

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.13.015

实验研究

半夏白术天麻汤对痰湿壅盛型高血压模型大鼠下丘脑蛋白质组学的影响

姜凌宇¹, 姜月华², 杨传华^{2*}, 吴赛³

(1. 山东中医药大学第一临床医学院, 山东省济南市历下区经十路 16369 号, 250014; 2. 山东中医药大学附属医院; 3. 青岛海慈集团)

摘要 目的 探讨半夏白术天麻汤治疗痰湿壅盛型高血压病的可能分子机制。方法 大鼠高脂饮食 24 周建立痰湿壅盛型高血压模型, 16 只造模成功大鼠随机分为模型组和半夏白术天麻汤组, 每组各 8 只, 并以普通饲料喂养大鼠 8 只设为正常组。半夏白术天麻汤组给予半夏白术天麻汤 13.8 g/(kg·d) 灌胃, 正常组和模型组给予等量生理盐水灌胃, 均灌胃 12 周。记录大鼠体重、血压, 计算 Lee's 指数, 检测大鼠血清葡萄糖、甘油三酯、总胆固醇水平; 双向电泳分离样品并且进行硝酸银染色, 筛选下丘脑差异蛋白质点提交质谱鉴定, 采用 MALDI-TOF-TOF 质谱仪进行质谱分析、肽指纹图谱进行蛋白质鉴定, 选取部分蛋白质点验证蛋白质组学结果。结果 半夏白术天麻汤组大鼠体重、血压、Lee's 指数、血清总胆固醇均较模型组下降 ($P < 0.05$)。正常组、模型组、半夏白术天麻汤组分别分离出 3342、3844、3828 个蛋白点, 其中半夏白术天麻汤组同模型组比较, 100 个蛋白质表达降低, 72 个蛋白质表达增加。在质谱仪进一步鉴定的 19 种蛋白中, 模型组与正常组相比有差异而半夏白术天麻汤可使差异趋势逆转的蛋白点为 11 个, 其中 5 个表达上调, 6 个表达下调。结论 半夏白术天麻汤治疗痰湿壅盛型高血压病的分子机制可能与改善细胞骨架和形态、内质网应激、能量代谢、神经元结构等有关。

关键词 高血压病; 痰湿壅盛; 半夏白术天麻汤; 下丘脑; 蛋白质组学

肥胖是高血压病的独立及首要危险因素^[1]。肥胖导致血压调节中枢功能减退, 血压调节敏感性降低, 同时内脏脂肪含量的增加可提高交感神经活性及循环中血管紧张素原、肾素、醛固酮、血管紧张素转化酶的活性, 促进血压的升高^[2-4]。从中医角度, 高血压病可归属于“眩晕”范畴, 而《丹溪心法·头眩》中提到“肥白人多痰湿”“无痰不作眩”。嗜食肥甘厚味可损伤脾胃, 以致脾胃健运失司, 积聚生痰, 故而痰阻中焦, 清阳不升, 发为眩晕^[5]。半夏白术天麻汤出自《医学心悟》, 可风痰并治、肝脾并调, 现代药理研究证实其不仅可改善痰湿壅盛型高血压病患者的临床症状, 并且在降低血压、血脂及改善胰岛素抵抗等方面均具有显著疗效^[6]。本课题组前期研究通过长期高脂肪饮食诱导建立痰湿壅盛型高血压大鼠模型, 使大鼠内脏脂

肪组织过度累积, 并兼具高血压、高血脂、糖耐量异常和脂肪肝^[7]。本研究旨在通过观察半夏白术天麻汤对痰湿壅盛型高血压大鼠下丘脑蛋白质组学的干预作用, 探讨半夏白术天麻汤祛痰化湿的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 Wistar 大鼠 44 只, 8 周龄, 体重 200 ~ 240 g, 由山东鲁抗医药集团有限公司提供, 实验动物合格证号: SCXK (Lu) 20130001。

