

·方药研究·

健胃愈疡颗粒对乙酸性胃溃疡复发大鼠作用的蛋白质组学研究

申定珠 李家邦 蒋荣鑫 凌江红 叶川 马国添 叶仁群 张宗 黄国栋 郭全

(中南大学湘雅医院中西医结合研究所, 长沙市湘雅路87号, 410008)

[摘要] **目的** 分析健胃愈疡颗粒(JWYY)对乙酸性胃溃疡复发大鼠蛋白质表达谱的影响,寻找JWYY抗胃溃疡复发作用的相关蛋白。**方法** 采用二维凝胶电泳(2-DE)分离JWYY处理组和JWYY未处理组大鼠胃组织的总蛋白,图像分析识别差异表达的蛋白质点,基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱得到相应的肽质量指纹图,NCBI及SWISS-PROT数据库搜索鉴定蛋白质。**结果** 所获2-DE图谱分辨率高、重复性好,质谱分析共鉴定了12个差异蛋白质点,其中JWYY处理组有8个蛋白质点表达上调,4个蛋白质点表达下调,大多数蛋白与溃疡复发的形成、生长、凋亡及免疫等环节相关。**结论** JWYY抗胃溃疡复发作用可能与多种蛋白直接或间接相关,这些蛋白质的鉴定及进一步研究有助于抗溃疡复发药物新型靶标的发现。

[关键词] 健胃愈疡颗粒;胃溃疡复发;蛋白质组;双向凝胶电泳;质谱

Proteomic Analysis of the Effect of Jianwei Yuyang Granule on Rats with Recurring Gastric Ulcer Caused by Acetic Acid

SHEN Ding-zhu, LI Jia-bang, JIANG Rong-xin, et al.

(Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008)

ABSTRACT **Objective** To study the effect of Jianwei Yuyang Granule (JYG) on protein spectra of rats with recurring gastric ulcer caused by acetic acid and to search the proteins involved. **Methods** Total proteins in gastric tissue of rats in JYG and nulli-JYG groups were separated by two dimensional gel electrophoresis (2-DE). Differential protein spots were identified by peptide mass fingerprint based on matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and data searching in National Center for Biotechnology Information and SWISS-PROT databases. **Results** Well-resolution and reproducible 2-DE maps were obtained and 12 differential protein spots were identified by mass spectrographic analysis. The expression of 8 protein spots increased and 4 decreased in JYG group. Most of the differential protein spots were relevant to formation, proliferation, apoptosis and immunity of the recurrence of gastric ulcer. **Conclusion** JYG can prevent the recurrence of gastric ulcer, which might be relevant to many proteins. Identification and further study of these proteins conduces to discovering new targets of drugs for ulcer.

Key Words Jianwei Yuyang Granule; Recurrence of gastric ulcer; Proteome; Two dimensional gel electrophoresis; Mass spectra

消化性溃疡(PU)是临床常见病、多发病之一。随着溃疡病治疗药物的进展,PU的近期愈合已不成问题,但停药后1年复发率约30%~50%^[1]。因此,寻找能有效治疗甚至预防溃疡复发的药物一直是科研人员的目标。健胃愈疡颗粒(JWYY)的前期临床和实验研究显示,其对MK、EGFR^[2]、TFF1^[3]等细胞因子的表达具有良好的调节作用,能增强促愈合因子Midkine(MK)和表皮生长因子受体(EGFR)的上增性表达,抑制炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的表达,同时还能提高胃溃疡大鼠及胃溃疡复发大鼠胃黏膜上皮细胞Bcl-2基因的表达,显著减轻胃溃疡大鼠胃黏膜上皮细胞的凋亡,改善胃黏膜过度凋亡状态,进而与提高溃疡

