

实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.21.015

金匱肾气丸对肾阳虚证模型大鼠股骨髁松质骨差异蛋白质表达的影响

黄露露¹, 朱亚菊¹, 赖兴泉¹, 李保林², 王建辉¹, 蔡唐彦¹,
张艺强¹, 滕方舟², 詹正烜¹, 张子怡¹, 苏友新^{1,3*}

(1. 福建中医药大学康复医学院, 福建省福州市闽侯县上街镇邱阳路 1 号, 350122; 2. 福建中医药大学骨伤学院; 3. 福建卫生职业技术学院)

摘要 目的 探讨金匱肾气丸治疗肾阳虚证的可能作用机制。方法 60 只 Wistar 大鼠随机分为正常组 20 只和造模组 40 只, 将造模成功的 38 只大鼠再随机分为中药组和模型组各 19 只, 中药组大鼠给予金匱肾气丸 8.44 g/(kg·d) 灌胃, 正常组和模型组大鼠给予生理盐水 3 ml 灌胃, 每日 1 次, 连续 3 周。分别取正常组、模型组和中药组大鼠的股骨髁松质骨, 进行总蛋白的提取与制备; 采用蛋白质双向凝胶电泳技术展示各组大鼠股骨髁松质骨蛋白质组图谱, 应用 PDQuest 8.0 软件分析各组间差异表达蛋白点, 采用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 初步鉴定差异表达蛋白点。结果 各组大鼠股骨髁松质骨双向凝胶电泳图谱的蛋白点数目均为 552 个; 与正常组比较, 模型组有 23 个差异表达的蛋白质; 与模型组比较, 中药组有 16 个差异表达的蛋白质。给予金匱肾气丸溶液后, 肾阳虚模型大鼠股骨髁松质骨中原来表达上调的磷酸甘油酸激酶 1 及表达下调的 14-3-3 ζ 蛋白、网钙蛋白 3、原肌球蛋白异构体 2 α -3 链、原肌球蛋白 α -4 链、原肌球蛋白异构体 α -1 链、40S 核糖体蛋白 sa、半乳糖凝集素 1、线粒体 ATP 合成酶亚基 α 、膜联蛋白 A1、GDP 解离抑制因子 1、I 型胶原 α -1 链、LOC683667 蛋白、膜联蛋白 A5、过氧化氧化还原蛋白 2 和蛋白质二硫键异构酶 A3 均出现表达趋势的反向调整。结论 金匱肾气丸对肾阳虚证的调节可能涉及股骨髁松质骨结构构成、物质转运、能量代谢和细胞增殖与凋亡等方面。

关键词 金匱肾气丸; 肾阳虚证; 股骨; 松质骨; 差异蛋白质

金匱肾气丸是《金匱要略》中温补肾阳的名方, 与肾阳虚证是方证相应的关系, 但对金匱肾气丸与肾阳虚证方证相应机理的研究较少, 金匱肾气丸改善肾阳虚证候的机理尚未完全明确。中医学认为, 肾主骨, 骨的生理、病理变化与肾关系密切, 肾强则骨强, 肾虚则骨病^[1-3]。蛋白质是生命征象的直接体现者, 其在疾病发生的不同组织、不同发展阶段的表达也有所不同, 骨组织结构与功能状态差别最终体现在其内在不同功能蛋白质的表达状态, 通过研究蛋白质表达的变化, 可以更深入地了解疾病发生、发展机理。我们前期已经报道了金匱肾气丸对肾阳虚证模型大鼠股骨皮质骨差异蛋白质

表达的影响^[4]。本研究继续从股骨髁松质骨差异蛋白质表达角度探讨金匱肾气丸干预肾阳虚证的内在机制。

1 材料和方法

1.1 动物

3 月龄 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 60 只, 体质量 (210 $\pm$ 20) g, 由上海斯莱克实验动物有限公司提供, 实验动物许可证号: SCXK (沪) 2012-0002。实验获得福建中医药大学动物保护委员会批准, 批件号: 福中医 [2017] 伦理审字第 (019) 号。

1.2 药物

金匱肾气丸组成: 生地黄 24 g, 山药 12 g, 山茱萸 12 g, 泽泻 9 g, 牡丹皮 9 g, 茯苓 9 g, 桂枝 3 g, 炮附片 3 g, 以上药材均购自福建中医药大学附属国医堂门诊部。冷水浸泡上述药物 30 min 后,

