

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.24.014

实验研究

基于 iTRAQ 技术分析脾气虚证大鼠回肠蛋白质的差异

杨关林^{*}, 宋囡¹, 贾连群¹, 王德山², 单德红², 张哲³, 马艺鑫¹, 张妮¹

(1. 辽宁中医药大学中医脏象理论及应用教育部重点实验室, 辽宁省沈阳市皇姑区崇山东路 79 号, 110847; 2. 辽宁中医药大学基础医学院; 3. 辽宁中医药大学附属医院)

摘要 目的 探讨脾气虚证分子生物学特征。方法 12 只 SD 大鼠随机分为正常组和脾气虚组各 6 只。脾气虚组采用饮食不节加力竭游泳建立脾气虚证模型。分离提取回肠总蛋白, 用相对和绝对定量同位素标记 (iTRAQ) 法检测分析差异表达的蛋白质种类及两组表达比值, 用 Western blot 法验证差异蛋白小肠脂肪酸结合蛋白 (I-FABP)、肝脂肪酸结合蛋白 (L-FABP)、尼曼匹克 C1 型类似蛋白 (NPC1L1) 的表达量。结果 iTRAQ 技术分析发现两组大鼠脂肪消化及吸收相关通路蛋白存在差异, 与正常组比较, 脾气虚组 I-FABP、微粒体甘油三酸酯转移蛋白 (MTTP)、L-FABP、NPC1L1、载脂蛋白 B (ApoB)、载脂蛋白 A4 (ApoA4) 及单酰甘油酰基转移酶 (Mogat 2) 7 个蛋白均出现了上调 (变化倍数 > 1.2)。Western blot 法验证差异蛋白 I-FABP、L-FABP、NPC1L1 变化趋势与蛋白质组学结果相一致。结论 脾气虚证大鼠回肠组织中 I-FABP、MTTP、L-FABP、NPC1L1、ApoB、ApoA4 及 MGAT7 蛋白表达上调。

关键词 脾气虚证; 回肠; 蛋白质组学; 脂肪酸

脾气虚证是指脾气不足、失其健运所表现的证候。中医学脾的功能不仅涵盖了西医学的整个消化系统, 而且与神经、内分泌、血液、循环、免疫等系统生理功能密切相关^[1]。现代医学认为, 脾气虚证与亚健康状态归属同一范畴^[2], 可能与多种疾病的发生存在密切的关系。脾失运化, 水湿内停, 日久化痰, 痰浊血瘀, 是高脂血症、肥胖、冠心病、糖尿病等多种疾病的病理基础^[3]。蛋白质组学主要用于寻找和发现区别于正常生理状态下的疾病特异表达蛋白, 这有利于阐明疾病的发病机理。目前, 相对和绝对定量同位素标记 (iTRAQ) 技术是蛋白质组学研究的主要手段之一。由于脾主运化的部分作用与小肠的功能相似, 故本课题组采用 iTRAQ 技术对脾气虚大鼠小肠组织差异蛋白进行检测, 并对其表达进行分析, 以观察脾气虚证的分子生物学特征。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级 1 月龄 SD 大鼠雄性 12 只, 体重 (200 ± 10) g, 购于本溪实验动物中心, 实验动物许可证号: SCXK (辽) -2010-0001。

1.2 主要试剂与仪器

β 肌动蛋白 (β-actin) 抗体 (批号: sc-47778)、肠脂肪酸结合蛋白 (I-FABP) 抗体 (批号: sc-16063)、尼曼匹克 C1 型类似蛋白 (NPC1L1) 抗体 (批号: sc-49061) 均由美国 Santa Cruz 公司生产; 肝脂肪酸结合蛋白 (L-FABP) 抗体 (批号: bs-0897R), 北京博奥森生物技术有限公司; 羊抗兔过氧化物酶标记 IgG (批号: CW0103)、羊抗鼠过氧化物酶标记 IgG (批号: CW0102s)、兔抗羊过氧化物酶标记 IgG (批号: CW0105), 均由北京康为世纪生物科技有限公司生产; BCA 蛋白测定试剂盒 (批号: 37B00150)、凝胶制备试剂盒 (批号: 37K00130), 均由北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司生产; 三羟甲基氨基甲烷 (Tris, 批号: 57160104300)、甘氨酸 (Glycin,

