

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2026.07.002

✧基础医学研究✧

基于蛋白质组学方法探究直肠癌新辅助盆腔放射治疗致直肠黏膜损伤的机制

薛钧泽^{1,2}, 王昆², 林浩², 张益豪², 焦学龙², 谭晓杰², 江海涛²

(1. 青岛大学; 2. 青岛大学附属医院胃肠外科, 山东 青岛 266000)

【摘要】目的: 基于蛋白质组学方法, 探究直肠癌新辅助放疗后急性慢性放射性肠炎的分子机制及相关通路信息。**方法:** 采用数据非依赖性采集(DIA)蛋白质组学技术, 对比未放疗组(C组)与放疗后60~90 d组(E组)、放疗后150~160 d组(P组)的非肿瘤直肠组织, 筛选出 $| \text{差异倍数 (FC)} | > 1.5$ 且 $P < 0.05$ 的差异蛋白, 对其进行基因本体论(GO)、京都基因与基因组百科全书(KEGG)、真核生物同源蛋白簇(KOG)及蛋白结构域的富集分析。**结果:** E组与C组相比, 有94种差异蛋白上调、44种差异蛋白下调, 上调蛋白主要富集于肽激素加工、神经活性配体-受体相互作用通路及突触蛋白结构域; P组与C组相比, 有46种差异蛋白上调、56种差异蛋白下调, 上调蛋白主要富集于DNA重组负调控、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)及翼型螺旋转录因子(Wnt)信号通路, 同时伴随碱性亮氨酸拉链等蛋白结构域的表达变化。**结论:** 放射性直肠损伤早期以肠神经-内分泌系统过度活跃为主要特征, 晚期则可能通过激活MAPK/Wnt通路驱动慢性炎症及基质沉积, 本研究结果可为放射性肠炎的防治提供新思路。

【关键词】 DIA 蛋白质组学; 直肠癌; 新辅助放疗; 放射性肠炎

【中图分类号】 R730.55 **【文献标志码】** A

The injury mechanism of rectal mucosa induced by neoadjuvant pelvic radiotherapy for rectal cancer based on proteomic approaches

XUE Jun-ze^{1,2}, WANG Kun², LIN Hao², ZHANG Yi-hao², JIAO Xue-long², TAN Xiao-jie², JIANG Hai-tao²

(1. Qingdao University; 2. Department of Gastrointestinal Surgery, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266000, Shandong, China)

【Abstract】Objective: To investigate the molecular mechanisms and pathway information of acute and chronic radiation enteritis following neoadjuvant radiotherapy for rectal cancer by proteomics-based approaches. **Methods:** Data-Independent Acquisition (DIA) proteomics was used to compare the non-tumor rectal tissues from patients without radiotherapy (group C) with those collected at 60~90 days (group E) and 150~160 days (group P) after radiotherapy. Differentially expressed proteins (DEPs) with $| \text{fold change (FC)} | > 1.5$ and $P < 0.05$ were screened, and enrichment analyses of Gene Ontology (GO), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), Eukaryotic Orthologous Groups (KOG) and protein domain were performed on these DEPs. **Results:** Compared with group C, 94 DEPs were up-regulated and 44 were down-regulated in group E, the up-regulated proteins were mainly enriched in peptide hormone processing, neuroactive ligand-receptor interaction pathway and synaptic protein domains. In the comparison of group P and group C, 46 DEPs were up-regulated and 56 were down-regulated, with the up-regulated proteins primarily enriched in negative regulation of DNA recombination, mitogen-activated protein kinase (MAPK) and Wingless-type (Wnt) signaling pathways, accompanied by changes in domains such as basic leucine zipper. **Conclusion:** The early phase of radiation-induced rectal injury is characterized by hyperactivity of the enteric neuro-endocrine system, whereas chronic inflammation and matrix deposition in the late phase are likely driven by the activation of MAPK/Wnt pathways. These findings may offer novel insights for the prevention and treatment of radiation enteritis.

【Key words】 DIA proteomics; Rectal cancer; Neoadjuvant radiotherapy; Radiation enteritis

基金项目: 吴阶平医学基金会(320.6750.2024-17-42)