基金项目: 国家自然科学基金 (81273888)

* 通讯作者: suyouxin777@hotmail.com

煎煮 2 次, 每次 30 min, 合并 2 次药液, 然后浓缩至含生药 1 g/ml。氢化可的松注射液由福州海王福药制药有限公司生产, 批号: 1303051。

1.3 主要试剂和仪器

二硫苏糖醇 (DTT)、3- [(3-胆固醇氨基丙基) 二甲基氨基] -4-丙磺酸 (CHAPS)、ReadyStrip IEF 缓冲液 (Bio-lyte)、矿物油、碘乙酰胺 (IAA)、分离胶缓冲液 (Tris Hcl)、丙烯酰胺预混液 (30% AcyBis)、过硫酸铵 (AP)、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、十二烷基磺酸钠 (SDS) 及 ReadyPrep 2-D Clean up 试剂盒, 均为美国 Bio-Rad 公司产品, 批号分别为: 161-0601、161-0460、163-2093、163-2129、163-2109、161-0798、161-0154、161-0700、161-0716、161-0301、163-2130; Dnase、Rnase 酶 (德国 Thermo 公司, 批号: 18047019、8080119)。

低温高速离心机 (型号: D-37520, 德国 Thermo 公司); 等电聚焦仪 (型号: 10165-4000)、电泳仪 (型号: 164-5070), 均为美国 Bio-Rad 公司产品; 扫描仪 (型号: PowerLook 2100XL, 台湾 UMAX 公司); 酶联免疫检测仪 (型号: M200 Pro, 瑞士 Tecan 公司); Milli-Q 超纯水仪 (型号: Heal Force SMART-N, 香港力康公司); 质谱仪 (型号: Autoflex speed, 美国 BRUKER 公司)。

1.4 动物模型制备、分组及给药

60 只 Wistar 大鼠适应性喂养 7 天后, 采用随机数字表法分为正常组 20 只和造模组 40 只。造模组大鼠予臀部肌肉注射氢化可的松注射液 (2.5 mg/100 g), 每日 1 次, 连续 15 天, 建立肾虚大鼠模型^[4]。观察各组大鼠活动、反应、弓背、毛色及饮食、饮水等一般情况, 第 15 天测量大鼠体重、肛温; 检测血清环磷酸腺苷 (cAMP)、环磷酸鸟苷 (cGMP) 和 cAMP/cGMP 比值进行模型鉴定^[5-6]。若造模组大鼠出现爪甲与耳廓颜色变淡、体毛枯疏并失去光泽、活动减少、反应迟钝、弓背蜷缩、喜扎堆等畏寒怕冷表现, 食量及饮水量减少, 体温及体质量显著下降; 与正常组比较, cAMP 含量下降, cGMP 含量升高, cAMP/cGMP 比值降低 ($P < 0.05$), 即为造模成功^[5-6]。

采用随机数字表法将造模成功的 38 只大鼠分为中药组、模型组, 每组 19 只。中药组给予金匱肾气丸 8.44 g/(kg · d) 灌胃, 给药剂量按人与动物千克体质量折算的等效剂量换算^[7], 每日上午灌胃 1 次, 连续给药 3 周。正常组、模型组大鼠予生

理盐水 3 ml 灌胃, 每日 1 次, 共 3 周。

1.5 松质骨总蛋白提取与制备

干预结束后, 放血处死大鼠, 在冰上迅速取下其股骨干, 并用骨剪剪开, 用超纯水将骨髓冲洗干净, 将股骨髁松质骨放入 5 ml 的 Eppendorf 管中, 标记后置于 -80℃ 冰箱中保存备用。取松质骨样本 1g, 放在盛有液氮的研钵里研磨粉碎后转入 Eppendorf 管中, 并加入 1.8 ml 样品裂解液, 于 4℃ 冰箱中裂解提取蛋白质 4 h; 然后置于低温高速离心机以 100000 r/min 离心 30 min, 吸取上清液; 每 1 ml 上清液加入 2 μ l Dnase 和 2 μ l Rnase, 冰上放置 15 min, 4℃ 100000 r/min 离心 30 min, 吸取上清液; 按 2-D Clean-Up 试剂盒说明书提纯浓缩蛋白; Bradford 法^[8]测定蛋白浓度, 并计算蛋白上样体积。