愈合质量(QOUH)有关^[2,4~6]。近年来,蛋白质组学的出现和发展给药物作用机制的研究提供了高通量的方法和途径。鉴于此,我们利用蛋白质组学手段在蛋白质水平上对JWYY抗胃溃疡复发的机制进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及药品 清洁级SD大鼠由中南大学医学实验动物中心提供,许可证号:SYXK(湘)2005-0005。合成人白细胞介素-1 β IL-1 β 为英国Peprotech公司产品。JWYY为湘雅制药集团公司产品,批准文号:国药准字Z10960018,主要成分:柴胡、党参、白芍、延胡索、白及、珍珠粉、青黛、甘草等。

试剂:丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、三羟甲基氨基甲烷、甘氨酸、十二烷基磺酸钠(SDS)、超纯尿素、

CHAPS 购自 Promega 公司; 2-DE 蛋白定量试剂盒、IPG buffer (pH³~10) 及固相化 pH 梯度干胶条 (IPG strip pH³~10, 24cm)、覆盖液均购自 Amersham Pharmacia 公司; 二硫苏糖醇 (DTT)、碘乙酰胺、TPCK 处理的胰蛋白酶、三氟乙酸 (TFA)、碳酸氢铵、硫代硫酸钠、乙腈、CCA 购自 Sigma 公司; 等电聚焦仪、Ettan DALT 垂直电泳槽、Image Scanner 扫描仪为 Amersham Biosciences 公司产品; Applied Biosystem Voyager-DE STR BiospectrometryTM Workstation System 4307 MALDI-TOF-MS 质谱仪为 ABI 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 分组、给药及组织标本的处理 SD 大鼠 80 只, 雌雄各半, 体重 150~200g, 随机分为正常组 (20 只)、胃溃疡模型组 (40 只) 及 JWYY 组 (20 只), 采用改良的 Okabe 乙酸涂沫法^[7]制作大鼠实验性胃溃疡模型。术后 24 小时开始正常喂食, JWYY 组灌服 JWYY 药液 [用量按动物体表面积以成人用量折合, 200g 大鼠每日用量为成人剂量的 0.018 倍; JWYY 成人每日剂量为 9g, 则大鼠每日量为 $9\text{g} \times 0.018 \times 5 = 0.81\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 故以蒸馏水稀释成浓度为 0.081g/ml 的药液 (灌胃剂量按 SD 大鼠 1ml/100g 体重计算)], 正常组则予灌服等量蒸馏水, 连续 90 天后, 将胃溃疡模型组大鼠再随机分为胃溃疡模型组和胃溃疡模型复发组各半。根据文献[8], 采用 IL-1 β 复制胃溃疡复发大鼠模型, 即胃溃疡模型复发组 JWYY 组大鼠腹腔内注射 (ip) IL-1 β 按 SD 大鼠 12g/kg 体重计算, 所有大鼠于胃溃疡复发模型成功后 24 小时禁食, 48 小时后颈椎脱臼法处死, 分别取出胃溃疡模型复发组大鼠胃溃疡处胃组织和 JWYY 组大鼠相应处胃组织, 予冰盐水反复清洗干净, 以去除血液, 并尽可能剪去其他多余组织, 滤纸吸去多余的液体, 一部分予 4% 多聚甲醛保存, 留作石蜡切片, 另一部分立即置液氮中速冻, 后移至 -80℃ 低温冰箱保存。经病理组织学指标分别确定胃溃疡及胃溃疡复发大鼠模型成立。

1.2.2 胃组织总蛋白质的提取 取冻存于液氮中的经 JWYY 处理和未经 JWYY 处理的胃溃疡复发 SD 大鼠胃组织各 1 份, 称取重量, 置于研磨管, 按照 1g 组织的比例加入组织裂解液 (7mol/L Urea, 2 mol/L Thiourea, 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, 1mg/ml DNase I, 0.25 mg/ml RNase A) 1.0ml, 充分涡旋混匀, 置于 37℃ 孵育 1 小时, 取出后再充分涡旋, 15000 转/分钟、4℃ 离心 30 分钟^[9], 吸取上清液即为组织的总蛋白质。蛋白质定量试剂盒测定蛋白质浓度, -80℃ 冻存

