.4 免疫组织化学染色. 对每例临床标本进行免疫组织化学检测. 肺组织标本经 4%多聚甲醛固定 12 h, 常规脱水透明后石蜡包埋切片, 按照免疫组织化学超敏试剂盒说明书步骤进行操作, 采用微波进行抗原修复, 一抗浓度稀释比例为 1:100, 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, DAB 显色, 苏木素复染, 以磷酸盐缓冲液替代一抗作为阴性对照. 在显微镜下随机选取至少 10 个高倍镜视野($\times 200$), 至少计数 500 个细胞, 以积分法计算结果^[5]. 即根据每张切片的染色强度和阳性细胞比例计分. 着色强度: 无色 0 分; 浅黄色 1 分; 黄色 2 分; 棕色 3 分. 着色细胞比例: 无着色 0 分; <30%为 1 分; 30%~60%为 2 分; $\geq 60\%$ 为 3 分. 两者相加 0~2 分为阴性; 3~4 分为阳性; 5~6 分为强阳性.

1.2.5 Western-blotting 检测. 以蛋白质池为单位进行检测, 每一蛋白质池检测 2 次. 组织总蛋白经 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶 100V 恒压电泳分离, 按照凝胶面积以 0.65 mA/cm²恒流电转移 1.5 h 将蛋白质自凝胶转印至 PVDF 膜, 5%脱脂奶粉室温封闭 2 h 后, 加入 1:1 000 稀释的一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 封闭液漂洗后加入 1:2 000 稀释的二抗室温孵育 1 h, 漂洗后增强化学发光法发光, 胶片显影. 实验中检测 β -actin 蛋白表达水平作为内对照, 利用图像分析系统对胶片上的条带进行吸光度值分析, 以 D4-GDI 蛋白条带与 β -actin 蛋白条带吸光度值的比值作为 D4-GDI 蛋白表达的相对强度.

1.2.6 统计学分析. 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 两样本均数比较采用 t 检验; 3 组均数比较采用单因素方差分析, 如有差异再采用 q 检验进行两两比较; 组间性别结构和标本取材部位比较采用 χ^2 检验; 组间免疫组织化学染色积分比较采用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义.

2 结 果

2.1 二维电泳图谱分析与质谱分析蛋白质鉴定结果

利用 PDquest 软件对 3 组患者的二维电泳图谱进行分析显示, 3 组蛋白质池获得的图谱蛋白质斑点具有良好的匹配性(图 1). COPD 组二维电泳图谱的蛋白质斑点数为(729 $\pm$ 21)个, 吸烟组二维电泳图谱的蛋白质斑点数为(641 $\pm$ 33)个, 对照组二维电泳图谱的蛋白质斑点数为(775 $\pm$ 38)个, 3 组图谱表达差异达到 1.5 倍以上的蛋白质斑点为 47 个. 通过对以上 47 个蛋白质斑点进行质谱分析,