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (“973” 计划) (2013CB531704); 国家自然科学基金 (81202834); 辽宁省高等学校优秀人才支持计划 (LR2015041)

* 通讯作者: yang_guanlin@163.com, (024) 31207358

批号: 57090103300) 均由美国 Genview 公司分装; 十二烷基硫酸钠 (SDS, 批号: STBF7245V)、苯甲基磺酰氟 (PMSF, 批号: 78830)、乙二胺四乙酸 (EDTA, 批号: E5134)、二硫苏糖醇 (DTT, 批号: 43815)、碘乙酰胺 (IAM, 批号: II149)、三乙胺硼烷 (TEAB, 批号: 43815), 均由美国 Sigma 公司生产; TBS 缓冲液 (批号: 09D24C31), 武汉博士德生物工程有限公司。低速冷冻离心机 (型号: ST40)、串联电喷雾 (ESI) 质谱仪 (型号: Q-EXACTIVE) 均购于美国赛默飞世尔科技公司; 微型垂直电泳槽 (型号: 552BR)、半干转印槽 (型号: 170-3940) 均购于美国 Bio-Rad 公司。

1.3 动物分组及造模

12 只 SD 大鼠采用随机数字表法分为正常组、脾气虚组, 每组 6 只。脾气虚组参照文献 [4] 采用饮食不节加力竭游泳建立脾气虚证模型, 先饱食 1 天, 再禁食 2 天, 3 天为一个循环, 期间自由饮水, 并每日游泳至力竭, 水温 35 ~ 37℃, 连续 15 天。第 15 天晚上 12 只大鼠禁食禁水, 次日 4% 水合氯醛 0.5 ml/100 g 腹腔麻醉后腹主动脉取血, 同时分离回肠组织并保存于 -80℃ 冰箱中备用。

1.4 iTRAQ 定量分析蛋白

每组取 3 只大鼠提取蛋白, 称取 0.5 g 的回肠组织, 加入 1 ml 蛋白裂解液溶解, 超声破碎组织 15 min, 25 000 r/min 离心 20 min, 取上清, 加入 5 倍体积预冷丙酮, -20℃ 沉淀 2 h 后, 16 000 r/min 离心 20 min, 弃上清。沉淀用 0.5 ml 蛋白裂解液溶解, 分别添加终浓度为 1 mmol/L 的 PMSF, 2 mmol/L 的 EDTA, 5 min 后, 添加终浓度为 10 mmol/L 的 DTT, 超声 15 min 后 25 000 r/min 离心 20 min, 取上清在 56℃ 条件下加入终浓度为 10 mmol/L 的 DTT 处理 1 h, 加入终浓度为 55 mmol/L IAM 暗室静置 45 min, 加入 5 倍体积预冷丙酮, -20℃ 静置 2 h, 25 000 r/min 离心 20 min, 弃上清, 沉淀在 200 μl 0.5 mol/L TEAB 中超声溶解 15 min, 25 000 r/min 离心 20 min 后取上清, 测定蛋白浓度, 然后十二烷基硫酸钠 (SDS) 凝胶电泳, 120V 恒压电泳 120 min, 经过蛋白质酶解、iTRAQ 标记、强阳离子交换色谱 (SCX) 分离后, 采用 ESI 质谱仪对经过液相分离的肽段进行分析。

对于质谱下机的原始文件, 进行峰识别, 得到峰列表。用 Mascot 2.3.02 软件在蛋白质数据库中搜索肽质量指纹谱数据进行肽段及蛋白质的鉴定并确定蛋白质。用 KEGG 数据库 (<http://www.genome.jp/kegg>) 对两组差异表达的蛋白进行分析。

genome. jp/kegg) 对两组差异表达的蛋白进行分析。

1.5 Western bolt 法检测差异蛋白表达

每组选取 3 只大鼠, 每只大鼠称取 50 mg 回肠组织提取总蛋白, BCA 蛋白定量法测定蛋白浓度, 12% SDS-PAGE 凝胶电泳, PVDF 膜印迹。加入一抗 β-actin (1 : 300)、I-FABP (1 : 300)、NPC1L1 (1 : 300)、L-FABP (1 : 300) 4℃ 过夜, 洗膜后分别加入二抗羊抗鼠过氧化物酶标记 IgG (1 : 2000)、兔抗羊过氧化物酶标记 IgG (1 : 2000)、羊抗鼠过氧化物酶标记 IgG (1 : 2000)、羊抗兔过氧化物酶标记 IgG (1 : 2000) 室温孵育 1 h, 以 β-actin 为内参, 运用 AlphaView SA 3.4.0.0 分析软件对蛋白点用带进行灰度值检测, 对目的蛋白与内参蛋白灰度值的比值进行比较。

