

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.15.004

## Piezo2 蛋白的生物信息学分析及其在肠道中的表达\*

白涛,钱伟,汪欢,张磊,宋军<sup>△</sup>,侯晓华

(华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科,武汉 430022)

**[摘要]** **目的** 对 Piezo2 性质、结构和功能进行预测分析,并检测其在肠道的表达。**方法** 利用 ProtParam 程序预测人 Piezo2 蛋白基本理化性质;TMHMM Serve 2.0 预测跨膜结构域;ProtComp Version 9.0 分析亚细胞定位;用 SOPMA 程序预测其二级结构;SWISS-MODEL 服务器生成其三维模型。免疫组织化学染色确定 Piezo2 在肠道组织的表达位置,以实时定量荧光 PCR 检测 Piezo2 在不同肠段的表达量及与 Epacl 表达的相关性。**结果** Piezo2 蛋白分子式为 C<sub>14539</sub> H<sub>22436</sub> N<sub>3662</sub> O<sub>4087</sub> S<sub>130</sub>, 相对分子质量为 318.092×10<sup>3</sup>,等电点 pI=5.82。Piezo2 蛋白存在 35 个跨膜结构域,并有多数蛋白修饰位点。免疫组织化学染色发现 Piezo2 蛋白表达于肠道上皮与神经节,其在结肠表达水平较回肠丰富(P<0.01),其中结肠 Piezo2 与 Epacl 在 mRNA 水平表达呈正相关(r<sup>2</sup>=0.65,P<0.01)。**结论** Piezo2 在结肠表达丰富,可能通过 Epacl 通路参与肠道机械力感知与调控。

**[关键词]** 肠神经系统;肠黏膜;机械门控离子通道;Piezo2

**[中图分类号]** R574.6

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2016)15-2040-03

## Bioinformatics analysis of Piezo2 and its expression detection in the gut\*

Bai Tao, Qian Wei, Wang Huan, Zhang Lei, Song Jun<sup>△</sup>, Hou Xiaohua

(Department of Gastroenterology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430022, China)

**[Abstract]** **Objective** To predict and analysis the physical and chemical properties as well as the structure and function of Piezo2, and to detect the expression of Piezo2 in gut. **Methods** Physical and chemical properties of Piezo2 were predicted with ProtParam. Transmembrane domain was predicted with TMHMM Serve 2.0. Subcellular location was analyzed with ProtComp Version 9.0. Protein secondary structure was predicted with SOPMA program. Three-dimensional model was created with SWISS-MODEL. Location of Piezo2 in intestine was analyzed with immunohistochemical staining and RT-PCR was performed to compare the expression in different segment of intestine and correlation to Epacl. **Results** Molecular formula of Piezo2 was C<sub>14539</sub> H<sub>22436</sub> N<sub>3662</sub> O<sub>4087</sub> S<sub>130</sub> with molecular weight of 318.092×10<sup>3</sup> and isoelectric point of 5.82. Piezo2 had 35 transmembrane domains and many post-translational modification sites. Piezo2 existed in intestinal epithelial tissue and ganglion cells. Expression of Piezo2 in colon was much more abundant than that in small intestine(P<0.01) and positive correlated to Epacl (r<sup>2</sup>=0.65,P<0.01). **Conclusion** Colon is rich in Piezo2. Piezo2 might play a key role in function regulation of intestinal epithelium and enteric nervous system by Epacl pathway.

**[Key words]** enteric nervous system;intestinal mucosa;mechanically gated ion channels;Piezo2

2010 年 Coste 等<sup>[1]</sup>发现并定义了 Piezo2 蛋白。通过细胞系中的体外 siRNA 筛选及电生理实验的方法,证实 Piezo2 是机械门控离子通道蛋白。Piezo2 是非选择性阳离子通道蛋白,受机械信号刺激,通道开放,将机械刺激信号转化为生物电信号。Piezo2 表达于传入神经节(如三叉神经节及背根神经节)、梅克尔细胞、肺、膀胱等组织。在生物机体感受机械刺激过程中有重要作用。有关机械刺激的感知的细胞学及分子生物学机制研究尚不清楚,Piezo2 蛋白的发现和具有重要研究意义。本文通过生物信息学预测 Piezo2 蛋白理化性质、蛋白结构、生物学功能,同时检测其在肠道组织中的表达及定位,推测 Piezo2 蛋白在肠道感知机械刺激信号中可能有重要作用,现报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 人 Piezo2 蛋白的基因及其编码蛋白的 GenBank 登录号依次为 JN790819 与 AFC88283。多克隆抗体 Piezo2 购