1.2 药物

半夏白术天麻汤组成: 清半夏 9 g, 白术 18 g, 天麻 6 g, 橘红 6 g, 茯苓 6 g, 甘草 3 g, 水煎两次浓缩定容至 1 g/ml 溶液。

1.3 主要仪器及试剂

无创大鼠尾动脉血压监测仪 (MRBP 型, 美国 IITC 公司); 超声仪 (型号: BILON-R1200, 西安

基金项目: 国家自然科学基金 (81573916, 81673807)

* 通讯作者: yangchuanhua1962@126.com, {0531} 68616602

比朗生物科技有限公司); 紫外分光光度计 (型号: 4802S, UNIC 公司); 等电聚焦仪 (型号: GE Ettan IPGphor3, GE healthcare 公司); 电泳槽 (型号: Mini-PROTEAN, 美国 Bio-Rad 公司); 扫描仪 (型号: ImageScanner III, GE 公司); 质谱仪 (型号: Autoflex speed MALDI-TOF-TOF, 德国 Bruker Dalton 公司); IPG Buffer (型号: 17-6000-86, GE 公司)。

蛋白酶抑制剂 (PMSF, 货号: 0754)、二硫苏糖醇 (DTT, 货号: 0281)、低熔点琼脂糖 (货号: 0815) 均为 Amresco 公司产品; N, N, N, N-四甲基乙二胺 (TEMED, 货号: 0761, Amersham 公司); 兔抗大鼠 PDIA3 一抗 (货号: 15967-1-AP)、兔抗大鼠 PP2A 一抗 (货号: 10321-1-AP) 均购自武汉三鹰生物技术有限公司; 戊巴比妥钠 (货号: P8410, Solarbio 公司); Tris (货号: TT1492)、尿素 (货号: UT0907)、硫脲 (货号: A110226-0100)、EDTA (货号: E0322)、十二烷基硫酸钠 (货号: SS0228) 均为上海生工生物有限公司产品; CHAPS (货号: C-3023, Sigma 公司)。

1.4 造模及给药方法

参照文献 [8] 方法, 大鼠适应性喂养 1 周, 采用随机数字表法选取 36 只大鼠喂食高脂肪饲料 24 周, 具体配方为: 普通饲料 60%, 猪油 12%, 蔗糖 5%, 奶粉 5%, 花生粉 5%, 鸡蛋 10%, 麻油 1%, 食盐 2%, 由山东鲁抗医药集团有限公司加工制作。其余 8 只喂食普通饲料作为正常组。每周监测大鼠体重, 以无创尾动脉血压监测仪监测大鼠血压, 平行测量 5 次, 计算血压平均值。24 周后, 选择体重和血压均高于正常组 25% 的大鼠确定为造模成功, 共筛选造模成功大鼠 16 只。造模成功大鼠采用随机数字表法分为模型组和半夏白术天麻汤组, 每组各 8 只。半夏白术天麻汤组以半夏白术天麻汤 13.8 g/(kg·d) 灌胃 12 周, 正常组和模型组给予等量生理盐水灌胃, 灌胃期间模型组和半夏白术天麻汤组继续给予高脂饲料。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 一般情况 记录大鼠体重、血压, 并计算 Lee's 指数 [9]; 实验结束后下腔静脉取血, 分离血清, 检测大鼠血清葡萄糖、甘油三酯、总胆固醇水平, 委托山东省中医药大学附属医院检验科进行。

1.5.2 大鼠下丘脑差异蛋白质图谱 在观察结束时, 3% 戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉, 0.85% NaCl 原位灌注, 观察脑组织变成白色后, 在

冰上尽快分离下丘脑组织。将下丘脑组织加入 0.5 ml IEF 缓冲液 (40 mM Tris, 5M 尿素, 2M 硫脲, 4% CHAPS, 10 mM DTT, 1.0 mM EDTA 和 1% PMSF) 中, 在液氮中反复冻融 3 次, 进行匀浆, 4℃ 以 12 000 r/min 离心 15 min。BCA 法测定上清液中的蛋白质浓度。