1.6 统计学方法

用 SPSS 19.0 统计软件进行分析。数据均采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组差异蛋白分析结果

蛋白定量分析结果发现, 可被识别蛋白达 5124 个, 其中被定量蛋白达到 3705 个, 与正常组相比, 脾气虚组有 271 个上调蛋白和 303 个下调蛋白, 共计 574 个差异蛋白。KEGG 通路富集分析结果显示, 主要发生变化的有补体系统、药物代谢、胰液分泌、花生四烯酸代谢、疟疾、淀粉和蔗糖代谢、碳水化合物的消化和吸收、造血细胞谱系、维生素的消化和吸收、脂肪消化与吸收、细胞外基质受体交互作用通路、蛋白质的消化与吸收、PPAR 信号通路、甾类激素生物合成与脂肪酸合成 15 个通路。本研究重点分析脂肪消化及吸收相关通路蛋

表 1 脂肪消化及吸收相关通路表达上调蛋白

序号	KO 编号	蛋白名称	趋势	脾气虚组/正常组
1	K08751	I-FABP	↑	1.6936
2	K14463	MTTP	↑	1.2216
3	K08750	L-FABP	↑	1.2344
4	K14461	NPC1L1	↑	2.0869
5	K14462	ApoB	↑	1.2519
6	K08760	ApoA4	↑	1.7301
7	K14457	Mogat2	↑	1.3380

注: I-FABP, 肠脂肪酸结合蛋白; MTTP, 微粒体甘油三酸酯转移蛋白; L-FABP, 肝脂肪酸结合蛋白; NPC1L1, 尼曼匹克 C1 型类似蛋白; ApoB, 载脂蛋白 B; ApoA4, 载脂蛋白 A4; Mogat 2, 单酰甘油酰基转移酶

白,表 1 示,7 个蛋白均出现了上调(变化倍数 > 1.2),这些蛋白均参与了脂肪在小肠中的吸收过程,并且这些蛋白之间存在关联。

2.2 两组大鼠回肠组织中差异蛋白 I-FABP、NPC1L1、L-FABP 表达比较

根据文献 [5-6] 选取其中 3 个与课题研究密切相关的蛋白进行验证。表 2 示,与正常组比较,脾气虚组 I-FABP、NPC1L1 及 L-FABP 蛋白表达水平均显著上调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 2 两组大鼠回肠组织中 I-FABP、L-FABP、NPC1L1 表达比较 ($1/\beta$ -actin, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	I-FABP	L-FABP	NPC1L1
正常组	3	0.58 ± 0.07	0.37 ± 0.06	0.38 ± 0.06
脾气虚组	3	0.76 ± 0.05*	0.61 ± 0.05*	0.57 ± 0.06**

注: I-FABP, 肠脂肪酸结合蛋白; L-FABP, 肝脂肪酸结合蛋白; NPC1L1, 尼曼匹克 C1 型类似蛋白; 与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

脾主运化,为后天之本,气血生化之源。《素问·灵兰秘典论》云“脾胃者,仓廪之官,五味出焉。”《素问·经脉别论》曰“饮入于胃,游溢精气,上输于脾,脾气散精,……水精四布,五经并行。”张志聪《黄帝内经灵枢集注》云“中焦之气,蒸津液,化其精微,……溢于外则皮肉膏肥,余于内则膏肓丰满。”《中西汇通医经精义》曰“脾生脂膏”“脂脾所司”,说明脾运化水谷精微的同时,也将脂膏协同转输。脂膏,亦称为膏脂,中医认为膏脂在人体属于正常津液的一部分,早在《黄帝内经》中已明确阐述了膏脂的生成及其作用。《灵枢·五癃津液别》曰“五谷之津液和合而为膏者,内渗于骨空,补益髓髓,而下流于阴股”,说明膏脂随血而循脉上下,敷布全身以濡润滋养五脏六腑、四肢百骸,是人体生命活动的重要物质。本课题组前期研究发现脾气虚证严重影响了胆固醇的摄取、合成、代谢及转运,加重了肝脏的脂肪沉积 [7-8]。