1.6 双向凝胶电泳

根据相关文献^[9]进行操作。第一向为 IEF 电泳, 等电聚焦完成后进行两次胶条的平衡及润洗, 然后进行第二向 SDS-PAGE 电泳。

1.7 凝胶蛋白点染色及差异表达蛋白点鉴定

电泳结束后, 将 2-DE 凝胶进行考马斯亮蓝染色。再经多次脱色至蛋白点明显且背景干净时, 用扫描仪获取图谱。应用 PDQuest 8.0 软件进行凝胶图谱蛋白点检测, 运用分析组管理器对 3 组图谱进行比较分析, 建立体积比较变化达 1.5 倍以上差异的集合, 并设置 PDQuest 8.0 软件里 t 检验达 99% (t 检验达 99% 为其设定的检测敏感度) 为有统计学意义^[10-11], 进行蛋白点自动检测, 得出蛋白上调或者下调达 1.5 倍以上蛋白点的序号, 再经人工筛选, 选择变化明显且清晰的蛋白点。

1.8 质谱分析样品制备

将差异蛋白点手动切胶, 酶解, 除盐点样后进行基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 技术定性各组间松质骨差异表达蛋白, 并通过生物信息学检索对差异表达蛋白的功能进行初步分析。

1.9 蛋白质鉴定及相关功能的生物信息学检索

使用 MASCOT (V3.2, Matrix Science, London, U. K) 搜库软件进行检索, MASCOT 蛋白质显著性检验, $P < 0.05$ 为可靠的鉴定结果。在 Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) 及 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 蛋白质数据库中查找质谱鉴定得到的已知蛋白的相关信息, 包括蛋白名称、主要生物功能等。

1.10 统计学方法

应用 SPSS 20.0 统计软件分析数据, 计量资料符合正态分布时以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 不符合正态分布时采用秩和检验, 取 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况

造模结束对大鼠进行眼眶静脉丛采血时, 由于乙醚麻醉及采血操作等因素, 导致正常组中 1 只大鼠及造模组中 2 只大鼠死亡, 故正常组余 19 只, 造模组余 38 只。与正常组相比, 造模组大鼠出现爪甲及耳廓颜色变淡、活动减少、弓背蜷缩、喜扎堆等畏寒怕冷表现。造模结束后 3 周内模型组 2 只大鼠腹泻严重且进食量少而导致死亡, 故模型组余 17 只, 中药组余 19 只; 与正常组相比, 模型组大

鼠仍存在肾阳虚证表现, 中药组大鼠爪甲与耳廓颜色介于正常组与模型组之间, 活动、反应、弓背及畏寒怕冷表现较模型组大鼠有所改善。

2.2 各组大鼠肛温、体质量及血清 cAMP、cGMP、cAMP/cGMP 比较

表 1 示, 与正常组比较, 造模组大鼠肛温、体质量、血清 cAMP 含量、cAMP/cGMP 值下降, cGMP 含量升高 ($P < 0.01$)。表 2 示, 干预后与正常组比较, 模型组和中药组大鼠肛温、体质量、血清 cAMP 含量、cAMP/cGMP 值下降, 血清 cGMP 含量升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 中药组大鼠肛温、体质量、血清 cAMP 含量、cAMP/cGMP 显著升高, 血清 cGMP 含量下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.3 凝胶蛋白点差异的辨识与分析

通过对正常组与模型组双向电泳凝胶图谱比较

表 1 两组大鼠造模后肛温、体质量及血清 cAMP、cGMP、cAMP/cGMP 比较 ($\bar{x} \pm s$)