通过双向电泳 (2DE) 分离样品, 第一相中使用等电聚焦仪, 第二相中使用高通量电泳槽。将样品 (500 μg 蛋白质) 加载到 24 cm IPG 胶条上, 50V 水化过夜。IEF 在 20℃ 室温时使用以下参数进行: 200V, 1h; 500V, 1h; 1000V, 1h; 8000V, 2h; 由 8000V 快速升至 70 000Vh, 500V 保持瞬时。然后将 IPG 胶条在 10 ml 平衡缓冲液 (6M 尿素, 2% 十二烷基硫酸钠, 50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 20% 甘油) 中平衡 30 min, 4℃ 以 60 mA 恒流进行预制的 12.5% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺 (SDS-PAGE) 凝胶电泳, 直至溴酚蓝前沿距离胶底部约 0.5 cm 处停止电泳, 在相同条件下实验重复 3 次。

硝酸银染色方法: 将凝胶置于固定液中固定过夜, 然后置于敏化液敏化 2 min, 去离子水漂洗 5 次, 每次 5 min, 新鲜配制的银氨染液染色 15 min, 去离子水漂洗 3 次, 每次 5 min, 然后以显色液 (5 mg/L 柠檬酸 & 9.5 mg/L 甲醛) 显色至理想程度, 1% 冰醋酸终止显色。将银染凝胶在玻璃纸间干燥, 随后用扫描仪扫描并进行分析。为选择差异蛋白点用于质谱分析, 对背景消减和标准化后的蛋白点的体积进行统计分析, 对蛋白点体积进行数据转换, 计算每个点的标准丰度值和点样标准差, 以模型组凝胶作为参考, 对相对分子量和等电点进行分析和匹配, 筛选差异蛋白点, 以丰度差异大于 1.5 (LOD > 1.5) 的蛋白质斑点提交质谱鉴定。

1.5.3 质谱分析和蛋白质鉴定 重复电泳, 凝胶采用改良考马斯亮蓝染色, 从双向电泳凝胶上切下蛋白斑点, 依据文献 [9] 方法处理样品, 利用 Autoflex speed MALDI-TOF-TOF 质谱仪进行质谱分析。UV 波长为 355 nm, 重复速率为 200 Hz, 加速电压为 20 000 V, 最优质量分辨率为 1500 Da。扫描质量范围为 700 ~ 3200 Da, 收集信号。胰酶自切峰为内标校正质谱仪。所有实验样品的质谱图均以默认模式获得。利用 flex Analysis 软件 (Bruker Dalton 公司) 过滤基线峰、识别信号峰。以 Mascot 软件搜索 NCBI 数据库, 寻找匹配的蛋白质。查询条件: 1) 肽质量范围: 800 ~ 4000 Da; 2) 表观 PI

与表观 Mr 的误差范围: 无限制; 3) 一级质谱质量误差范围: 50ppm; 4) 二级质谱质量误差范围: 0.5Da; 5) 酶解片段不完全 (遗漏酶切位点): 1 个; 6) 物种来源: Rattus; 7) 电荷: +1; 8) 同位素峰: monoisotopic; 9) 固定修饰: 半胱氨酸碘乙酰胺化; 10) 可变修饰: 蛋氨酸氧化。通过 MS/MS 分析获得的序列信息确认蛋白质。当蛋白质评分接近阈值 51 时, 执行 LIFT 分析作为另外的平均值来确定蛋白质, 通过肽-质量指纹图谱 (PMF) 进行与先前描述相同的参数操作。

使用 Western blot 分析验证蛋白质组学结果。具体步骤如下: 12% SDS-PAGE, 上样量为 40 μg; 电转印后, 以含 5% 脱脂奶的 PBS 室温封闭 1h。加入兔抗大鼠 PDIA3 一抗 (1 : 2000 稀释) 或兔抗大鼠 PP2A 一抗 (1 : 800 稀释), 以 β-actin 为内参, 4℃ 孵育过夜。次日 1 × PBS-T 洗涤 5 min × 5