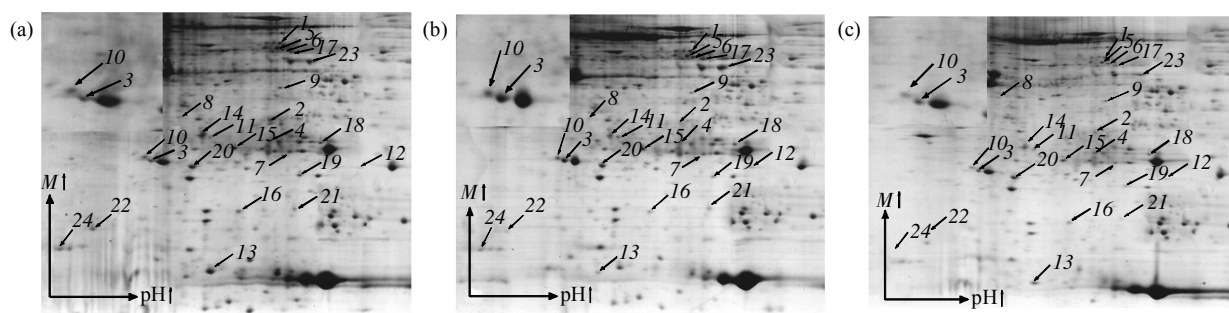


Fig. 1 Representative protein two dimensional electrophoretic maps

For protein two dimensional electrophore, 800 μ g protein was loaded onto each linear IPG strips (pH 3~10 L) for isoelectrofocusing and separated by 10% sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. (a) is a representative map from COPD smokers, (b) is a representative map from non-COPD smokers, and (c) is a representative map from never-smokers, the maps have been clipped therefore not given the full-scale separated protein spots. Two dimensional electrophore images were analyzed by PDQuest software to discover different intensity stained protein spots between groups, and 47 proteins spots were found to be intensity variance more than 1.5 times, for all of the 47 spots, 24 proteins spots (marked with arrows in images, and spot 10 was identified to be D4-GDI) were identified by mass spectrum analyses and database query.

共鉴定出 24 种蛋白质, 其中主要为基本代谢相关酶类、氧化应激相关蛋白、信号转导分子相关蛋白、凋亡相关蛋白, 也还包含少部分其他功能蛋白。表达差异蛋白质的名称、表达变化情况、主要功能及核心鉴定数据见表 1。

Table 1 Characterized differential expressed proteins in lung tissue of COPD smokers and non-COPD smokers when compared with never-smokers

Spot No.	Swiss-prot AC	Protein name	Score	Coverage	Intensity variation*		Main function
					Smoker	COPD	
1	P02675	Fibrinogen β chain	186	42%	2.2	3.3	Aggregation
2	P15157	Tryptase α -1	57	14%	0.5	2.2	Enzymatic activity
3	P02647	Apolipoprotein A-I	153	46%	3.3	2.2	Metabolism
4	P18669	Phosphoglycerate mutase 1	108	50%	1.1	2.9	Metabolism
5	P00352	Retinal dehydrogenase 1	162	36%	1.8	3.8	Metabolism
6	P28838	Cytosol aminopeptidase	79	10%	1.1	2.0	Degradation
7	P60174	Triosephosphate isomerase	261	86%	2.7	5.6	Metabolism
8	P12429	Annexin A3	179	45%	0.6	1.2	Signal transduction
9	P09382	Galectin-1	146	62%	2.3	1.2	Signal transduction
10	P52566	D4-GDI	109	63%	1.7	3.2	Metabolism
11	Q06323	Proteasome activator complex subunit 1	82	25%	1.5	2.4	Metabolism
12	P30043	Flavin reductase	171	69%	2.3	3.8	Defense response
13	P06702	Protein S100-A9	62	46%	2.8	4.6	Binding proteins
14	P07339	Cathepsin D	146	33%	1.2	2.5	Peptidase activity
15	P04792	Heat shock protein β -1	157	73%	2.3	4.7	Defense response
16	P00738	Haptoglobin	64	20%	1.1	1.7	Binding proteins
17	Q16658	Fascin	63	20%	2.2	3.8	Signal transduction
18	P00918	Carbonic anhydrase 2	86	32%	1.6	4.1	Metabolism
19	Q06830	Peroxiredoxin-1	102	41%	2.4	5.0	Defense response
20	P04406	Glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase	92	37%	1.4	2.8	Metabolism
21	P62937	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	136	81%	15	30	Signal transduction
22	P00167	Cytochrome b5	80	47%	1.2	2.8	Defense response
23	Q8WU71	α -Enolase	139	36%	2.5	4.1	Metabolism
24	P60660	Myosin light polypeptide 6	137	53%	2.1	12.6	Metabolism

* The "smoker" in table represents non-COPD smokers, the "COPD" in table represents COPD smokers. The numbers in these two columns represent times of intensity relative to never-smokers.