备用。

1.2.3 双向凝胶电泳 取蛋白质样品 1mg 与水化液 [内含 8mol/L Urea、4% CHAPS、40 mmol/L Tris、18mmol/L DTT、0.5% IPG buffer (pH 3~10) 及痕量溴酚蓝] 混合, 上样总体积为 450 μ l。30V 水化 14 小时后经 500V 1 小时、1000V 1 小时、8000V 8.5 小时进行固相 pH 梯度 3~10 的等电聚焦。等电聚焦后分别于 10ml 平衡 A 液 [50mmol/L Tris-HCl (pH 8.8), 6mmol 尿素, 30% 甘油, 0.2% DTT 及痕量溴酚蓝] 和 10ml 平衡 B 液 [50mmol/L Tris-HCl (pH 8.8) 6mmol 尿素, 30% 甘油, 3% 碘乙酰胺及痕量溴酚蓝] 中各平衡 15 分钟。平衡后的 IPG 胶条转移至 12.5% 的 0.75mm SDS~PAGE 胶上端进行第二向垂直电泳。考马斯亮蓝染色参照 Candiano 等^[10]的胶体考马斯亮蓝染色方法。

1.2.4 图像分析 应用 Image Scanner 扫描仪对胶体考马斯亮蓝染色的 2-DE 胶扫描。JWYY 处理与未处理组胃溃疡复发组织各 3 张双向凝胶电泳图使用 PDQuest 2DE 软件进行成组匹配、背景消减、点检测等分析, 所获数据的统计分析在 SPSS 11.5 软件上进行。对经统计有显著性差异 ($P < 0.05$) 的蛋白质点进行进一步的酶解与鉴定。

1.2.5 差异蛋白质点 MALDI-TOF-MS 分析 切割蛋白质点置于 1.5ml EP 管中, 50% 乙腈和 50mmol 碳酸氢铵脱色 30 分钟, 乙腈脱水, 真空冷冻离心抽干。加入 5 μ l TPCK 处理的胰蛋白酶 (0.1 μ g/ml) 冰上吸胀 60 分钟, 37℃ 酶解 12 小时, 30 μ l 萃取液 (100% 乙腈与 5% 三氟乙酸以 1g 比例混匀) 萃取 60 分钟, 共两次。将萃取液收集于 0.5ml EP 管中真空冷冻离心浓缩至约 5 μ l, 然后取 0.5 μ l 样品与 1 μ l 基质液 CCA 混合, 点样于不锈钢板。MALDI-TOF-MS 质谱仪采用反射模式, 正离子谱测定, 离子源加速电压 20000V, 反射电压比 1.12, N₂ 激光波长 337nm, 脉冲宽度 3ns, 离子延迟提取 100nsec, 真空度 4×10^{-7} Torr, 质谱信号单次扫描累加 50 次, 质谱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。利用 Mascot 软件检索 NCBI nr 及 SWISS-Prot 数据库鉴定差异表达蛋白质, 搜索条件为: 肽片段质量误差控制在 100ppm, 酶解片段漏切位点选择为 1 个, 物种来源不限, 离子选择 $[M + H]^+$, 固定修饰为半胱氨酸碘乙酰胺化, 经 Mascot Distiller 识别信号峰。

2 结果

2.1 JWYY 处理组与未处理组大鼠胃组织的双向凝胶电泳图

应用同一实验条件和参数对 JWYY 处理组与未

处理组大鼠的胃组织进行双向凝胶电泳,对所获胶体考马斯亮蓝染色的2-DE 胶应用 Image Scanner 扫描仪进行扫描。结果显示,蛋白质上样量在1mg 时所获凝胶电泳图聚焦良好、背景清晰、分辨率高、重复性高(图略)。