次, 加入山羊抗兔 IgG 二抗 (1 : 20000) 室温孵育 1h, 1 × PBS-T 洗涤 5 min × 5 次。ECL 显色, Fluor Chem Q 曝光、条带半定量分析。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计软件, 所有数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况比较

表 1 示, 与正常组比较, 模型组大鼠体重、Lee's 指数、收缩压、舒张压、血清总胆固醇水平均显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 半夏白术天麻汤组大鼠体重、Lee's 指数、收缩压、舒张压、血清总胆固醇水平均显著下降 ($P < 0.05$)。各组大鼠血清葡萄糖、血清甘油三酯水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠一般状况比较

组别	鼠数	体重 (g)	Lee's 指数	收缩压 (mmHg)	舒张压 (mmHg)	血清葡萄糖 (mmol/L)	血清甘油三酯 (mmol/L)	血清总胆固醇 (mmol/L)
正常组	8	738.26 ± 18.10	268.2 ± 4.6	135.13 ± 12.69	100.86 ± 9.62	4.16 ± 0.38	0.76 ± 0.11	1.45 ± 0.21
模型组	8	1015.97 ± 167.53*	330.2 ± 7.4*	171.63 ± 10.59*	132.25 ± 10.21*	4.87 ± 0.31	0.85 ± 0.22	2.13 ± 0.29*
半夏白术天麻汤组	8	750.32 ± 22.40 [△]	274.8 ± 5.8 [△]	147.46 ± 10.68 [△]	110.41 ± 8.64 [△]	4.10 ± 0.24	0.80 ± 0.22	1.48 ± 0.20 [△]

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

表 2 MALDI-TOF-TOF 质谱仪鉴定的大鼠下丘脑 19 种差异蛋白表达

斑点编号	检索名称	蛋白质名称	蛋白质评分	分子量	等电点	BBT/HFD 比值	趋势
A04	2AAB_ RAT	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A beta isoform	361	66649	4.99	0.479	下调
A07	AINX_ RAT	Alpha-interneixin	728	56253	5.20	0.561	下调
A08	DPYL2_ RAT	Dihydropyrimidinase-related protein 2	611	62638	5.95	0.533	下调
A09	PDIA3_ RAT	Protein disulfide-isomerase A3	512	57044	5.88	0.000001	下调
A17	ODO2_ RAT	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	391	49236	8.89	0.519	下调
A21	TBA1B_ RAT	Tubulin alpha-1B chain	392	50804	4.94	0.422	下调
A45	TPM2_ RAT	Tropomyosin beta chain	369	32931	4.66	0.585	下调
A46	TBA1B_ RAT	Tubulin alpha-1B chain	416	50804	4.94	0.634	下调
A54	DDAH1_ RAT	N (G), N (G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	604	31805	5.75	0.638	下调
A63	TBB5_ RAT	Tubulin beta-5 chain	587	50095	4.78	0.439	下调
A64	FAHD2_ RAT	Fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing protein 2	305	34958	8.63	0.000001	下调
B01	GRP78_ RAT	78 kDa glucose-regulated protein	245	72473	5.07	1.543	上调
B08	STXB1_ RAT	Syntaxin-binding protein 1	359	67925	6.49	1.963	上调
B14	AL9A1_ RAT	4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase	383	54530	6.57	6.149	上调
B45	HDHD2_ RAT	Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 2	148	28932	5.65	2.107	上调
B47	PGAM1_ RAT	Phosphoglycerate mutase 1	523	28928	6.67	5.164	上调
B49	ATPB_ RAT	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	232	56318	5.19	3.575	上调
B51	PSA6_ RAT	Proteasome subunit alpha type-6	467	27838	6.34	1.654	上调
B71	TPPC3_ RAT	Trafficking protein particle complex subunit 3	508	20460	4.88	3.205	上调