在鉴定的 24 种蛋白质中, D4-GDI 在 3 组间的表达水平具有显著性差异。鉴于 D4-GDI 是一种重要的 G 蛋白偶联受体抑制因子, 参与多种细胞功能活动的调节过程, 而且与 COPD 的研究未见报道, 因此, 作者将其作为代表蛋白质, 对其表达水平进行了免疫组织化学和 Western-blotting 验证, 并进一步对其表达进行组织学定位。D4-GDI 肽质量指纹图谱及数据库查询截图见图 2。

2.2 免疫组织化学染色结果

对每例研究对象免疫组织化学染色结果随机观

察 5 个低倍镜视野, 结果显示肺组织广泛表达 D4-GDI。总体来说, 对照组肺组织绝大多数细胞 D4-GDI 染色呈浅黄色, 其余细胞呈黄色; 吸烟组肺组织绝大多数细胞 D4-GDI 染色呈黄色, 其余细胞呈棕色; COPD 组患者肺组织大部分细胞染色呈棕色, 少部分细胞呈黄色(图 3)。3 组研究对象的免疫组织化学染色积分分布情况见表 2, 秩和检验显示 3 组间的免疫组织化学染色积分 COPD 组 > 吸烟组 > 对照组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

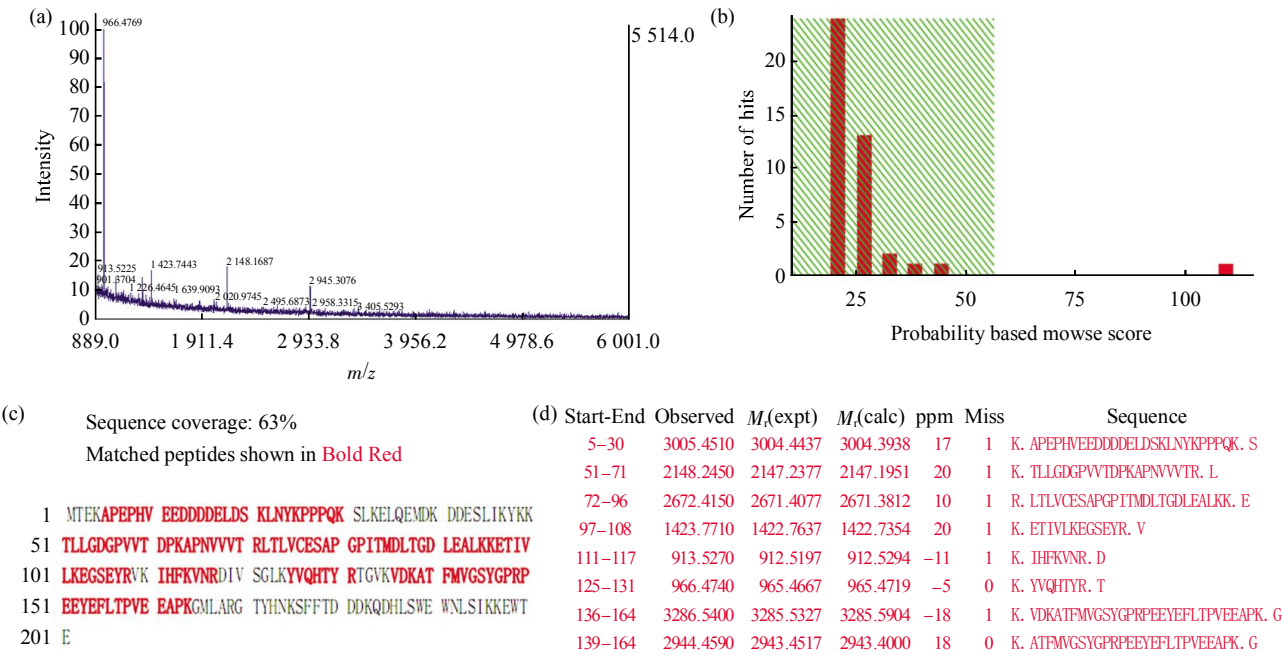


Fig. 2 Matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry peptide mass fingerprint map and SwissProt 56.4 database query result of D4-GDI