2.2 蛋白质点差异分析、肽质量指纹图谱分析及数据库查询鉴定蛋白质

应用 PDQuest 2-DE 软件对双向凝胶电泳图进行分析, JWYY 处理组与未处理组的平均蛋白质点数分别为(1023±36)、(1109±24)。平均匹配率为(92.2±2)%。经成组比较共计有12个明显差异表达的蛋白质点,其中8个蛋白质点在 JWYY 处理组表达上调,4个蛋白质点表达下调。这些差异点至少出现在3次不同的实验中,且 JWYY 处理组与 JWYY 未处理组相对含量之间差异有显著性意义($P < 0.05$)。取差异蛋白点进行胶内原位酶解,应用 MALDI-TOF-MS 分析,质谱鉴定了每组3张2-DE 胶的平均胶比较(组间比较)后的12个差异表达的蛋白质点,得到12张肽质量指纹图(PMF)。对所获 PMF 应用 Mascot 软件查询 NCBI 及 SWISS-Prot 数据库,初步鉴定了12个蛋白质,大多数蛋白与胃溃疡复发的形成、生长、凋亡及免疫等环节相关,包括 Heat shock protein(HSP27), destrin, MHC Class II actigen beta chain, Annexin A2, 78kDa glucose-regulated protein(GRP78), 热休克蛋白60(chaperonin containing TCP1)、HSP70-binding protein 1, Gelsolin, Peroxiredoxin 2, L-Lactate dehydrogenase B Chain, Vinculin, Hemoglobin beta chain 等(图略)。

3 讨论

中医中药是消化性溃疡治疗的重要方面,中药治疗溃疡通过整体调节来实现对局部病理的修复,最大限度地调动了机体抗病祛邪的能力。近年来研究表明,中药不仅能有效地调节攻击因子与保护因子之间的失衡,而且在治愈溃疡的同时,还能对紊乱的消化功能进行调整而提高其愈合的质量^[11~13]。此外,中药可改善胃黏膜血流、保护胃黏膜、调节溃疡的相关细胞因子的表达,提高 QOUH 而降低复发率^[14]。

胃溃疡属于中医“胃脘痛”范畴,由于脾胃相表里,同为后天之本,故胃病常涉及于脾。针对肝郁脾虚这一胃溃疡复发的病理基础,给予健脾益气、疏肝理气、活血清热之健胃愈疡颗粒,方中柴胡疏肝理气,能调节下丘脑-植物神经功能,抑制迷走神经兴奋,党参健脾益气,可提高机体免疫功能,二药共为君药;辅以延胡索理气活血,改善胃黏膜血循环;青黛清热解毒,凉血,抑菌消炎;珍珠粉、白及祛除糜烂,收敛生肌。全方调整

体、敷局部,共奏扶正祛邪之功,则疾病自愈。

随着人类大规模基因组计划草图测序工作的完成,以蛋白质组学研究为主要标志的后基因组时代来临,无疑为抗胃溃疡复发药物治疗靶标的探寻及药物筛选提供了新的技术平台。虽然调控生命活动的源头是基因,但作为基因表达终末产物的蛋白质才是溃疡复发细胞周期、凋亡及转移调控的直接参与者。因此,从蛋白质水平探索胃溃疡复发的药物作用的分子机制,是当今胃溃疡研究的新热点。多项研究表明, JWYY 能改善胃黏膜过度凋亡状态,提高 QOUH,但其具体作用机制较为复杂,而利用蛋白质组学研究的高通量特点,有望发现药物具体作用机制的线索。基于此,我们利用 IL-1 β 致乙酸性胃溃疡复发大鼠作为研究对象,在实验中发现, JWYY 作用于胃溃疡复发大鼠后,通过原位酶解及质谱鉴定,与 JWYY 未干预组大鼠比较,明确了12个差异表达的蛋白质。其中 HSP27, Vinculin, MHC Class II actigen beta chain, GRP78, TCP1, HSP70-binding protein 1, Gelsolin, Hemoglobin beta chain 8个蛋白质在 JWYY 干预大鼠胃组织中表达上调,而 Peroxiredoxin 2, L-Lactate dehydrogenase B Chain, destrin, Annexin A2 4个蛋白质在 JWYY 干预大鼠胃组织中表达下调。