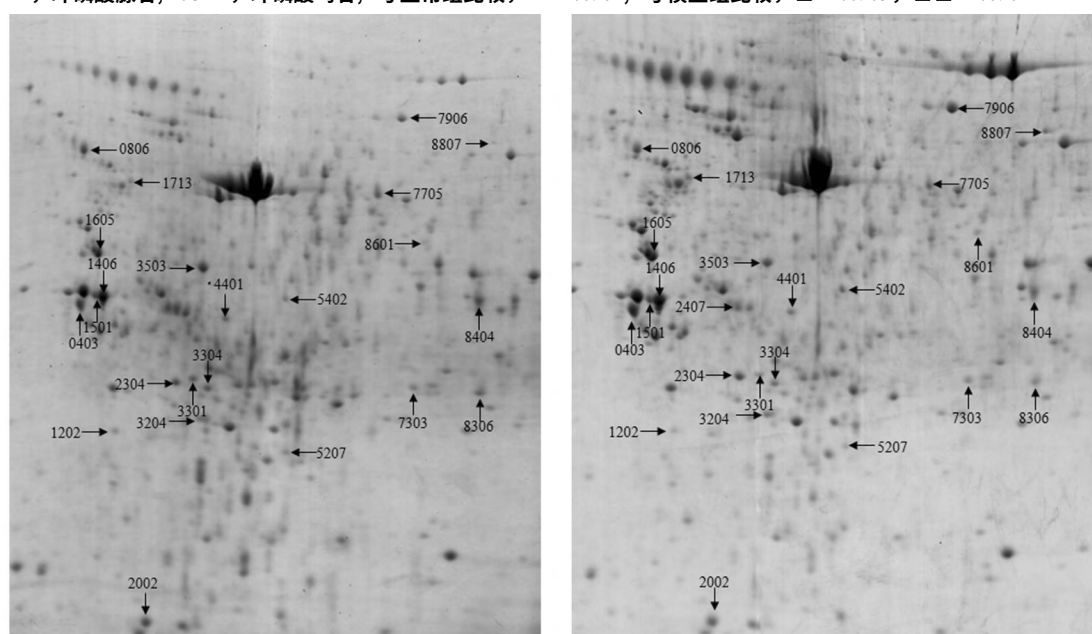
组别	鼠数	肛温 ($^{\circ}\text{C}$)	体质量 (g)	cAMP (pmol/ml)	cGMP (pmol/ml)	cAMP/cGMP
正常组	19	38.13 $\pm$ 0.20	315.35 $\pm$ 12.25	35.98 $\pm$ 5.54	8.49 $\pm$ 3.68	4.92 $\pm$ 1.84
造模组	38	37.01 $\pm$ 0.27*	211.61 $\pm$ 22.14*	23.75 $\pm$ 4.44*	26.59 $\pm$ 3.73*	0.91 $\pm$ 0.20*

注: cAMP, 环磷酸腺苷; cGMP, 环磷酸鸟苷; 与正常组比较, * $P < 0.01$

表 2 各组大鼠干预后肛温、体质量及血清 cAMP、cGMP、cAMP/cGMP 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	肛温 ($^{\circ}\text{C}$)	体质量 (g)	cAMP (pmol/ml)	cGMP (pmol/ml)	cAMP/cGMP
正常组	19	38.03 $\pm$ 0.26	326.79 $\pm$ 12.61	36.48 $\pm$ 3.98	8.15 $\pm$ 0.89	4.55 $\pm$ 0.61
模型组	17	36.93 $\pm$ 0.22*	223.29 $\pm$ 26.87*	23.63 $\pm$ 2.94*	25.83 $\pm$ 2.99*	0.93 $\pm$ 0.18*
中药组	19	37.81 $\pm$ 0.31* Δ	275.32 $\pm$ 19.08* $\Delta\Delta$	29.17 $\pm$ 6.32* $\Delta\Delta$	14.16 $\pm$ 3.78* $\Delta\Delta$	2.20 $\pm$ 0.60* $\Delta\Delta$