(a) given peptides mass fingerprint (PMF) map of protein spot 10, x axis represents m/z and y axis represents intensity. (b) given the database query result of the PMF map, which shown the PMF map was positive matched (score 109, $P < 0.05$) with D4-GDI. (c) given the capture graph of the database BLAST result, which shown the observed peptides covered 63% of D4-GDI sequence (matched peptide shown in bold red). (d) given the capture graph of database mass analysis result between observed peptides sequence and D4-GDI, which shown the mass of observed peptides were precisely matched with D4-GDI.

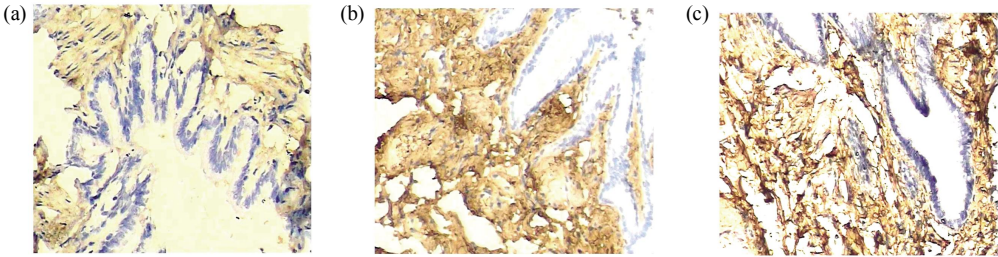


Fig. 3 Representative D4-GDI immunohistochemical staining results for subjects

(a) was from never-smoker, D4-GDI immunohistochemistry staining were generally light yellow. (b) was from non-COPD smoker, D4-GDI immunohistochemistry staining were generally yellow. (c) was from COPD smoker, D4-GDI immunohistochemistry staining were general brown. Original magnification: $\times 200$

Table 2 The D4-GDI immunohistochemical staining score distribution (cases/score) comparison between COPD smokers, non-COPD smokers and never-smokers

	n	Immunohistochemical staining score		
		4	5	6
COPD smokers	24	0	6	18
Non-COPD smokers	24	3	21	0
Never-smokers	24	24	0	0

2.3 Western-blotting 检测结果

Western-blotting 结果显示, 对照组肺组织 D4-GDI 与 β -actin 的相对表达强度为 0.098 ± 0.022 , 吸烟组肺组织 D4-GDI 与 β -actin 的相对表达强度为 0.185 ± 0.041 , COPD 组肺组织 D4-GDI 与 β -actin 的相对表达强度为 0.325 ± 0.073 , 3 组之间的表达水平具有显著性差异($F=52.348$, $P < 0.05$).

3 组之间两两比较, 吸烟组表达强度高于对照组 ($P < 0.05$), COPD 组表达强度高于吸烟组 ($P < 0.05$). 代表性的 Western blotting 图片和统计分析见图 4.

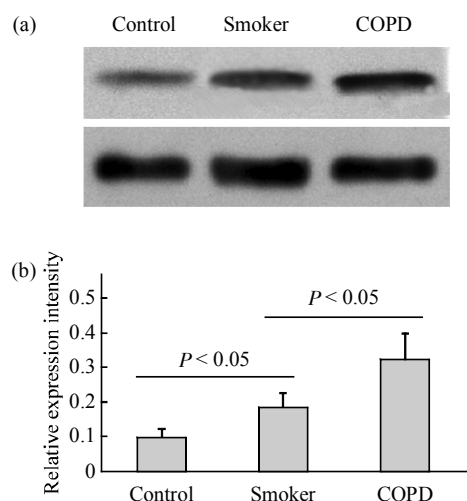


Fig. 4 D4-GDI Western-blotting result and representative pictures

(a) The representative pictures of Western-blotting shown that D4-GDI expression level in lung tissue of COPD smokers (COPD) was higher than that in non-COPD smokers (Smoker), and expression level in lung tissue of non-COPD smokers was higher than that in never-smokers (Control). (b) Statistic of D4-GDI expression intensity in lung tissue of COPD smokers (COPD), non-COPD smokers (Smoker), and statistic difference were tested and show.