2.2 各组大鼠下丘脑差异蛋白质图谱

在双向电泳凝胶/银染分析中, 正常组、模型组、半夏白术天麻汤组分别分离出 3342、3844、3828 个蛋白点, 其中模型组同正常组比较, 128 个蛋白质表达降低, 133 个蛋白质表达增加; 半夏白术天麻汤组同模型组比较, 100 个蛋白质表达降低, 72 个蛋白质表达增加。使用 MALDI-TOF-TOF 质谱仪进一步鉴定其中表达差异较大且符合本研究的具有代表性的 19 种蛋白质, 详见表 2; 其中模型组与正常组相比有差异而半夏白术天麻汤可使差异趋势逆转的蛋白点为 11 个, 包括 5 个表达上调, 6 个表达下调, 详见表 3。

表 3 大鼠下丘脑共同差异蛋白点表达在各组间的变化

斑点编号	模型组/正常组 比值	表达变化	半夏白术天麻汤 组/模型组比值	表达变化
A04	3.059	上调	0.513	下调
A07	1000000	上调	0.561	下调
A08	3.158	上调	0.533	下调
A09	1000000	上调	0.000001	下调
A21	10.909	上调	0.422	下调
A45	3.269	上调	0.585	下调
B08	0.198	下调	1.963	上调
B45	0.621	下调	2.107	上调
B47	0.214	下调	5.164	上调
B49	0.558	下调	3.575	上调
B71	0.625	下调	3.205	上调

差异表达蛋白点中, 蛋白质点 A09 (PDIA3) 与蛋白质点 A04 (PP2A) 变化显著, PDIA3 是重要的内质网应激相关蛋白, PP2A 为促凋亡因子, 二者均与细胞的增殖、凋亡密切相关, 在细胞生物学中起重要作用^[10-11], 因此可能是半夏白术天麻汤治疗痰湿壅盛型高血压病的重要靶点, 特通过 Western blot 分别检测验证 PDIA3、PP2A 蛋白表达含量。

2.3 各组大鼠下丘脑 PDIA3 和 PP2A 蛋白表达比较

表 4 示, 与正常组比较, 模型组大鼠下丘脑 PDIA3 和 PP2A 蛋白表达均明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 半夏白术天麻汤组大鼠下丘脑 PDIA3 和 PP2A 蛋白表达均明显降低 ($P < 0.05$)。

表 4 各组大鼠下丘脑 PDIA3 和 PP2A 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	PDIA3	PP2A
正常组	8	0.22 ± 0.03	0.10 ± 0.03
模型组	8	0.60 ± 0.08*	0.33 ± 0.03*
半夏白术天麻汤组	8	0.32 ± 0.04 [△]	0.16 ± 0.02 [△]

注: 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

3 讨论

高血压病属于中医学“眩晕”范畴。中医学认为, 饮食不节, 恣食肥甘厚味, 损伤脾胃, 致健运失司, 聚湿生痰, 或年老正气亏虚, 气虚津化无力, 化生痰湿, 痰阻中焦, 清阳不升, 浊阴不降, 发为眩晕。《丹溪心法》言“湿土生痰, 痰生热, 热生风也”, 指出痰湿既是病理产物又是新的致病因素, 痰湿生热致眩晕渐进为中风。半夏白术天麻汤是临床用于治疗痰湿壅盛的经典方剂, 可化痰祛湿、健脾和胃以熄风止眩。因此, 本研究采用半夏白术天麻汤干预痰湿壅盛型高血压大鼠, 并且借助下丘脑差异蛋白质组学从中枢调节角度对其药理机制进行观察研究。