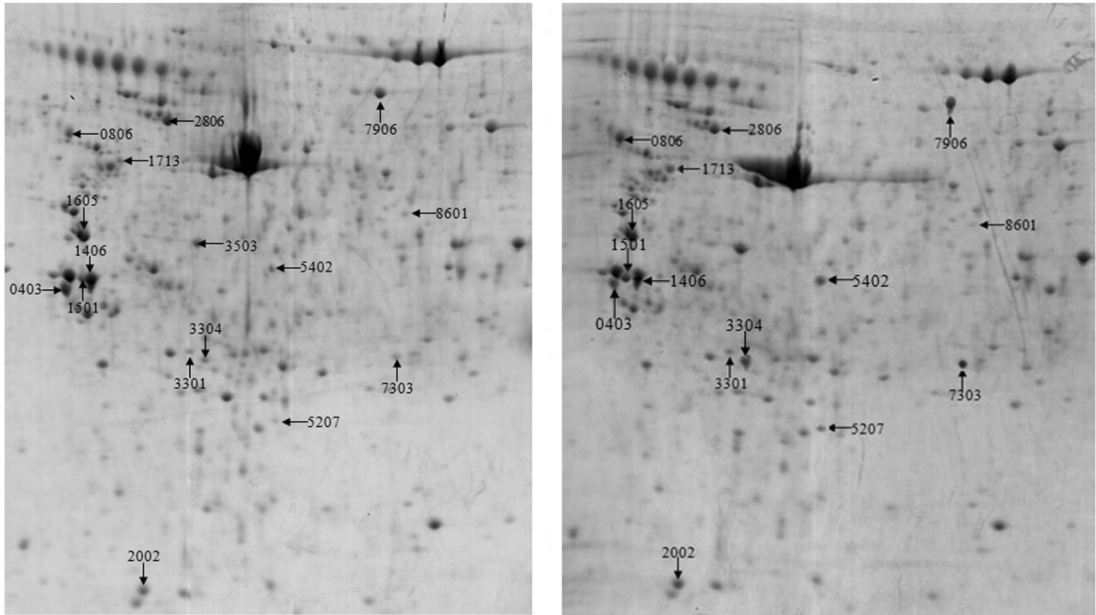
注: cAMP, 环磷酸腺苷; cGMP, 环磷酸鸟苷; 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$



正常组

模型组

图 1 正常组与模型组大鼠股骨髁松质骨差异蛋白点标识



模型组
中药组
图 2 模型组与中药组大鼠股骨髁松质骨差异蛋白点标识

分析,检测到 23 个明显差异表达蛋白质点,以正常组为参考,其中模型组点 3204、8601、8807 表达上调,点 0403、0806、1202、1406、1501、1605、1713、2002、2304、3301、3304、3503、4401、5207、5402、7303、7705、7906、8306、8404 表达下调,见图 1。对模型组与中药组双向电泳凝胶图谱比较分析,检测到 16 个明显差异表达蛋白质点,以模型组为参考,其中中药组点 0403、0806、1406、1501、1605、1713、2002、2806、3301、3304、3503、5207、5402、7303、7906 表达上调,点 8601 表达下调,见图 2。

2.4 差异表达蛋白的质谱鉴定及生物信息学检索结果

将正常组、模型组与中药组共 24 个差异蛋白进行质谱鉴定后,在 Uniprot 及 NCBI 蛋白质数据库中进行搜索,得到蛋白名称、主要生物功能(见表 4)。

3 讨论

本研究采用大鼠肾肌注射氢化可的松注射液,成功复制出稳定的肾阳虚大鼠模型,并且经金匱肾气丸干预后模型大鼠肛温、体质量、血清环核苷酸系统得到不同程度的改善。

金匱肾气丸干预后,肾阳虚大鼠股骨髁松质骨差异蛋白中原来表达上调的磷酸甘油酸激酶 1 及表达下调的 14-3-3 ζ 蛋白、网钙蛋白 3、原肌球蛋白异构体 2 α -3 链、原肌球蛋白 α -4 链、原肌球蛋白