3 讨 论

COPD 是呼吸系统的重大疾病之一, 主要发生于吸烟人群, 历时半个世纪的研究证明, COPD 发病是遗传因素与环境因素共同作用的结果, 而吸烟是导致 COPD 的最主要危险因素^[1]. 虽然, 研究发现, COPD 发病与氧化应激、蛋白酶 / 抗蛋白酶失衡、炎症、细胞凋亡等机制有关^[6], 但是, 人们对 COPD 的认识仍然很有限, 以致于并不能达到满意的治疗效果.

蛋白质组学研究方法具有直接、高效、信息量大的特点, 在疾病研究领域越来越受到重视. 近年来, 随着蛋白质组学应用于 COPD 研究, 人们对 COPD 产生了一些新的认识^[7]. 蛋白质组学技术被认为在 COPD 的研究领域具有广阔的前景^[8]. 其中最具有代表性的是 Kelsen 等^[9]通过对吸烟者与不吸烟者的肺组织进行比较蛋白质组学研究, 发现吸烟能够导致肺组织发生内质网应激, 因为此后的研究

表明吸烟引起肺组织细胞发生内质网应激可能是导致肺结构细胞凋亡从而促进 COPD 发生发展的主要原因^[10-12].

目前, 关于 COPD 的蛋白质组学研究主要是针对痰液、支气管肺泡灌洗液和血浆(血清), 而关于能够更加充分揭示 COPD 疾病本质的肺组织的蛋白质组变化, PubMed 数据库中的文献报道目前仅见 2 篇^[9, 13]. 本研究通过对不吸烟者、非 COPD 吸烟者和吸烟 COPD 患者的肺组织进行比较蛋白质组学研究, 共找到 24 种差异表达蛋白, 与已经报道的 2 篇文献比较, 有一些共同的蛋白质, 而且变化趋势也基本相同, 如组织蛋白酶 D、热休克蛋白 27 等, 但是, 本研究发现的差异表达蛋白大部分未被报道^[9, 13], 因此, 在既往研究的基础上, 能够为揭示 COPD 的疾病本质研究提供新的线索.

D4-GDI 属于 Rho/Rac GDP 解离抑制因子家族^[14], 其功能主要是与 Rho/Rac 家族蛋白结合, 通过抑制 Rho/Rac 家族蛋白对 GTP 的降解, 从而抑制 GDP 与 Rho/Rac 家族蛋白解离, 达到抑制 G 蛋白偶联受体的作用^[15]. 近年的研究发现, D4-GDI 参与了多种肿瘤的发病机制, 对肿瘤的生长和浸润发挥促进或者抑制作用^[16-19], 而且其作用机制可以依赖于或者不依赖于与 Rho/Rac 家族蛋白结合^[16, 19], 因此被认为是重要的肿瘤治疗靶标^[20]. 此外, D4-GDI 还具有调节 T 淋巴细胞迁移、分化、黏附功能等作用^[15].

D4-GDI 与呼吸系统疾病的相关研究报道比较少见, 研究报道 D4-GDI 在支气管哮喘的治疗过程中能够导致 $\beta 2$ 肾上腺素受体敏感性降低, 从而削弱治疗效果^[21]. 迄今为止, 作者未发现 D4-GDI 与 COPD 的相关研究报道. 本研究通过蛋白质组学研究发现, 非 COPD 吸烟者肺组织 D4-GDI 表达水平为不吸烟者的 1.7 倍, 而作为吸烟指数没有显著性差异的中重度吸烟者, COPD 患者肺组织 D4-GDI 表达水平接近非 COPD 患者的 2 倍, 免疫组织化学染色结果和 Western-blotting 检测结果与蛋白质组学研究结果高度一致, 一方面说明吸烟能够导致肺组织 D4-GDI 表达水平升高, 另一方面说明 D4-GDI 参与了 COPD 的发病机制, 更进一步说明吸烟者是否发生 COPD 与肺组织的 D4-GDI 表达水平具有相关性, 提示 D4-GDI 表达水平可能与 COPD 易感性相关.

