

证的研究

束缚所致肝郁证动物模型肝组织蛋白质组的差异表达研究

钟小兰¹ 吕志平¹ 钱令嘉² 刘晓华² 谭秦湘¹ 张晓刚¹

摘要 目的:通过运用组织蛋白质组学技术和方法,寻找肝郁证动物模型肝组织差异表达蛋白质。方法:以束缚制动法制备肝郁证大鼠模型,采用组织溶解方法分步抽提大鼠肝脏组织蛋白质,对获得的蛋白质进行二维凝胶电泳(2-DE)分离、胶体染色,分析模型组和对照组蛋白质分子的差异表达,并以基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)检测肽质量指纹,在数据库中检索出相应的蛋白质。结果:在大鼠肝组织胶体考染的2-DE图谱上,约能辨识出300余个清晰的蛋白质斑点,共找出3个与肝郁证辨证相关的肝组织差异表达蛋白,质谱出峰率达100%,检索结果分别为芳基硫酸转移酶、烯酰辅酶A水合酶和转甲状腺素蛋白。结论:肝主疏泄功能的正常可能和实体肝组织中的特异表达蛋白质——芳基硫酸转移酶、烯酰辅酶A水合酶和转甲状腺素蛋白的不同表达密切相关。

主题词 肝气郁结/代谢 蛋白质组/代谢

Study on Differential Expression of Proteome in the Liver Tissue of the Model Rat with Stagnation of the Liver-qi Induced by Restraint

Zhong Xiaolan¹, Lv Zhiping¹, Qian Lingjia², et al.

(College of TCM, Southern Medical University, Guangzhou 510515; 2. Institute of Hygiene Environmental Medicine, Tianjin 300050)

Objective: To search for differentially expressed proteins in the liver tissue of the model rat with stagnation of the liver-qi by using technique and method of tissue proteomics. **Methods:** The rat model with stagnation of the liver-qi was established by restraint. Proteins in the liver tissue of the rat were extracted with histolysis step by step, and the attained proteins were separated by two-dimensional electrophoresis(2-DE), with colloidal staining. The differential depressions of proteins were analyzed in the model group and the control group. The peptide mass fingerprints were detected with MALDI-TOF-MS, and the corresponding proteins were retrieved in Databank. **Results:** In the colloidal stained 2-DE map of the liver tissue of the rat, over 300 clear protein spots could be differentiated, and totally 3 differential expressed proteins in the liver tissue related with syndrome of stagnation of the liver-qi were found, the mass spectrogram peaking rate being 100%. They were aryl sulfotransferase, enoyl-coa hydratase and transthyretin. **Conclusion:** The normal dispelling function of the liver is possibly related with differential expression of the above 3 transpotanted proteins.

Key Words Stagnation of the liver-qi/metabolism; Proteome/metabolism

中医肝病占五脏发病的39.6%^[1],肝郁证及其相关证候更居其首,是肝病证候的基本病理变化。肝主疏泄,调气机,肝的疏泄功能失常、肝气郁结是导致肝郁证的最重要病机;虽然肝郁证的发生和心、肝、脾、肺、肾均有关系,但最为密切的相关脏器还是肝;而且,中医的肝和现代医学的肝脏在解剖学位置上具有相似性。肝脏是蛋白质代谢的主要场所,约有80%的氨基酸在肝脏合成蛋白质,血浆中的重要蛋白质几乎都在肝

脏中合成,肝脏还有储存蛋白质的作用。因此,以肝脏组织的蛋白质组差异表达作为研究目的,探讨肝郁证和肝脏蛋白质表达之间的关系,对肝郁证相关的蛋白质组研究具有一定的现实意义。

1 材料和方法

1.1 动物模型和标本采集:参照文献[2]采用束缚制动的方法制备肝郁证动物模型。实验用Wistar雄性大鼠(军事医学科学院动物所提供)16只,平均体重190g,随机分为模型组和对照组,每组各8只,模型组每日予特制束缚笼制动6小时(9:00am~15:00pm),对照组不予任何干涉。造模共3周,处死动物获取肝脏,以pH7.4,0.05mol/L的Tris-cl洗净,置液氮冻存。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371713)