表 4 24 个差异蛋白质谱鉴定及生物信息学检索结果

编号	蛋白名称	主要生物功能
0403	14-3-3 ζ 蛋白	参与细胞凋亡及细胞信号通路调节
0806	网钙蛋白 3	参与协助细胞黏附、调节钙离子的代谢
1202	蛋白酶体 β 亚基 9 型	调控特定蛋白质和除去错误折叠的蛋白质
1406	原肌球蛋白异构体 2 α -3 链	细胞骨架蛋白
1501	原肌球蛋白 α -4	参与细胞骨架构成
1605	原肌球蛋白异构体 α -1 链	参与细胞骨架构成
1713	40s 核糖体蛋白 sa	在细胞黏附到基底膜和随之激活的信号通路中发挥作用
2002	半乳糖凝集素 1	参与细胞黏附、细胞凋亡、炎症反应
2304	GDP 解离抑制因子 β	调控 GDP 解离活性
2806	线粒体 ATP 合酶亚基	能量代谢的关键酶
3301	膜联蛋白 A1	参与钙/磷脂结合,促进膜融合及胞吐
3204	α -肌动蛋白 1	构成细胞骨架,参与细胞运动
3304	GDP 解离抑制因子 1	调控 GDP 解离活性
3503	I 型胶原 α -1 链	构成细胞外基质结构,参与胶原的合成
4401	氯离子通道蛋白 1	参与氯通道细胞间跨膜运输,维持细胞膜的稳定性
5207	LOC683667 蛋白	参与钙离子的转运、DNA 代谢
5402	膜联蛋白 A5	调节 Ca^{2+} 离子转运及细胞凋亡
7303	过氧化氢还原蛋白 2	参与细胞氧化还原及细胞凋亡
7705	丙酮酸激酶同工酶	催化糖酵解,参与 ATP 合成
7906	蛋白质二硫键异构酶 A3	催化蛋白中二硫键氧化还原
8306	Rhoc 蛋白	参与细胞信号传导、增殖和肌动蛋白骨架的调节
8404	DJ-1 蛋白	调节细胞转化及抗氧化反应
8601	磷酸甘油酸激酶 1	参与糖酵解的关键酶
8807	乙醛脱氢酶 2	参与酒精代谢的关键酶,抑制细胞凋亡

异构体 α -1 链、40s 核糖体蛋白 sa、线粒体 ATP 合酶亚基 α 、半乳糖凝集素 1、膜联蛋白 A1、GDP 解离抑制因子 1、I 型胶原 α -1 链、LOC683667 蛋白、膜联蛋白 A5、过氧化氧化还原蛋白 2 和蛋白质二硫键异构酶 A3 16 个蛋白均出现表达趋势的反向调整,说明以上这些差异蛋白与肾阳虚证有着紧密联系,提示金匱肾气丸治疗肾阳虚证可能与调整这些蛋白的表达有关。所以,我们对经中药干预后蛋白表达趋势出现反向调整的 16 个差异蛋白进行分析。

通过文献梳理,按照功能分类,这 16 个差异蛋白归为以下四类: 1) 细胞骨架类 4 个: I 型胶原 α -1 链、原肌球蛋白异构体 2 α -3 链、原肌球蛋白 α -4 链、原肌球蛋白异构体 α -1 链; 2) 物质转运类 1 个: LOC683667 蛋白; 3) 细胞增殖、凋亡调节类 8 个: 14-3-3 ζ 蛋白、网钙蛋白 3、40s 核糖体蛋白 sa、半乳糖凝集素 1、膜联蛋白 A1、GDP 解离抑制因子 1、膜联蛋白 A5、过氧化氧化还原蛋白 2; 4) 化学反应催化类 3 个: 线粒体 ATP 合酶亚基 α 、磷酸甘油酸激酶 1、蛋白质二硫键异构酶 A3。通过对上述 16 个与肾阳虚证存在着密切联系的蛋白进行分类,我们分析金匱肾气丸对肾阳虚证的调节可能涉及股骨髁松质骨结构构成、物质转运、能量代谢和细胞增殖、凋亡等方面。现每一类挑选一个差异蛋白详细探讨其与金匱肾气丸干预效应之间的联系。

I 型胶原 α -1 链是骨基质最主要成分,其表达的高低在一定程度上可以反映 I 型胶原蛋白合成的多少^[2]。研究表明, I 型胶原与骨组织的功能状态有着密切的关联^[13-14]。本研究结果显示, I 型胶原 α -1 链在模型组股骨髁松质骨中表达下调,而在中药组中表达上调,提示肾阳虚证骨组织 I 型胶原蛋白合成低下,金匱肾气丸对肾阳虚证骨组织的干预作用可能与调节 I 型胶原 α -1 链表达有关,通过促进 I 型胶原蛋白合成,改善对骨的生物力学特性,从而纠正肾阳虚证骨组织一系列异常表现。

LOC683667 蛋白作为转运类蛋白具有参与钙离子转运的作用。骨组织中破骨细胞骨吸收过程中钙基质被降解后以离子形式存留于吸收腔隙中,需要及时转运到细胞间液中才能保证破骨细胞的骨吸收不断进行,而钙离子通道在参与此过程起着关键作用^[15]。我们推测金匱肾气丸对肾阳虚证骨组织钙离子的代谢调节作用可能与纠正这类蛋白的表达有关。