本研究结果显示, MALDI-TOF-TOFMS 质谱仪鉴定的差异蛋白 19 种, 模型组与正常组相比有差异而半夏白术天麻汤可使差异趋势逆转的蛋白点为 11 个, 包括 5 个表达上调, 6 个表达下调, 其中包括: 1) 细胞骨架和形态相关蛋白。蛋白质点 A21、A46、A63 被同时鉴定为微管蛋白, 是组成微管的主要成分, 在细胞的有丝分裂、物质运输、能量转换和迁移运动中起重要作用^[12]。微管蛋白的高表达影响微管聚合和稳定性, 干扰谷氨酸、 γ -氨基丁酸等血压调节神经递质的传递及运输, 引起血压变化^[13]。A08 鉴定为二氢嘧啶酶相关蛋白 2, 其通过参与微管的动态调节过程而调节神经元和突触结构。肥胖性高血压血压中枢调节能力下降, 下丘脑组织中有一定数量的蛋白质发生了明显的氧化修饰, 其中包括对氧化损伤非常敏感的二氢嘧啶酶相关蛋白 2^[14-16]。本研究中应用半夏白术天麻汤后, A21、A46、A63、A08 蛋白水平均出现了下调, 其中对 A08、A21 的升高有逆转作用, 提示增生的微管蛋白得到了有效控制, 有助于神经元细胞形态和功能恢复正常。2) 内质网应激相关蛋白。蛋白质点 A09 与 B01 均与内质网应激相关。蛋白质点 A09 为蛋白质二硫键异构酶 A3 (PDIA3), 有研究发现在膳食诱导肥胖大鼠下丘脑、胰腺、肝脏和骨骼肌中分子伴侣 PDIA3 表达均上调, 推论出摄入过多的营养物质可诱导在 PDIA3 作用下的内质网应激, 造成蛋白质的错误折叠和未折叠^[17]。B01 鉴定为 78kDa 葡萄糖调节蛋白 (GRP78), 有保护缺血神经元、抵抗凋亡的作用, 通过阻断特异性凋亡介质 caspase-12 活化减少神经元凋亡^[18]。B51 鉴定为蛋白酶体 α 亚基 6, 细胞使用蛋白酶体调控特

定蛋白质和去除错误折叠蛋白质^[9]。本研究观察到应用半夏白术天麻汤后, PDIA3 表达降低且呈现为逆转作用, GRP78 表达升高, 两种表达的改变均使内质网应激水平下降, 同时 B51 的升高又可纠正蛋白质的错误折叠, 减少内质网应激造成的反应, 三者变化最终均可抑制神经元细胞凋亡。3) 能量代谢相关蛋白。A17 鉴定为 α 酮戊二酸脱氢酶复合体 (KGDHC) 的二氢硫辛酸琥珀酰转移酶 (DLST), B49 为 ATP 合酶 β 亚基, B47 为磷酸甘油酸变位酶 (PGAM), 三者均与细胞能量代谢相关。ATP 合酶亚基 β (ATP5b) 属于线粒体 ATP 酶复合物催化核心, 产生 ATP, 并在维持细胞能量稳态方面具有重要作用。PGAM 是糖酵解和糖异生过程中的一个关键酶, 与碳水化合物转运、新陈代谢、催化活性及生长发育有关^[20], 催化 3-磷酸甘油酸和 2-磷酸甘油酸之间的相互转化。B47 及 B49 的升高有利于 ATP 的产生、增加神经元的能量供给、维持下丘脑神经细胞的能量稳态。本研究中应用半夏白术天麻汤后 A17 出现下调, 而 B49、B47 上调, 且同正常组比较, B49、B47 变化呈逆转改变。4) 神经元结构相关蛋白。A07 鉴定为 α 互联蛋白, 其在轴突的生长中起重要作用, 在发育中的鼠的小脑以及培养的神经元细胞中发现, 在迁移颗粒细胞以及成熟的颗粒神经元轴突中 α 互联蛋白是唯一的中间纤维, 聚集形成网络状^[21]。本研究中半夏白术天麻汤组 A07 水平下降, 提示该药组方可减少中间纤维的积累及神经元变性, 因此我们推测其能更好地维持树突状结构的正常, 并且有利于调节血压信号的传导。B08 鉴定为突触融合蛋白 1, 参与突触小泡及突触前膜的对接, 与囊泡迁移及神经递质的释放密切相关^[22]。A07 与 B08 均与神经元结构有关, 二者变化的意义在于更有利于维持神经元基本结构, 保证信息传递、血压调节信号下达功能的正常。5) A04 鉴定为丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶 2A (PP2A), PP2A 在细胞生物学中起重要作用, 包括细胞周期调节、细胞增殖与凋亡、细胞骨架动力学等^[23]。本研究中, 半夏白术天麻汤能逆转 PP2A 的升高, 提示神经细胞凋亡减少, PP2A 可能是半夏白术天麻汤治疗痰湿壅盛型高血压的重要靶点。