作者简介: 薛钧泽(2000—), 男, 硕士研究生。E-mail: 19862728010@163.com

通讯作者: 江海涛。E-mail: 18669801619@163.com

结直肠癌是全球四大致命恶性肿瘤之一,每年因该疾病死亡的人数超 90 万^[1]。手术是结直肠癌根治的主要手段,但其发病具有隐匿性,多数直肠癌患者确诊时已处于 II~III 期;且直肠位于盆腔内,手术切除的难度较高,局部复发风险增加,因此此类患者术前接受新辅助放疗具有重要的临床意义^[2-3]。但放疗引发的局部并发症同样不容忽视^[4],目前放射性肠损伤的具体分子机制尚未明确。肠神经系统(ENS)在肠道炎症反应的调控与协调中发挥关键作用,近十年的研究证实,炎症性疾病中免疫调节与神经调节存在密切的相互作用^[5]。本研究采用 DIA 蛋白质组学技术,鉴定直肠组织中受辐射影响而表达改变的蛋白质;并对鉴定到的总蛋白质及各比较组的差异蛋白进行全面的注释与富集分析,包括 GO、KOG 功能分类、KEGG 通路、蛋白质结构域及亚细胞结构定位分析。旨在通过 DIA 蛋白质组学技术,揭示直肠癌新辅助放疗后不同阶段直肠黏膜损伤的分子特征,为放射性肠炎的防治提供新靶点。

1 材料与方法

1.1 标本的收集与分组

本研究的人直肠组织标本均取自 11 例直肠癌患者,所有患者在 2024 年 10 月至 2025 年 6 月由青岛大学附属医院同一手术团队实施直肠全系膜切除术(TME)。标本分为 3 组,各组患者的性别、年龄无显著差异,其中未接受术前放疗组(C 组, $n=3$)、术前放疗后 60~90 d 手术组(E 组, $n=6$)、术前放疗后 150~160 d 手术组(P 组, $n=2$)。所有放疗患者均接受 50 Gy/次、25 次的直肠标准化放疗,正常直肠组织均取自肿瘤边缘 5cm 以外,且处于放疗照射区域内。本研究排除合并炎症性肠病、术前 2 周内接受过化疗/免疫/靶向治疗、使用过免疫抑制类药物/类固醇/抗生素的患者。直肠组织离体后,剪除肠脂垂,立即在 0℃冰面上用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗干净样本表面残留血液,随后放入液氮中速冻 3 h,转移至 -80℃冰箱中保存。所有研究对象均自愿签署知情同意书,本研究的标本采集方案经青岛大学附属医院伦理委员会批准(QY-FYEC2024-237)。

1.2 蛋白质提取

从 -80℃冰箱中取出标本,在液氮中研磨成粉末;取适量粉末转移至 1.5 mL 离心管,加入裂解缓冲液(含 8 mol/L 尿素、1 mmol/L 苯甲基磺酰氟、2 mmol/L 乙二胺四乙酸),冰上超声 5 min;于 4℃、15 000×g 条件下离心 10 min,收集上清液;采用

BCA 蛋白定量试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)测定上清液的蛋白浓度。

1.3 蛋白质酶解除盐

根据蛋白浓度取 100 μ g 蛋白质溶液,用 8 mol/L 尿素将体积补至 200 μ L;加入二硫苏糖醇(DTT)使终浓度达 5 mmol/L,37℃还原 45 min;在室温暗室条件下,加入碘乙酰胺使终浓度达 11 mmol/L,烷基化 15 min。加入 800 μ L 的 25 mmol/L 碳酸氢铵溶液及 2 μ L 胰蛋白酶(Promega, V5280),37℃酶解过夜。酶解后的肽段用 20%三氟乙酸(TFA)调节 pH 值至 2~3,采用 C18 柱料(Millipore, Billerica, MA)进行脱盐处理;最后通过 PierceTM 肽定量检测试剂与标准品试剂盒(Thermo fisher)测定肽段浓度。

1.4 纳升液相质谱仪检测

采用 Vanquish Neo 超高效纳升液相色谱(UHPLC)系统对样品进行分离,流动相 A 相为 0.1%甲酸水溶液,B 相为 0.1%甲酸乙腈溶液(乙腈纯度 100%)。进样模式为捕获-分析双柱法,其中捕获柱为 PepMap Neo Trap Cartridge(300 μ m × 5 mm, 5 μ m),分析柱为 Easy-SprayTM Pep-MapTM Neo UHPLC column(150 μ m × 15 cm, 2 μ m)。分析柱温度由集成柱温箱控制在 55℃,上样量 200 ng,流速 2.5 μ L/min,有效梯度洗脱时间 22 min,总检测时间 24 min。

1.5 Orbitrap Astral 质谱仪检测

DIA 分析采用纳升速 Vanquish Neo 系统(赛默飞)进行色谱分离,经纳升级高效液相色谱分离后的样品,通过 Orbitrap Astral 高分辨质谱仪(Thermo Scientific)进行 DIA 质谱分析。检测模式为正离子模式,母离子扫描范围 380~980 m/z,一级质谱分辨率为 240 000 at 200 m/z,归一化自动增益控制(AGC)目标为 500%,最大离子注入时间(IT)为 5 ms。二级质谱(MS2)采用 DIA 数据采集模式,设置 299 个扫描窗口,隔离窗口为 2 Th,高能碰撞解离(HCD)碰撞能量为 25%,归一化 AGC 目标为 500%,最大 IT 为 3 ms。