自 Abcam 公司;二抗购自武汉博士德公司;Trizol 购自 Gibco 公司;PCR 引物由上海英俊生物有限公司合成;逆转录酶试剂盒购自 TAKARA 公司;NIH 小鼠购自广东省实验动物中心。

## 1.2 方法

**1.2.1 生物信息学方法** 利用 ProtParam 在线程序预测人 Piezo2 蛋白基本理化性质<sup>[2]</sup>,如相对分子质量、等电点、平均疏水系数等;利用在线系统 TMHMM Serve 2.0 预测跨膜结构域<sup>[3]</sup>;利用 ProtComp Version 9.0 在线工具分析亚细胞定位;利用 SOPMA 在线程序预测其二级结构<sup>[4]</sup>;利用 SWISS-MODEL 服务器生成其三维模型<sup>[5]</sup>,并在 PyMOL Version 1.7.4 中编辑。

**1.2.2 实验室方法** 4%多聚甲醛固定组织标本 24 h 后,石蜡包埋。一抗工作浓度为 1:250,4℃过夜。二抗为荧光素标记的羊抗兔免疫球蛋白 G(IgG),中性树脂胶封片。磷酸缓冲盐溶液(PBS)代替一抗做阴性对照。使用 Trizol 提取组织 RNA

(步骤按照产品说明书),运用逆转录试剂盒使 RNA 逆转录为 cDNA,应用 SYBRGreen 和实时定量荧光 PCR (Real-time PCR)检测仪检测 Piezo2 的 mRNA 水平。引物如下, $\beta$ -actin: 上游 5'-TGT TAC CAA CTG GGA CGA CA-3',下游 5'-CTG GGT CAT CTT TTC ACG GT-3';Piezo2: 上游 5'-GTG GTA TGC AAC CCA GTA CCC-3',下游 5'-GGC CAT TCT CTA TGG GCA GG-3';Epacl: 上游 5'-GTG TTG GTG AAG GTC AAT TCT G-3',下游 5'-CCA CAC CAC GGG CAT C-3'。

**1.3 统计学处理** 采用 R2.11.1 软件,使用 *t* 检验和 Pearson 相关性检验方法进行统计分析,检验水准  $\alpha=0.05$ ,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 人 Piezo2 蛋白基本理化性质预测** 通过 ProtParam 预测 Piezo1 蛋白基本理化性质,推测蛋白分子式为  $C_{14539}H_{22436}N_{3662}O_{4087}S_{130}$ ,相对分子质量为  $318.092 \times 10^3$ ,等电点  $pI=5.82$ ,波长 280 nm 时摩尔消光系数为 505 380,半衰期为 30 h,平均疏水性系数为 -0.086,脂肪系数 93.51。不稳定参数为 50.26,属不稳定蛋白。Piezo1 蛋白所含氨基酸残基数为 2 752,其中碱性残基数目为 300,酸性残基数为 343。所含氨基酸组成为:氨基酸 Ala(5.3%),Arg(4.6%),Asn(3.3%),Asp(4.1%),Cys(1.8%),Gln(3.6%),Glu(8.3%),Gly(4.7%),His(2.0%),Ile(7.4%),Leu(10.7%),Lys(6.3%),Met(2.9%),Phe(6.0%),Pro(4.0%),Ser(7.7%),Thr(4.9%),Trp(2.2%),Tyr(4.1%),Val(6.1%),含 Leu 和 Glu 最多,不含 Pyl 和 Sec。