热休克蛋白(HSPs)存在于人及动物的胃黏膜,胃黏膜在受到外源性刺激(如乙醇等)后将迅速合成 HSPs,在急性胃黏膜损害过程中起胃黏膜保护作用。HSPs 在维持细胞的正常形态及功能中起着重要作用, HSPs 可提高细胞对应激源的耐受性,与细胞凋亡密切相关^[15]。HSP27是 HSP 家族中小分子量亚家族中的一员,分子量为27KD^[16],是热休克基因编码的功能蛋白质,具有可溶性,能阻止应激状态的肌动蛋白和微丝的分裂,有利于细胞骨架的稳定,它不仅对单个细胞产生应激耐受起重要作用,而且通过内皮和上皮的屏障作用,对组成整个有机体起必要的保护作用^[17]。在急性炎症期, HSP27阳性表达增高,可能是由于非磷酸化 HSP27a 早期提供及时基础保护作用。HSP27细胞中含量减少,刺激 HSP27的表达增强,这种表达是在转录水平上调的^[18],可能是由 HSP27磷酸化水平决定的。中性粒细胞和活化的巨噬细胞可以释放白细胞介素1、肿瘤坏死因子等细胞因子,调节免疫,介导炎症反应。同时,炎症因子增强 HSP27磷酸化,调节 HSP27的表达。我们的实验表明, JWYY 的应用可使胃溃疡复发大鼠胃组织中 HSP27的表达上调,其抑制胃溃疡复发的机制是否与 HSP27抗细胞凋亡等作用有关,还有待于进一步的研究证实。HSP70是

HSP 中功能最多、研究最深入的一种。HSP70作为一种在进化过程中有高度保守性的应激蛋白,在防止热和其他应激引起的细胞损害或者使受损的细胞恢复方面起着重要作用。HSP70的细胞保护作用机制与其分子伴侣作用、协同免疫作用及抗细胞凋亡作用密切相关^[19]。目前认为,HSP70有多种功能,是一种非特异性保护蛋白,动物在高温及各种有害条件因素刺激下,HSP70合成增加最为明显,HSP70合成的增加可以提高机体耐热和抗应激能力,其生理和病理作用已成为当今生命科学研究的热点^[20]。李国成等发现其自制健脾益气中草药方能诱导大鼠提高 HSPs 的表达,防止胃黏膜损伤,促进溃疡的愈合,认为 HSPs 可能介导胃黏膜防御^[21]。目前研究表明^[22,23],HSP70的细胞保护作用主要是通过分子伴侣、提高细胞对应激原的耐受性、抗细胞凋亡、减轻过氧化及炎性损伤等作用而实现的。而 HSP70表达的增强可以看作是细胞保护作用的体现,经过合理配伍的中药复方制剂能诱导其表达的进一步增强,我们的实验结果表明,JWYY 的干预可使胃溃疡复发大鼠胃组织的 HSP70-binding protein 1表达上调,从分子水平上看,HSP70表达的增强阐明了 JWYY 对溃疡复发这一应激所产生的预防保护效果。其抑制溃疡炎症细胞和组织生长的机制是否与 HSP70-binding protein 1抗细胞凋亡及抗过氧化等机制相关,值得深入探讨。