1.6 质谱数据解析

本研究的 DIA 质谱数据采用 DIA-NN(v1.8.1)软件进行搜库分析,搜库数据库为 uniprotkb_proteome_UP000005640_human_82493_20240528.fasta(共 82 493 条序列)。搜库参数设置:勾选基于深度学习参数以预测谱图库;勾选峰匹配(Match Between Runs, MBR),利用 DIA 数据生成谱图库,并基于该谱图库对 DIA 数据进行重分析,获取蛋白质的定性与定量结果。前体离子及蛋白质水平的鉴

定假发现率(FDR)均以 1% 为阈值进行过滤,过滤后的数据集用于后续生物信息学分析。

1.7 生物信息学分析

采用 ComplexHeatmap 2.12.0(R 4.2.0)软件,对鉴定到的总蛋白质及各比较组的差异蛋白进行 z-score 归一化处理,绘制聚类热图;并对差异蛋白进行功能注释与富集分析,分析平台包括 GO (<http://www.geneontology.org/>)、KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>)、COG/KOG (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG>)、蛋白家族与结构域数据库(IPR,<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>)。

1.8 统计学分析

所有数据均采用 GraphPad Prism 9.3 与 R 4.2.0 软件进行统计学分析。两组间的差异比较

采用 Student's *t* 检验。采用超几何检验计算富集分析的 *P* 值,以 $P \leq 0.05$ 为阈值,判断差异蛋白相较于背景蛋白(本研究为所有鉴定到的蛋白质),是否在特定功能类型、信号通路中存在显著的富集趋势。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 蛋白质的鉴定

本研究共鉴定到 8 937 种蛋白质。对所有蛋白进行定量分析,以 $P < 0.05$ 、蛋白倍数变化 > 1.5 或 < 0.67 为标准,判定为差异表达蛋白(DEPs)。对比 E 组与 C 组、P 组与 C 组的蛋白质组成差异:E 组与 C 组间共检测到 138 种差异蛋白,其中 94 种上调、44 种下调;P 组与 C 组间共检测到 102 种差异蛋白,其中 46 种上调、56 种下调。见图 1。

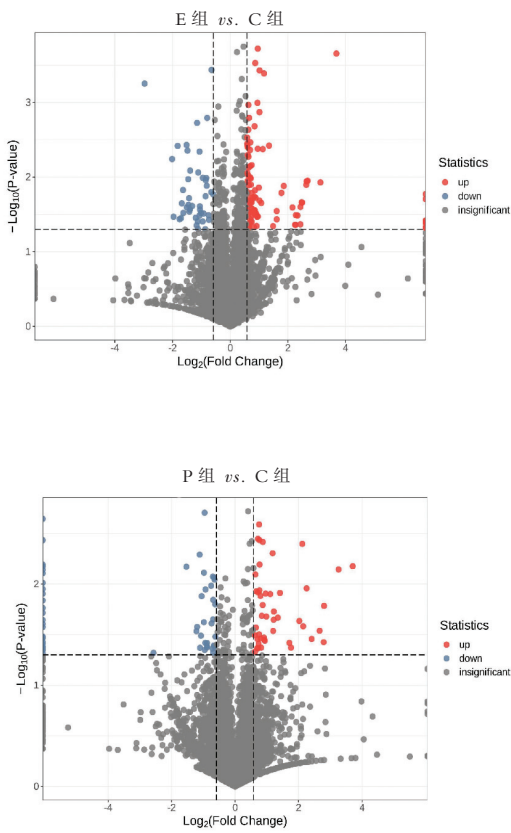
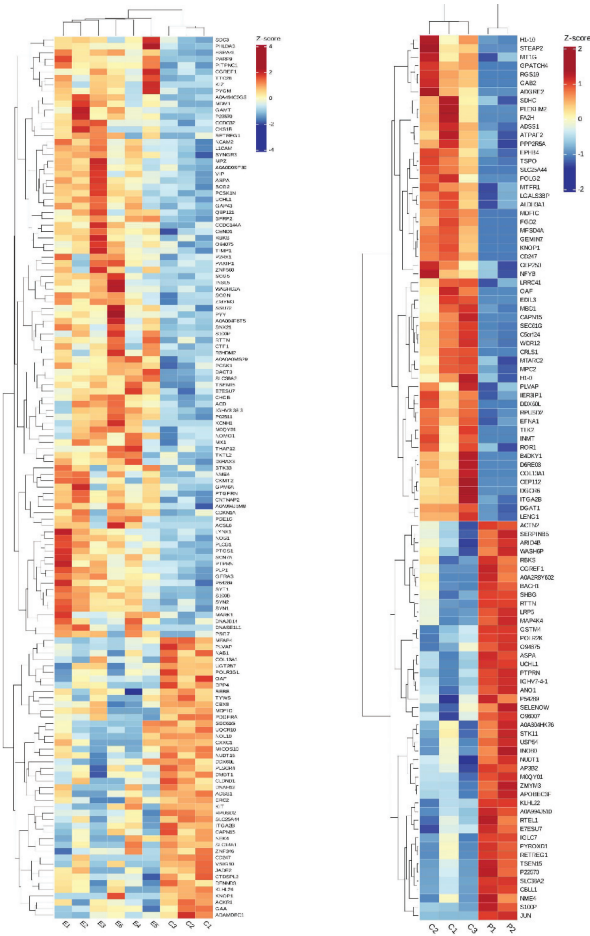