**2.2 人 Piezo2 蛋白跨膜结构域、亚细胞定位及翻译后修饰位点分析** 利用在线系统 TMHMM Serve 2.0 对 Piezo2 蛋白进行跨膜结构域预测分析,结果见图 1。人 Piezo2 蛋白存在 35 个跨膜结构域,编号位置分别为 10-41,62-84,122-144,214-236,241-260,267-289,504-526,539-561,581-598,678-700,704-726,733-755,787-809,932-954,959-976,981-1003,1052-1074,1113-1135,1139-1156,1169-1191,1217-1239,1291-1310,1314-1336,1349-1371,1909-1931,1936-1955,1965-1987,2189-2211,2231-2253,2260-2282,2292-2314,2327-2344,2359-2378,2399-2421,2660-2682。使用 ProtComp Version 9.0 在线工具分析 Piezo2 蛋白亚细胞定位,结果显示存在于细胞膜、高尔基体、内质网等生物膜结构中。使用 MotifyScan 进行

翻译后修饰位点分析,预测人 Piezo2 蛋白理论上存在 4 个酰胺化位点(382-385,1529-1532,2062-2065,2139-2142),16 个 N-糖基化位点(95-98,765-768,1009-1012,1013-1016,1020-1023,1030-1033,1085-1088,1713-1716,2114-2117,2125-2128,2525-2528,2539-2542,2559-2562,2572-2575,2622-2625,2634-2637),8 个 cAMP-和 cGMP-依赖性蛋白激酶磷酸化位点(384-387,1048-1051,1601-1604,1613-1616,1632-1635,2064-2067,2096-2099,2284-2287),32 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点(97-100,155-158,366-369,405-408,477-480,783-786,823-826,838-841,886-889,896-899,954-957,1203-1206,1284-1287,1515-1518,1556-1559,1604-1607,1718-1721,1722-1725,1767-1770,1782-1785,1795-1798,1810-1813,1819-1822,1844-1847,1857-1860,1861-1864,1879-1882,2054-2057,2086-2089,2101-2104,2223-2226,2495-2498),19 个豆蔻酰化位点(113-118,128-133,216-221,414-419,620-625,761-766,1046-1051,1106-1111,1123-1128,1201-1206,1695-1700,1728-1733,1763-1768,1800-1805,2119-2124,2320-2325,2501-2506,2672-2677,2691-2696),31 个蛋白激酶 C 磷酸化位点(56-58,102-104,110-112,195-197,321-323,459-461,483-485,871-873,954-956,1004-1006,1310-1312,1358-1360,1390-1392,1604-1606,1863-1865,1897-1899,1961-1963,2070-2072,2106-2108,2113-2115,2116-2118,2122-2124,2127-2129,2135-2137,2160-2162,2282-2284,2384-2386,2550-2552,2561-2563,2576-2578,2623-2625),2 个酪氨酸激酶磷酸化位点(1790-1797,2382-2388)。

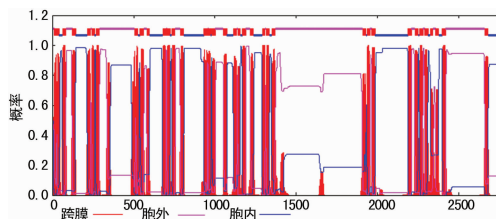
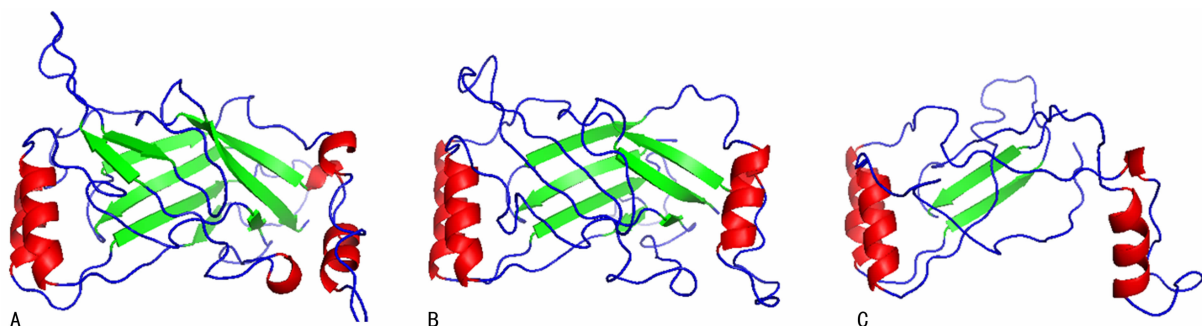