鉴于 D4-GDI 对不同肿瘤的作用机制不同, 既可能起促进作用, 也可能起抑制作用, 因此, 作者

认为, 吸烟者尤其是吸烟 COPD 患者肺组织内 D4-GDI 表达升高, 既可能是一种保护机制, 也可能是促进 COPD 发生发展的原因之一, 甚至兼具有以上两方面作用, 其具体作用及机制值得进一步研究.

参 考 文 献

- [1] Silverman E K, Spira A, Paré P D. Genetics and genomics of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*, 2009, **6**(6): 539–542
- [2] 欧阳卿, 胡瑞成, 戴爱国, 等. 蛋白质组学技术在慢性阻塞性肺疾病研究中的应用. *国际呼吸杂志*, 2009, **29**(3): 154–158
Ouyang Q, Hu R C, Dai A G, *et al.* *J Int Respir (Chin)*, 2009, **29**(3): 154–158
- [3] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2007 年修订版). *中华结核和呼吸杂志*, 2007, **30**(1): 8–17
Group of COPD, Respiratory disease branch of Chinese medical association. *Chin J Tuberc Respir Dis*, 2007, **30**(1): 8–17
- [4] 欧阳卿, 胡瑞成, 戴爱国, 等. 慢性阻塞性肺疾病吸烟者与非慢性阻塞性肺疾病吸烟者肺组织蛋白质组学比较分析. *中国生物化学与分子生物学报*, 2010, **26**(1): 81–87
Ouyang Q, Hu R C, Dai A G, *et al.* *Chin J Biochem Mol Biol*, 2010, **26**(1): 81–87
- [5] 谭双香, 李 君, 易 红, 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, Yi H, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2009, **36**(6): 743–749
- [6] Demedts I K, Demoor T, Bracke K R, *et al.* Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *Respiratory Research*, 2006, **7**(1): 53
- [7] Chen H, Wang D, Bai C, *et al.* Proteomics-based biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease. *J Proteome Res*, 2010, **9**(6): 2798–2808
- [8] Casado B, Iadarola P, Luisetti M, *et al.* Proteomics-based diagnosis of chronic obstructive pulmonary disease: the hunt for new markers. *Expert Rev Proteomics*, 2008, **5**(5): 693–704
- [9] Kelsen S G, Duan X, Ji R, *et al.* Cigarette smoke induces an unfolded protein response in the human lung: A proteomic approach. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2008, **38**(5): 541–550
- [10] Jorgensen E, Stinson A, Shan L, *et al.* Cigarette smoke induces endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in normal and malignant human lung cells. *BMC Cancer*, 2008, **8**: 229
- [11] Tagawa Y, Hiramatsu N, Kasai A, *et al.* Induction of apoptosis by cigarette smoke *via* ROS-dependent endoplasmic reticulum stress and CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein (CHOP). *Free Radic Biol Med*, 2008, **45**(1): 50–59
- [12] Malhotra D, Thimmulappa R, Vij N, *et al.* Heightened endoplasmic reticulum stress in the lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease: the role of Nrf2-regulated proteasomal activity. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, **180**(12): 1196–1207
- [13] Lee E J, In K H, Kim J H, *et al.* Proteomic analysis in lung tissue of smokers and COPD patients. *Chest*, 2009 **135**(2): 344–352
- [14] Dovas A, Couchman J R. RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. *Biochem J*, 2005, **390**(Pt1): 1–9
- [15] Kondoh K, Nakata Y, Yamaoka T, *et al.* Altered cellular immunity in transgenic mice with T cell-specific expression of human D4-guanine diphosphate-dissociation inhibitor (D4-GDI). *Int Immunol*, 2008, **20**(10): 1299–1311
- [16] Zhang Y, Rivera Rosado L A, Moon S Y, *et al.* Silencing of D4-GDI inhibits growth and invasive behavior in MDA-MB-231 cells by activation of Rac-dependent p38 and JNK signaling. *J Biol Chem*, 2009, **284**(19): 12956–12965
- [17] Cho H J, Baek K E, Park S M, *et al.* RhoGDI2 expression is associated with tumor growth and malignant progression of gastric cancer. *Clin Cancer Res*, 2009, **15**(8): 2612–2619
- [18] Nakata Y, Kondoh K, Fukushima S, *et al.* Mutated D4-guanine diphosphate-dissociation inhibitor is found in human leukemic cells and promotes leukemic cell invasion. *Exp Hematol*, 2008, **36**(1): 37–50
- [19] Moissoglu K, McRoberts K S, Meier J A, *et al.* Rho GDP dissociation inhibitor 2 suppresses metastasis *via* unconventional regulation of RhoGTPases. *Cancer Res*, 2009, **69**(7): 2838–2844
- [20] Cho H J, Baek K E, Yoo J. RhoGDI2 as a therapeutic target in cancer. *Expert Opin Ther Targets*, 2010, **14**(1): 67–75
- [21] Liu H, Zhou L F, Zhang Q, *et al.* Increased RhoGDI2 and peroxiredoxin 5 levels in asthmatic murine model of β_2 -adrenoceptor desensitization: A proteomics approach. *Chinese Medical Journal(Engl)*, 2008, **121**(4): 355–362