图 1 E 组与 C 组、P 组与 C 组差异蛋白的聚类热图和火山图



2.2 差异蛋白的 GO 功能注释和富集分析

E 组与 C 组的差异蛋白在生物学过程中富集于肽激素加工,细胞组分中富集于核周体、树突、分泌颗粒,分子功能中以激素活性最为显著。P 组与 C 组的差异蛋白在生物学过程中富集于 DNA 重组

负调控、Wnt 信号通路调控。见图 2。

2.3 差异蛋白 KEGG 功能注释和富集分析

E 组与 C 组的差异蛋白主要富集于神经活性配体-受体相互作用、细胞黏附分子通路,其中神经活性配体-受体相互作用通路的富集程度最为显著

($P < 0.001$, FDR = 0.037)。P 组与 C 组的差异蛋白主要富集于 MAPK 信号通路、Wnt 信号通路。见图 3。

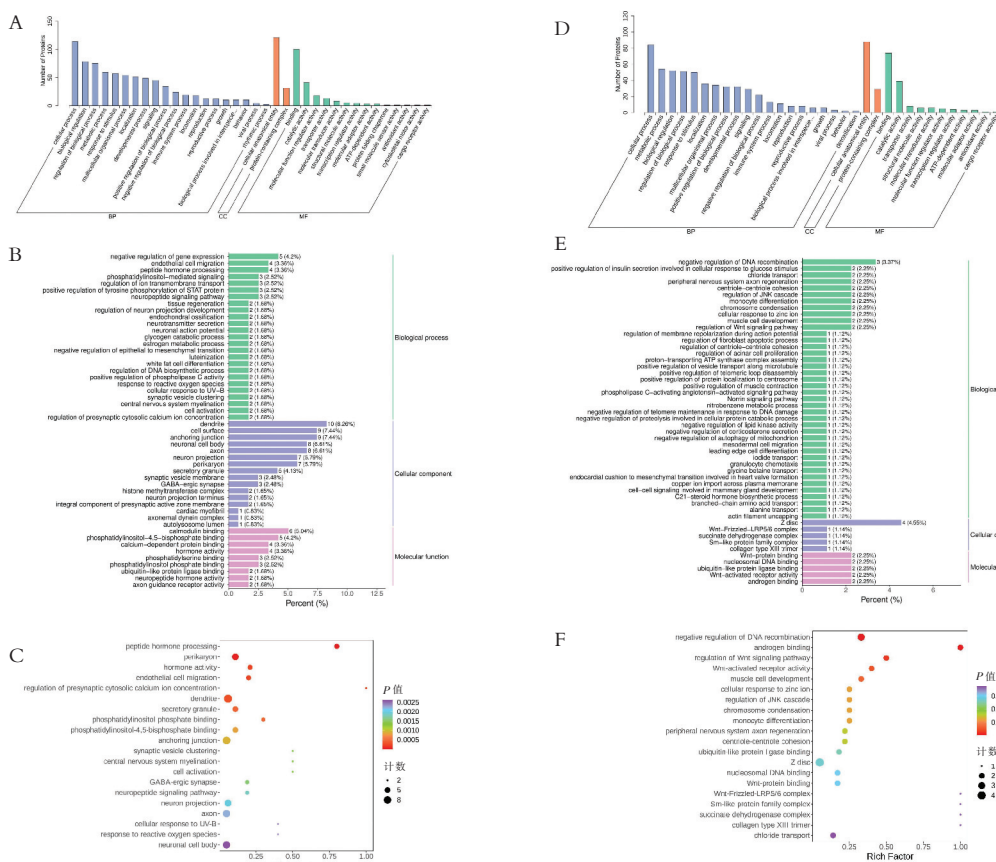


图 2 GO 功能注释和富集分析

A-C. E 组与 C 组; D-E. P 组与 C 组。