图 1 Piezo2 蛋白进行跨膜结构域预测分析



A: 预测模型 1; B: 预测模型 2; C: 预测模型 3。

图 2 人 Piezo2 蛋白三级结构

**2.3 人 Piezo2 蛋白二级、三级结构及功能预测** SOPMA 在

线程序分析结果显示,人 Piezo2 蛋白含 2 752 个氨基酸,其中

1 301 个(47.27%)氨基酸可能形成  $\alpha$  螺旋,537 个(19.51%)氨基酸形成延伸链,204 个(7.41%)氨基酸形成  $\beta$  转角,710 个(25.80%)氨基酸形成无规则卷曲。通过 SWISS-MODEL 服务器生成三维模型,在 PyMOL Version 1.7.4 中进行结构编辑,生成 Piezo2 蛋白三维模型如图 2。

**2.4 Piezo2 蛋白在肠道中的表达** Piezo2 表达于上皮与肠神经系统,Piezo2 蛋白在小鼠结肠组织中表达见图 3。

**2.5 Piezo2 蛋白在小鼠肠道表达差异** Real-time PCR 检测小鼠不同肠段 Piezo2 与 Epac1 mRNA 表达情况,结肠 Piezo2 及 Epac1 表达较小肠丰富( $P < 0.01$ ),见图 4A、B;结肠 Piezo2 与 Epac1 在 mRNA 水平表达呈正相关( $r^2 = 0.65, P < 0.01$ ),而在小肠未检测出相关性,见图 4C、D。

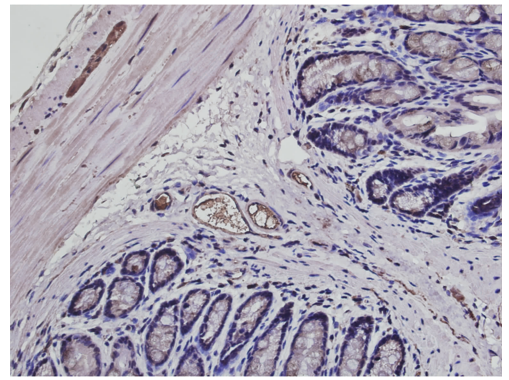
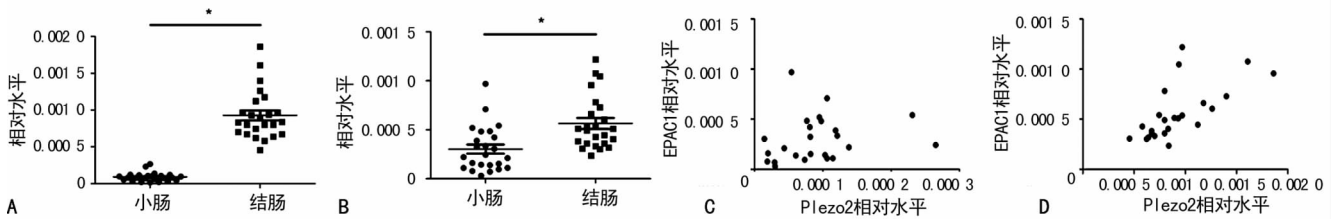


图 3 Piezo2 蛋白在结肠中的表达(SABC,  $\times 400$ )



A:不同肠段 Piezo2 表达;B:不同肠段 Epac1 表达;C:小肠 Piezo2 与 Epac1 表达;D:结肠 Piezo2 与 Epac1 表达。

图 4 不同肠段 Piezo2 与 Epac1 mRNA 表达情况

### 3 讨论

Piezo2 是重要的机械敏感离子通道蛋白,在机械刺激感知中有重要作用。已有研究发现,Piezo2 表达于初级传入神经(三叉神经节、背根神经节),参与其机械信号感知,在背根神经节中干扰 Piezo2 表达可以调节细胞的感觉阈值<sup>[6-9]</sup>。Piezo2 在梅克尔细胞中表达,在皮肤感受触觉中有重要作用<sup>[10-12]</sup>。此外,Piezo2 在 DRG 中与伤害感受器共表达,提示了感受机械伤害性刺激的重要分子机制<sup>[13]</sup>。Piezo2 的突变与神经肌肉功能异常的疾病相关,在远端关节挛缩、戈登综合征及马丹沃克综合征中发现了 Piezo2 的突变,提示 Piezo2 在调节神经及运动功能中有重要作用<sup>[14-15]</sup>。