蛋白质组学技术主要的特点是在整体水平上对蛋白质的作用模式、功能机理、调节控制以及蛋白质间的相互关系进行分析研究,涵盖了大量的生物学信息 [9],其中, iTRAQ 技术具有较好的定量效果、较高的重复性,并且能够通过同位素标记准确把握差异表达蛋白的动态变化 [10]。本研究通过 iTRAQ 技术观察脾虚证大鼠与正常大鼠蛋白表达的

差异。

脂肪酸结合蛋白 (FABP) 广泛存在于脊椎动物和非脊椎动物的细胞质中,是脂质结合蛋白超家族成员,目前发现 9 种类型的 FABP。不同类型的脂肪酸结合蛋白分布具有组织特异性,但均是对脂肪酸具有高亲和力的可溶性蛋白质 [11]。FABP 的基本功能是在细胞内进行脂肪酸短暂的存贮与运输,并广泛参与脂肪酸的转运代谢,主要是将脂肪酸从细胞膜运送到脂肪酸氧化、甘油三酯和磷脂合成的位置 [12],同时在细胞内与脂肪酸结合,促进细胞摄取脂肪酸 [13]。I-FABP 特异性地表达于小肠近端上皮吸收细胞,负责食物中长链脂肪酸的吸收、运输与代谢。食物中、短链脂肪酸以扩散方式直接进入肠道上皮,在胞浆内与 I-FABP 结合并靶向代谢场所。小肠近端除分布着 I-FABP 外,还有 L-FABP,但对长链脂肪酸的亲和力不及 I-FABP [14]。高亲和力的 I-FABP 提高了脂肪酸的水溶性,有利于脂类的吸收与运输 [15]。因此,组织分布特点及高亲和力可能赋予 I-FABP 在脂类代谢中发挥着重要的生物学作用。NPC1L1 的表达分布具有物种差异性,在啮齿类动物中的小肠高表达,目前研究认为 NPC1L1 是胆固醇吸收的关键蛋白,可能的作用机制是位于膜表面 NPC1L1 的 SSD 区域与一定量的胆固醇结合后,再通过特定作用被转运到细胞内。研究发现, NPC1L1 表达缺陷时小鼠胆固醇吸收下降量 (>70%),与降血脂药物依泽替米贝的作用水平 (降低 68% ~ 73%) 相当,给 NPC1L1 基因敲除小鼠喂食高胆固醇食物后,小鼠未出现高脂血症和动脉粥样硬化 [16]。

本研究结果发现, I-FABP、L-FABP 及 NPC1L1 蛋白在脾气虚组与正常组比较均出现了显著的上调,同时 Western blot 验证结果与之一致,说明脾气虚证大鼠小肠通过 I-FABP、L-FABP 及 NPC1L1 蛋白表达的上调促进脂肪在小肠中的吸收,使得脂肪在机体中的堆积,引发多种疾病。而在庞大的蛋白质组的结果中,仍然有很多相关通路的蛋白值得关注,有待课题组的进一步探讨研究,挖掘脾气虚证的分子生物学特点。

参考文献

- [1] 侯丽颖,季幸姝,曾常春. 从脾功能不同角度探讨脾虚病证线粒体改变意义 [J]. 北京中医药大学学报, 2011, 34(2): 92-94.
- [2] 准冬芬,孙洁,姜睿,等. 亚健康状态的中医证治规律研究 [J]. 中医药信息, 2005, 22(4): 1-2.