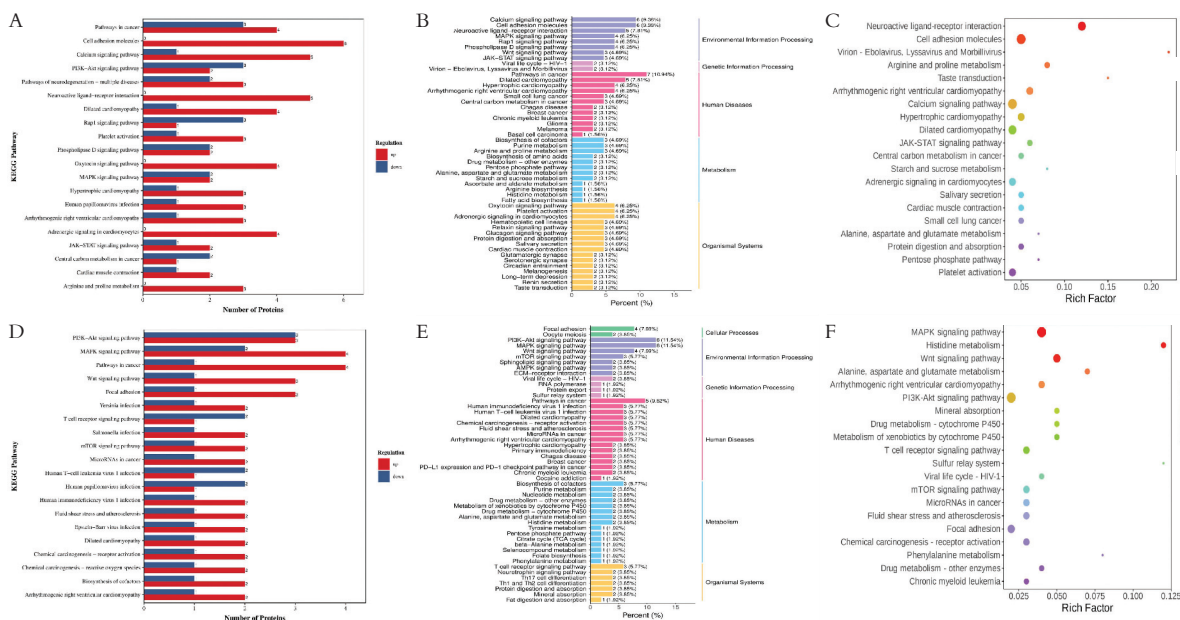


图 3 KEGG 功能注释和富集分析

A-C. E 组与 C 组; D-E. P 组与 C 组。

2.4 KOG 功能注释和富集分析

KOG 功能富集分析结果显示, E 组与 C 组的差异蛋白主要富集于信号转导机制、碳水化合物转

运与代谢; P 组与 C 组的差异蛋白则主要富集于信号转导机制。见图 4。

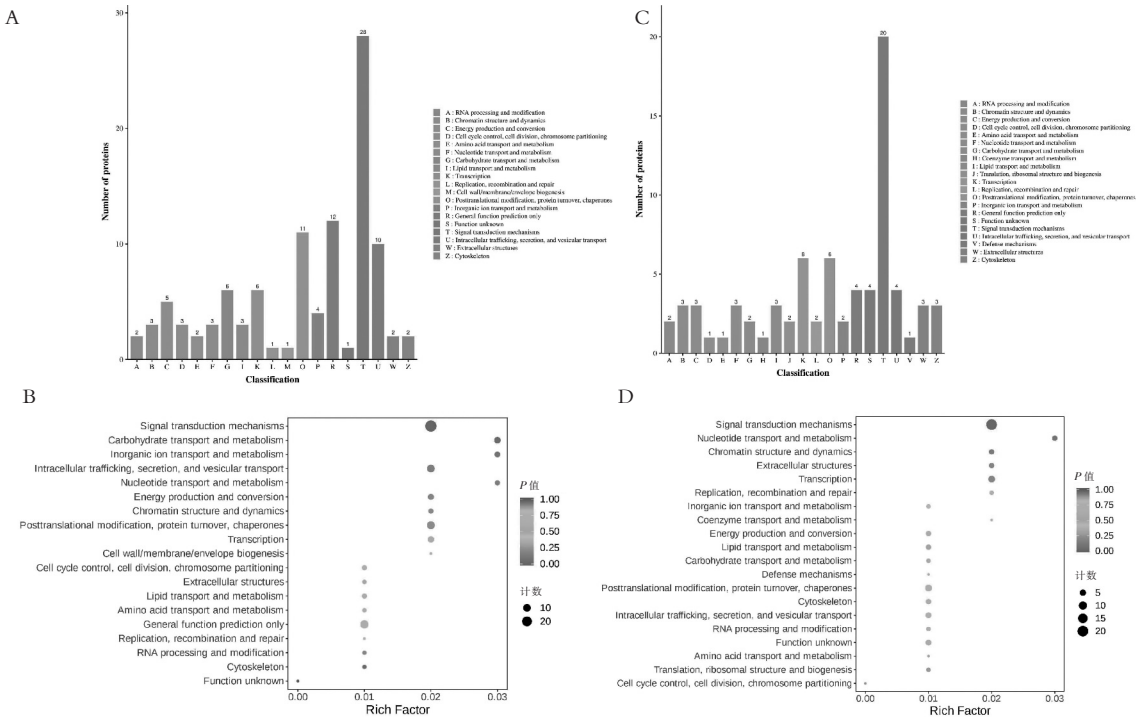


图 4 KOG 功能注释和富集分析

A-B. E 组与 C 组;C-D. P 组与 C 组。

2.5 差异蛋白结构域富集分析

蛋白质结构域富集分析结果显示,E 组与 C 组的差异蛋白在突触素、突触素前 ATP-抓握结构域、突触素 ATP 结合结构域等条目上的 P 值最小;