1 南方医科大学中医药学院,广东省广州市广州大道北1838

号(510515)(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 军事医学科学院卫生学环境医学研究所

收稿日期:2005-09-13;修回日期:2005-11-20

1.2 蛋白质样品制备:取小块肝组织,以液氮研磨至粉末状,按照100mg 肝组织予400 μl 裂解液(8M Urea, 4% CHAPS, 0.48% Tris base, 40mmol/L DTT, 用时加入 10mmol/L PMSF) 的比例混匀,置 4℃裂解 30 分钟后,在 4℃以 12000 转/分钟离心 30 分钟,避开脂层,取上清液分装,用Bradford 考马斯亮蓝G250 法经紫外分光光度计对蛋白质进行定量,分别对两组蛋白质样品进行组内等量混合,分装冻存。

1.3 双向凝胶电泳分离蛋白质:用前经再次对蛋白质定量后,各取模型组和对照组肝组织蛋白质 1.1mg,分别与适量泡胀缓冲液(8M Urea, 4% CHAPS, 0.5% Pharmalyte, 20mmol/L DTT, 少量Bromopheol blue) 混匀,总容量为 340 μl,加入胶条槽,以 18cm, pH3~10 的 IPG 干胶条覆盖,置于 IPGphor 水平电泳仪(Amer-sham Pharmacia Biotech 公司) 电极板上,在 20℃,每胶 50mA 的条件下等电聚焦电泳,总电压时间积约为 53000Vh;然后平衡胶条各 10 分钟,置 12.5%SDS 凝胶进行垂直电泳分离;参照文献[3]以Coomassie bril-liant blue G-250 对凝胶做胶体考染,用纯净水脱色至干净。每组实验重复 3 次。

1.4 图像采集与分析:用Image Scanner 扫描仪以及 Lab Scan 扫描软件扫描凝胶,获取 300dpi 分辨率图像,以Image Master 2D Elite 图像分析软件进行图像分析,经蛋白质斑点检测、标准化和匹配做差异分析后得出差异蛋白质点的数据信息,采用t 检验分析数据。

1.5 差异蛋白点肽质量指纹分析:切下选定的差异蛋白斑点,反复以纯净水清洗后,用脱色液(200mmol/L 碳酸氨、100%乙腈各等份) 和乙腈(100%) 分别进行脱色和脱水处理;再以胰蛋白酶消化,经离心和真空冷冻干燥后,以美国 ABI 公司的 DEST R MALDI-TOF 质谱仪对处理好的样品进行质谱检测,获取肽质量指纹图谱。以 Mascot 程序在NCBI n r 和EMBL 数据库进行信息搜索,查询对应蛋白质。

1.6 统计学方法:实验数据采用Excel 软件,以t 检验进行数据分析。

2 结果

2.1 肝郁证大鼠肝组织蛋白质组双向凝胶电泳图像分析:大鼠肝组织蛋白质的二维凝胶电泳(2-DE) 图像清晰,没有背景条纹的干扰,蛋白质斑点分离完全,在相同条件下,反复 3 次重复的实验结果图大致相同,匹配率较高。以胶体考染的大鼠肝脏组织蛋白质凝胶能获得 300 余个清晰的蛋白质斑点,经过比较分析筛选出 3 个表达量具有显著差异的蛋白质斑点,两组蛋白质斑点表达量比较见表 1。

表 1 两组蛋白质斑点表达量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	No. 160	No. 193	No. 254
对照组	851.68±131.77	160.96±4.75	422.54±33.72
模型组	2252.62±590.62*	36.17±11.18**	1372.95±228.58**

与对照组比较, * P<0.05, ** P<0.01

2.2 差异蛋白点肽质量指纹图谱分析:在肝郁证模型大鼠肝脏中找出的 3 个差异表达蛋白质斑点经质谱检测,出峰率达 100%,波峰稳定;将所获得的肽质量指纹图谱进行数据库查询,均找到相应的蛋白质,分别为芳基硫基转移酶(aryl sulfotransferase) 、烯酰辅酶 A 水合酶(Enoyl-CoA Hydratase) 和转甲状腺素蛋白(transthyretin) 。见表 2。