GDP 解离抑制因子 1 为细胞增殖、凋亡调节

类蛋白,对启动细胞凋亡起关键作用^[16]。其表达下调不仅可诱导细胞凋亡^[17],同时还参与调节能量代谢^[18]。有研究表明,细胞能量代谢异常可能是肾阳虚证出现虚寒的主要原因之一^[19]。金匱肾气丸对肾阳虚证肛温的调节作用可能与纠正这类蛋白的表达有关。

蛋白质二硫键异构酶 A3 是内质网应激信号通道蛋白,与机体免疫密切相关^[20]。蛋白质折叠是指蛋白质可凭借相互作用在细胞环境下自行组合,是决定生命健康与否的关键步骤之一^[21]。蛋白质二硫键异构酶 A3 还具有清除错误折叠的蛋白质,抵御内质网诱使细胞趋亡的功能^[22]。经金匱肾气丸干预后蛋白质二硫键异构酶 A3 在股骨髁松质骨中表达上调,表明金匱肾气丸对肾阳虚证的干预作用可能与调节其表达从而使机体提高清除错误折叠蛋白质及抵御内质网诱使细胞趋亡的能力。

本研究仅对部分差异蛋白的功能进行了分析,我们推测同类别差异蛋白也与肾阳虚证候群的发生密切相关,是金匱肾气丸治疗肾阳虚证的微观物质基础,有待于今后进一步研究。

参考文献

- [1] 沈自尹. “肾的研究”通过“与时俱进”而不断进取 [J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(8): 946-949.
- [2] 王国栋, 莫文. 308 例骨密度结果及与“肾虚、气虚、血瘀证”相关性的分析 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2011, 17(8): 720-722.
- [3] 郑乃熙, 詹正烜, 张英杰, 等. 金匱肾气丸对肾阳虚证模型大鼠股骨皮质骨差异蛋白质表达的影响 [J]. 康复学报, 2017, 27(1): 25-29.
- [4] 苟小军, 韩宝侠, 王朝廷, 等. 肾阳虚证造模方法考察 [J]. 吉林中医药, 2009, 29(9): 814-815.
- [5] 杜江, 李楠, 王和鸣. 肾虚模型造模方法及相关指标 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(50): 9433-9436.
- [6] 张子怡, 陈宝军, 张英杰, 等. 肾阳虚、肾阴虚证大鼠模型的建立与稳定性观察 [J]. 福建中医药, 2015, 46(1): 51-54.
- [7] 陈奇. 中药药理研究方法 [M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 31.
- [8] ANTHARAVALLY BS, MALLIA KA, RANGARAJ P, et al. Quantitation of proteins using a dye-metal-based colorimetric protein assay [J]. Anal Biochem, 2009, 385(2): 342-345.
- [9] STARITA-GERIBALDI M. Selection of pH ranges in 2DE [J]. Methods Mol Biol, 2009, 519: 31-45. doi: 10.1007/978-1-59745-281-6_3.
- [10] NABESHI H, OIKAWA S, INOUE S, et al. Proteomic

analysis for protein carbonyl as an indicator of oxidative damage in senescence-accelerated mice [1]. Free Radic Res, 2006, 40(11) : 1173-1181.

- [1] SANTOS PM, BENNDORF D, SÁ-CORREIA I. Insights into *Pseudomonas putida* KT2440 response to phenol-induced stress by quantitative proteomics [J]. Proteomics, 2004, 4(9) : 2640-2652.
- [2] 范陈豪, 赵晶晶, 谢海宝. I 型胶原 $\alpha 1$ 基因多态性与原发性骨质疏松症 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2001, 7(3) : 267-270.
- [3] 严海燕, 曾华, 罗玲, 等. 三种骨代谢标志物在诊断及鉴别骨疾病中的应用 [J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2012, 27(9) : 859-860.
- [4] 刘敬, 许增禄, 徐雁英, 等. 绝经后骨质疏松症病人 I 型胶原的变化 [J]. 解剖学报, 2003, 32(5) : 491-495.
- [5] HOENDEROP JG, MULLER D, SUZUKI M, et al. Epithelial calcium channel: gate-keeper of active calcium re-absorption [J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2000, 9(4) : 335-340.
- [6] HALL A, BISHOP A. Rho GTPases and actin cytoskeleton [J]. Science, 1998, 279(3) : 509-514.
- [7] MA L, XU G, SOTNIKOVA A, et al. Loss of expression

of LyGDI (ARHGDI1B), a rho GDP-dissociation inhibitor, in Hodgkin lymphoma [J]. Br J Haematol, 2007, 139(2) : 217-223.