P 组与 C 组的差异蛋白在碱性亮氨酸拉链结构域、连接组蛋白 H1/H5 的 H15 结构域、黄素腺嘌呤二核苷酸/烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸[FAD/NAD(P)]结合结构域等条目上的 P 值最小。见图 5。

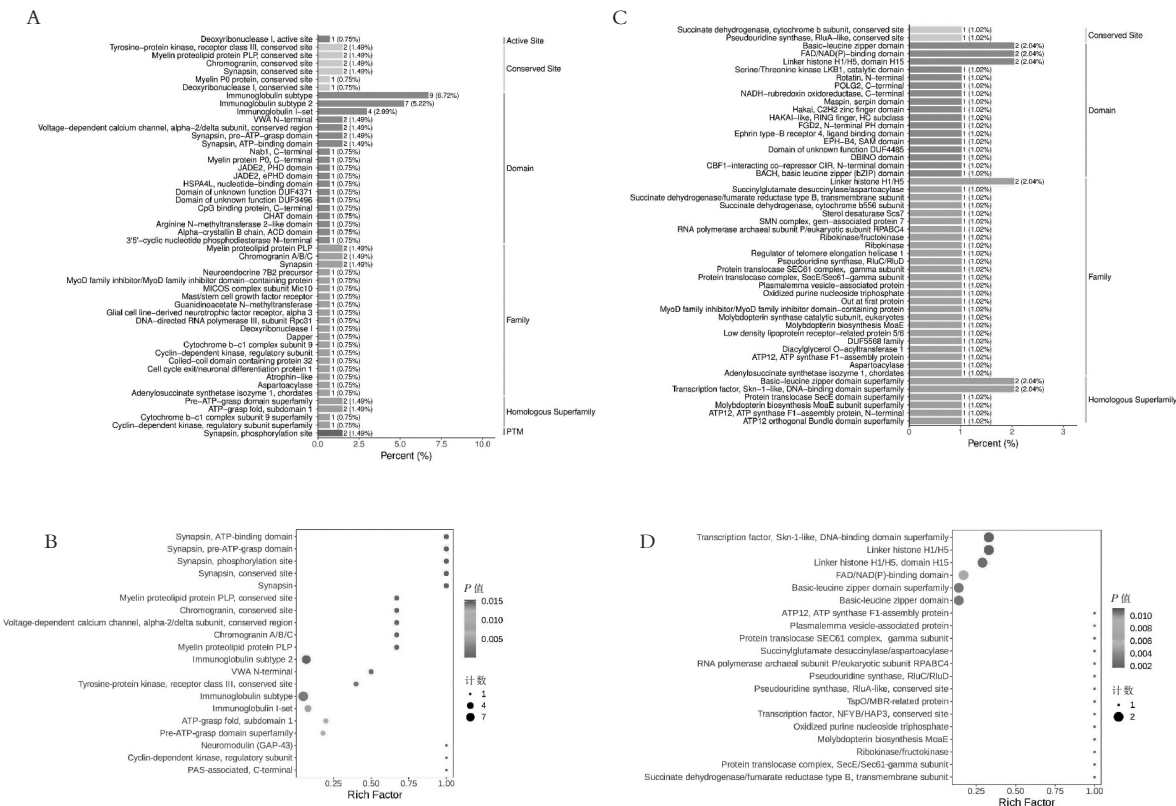


图 5 蛋白结构域功能注释和富集分析

A-B. E 组与 C 组;C-D. P 组与 C 组。

3 讨论

尽管放疗技术的精准性已得到显著提升,但在盆腔、直肠或腹部接受放疗的患者中,因肠道毗邻盆腔器官,高达 90% 的患者会发生放射性肠炎^[6]。部分患者会出现出血、吸收不良、腹泻、腹痛、恶心、呕吐等症状,症状严重者需中断放疗,进而影响抗癌治疗的效果。急性期放射性肠炎患者中,近 50% 会进展为慢性肠炎^[7],目前急慢性放射性肠炎的分子机制尚未阐明。本研究通过对直肠癌盆腔放疗后的人直肠组织进行 DIA 蛋白质组学分析,进一步揭示了放疗诱导直肠损伤的分子通路。