参考文献

- [1] 陈灏珠主编. 实用内科学. 10版. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 1740~1752.
- [2] 陈文红, 李家邦. 健胃愈疡颗粒对胃溃疡大鼠胃组织 MK 和表皮生长因子受体表达的影响. 中国中西医结合消化杂志, 2001, 9(6): 341~344.
- [3] 张炜宁, 张烨, 李家邦. 健胃愈疡颗粒对胃溃疡患者胃黏膜 Httf1 mRNA 表达的影响. 现代中西医结合杂志, 2003, 12(18): 1925~1927.
- [4] 熊国良, 李家邦. 健胃愈疡颗粒对胃溃疡大鼠胃黏膜上皮细胞原位凋亡的影响及 Bcl-2, Bax 表达的调节. 中国中医基础医学杂志, 2003, 9(2): 118~120.
- [5] 陈文红, 李家邦. 健胃愈疡颗粒对胃溃疡大鼠胃黏膜 TNF α 表达的影响. 中成药, 2000, 22(6): 433~435.
- [6] 喻长远, 李家邦. 健胃愈疡颗粒对胃溃疡复发大鼠胃黏膜上皮细胞凋亡及其相关调控基因影响. 中国中医基础医学杂志, 2003, 9(9): 665~667.
- [7] 李家邦, 田永立, 陈文红, 等. 中药健胃愈疡颗粒剂治疗大鼠实验性胃溃疡. 世界华人消化杂志, 2002, 10(11): 1282~1287.
- [8] Watanabe T, Arakawa T, Fukuda T, et al. Role of neutrophils in a rat model of gastric ulcer recurrence caused

- by interleukin-1 β . Am J Pathol, 1997, 150(3): 971~979.
- [9] Araki N, Morimasa T, Sakai T, et al. Comparative analysis of brain proteins from P53-deficient mice by two-dimensional electrophoresis. Electrophoresis, 2000, 21(9): 1880~1889.
- [10] 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.
- [11] 梅武轩, 邓兰琼, 崔世高. 柴胡桂枝汤对大鼠胃溃疡愈合质量的影响. 中国中西医结合脾胃杂志, 2000, 8(5): 278.
- [12] 鄢顺琴, 风良元, 苏英豪, 等. 胃痛灵保护胃黏膜作用及对溃疡愈合质量的影响. 中国中西医结合杂志, 1995, 15(10): 612.
- [13] 张永峰, 赵燕平, 刘立昌, 等. 健胃汤抗大鼠乙酸胃溃疡及泼尼松再损伤的实验研究. 中国中西医结合杂志, 2002, 15(2): 86~88.
- [14] 周福生, 胡玲, 黄志新, 等. 抗消化性溃疡复发机制的中医药研究策略. 中国中西医结合消化杂志, 2001, 9(2): 108~110.
- [15] Nylandsted J, Brand K, Jaaltela M, et al. Heat shock protein 70 is required for the survival of cancer cells. Ann NY Acad Sci, 2001, 926: 122~125.
- [16] Morino M, Tsuzuki T, Ishikawa Y, et al. Specific expression of HSP27 in human tumor cell lines in vitro. In Vivo, 1997, 11(2): 179~184.
- [17] Hahm KB, Park IS, Kim YS. Role of rebamipide on induction of heat-shock proteins and protection against reactive oxygen metabolite-mediated cell damage in cultured gastric mucosal cells. Free Radic Biol Med, 1997, 22(4): 711~716.
- [18] Mehlen P, Coronas V, Ljubec-Thubal V, et al. Small stress protein Hsp27 accumulation during dopamine-mediated differentiation of rat olfactory neurons counteracts apoptosis. Cell Death Differ, 1999, 6(3): 227~233.
- [19] Gabai VL, Meriin AB, Mosser DD, et al. HSP70 prevents activation of stress kinase. A novel pathway of cellular thermotolerance. J Biol Chem, 1997, 272(29): 18033~18037.
- [20] Kanazawa Y, Isomoto H, Oka M, et al. Expression of heat shock protein Hsp 70 and Hsp 40 in colorectal cancer. Med Oncol, 2003, 20(2): 157~164.
- [21] 李国成, 陶秀良, 罗树星. 健脾益气中药对乙酸慢性胃溃疡大鼠热休克蛋白表达的影响. 中国中西医结合脾胃杂志, 1999, 7(3): 133~136.
- [22] Ellis RJ. Molecular chaperones: plugging the transport gap. Nature, 2003, 421(6925): 801~802.
- [23] 袁志强. 热休克蛋白70与细胞保护. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2002, 23(5): 287~288.

(收稿日期: 2006-08-22; 修回日期: 2007-01-10)