- [8] WANG J, WANG J, ZHANG Y, et al. Proteomic analysis of adrenocorticotrophic hormone treatment of an infantile spasm model induced by N-Methyl-D-Aspartic acid and prenatal stress [J]. PloS One, 2012, 7(9) : e45347.
- [9] 卢德赵, 沃兴德, 沃立科, 等. 甲状腺切除的肾阳虚大鼠肝线粒体蛋白质组的研究 [J]. 中医药学报, 2008, 36(4) : 11-15.
- [10] 杨拴盈, 田应选, 南岩东, 等. 人肺腺癌细胞系 A549 细胞双向电泳-飞行时间质谱研究 [J]. 西安交通大学学报(医学版), 2007, 28(4) : 422-426.
- [11] 温玉琴. 研究发现蛋白质可通过“展开”来预防机能失调及疾病 [J]. 广东药科大学学报, 2017, 33(5) : 676.
- [12] CORAZZARI M, LOVAT PE, ARMSTRONG JL, et al. Targeting homeostatic mechanisms of endoplasmic reticulum stress to increase susceptibility of cancer cells to fenretinide-induced apoptosis: the role of stress proteins ERdj5 and ERp57 [J]. Br J Cancer, 2007, 96(7) : 1062-1071.

Effects of *Jinkui Shenqi Pill* (金匮肾气丸) on Protein Expression in Femoral Cancellous Bone Tissues of Rats with Kidney-yang Deficiency Syndrome

HUANG Lulu¹, ZHU Yaju¹, LAI Xingquan¹, LI Baolin², Wang Jianhui¹, CAI Tangyan¹, ZHANG Yiqiang¹, TENG Fangzhou², ZHAN Zhengxuan¹, ZHANG Ziyi¹, SU Youxin^{1,3}

(1. Rehabilitation Medicine College, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, 350122; 2. Orthopedics College, Fujian University Traditional Chinese Medicine; 3. Fujian Health College)

ABSTRACT Objective To study the mechanism of *Jinkui Shenqi Pills* (金匮肾气丸) on kidney-yang deficiency. **Methods** A total of 60 male Wistar rats were randomly divided into 20 rats in a normal group and 40 in experimental group. Thirty-eight successfully modeling rats were randomly divided into traditional Chinese medicine group and model group, with 19 rats in each group. *Jinkui Shenqi Pills* 8.44 g/(kg · d) was intragastrically given to the traditional Chinese medicine group, and 3 ml normal saline was given to the normal group and the model group, once a day for 3 weeks consecutively. Femoral cancellous bone tissues of each group were obtained to extract and prepare the total protein. Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) technique was used to display the cancellous bone proteome map of each group. PDQuest 8.0 software was used to analyze the differentially expressed protein spots in each group. The matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) was used to initially identify differentially expressed protein spots. **Results** There were 552 discernible proteins spots in each rat femoral cancellous bone total protein 2-DE gel map of 3 groups. Compared with the normal group, the model group had 23 differentially expressed proteins. Compared with the model group, traditional Chinese medicine group had 16 differentially expressed proteins. After treatment with *Jinkui Shenqi Pill*, the expression of up-regulated phosphoglycerate kinase 1 and the down-regulated 14-3-3 ζ protein, reticulocalbin 3, myosin promyosin isomer 2 α -3 chain, myosin α -4 chain, myosin isoform α -1 chain, 40s ribosomal protein sa, galactoside agglutinin 1, annexin A1, GDP dissociation inhibition factor 1, type I collagen α -1 chain, LOC683667 protein, annexin A5, peroxy redox protein 2 and protein disulfide isomerase A3 all present reserve trend adjustment. **Conclusion** The regulation of *Jinkui Shenqi Pills* on kidney-yang deficiency probably concern with the structure of femoral cancellous bone tissues, material transport, energy metabolism, proliferation and apoptosis of cells, etc.

Keywords *Jinkui Shenqi Pill*; kidney-yang deficiency syndrome; femur; cancellous bone; differential proteins

(收稿日期: 2017-12-02; 修回日期: 2018-05-20)

编辑: 王利芬