肠道与其他外周器官的显著区别在于其拥有完整的内在神经系统—肠神经系统(ENS),该系统即使与中枢神经系统(CNS)完全分离,仍可独立调控肠道的生理功能^[8]。ENS 由神经细胞、肠神经节、神经节间的神经连接及支配效应器组织的神经纤维小聚集体组成,其支配的效应器包括肠壁肌层、上皮黏膜、固有层血管及胃肠胰腺内分泌细胞^[9]。ENS 不仅可调控肠道运动、消化液分泌、局部血流及肠上皮屏障通透性,还与肠道的免疫、内分泌系统存在紧密的相互调控关系。本研究的 GO 富集分析显示,E 组与 C 组的差异蛋白在核周体、树突等细胞组分中显著富集,上述组分均为肠神经系统神经细胞的重要结构;差异蛋白在肽激素加工、突触前胞质钙离子浓度调控等生物学过程中富集,这些过程参与神经末梢及内分泌细胞中调节性肽类激素的合成与释放;分子功能层面,差异蛋白在激素活性条目上的富集程度最高,且上述 GO 条目富集的差异蛋白均以显著上调为主。蛋白结构域富集分析显示,E 组与 C 组的差异蛋白主要富集于突触素前 ATP-抓握结构域、突触素 ATP 结合结构域,突触素是调控突触小泡储存、转运与释放的关键蛋白,对神经递质释放及突触可塑性具有重要作用,突触素是定位于神经突触前膜的核心功能蛋白,其前 ATP-抓握结构域与 ATP 结合结构域是维持突触素功能的关键区域,可通过结合 ATP 提供能量,调控突触小泡的锚定、转运与胞吐过程,进而介导神经递质与神经肽的释放。KEGG 富集分析则显示,E 组差异蛋白富集最显著的通路为神经活性配体-受体相互作用,而肠神经内分泌系统中的神经递质、肽类激素及其受体均为该通路的核心组分,且本研究中该通路相关差异蛋白均呈显著上调表达。

KEGG 富集分析结果显示,P 组与 C 组的差异蛋白主要富集于 MAPK 信号通路($P=0.010$)与 Wnt 信号通路($P=0.013$)。MAPK 信号通路是由

细胞外刺激激活的蛋白激酶级联反应系统,广泛参与细胞增殖、分化、凋亡、应激反应等生物学过程。本研究中,共有 4 种上调蛋白、2 种下调蛋白富集于 MAPK 信号通路;有研究^[10]表明,MAP4K4 可通过促进 Drp1 的 S-亚硝基化修饰,导致线粒体功能障碍与心脏微血管损伤。其在放疗后直肠组织中的作用仍需进一步验证;c-Jun 的激活可促进炎症因子的分泌,加剧肠道炎症反应^[11];细丝蛋白 B(FLNB)作为细胞骨架蛋白,可介导细胞外信号与细胞内肌动蛋白网络的耦联,参与细胞黏附、增殖、迁移等过程^[12];CACNA2D1 基因敲低可抑制成纤维细胞的迁移能力^[13],该基因的高表达可能促进成纤维细胞活化及胶原蛋白合成,进而参与肠道纤维化的发生;肝配蛋白 A1(EFNA1)与其受体的相互作用是血管生成及内皮细胞增殖的关键调控环节^[14]。该蛋白的下调可能阻碍放疗后直肠组织的微循环重建。慢性放射性肠损伤的核心病理特征为肠道持续性慢性炎症、纤维化及细胞外基质(ECM)沉积,上述病理改变可能与 Wnt 信号通路的激活相关。本研究中,共有 3 种上调蛋白(CTBP1、LRP5、JUN)与 1 种下调蛋白(ROR1)富集于 Wnt 通路;巨噬细胞、树突状细胞等炎症细胞可通过分泌细胞因子或与上皮细胞直接相互作用,激活 Wnt 信号通路^[15];该通路可促进细胞增殖与存活,进而导致炎症细胞在肠道局部的聚集^[16];同时 Wnt 通路可激活成纤维细胞,促进胶原蛋白、纤维连接蛋白等 ECM 成分的合成与沉积^[17]。目前多种 Wnt 信号通路抑制剂(如 PORCN 抑制剂、端锚聚合酶抑制剂)正被研发用于器官纤维化与恶性肿瘤的治疗^[18],此类药物或可为慢性放射性直肠炎的治疗提供新的方向。