本文运用生物信息学工具预测 Piezo2 蛋白理化性质、结构及相关功能。Piezo2 具有超过 2 500 氨基酸残基,是多次穿膜的大分子蛋白。其中  $\alpha$  螺旋(47.27%)比例较大,有利于穿膜结构的稳定,无规则卷曲(25.80%)存在一定比例,并可能成为蛋白质功能调节和修饰位点的存在位置。翻译后修饰位点预测发现,在 Piezo2 蛋白中,具备多个重要修饰位点,其修饰位点功能的研究有待于进一步研究。本研究通过实验室方法证实,Piezo2 在肠神经系统中表达,结肠水平表达较回肠丰富,且表达在结肠与 Epac1 相关。肠神经系统有“肠脑”之称,在肠道感知肠腔刺激、调节肠道内环境稳态、调节肠道动力等过程中有重要作用。Piezo2 可能在肠道感知机械刺激中有重要作用,Epac1 通路同样可能参与 Piezo2 功能调控<sup>[8,16]</sup>。

### 参考文献

[1] Coste B, Mathur J, Schmidt M, et al. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels[J]. Science, 2010, 330(60): 55-60.  
[2] Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, et al. Protein identi-

fication and analysis tools on the exPASy server[M]. New York: Humana Press, 2005: 571-607.

- [3] Ikeda M, Arai M, Lao DM, et al. Transmembrane topology prediction methods: a re-assessment and improvement by a consensus method using a dataset of experimentally-characterized transmembrane topologies[J]. In Silico Biol, 2002, 2(1): 19-33.  
[4] Geourjon C, Deléage G. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments[J]. Comput Appl Biosci, 1995, 11(6): 681-684.  
[5] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, et al. The Swiss-Model workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling [J]. Bioinformatics, 2006, 22(2): 195-201.  
[6] Bron R, Wood RJ, Brock JA, et al. Piezo2 expression in corneal afferent neurons[J]. J Comp Neurol, 2014, 522(13): 2967-2979.  
[7] Schneider ER, Mastrotto M, Laursen WJ, et al. Neuronal mechanism for acute mechanosensitivity in tactile-foraging waterfowl[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(41): 14941-14946.  
[8] Eijkelkamp N, Linley JE, Torres JM, et al. A role for Piezo2 in EPAC1-dependent mechanical allodynia[J]. Nat Commun, 2013, 4: 1682.  
[9] Lou S, Duan B, Vong L, et al. Runx1 controls terminal morphology and mechanosensitivity of VGLUT3-expressing C-mechanoreceptors[J]. J Neurosci, 2013, 33(3): 870-882.

Gal-3 能否单独起到诱导作用及其与经典诱导剂 HGF 的诱导分化作用差异, 以及其是通过何种机制促使 BMSCs 的诱导分化等问题还需要进一步的实验探索研究。

### 参考文献

- [1] Hajifathali A, Saba F, Atashi A, et al. The role of catecholamines in mesenchymal stem cell fate[J]. *Cell Tissue Res*, 2014, 358(3): 651-665.
- [2] Kim JY, Kim MR, Kim SJ. Modulation of osteoblastic/odontoblastic differentiation of adult mesenchymal stem cells through gene introduction: a brief review[J]. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg*, 2013, 39(2): 55-62.
- [3] Hang HL, Xia Q. Role of BMSCs in liver regeneration and metastasis after hepatectomy[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(1): 126-132.
- [4] Li R, Liang L, Dou Y, et al. Mechanical strain regulates osteogenic and adipogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Biomed Res Int*, 2015: 873251.
- [5] Luchetti F, Canonico B, Bartolini DA, et al. Melatonin regulates mesenchymal stem cell differentiation: a review[J]. *J Pineal Res*, 2014, 56(4): 382-397.
- [6] Parivar KB, Baharara J, Sheikholeslami A. Neural differentiation of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells treated with sex steroid hormones and basic fibroblast growth factor[J]. *Cell J*, 2015, 17(1): 27-36.
- [7] Stock P, Brückner S, Winkler S, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cell-derived hepatocytes improve the mouse liver after acute acetaminophen intoxication by preventing progress of injury[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(4): 7004-7028.
- [8] Dumic J, Dabelic S, Flögel M. Galectin-3: an open-ended story[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1760(4): 616-635.
- [9] Yan YP, Lang BT, Vemuganti R, et al. Galectin-3 mediates post-ischemic tissue remodeling[J]. *Brain Res*, 2009, 1288: 116-124.