表 2 肝郁证大鼠肝脏差异表达蛋白质

蛋白点序号	蛋白质识别号(NCBI n r)	质谱肽片断匹配率(%)	标准分子量(Da)	理论等电点	蛋白质名称	表达情况
160	CAA48604	37	33422	6.41	芳基硫基转移酶	上调
193	g24159086	44	28498	6.41	烯酰辅酶 A 水合酶	下调
254	1GKEA	48	13122	6.04	转甲状腺素蛋白	上调

3 讨论

实验中采用标本混合的方法,先将同一组的肝脏组织蛋白质混合均匀,在同一条条件下反复进行验证,有利于减少因标本个体差异和实验手法等导致的误差,实验结果更具有可信性。王立顺等^[1]也认为,选取病理类型一致的组织进行混合,能够有效降低个体差异所造成的分析上的复杂性,避免错误信息。因此,在蛋白质组研究中,标本混合的方法可以作为实验设计的一个新思路。基于银染和质谱的相对不兼容性,采用灵敏度较高的胶体考染法,既能增加低丰度蛋白质双向凝胶电泳过程中的显影,又能获得质谱检测中良好的出峰率,值得推广。目前蛋白质组学技术并不能完全分离出所有的蛋白质,仍有许多表达量极少的低丰度蛋白质被漏检,还有待技术和检测手法的不断改进,以更好地运用于疾病相关蛋白质组的研究。

目前从蛋白质组学的角度对中医证实质的相关研究结果少见报道,我们从肝郁证大鼠模型的肝脏组织初步找出与肝郁证相关的蛋白质有:芳基硫基转移酶、烯酰辅酶 A 水合酶和转甲状腺素蛋白。其中,初步认定转甲状腺素蛋白除和甲状腺素的运载有关外,还参与嘌呤的分解代谢^[5],可作为临床营养代谢和反映肾功能的指标^[6];烯酰辅酶 A 水合酶在脂肪酸的氧化和线粒体中脂肪酸的合成中起着重要的作用;芳基硫基转移酶是一种重要的连接酶,以很多不同的形式存在于很多细胞,特别是肝细胞的细胞溶胶中,并催化将硫酸

盐类从磷酸腺苷磷酸硫酸(PAPS)上转移到外来或内在的含有羟基的化合物上,参与解毒作用,尤其对致癌化学物质的转化具有重要意义。在肝郁证大鼠肝组织中,转甲状腺素蛋白和芳基硫基转移酶的表达上调以及烯酰辅酶A水合酶表达下调,初步考虑与机体代谢减低,肝细胞的去分化加强,影响酶的诱导和对氧的消耗有关。然而,这些蛋白质在肝郁证的发生、发展和转归过程中的作用及机制还有待进一步的研究。

肝郁证作为中医常见证型之一,是因肝疏泄不及所致,以情绪抑郁、功能低下为始发特征;肝主疏泄的功能被认为在调节中枢以及外周器官的代谢和生理功能的过程中发挥着重要的作用,借助对肝郁证特异表达蛋白质功能的研究,可以更深入地了解疏泄正常、气机调畅的实质。肝郁证中的“肝”和实体肝是否相关,一直难以定论;实验从肝郁证动物模型中找到由实体肝产生的部分特异表达的蛋白质,可能和肝发挥正常疏泄功能密切相关,是否由此而拉近了中医“肝”和实体肝脏之间的距离,仍需进一步验证。与此同时,研究结

果从一个侧面反映了和肝郁证相关的部分特异表达蛋白质,对肝郁证实质和整个中医证型的研究均有借鉴作用。

参考文献

- 1 潘其民,陈国林,赵玉秋,等.中国肝病流行病学调查.中西医结合杂志,1991,11(3):1531.
- 2 唐己婷,陈家旭.三种中药复方对慢性束缚应激大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴的调节.北京中医药大学学报,2002,25(3):231.
- 3 Candiano G, Bruschi M, Musante L, et al. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. Electrophoresis, 2004, 25(9):1327~1333.
- 4 王立顺,尹艳慧,高素君,等.以双向凝胶电泳为基础的食管癌组织蛋白质组学分析新策略.中国免疫学杂志,2003,19(4):230.
- 5 Eneqvist T, Lundberg E, Nilsson L, et al. The transthyretin-related protein family. Eur J Biochem, 2003, 270(3):518~532.
- 6 Schweigert FJ, Wirth K, Raila J. Characterization of the microheterogeneity of transthyretin in plasma and urine using SELDI-TOF-MS immunoassay. Proteome Sci, 2004, 2(1):5.