本研究虽通过 DIA 蛋白质组学初步揭示了直肠癌新辅助放疗后直肠黏膜损伤的分子特征,但仍存在明显局限性。其一,研究样本量偏小,统计效力不足,总样本仅 11 例且晚期损伤相关的 P 组仅 2 例,个体异质性可能影响结果可靠性,使研究结论的外推性受限;其二,未对差异蛋白进行实验验证,本研究仅通过组学及生物信息学筛选出差异蛋白与关键通路,未采用 Western blot、免疫组化等技术验证蛋白表达,也未通过体内外模型验证其功能,结果仅为组学层面的相关性分析;其三,未结合患者临床随访数据,无法明确差异蛋白、关键通路与放射性肠炎临床表型及预后的关联性,难以挖掘其临床转化价值。后续研究需扩大样本量,通过多技术验证核心蛋白与通路的功能,并结合临床数据进一步明确其在放射性肠炎防治中的意义。

综上,本研究通过 DIA 定量蛋白质组学技术,

初步揭示放射性直肠损伤早期以肠道神经-内分泌系统过度活跃为特征,晚期则与 MAPK、Wnt 信号通路的异常激活密切相关,为放射性结肠炎的发病机制研究提供了新的组学线索。

参考文献

[1] Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, *et al.* Colorectal cancer[J]. The Lancet, 2019, 394(10207): 1467—1480.

[2] Tamas K, Walenkamp AME, de Vries EGE, *et al.* Rectal and colon cancer: Not just a different anatomic site [J]. Cancer Treatment Reviews, 2015, 41(8): 671—679.

[3] Hong TS, Clark JW, Haigis KM. Cancers of the colon and rectum: identical or fraternal twins? [J]. Cancer Discovery, 2012, 2(2): 117—121.

[4] Snyder J, Wang CM, Zhang AQ, *et al.* Materials and microenvironments for engineering the intestinal epithelium [J]. Annals of Biomedical Engineering, 2020, 48(7): 1916—1940.

[5] Chavan SS, Pavlov VA, Tracey KJ. Mechanisms and therapeutic relevance of neuro-immune communication [J]. Immunity, 2017, 46(6): 927—942.

[6] Moraitis I, Guiu J, Rubert J. Gut microbiota controlling radiation-induced enteritis and intestinal regeneration [J]. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2023, 34(8): 489—501.

[7] Hauer-Jensen M, Denham JW, Andreyev HJN. Radiation enteropathy — pathogenesis, treatment and prevention [J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2014, 11(8): 470—479.

[8] Bayliss WM, Starling EH. The movements and innervation of the small intestine [J]. The Journal of Physiology, 1899, 24(2): 99—143.

[9] Furness JB. The enteric nervous system and neurogastroenterology [J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology,

2012, 9(5): 286—294.

[10] 殷丽霞,牛民主,张可妮,等. 升麻素抑制 MAPK 通路调节辅助性 T 细胞免疫平衡改善小鼠克罗恩病样结肠炎[J]. 南方医科大学学报, 2025, 45(3): 595—602.

[11] Bu C, Hu M, Su Y, *et al.* Cell-permeable JNK-inhibitory peptide regulates intestinal barrier function and inflammation to ameliorate necrotizing enterocolitis [J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2024, 28(14): e18534.

[12] Ma H, Cao L, Wang F, *et al.* Filamin B extensively regulates transcription and alternative splicing, and is associated with apoptosis in HeLa cells [J]. Oncology Reports, 2020, 43(5): 1536—1546.

[13] Inoue H, Shiozaki A, Kosuga T, *et al.* CACNA2D1 regulates the progression and influences the microenvironment of colon cancer [J]. Journal of Gastroenterology, 2024, 59(7): 556—571.

[14] Beauchamp A, Debinski W. Ephs and ephrins in cancer: Ephrin-A1 signalling [J]. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2012, 23(1): 109—115.

[15] Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease [J]. Nature Medicine, 2012, 18(7): 1028—1040.

[16] Katoh M. Therapeutics targeting FGF signaling network in human diseases [J]. Trends in Pharmacological Sciences, 2016, 37(12): 1081—1096.

[17] Katoh M. Mutation spectra of histone methyltransferases with canonical SET domains and EZH2-targeted therapy [J]. Epigenomics, 2016, 8(2): 285—305.

[18] Huang SA, Mishina YM, Liu S, *et al.* Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling [J]. Nature, 2009, 461(7264): 614—620.

(收稿日期: 2026—02—02 修回日期: 2026—04—01)