- [1] 张嘉皓, 朱爱松. 从脾气虚角度论动脉粥样硬化 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(2): 353-355.
- [2] 刘旭东, 刘文俊, 孙大宇, 等. 脾气虚证模型大鼠神疲乏力的客观评价 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(3): 699-701.
- [3] 买拉木古丽. 新疆维吾尔族 FABP1, FABP2 基因多态性与非酒精性脂肪肝的关系 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2016.
- [4] 刘素稳. 蓝靛果花色苷提取物调节胆固醇代谢机理研究 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2017.
- [5] 谢秀枝, 王欣, 刘丽华, 等. iTRAQ 技术及其在蛋白质组学中的应用 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2011, 27(7): 616-621.
- [6] 李敏, 姜鹏, 王淑萍, 等. 蛋白质组学在中药研究中的应用 [J]. 药学实践杂志, 2013, 31(4): 241-245.
- [7] 冷雪, 贾连群, 杨关林, 等. 化痰祛痰方对脾虚型高脂血症大鼠肝脏 SREBP2 信号通路的干预作用 [J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(3): 320-326.
- [8] 朱美林, 贾连群, 杨关林, 等. 脾虚状态对高脂血症大鼠肝脏胆固醇代谢的影响及机制研究 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(8): 2712-2716.
- [9] 姜延志, 李学伟, 杨光希. 猪 L-FABP 基因的克隆、表达

- 特征及遗传多态性研究 [J]. 遗传学报, 2006, 33(7): 598-605.
- [2] 姜延志, 李学伟. 猪脂肪细胞型结合蛋白基因 Bsm I 位点多态性与肌肉脂肪含量的相关研究 [J]. 中国畜牧杂志, 2006, 42(7): 1-3.
- [3] WANG Q, LI H, LIU S, et al. Cloning and tissue expression of chicken heart fatty acid-binding protein and intestine fatty acid-binding protein genes [J]. Anim Bio technol, 2005, 16(2): 191-201.
- [4] ZIMMERMAN AW, VANMOERKERK HT, VEERKAMP JH. Ligand specificity and conformational stability of human fatty acid-binding proteins [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2001, 33(9): 865-876.
- [5] HO SY, STORCH J. Common mechanisms of monoacylglycerol and fatty acid uptake by human intestinal Caco-2 cells [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2001, 281(4): C1106-C1117.
- [6] HUANG Y, ZHENG Y C. The probiotic lactobacillus acidophilus reduces cholesterol absorption through the down-regulation of Niemann-Pick C1-like 1 in Caco-2 cells [J]. Br J Nutr, 2010, 10(34): 473-478.

Analysis of Difference of Ileal Protein in Rats with Spleen-qi Deficiency Syndrome Based on Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation Technology

YANG Guanlin¹, SONG Nan¹, JIA Lianqun¹, WANG Deshan², SHAN Dehong², ZHANG Zhe³, MA Yixin¹, ZHANG Ni¹

(1. Provincial Key Laboratory for Chinese Medicine Zang Image Theory and Application, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, 110847; 2. Basic Medical School, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine; 3. Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the molecular biological characteristics of spleen-qi deficiency syndrome. **Methods** Twelve Sprague Dawley rats were randomized into a normal group and a spleen-qi deficiency group (n=6 in each). Rats in the spleen-qi deficiency group were made spleen-qi deficiency models by improper diet and exhaustive swimming. Ileal total protein was separated and extracted. The differential expression proteins and the expression ratio in both groups were detected and analyzed with isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) method. The expressions of differential expression proteins, such as small intestinal fatty acid binding protein (I-FABP), liver fatty acid binding protein (L-FABP) and Niemann-Pick type C1 Like 1 (NPC1L1), were verified by Western blot method. **Results** iTRAQ technology analysis showed that there were difference in fatty digestion and absorption related pathway proteins in rats between the two groups. Compared with those in the normal group, I-FABP, microsomal triglyceride transfer protein (MTTP), L-FABP, NPC1L1, apolipoprotein B (ApoB), apolipoprotein A4 (ApoA4) and monoacylglycerol acyl transferase (Mogat 2) in the spleen-qi deficiency group were up-regulated (fold change more than 1.2). It was verified by Western blot method that the change trend of differential proteins I-FABP, L-FABP and NPC1L1 was in accord with the result of proteome. **Conclusion** The expressions of I-FABP, MTTP, L-FABP, NPC1L1, ApoB, ApoA4 and MGAT7 proteins in ileal tissue of rats with spleen-qi deficiency syndrome are up-regulated.

Keywords spleen-qi deficiency syndrome; ileum; proteomics; fatty acid

(收稿日期: 2017-02-08; 修回日期: 2017-07-14)

编辑: 王利菊