实验中我们发现, 部分蛋白质如 A54、A64、B14、B45、B71 未有详尽资料报道, 但其在肥胖性高血压中枢调节中可能具有重要的作用, 其具体功能和作用仍需进一步研究探索。综上所述, 肥胖

性高血压引起的下丘脑的蛋白改变可能与神经元结构及递质传递有关, 主要病理变化表现在神经细胞形态骨架、能量代谢、内质网应激以及神经元结构及功能的改变。半夏白术天麻汤改善痰湿壅盛型高血压的作用原理可能在于抑制神经元微管蛋白增生, 维持神经细胞形态正常; 改善下丘脑内质网应激, 减少细胞凋亡; 促进 ATP 生成, 维持细胞能量稳态; 保证神经元结构完整及信息传递等。

参考文献

- [1] 杨丽睿, 张慧敏. 肥胖高血压发病机制研究现状 [J]. 心血管病学进展, 2013, 34(2): 182-185.
- [2] KOTA SK, JAMMULA S, JAMMULA S, et al. Renin-angiotensin system activity in vitamin D deficient, obese individuals with hypertension: an urban Indian study [J]. Indian J Endocrinol Metab, 2011, 15(suppl 4): S395-S401.
- [3] HORITA S, SEKI G, YAMADA H, et al. Insulin resistance, obesity, hypertension, and renal sodium transport [J]. Int J Hypertens, 2011; 391762. doi: 10.4061/2011/391762.
- [4] DA SA, DO CJ, DUBINION J, et al. The role of the sympathetic nervous system in obesity-related hypertension [J]. Curr Hypertens Rep, 2009, 11(3): 206-211.
- [5] 周仲瑛. 中医内科学 [M]. 2 版. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 297-299.
- [6] 熊兴江, 王阶. 论半夏白术天麻汤在高血压病中的运用 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(11): 2862-2865.
- [7] 吴赛, 姜月华, 杨传华, 等. 痰湿壅盛证高血压大鼠的模型建立与评价 [J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(2): 222-228.
- [8] BUNYAN J, MURRELL EA, SHAH PP. The induction of obesity in rodents by means of monosodium glutamate [J]. Br J Nutr, 1976, 35(1): 25-39.
- [9] FERNANDEZ J, GHARAHDAAGHI F, MISCHE SM. Routine identification of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gels or polyvinyl difluoride membranes using matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) [J]. Electrophoresis, 1998, 19(6): 1036-1045.
- [10] CROWHURST GS, DALBY AR, ISUPOV MN, et al. Structure of a phosphoglycerate mutase: 3-phosphoglyceric acid complex at 1.7 Å [J]. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1999, 55(Pt 11): 1822-1826.
- [11] ZHAO J, LIEM RK. α -Internexin and peripherin: expression, assembly, functions, and roles in disease [J]. Methods Enzymol, 2016, 568: 477-507. doi: 10.1016/bs.