志谢 本研究得到卫生部肿瘤蛋白质组学重点实验室的帮助,深表感谢。

肝复乐治疗慢性乙型肝炎肝纤维化 50 例

邓友* 江元森* 谢俊强* 李学俊* 黄桂梅* 姚集鲁*

我们于2001年5月~2004年5月应用肝复乐片治疗乙型肝炎肝纤维化80例。观察其对血清肝纤维化指标透明质酸酶(HA)、Ⅲ型前胶原(PCⅢ)、Ⅳ型胶原(ⅣC)及层黏蛋白(LN)水平及肝功能的影响,以探讨肝复乐抗肝纤维化的疗效,现报道如下。

1 临床资料

全部病例均为2001~2004年本院住院及门诊就医的慢性乙型肝炎患者,临床诊断根据2000年西安会议制定的《病毒性肝炎诊断标准》。患者分为常规西药治疗组及对照组。治疗组50例,男45例,女5例,平均年龄43.7岁。对照组30例,男26例,女4例,平均年龄45.6岁,重点观察两组治疗前后丙氨酸转氨酶(ALT)、血清总胆红素(SB)、白蛋白(ALB)、HA、PCⅢ、ⅣC、LN。后4项放免试剂分别由上海医学研究所、重庆肿瘤研究所及上海军医学研究所提供。治疗组与对照组治疗前的ALT、SB、HA、PCⅢ、ⅣC及LN水平经统计学检验差异无显著性($P>0.05$)。

2 治疗方法

治疗组:肝复乐片(党参、白术、鳖甲、沉香、柴胡、重楼等),每次6片,每日3次,连服3个月为1个疗程,并给予常规基础治疗(肝安注射液、还原型谷胱甘肽、维生素类、白蛋白等制剂),腹水明显患者给予利尿治疗。对照组:除不给予肝复乐片外,治

疗方法与治疗组相同。

3 治疗结果

3.1 两组患者治疗前后HA、PCⅢ、ⅣC、LN水平变化:结果显示,治疗组各项指标的水平明显下降,与治疗前比较差异有显著性($P<0.01$)。对照组各项指标也有下降($P<0.01$)。两组治疗后比较差异有显著性($P<0.01$),即治疗组的各项指标的水平下降明显优于对照组。

3.2 治疗后两组丙氨酸氨基转移酶(ALT)和血清总胆红素(SB)与白蛋白(A)的变化:结果显示,治疗后两组肝功能指标(ALT、SB、A)均有显著改善($P<0.01$),两组间比较,治疗后差异也有显著性($P<0.01$)。

4 讨论

国内已有许多报道认为复方中药能抵制肝内胶原的生成和促进降解,保护肝细胞,抑制肝脏炎症,从而有抗纤维化作用。肝复乐方剂具有补气养血、健脾理气、活血化瘀、清热解毒功效。现代研究发现,柴胡、鳖甲等具有抑制胶原合成,抗结缔组织增生作用。研究表明,肝复乐能降低血清HA、PCⅢ、ⅣC、LN的含量、抗纤维化作用及抑制炎症、改善肝功能作用优于对照组。国内已有不少研究表明,血清HA、PCⅢ、ⅣC、LN含量测定可以反映肝纤维化程度和活性,是观察抗纤维化药物疗效的重要指标之一。肝复乐治疗后能使HA、PCⅢ、ⅣC、LN含量明显下降,提示这些标记物的合成减少或降解增加,肝损伤减轻。因此,肝复乐可考虑作为肝纤维化患者抗肝纤维化的常规用药。