- [10] Wan SY, Zhang TF, Ding Y. Galectin-3 enhances proliferation and angiogenesis of endothelial cells differentiated from bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Transplant Proc*, 2011, 43(10): 3933-3938.
- [11] 郑玉宝, 高志良. 干细胞移植在肝衰竭治疗的现状及前景[J]. *临床内科杂志*, 2014, 31(8): 523-525.
- [12] 崔红强, 吴绍华. 骨髓间充质干细胞研究进展[J]. *西南军医*, 2009, 11(4): 715-717.
- [13] 祝旭龙, 颜谭, 姚维杰, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞的分离与培养方法优化[J]. *南方医科大学学报*, 2014, 34(11): 1621-1626, 1631.
- [14] Oh SH, Miyazaki M, Kouchi H, et al. Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage in vitro[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 279(2): 500-504.
- [15] Okumoto K, Saito T, Hattori E, et al. Differentiation of rat bone marrow cells cultured on artificial basement membrane containing extracellular matrix into a liver cell lineage[J]. *J Hepatol*, 2005, 43(1): 110-116.
- [16] 徐跃, 杨仙玉. 半乳糖凝集素-3 及其相关抑制剂的研究进展[J]. *中国生化药物杂志*, 2011, 32(5): 417-420.
- [17] Yamazaki K, Kawai A, Kawaguchi M, et al. Simultaneous induction of galectin-3 phosphorylated on tyrosine residue, p21 (WAF1/Cip1/Sdi1), and the proliferating cell nuclear antigen at a distinctive period of repair of hepatocytes injured by CCl4[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 280(4): 1077-1084.
- [18] 杨永峰, 郑以山, 董磊, 等. 血清半乳糖凝集素-3 水平与肝衰竭预后相关性[J]. *肝脏*, 2013, 18(7): 461-462.
- [19] Ulu M, Alacacioglu A, Yuksel E, et al. Prognostic significance of serum galectin-3 levels in patients with hepatocellular cancer and chronic viral hepatitis[J]. *Saudi J Gastroenterol*, 2015, 21(1): 47-50.

(收稿日期: 2015-11-15 修回日期: 2016-02-01)

(上接第 2042 页)

- [10] Woo SH, Ranade S, Weyer AD, et al. Piezo2 is required for Merkel-cell mechanotransduction[J]. *Nature*, 2014, 509(752): 622-626.
- [11] Maksimovic S, Nakatani M, Baba Y, et al. Epidermal merkel cells are mechanosensory cells that tune mammalian touch receptors[J]. *Nature*, 2014, 509(752): 617-621.
- [12] Ikeda R, Gu JG. Piezo2 Channel conductance and localization domains in Merkel cells of rat whisker hair follicles [J]. *Neurosci Lett*, 2014, 583: 210-215.
- [13] Dubin AE, Schmidt M, Mathur J, et al. Inflammatory signals enhance piezo2-mediated mechanosensitive currents [J]. *Cell Rep*, 2012, 2(3): 511-517.

- [14] Coste B, Houge G, Murray MF, et al. Gain-of-function mutations in the mechanically activated ion channel PIEZO2 cause a subtype of distal arthrogryposis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(12): 4667-4672.
- [15] Mcmillin MJ, Beck AE, Chong JX, et al. Mutations in PIEZO2 cause Gordon syndrome, Marden-Walker syndrome, and distal arthrogryposis type 5[J]. *Am J Hum Genet*, 2014, 94(5): 734-744.
- [16] Laurent AC, Breckler M, Berthouze M, et al. Role of Epac in brain and heart[J]. *Biochem Soc Trans*, 2012, 40(1): 51-57.

(收稿日期: 2015-11-14 修回日期: 2016-01-08)