- mie. 2015. 09. 012.
- [2] DUGGIN IG, AYLETT CH, WALSH JC, et al. CetZ tubulin-like proteins control archaeal cell shape [J]. Nature, 2015, 519(7543): 362-365.
- [3] 陈金星, 张芊, 郑翼, 等. 高血压大鼠心脏细胞骨架蛋白 α -微管蛋白和结蛋白 [J]. 中华高血压杂志, 2006, 14(2): 124-128.
- [4] ARIMURA N, MENAGER C, FUKATA Y, et al. Role of CRMP-2 in neuronal polarity [J]. J Neurobiol, 2004, 58(1): 34-47.
- [5] KAWANO Y, YOSHIMURA T, TSUBOI D, et al. CRMP-2 is involved in kinesin-4-dependent transport of the Sra-1/WAVE 1 complex and axon formation [J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(22): 9920-9935.
- [6] BRITTA JM, PIEKARZ AD, WANG Y, et al. An atypical role for collapsin response mediator protein 2 (CRMP-2) in neurotransmitter release via interaction with presynaptic voltage-gated calcium channels [J]. J Biol Chem, 2009, 284(45): 31375-31390.
- [7] 时淑娟. DIO/DR 大鼠能量代谢相关蛋白在下丘脑和外周器官的表达 [J]. 天津: 天津医科大学, 2012.
- [8] QIAN Y, ZHENG Y, WEBER D. A 78-kDa glucoseregulated protein is involved in the decrease of interleukin-6 secretion by lead treatment from astrocytes [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, 293(3): 897-905.
- [9] ORTEGA Z, LUCAS JJ. Ubiquitin-proteasome system involvement in Huntington's disease [J]. Front Mol Neurosci, 2014, 7: 77. doi: 10.3389/fnmol.2014.00077.
- [10] 王芬, 李润花, 殷国荣. 磷酸甘油酸变位酶研究进展 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2012, 24(3): 353-357.
- [11] 刘治军, 赵明, 陈乃宏. Ca^{2+} 和突触融合蛋白 1 对突触前膜 5-HT 转运体转运活性的调控研究 [J]. 中国新药杂志, 2010, 19(20): 1853-1858.
- [12] 李天祝, 向本琼. 蛋白磷酸酶 PP2A 的结构及其肿瘤抑制因子功能 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2009, 36(2): 133-142.

Effect of *Banxia Baizhu Tianma Tang* (半夏白术天麻汤) on Proteomics in Hypothalamus of Hypertension Model Rats with Phlegm-dampness Excessive Accumulation Type

JIANG Lingyu¹, JIANG Yuehua², YANG Chuanhua², WU Sai³

(1. First Clinical School of Shandong University of Chinese Medicine, Jinan, 250014; 2. Affiliated Hospital of Shandong University of Chinese Medicine; 3. Qingdao Haici Group)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Banxia Baizhu Tianma Tang* (半夏白术天麻汤, BBTT) in treating hypertension of excessive accumulation of phlegm-dampness type. **Methods** The rats were given high fat diet for 24 weeks to build hypertension model of phlegm-dampness excessive accumulation type, and 16 successfully modelled rats were randomized into model group and BBTT group, and 8 rats with standard diet were set as the control group. BBTT group was given BBTT 13.8 g/(kg · d) by gavage for 12 weeks, while the control group and the model group were given normal saline of the same volume. The researchers recorded the weight, blood pressure, calculated Lee's index, and detected the serum glucose, triglyceride and total cholesterol levels. The specimens were separated by dielectrophoresis and stained by silver nitrate, and hypothalamic differential protein spots were screened for protein identification by MALDI-TOF-TOF mass spectrometer and peptide mass fingerprinting, and some protein spots were selected to verify the results of proteomics. **Results** The weight, blood pressure, Lee's index and total cholesterol level in the BBTT group were significantly lower than those in the model group ($P < 0.05$). As for the protein spots, 3342, 3844, 3828 were separated respectively in the control group, model group and BBTT group. Compared with the model group, the expressions of 100 proteins in the BBTT group were lower, and 72 higher. As for the 19 proteins with further identification by mass spectrometer, there were difference between the model group and the control group, while the BBTT group could reverse the difference trend of 11 of them, including 5 up-regulations and 6 down-regulations. **Conclusion** In treating hypertension of phlegm-dampness excessive accumulation type, BBTT might improve cytoskeleton and cellular morphology, endoplasmic reticulum stress, energy metabolism and neuron model.

Keywords hypertension; phlegm-dampness excessive accumulation; *Banxia Baizhu Tianma Tang* (半夏白术天麻汤); hypothalamus; proteomics

(收稿日期: 2016 - 12 - 04; 修回日期: 2017 - 03 - 10)

编辑: 邓 媛