Proteomics Research Focus on The Affection of Smoking to D4-GDI Expression in Lung Tissue and The Relationship With Chronic Obstructive Pulmonary Disease*

OUYANG Qing^{1,2)}, HU Rui-Cheng^{1)**}, DAI Ai-Guo¹⁾, TAN Shuang-Xiang¹⁾, Xiao Zhi-Qiang³⁾, TANG Cen-E³⁾

¹⁾ Department of Respiratory Medicine, Hunan Institute of Gerontology, Hunan Province Geriatric Hospital, Changsha 410016, China;

²⁾ Graduate School, University of South China, Hengyang 421001, China;

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

Abstract Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) development is the result of environmental factors interact with hereditary factors, and smoking is the primary cause for COPD development. Nevertheless, both the mechanisms of smoking leads to COPD and the mechanisms of COPD hereditary susceptibility are not well clarified so far. Proteomics research features high efficiency and rich information, which had provided strong help for COPD study, and considered has broad prospects in COPD research area. Two dimensional gel electrophoresis and matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry were used in proteomics research to compare the lung tissue proteome of never-smokers, non-COPD smokers and COPD smokers. By combined with bioinformatics technology, 24 proteins were identified to be differentially expressed between groups. The D4-GDI expression level in lung tissue of non-COPD smokers was 1.7 times to never-smokers, while the D4-GDI expression level in lung tissue of COPD smokers was nearly twice to non-COPD smokers. For verification, D4-GDI expression level in lung tissue was detected by immunohistochemical staining and Western-blotting, and the results was consistent with proteomics research. The results of this study for the first time to description: Smoking can up-regulate D4-GDI expression level in lung tissue, D4-GDI involved in the pathogenesis of COPD and may be associated with COPD susceptibility.

Key words chronic obstructive pulmonary disease, proteomics, two dimensional gel electrophoresis, mass spectrometry analysis, Rho GDP-dissociation inhibitor 2

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00240

*This work was supported by grants from The Natural Science Foundation of Hunan Province (06JJ4056), Science and Technology Foundation of Hunan Province (2007FJ3016, 2008FJ4206, 2009JT3054), Healthy and Scientific Research Foundation of Hunan Province (B2003-130, B2008-026).

**Corresponding author.

Tel: 86-731-84747306, E-mail: huruicheng@hotmail.com

Received: May 5, 2010 Accepted: June 14, 2010