

· 方药研究 ·

四物汤对血虚证模型大鼠肝线粒体蛋白质组的影响

龚文君¹ 沃兴德² 卢德赵² 丁慧登² 李毅²

(1. 浙江省桐庐县第一人民医院, 桐庐县桐君街道学圣路, 311500; 2. 浙江中医药大学)

[摘要] 目的 探讨四物汤治疗血虚证的机理。方法 Wistar 大鼠随机分为模型组、治疗组、正常组各 6 只。模型组和治疗组大鼠在第 1、4、7d 皮下注射 2% 乙酰苯肼生理盐水注射液, 第 4d 起模型组生理盐水灌胃, 治疗组给予四物汤灌胃, 正常组给予生理盐水, 连用 7d 后, 检测外周血象、肝脾湿重; 提取肝脏线粒体蛋白质, 用双向电泳等蛋白质组学技术测定大鼠肝线粒体中有影响的蛋白质。结果 模型组大鼠出现萎靡、苍白等血虚症状, 肝脾明显肿大, 红细胞数和血红蛋白量明显降低, 白细胞、网织红细胞计数明显升高 ($P < 0.01$); 四物汤治疗后外观较快恢复, 红细胞、血红蛋白、网织红细胞数较上升 ($P < 0.01$); 模型大鼠肝线粒体蛋白质与正常相比有 14 个能量代谢相关蛋白质的水平发生改变, 四物汤可使这些改变的蛋白质水平有所恢复。结论 四物汤可以调节肝线粒体内一些酶和伴侣分子, 清除自由基和过氧化物, 稳定线粒体结构, 保护线粒体功能; 改善糖、脂类、蛋白质代谢, 从蛋白质分子水平改善血虚动物的虚损状况。

[关键词] 四物汤; 血虚证; 肝线粒体; 蛋白质组; 中医药疗法

Effect of Siwu Decoction on Liver Mitochondrial Proteome of Blood Deficiency Model Rats

GONG Wenjun¹, WO Xingde², LU Dezha², DING Huideng², LI Yi²

(1. The First People's Hospital of Tonglu County, Zhejiang 311500; 2. Zhejiang University of Chinese Medicine)

ABSTRACT **Objective** To observe the mechanism of Siwu Decoction (Decoction of four ingredients) on blood deficiency syndrome. **Methods** Wistar rats were randomized into 3 groups: model group, treatment group, and normal group, 6 ones in each. Rats of the model group and the treatment group were injected 2% acetylphenylhydrazine (APH) saline subcutaneously on the first, fourth and seventh day. From the fourth day, the model group was treated with saline by gavage, the treatment group was treated with Siwu Decoction by gavage, and the normal group was treated with saline for 7 days in succession. Then the amount of peripheral blood cells, wet weight of liver and spleen were detected. Liver mitochondrial proteome of all rats were extracted. Proteomic technology was used to measure the regulated proteins by Siwu Decoction. **Results** In the model group, the rats had decreased general status significantly such as pale, enlarged liver and spleen, lowered red blood cells (RBC) and hemoglobin (HGB), increased white blood cells (WBC) and reticulocyte (RCT) ($P < 0.01$), and these changes were recovered quickly after treatment with Siwu Decoction, the 14 changed proteins related to energy metabolism were improved to a certain degree after treatment. **Conclusion** Siwu Decoction can improve the blood deficiency status at molecular level through regulating liver mitochondria, removing the free radicals and peroxides, stabilizing the mitochondrial structure, preserving mitochondrial functions, and improving carbohydrate, fat and protein metabolism.

Key Words Siwu Decoction (Decoction of four ingredients); Blood deficiency syndrome; Liver mitochondria; Proteome; TCM therapy

四物汤是治疗血虚证的中医名方。研究显示, 四物汤从外周血、骨髓蛋白质的表达等方面改善血虚患者的造血功能^[1]。化学物质中毒是血虚证的一种常见原因, 乙酰苯肼 (APH) 诱导血虚模型在血虚证型研究中具有代表性^[2]。血虚证机体功能低下, 能量代谢障碍。肝脏是机体物质代谢的重要器官, 线粒体是细胞进行能量代谢的重要场所。线粒体的蛋白质主要与氧化磷酸化的三羧酸循环和氧化呼吸链有关。故选用肝细胞线粒体为研究对象, 用蛋白质组学技术从分子水平探讨四物汤补益作用的机制。

1 材料与方法

1.1 药物

四物汤按《太平惠民和剂局方》的折算剂量称取熟地黄 15g、当归 10g、白芍 10g、川芎 6g。大鼠四物汤剂量参考实验方法学等效剂量^[3]。按照《中华人民共和国药典》附录中方法制成四物汤水煎液, 分装后 4℃ 冰箱保存备用。

1.2 试剂与仪器

乙酰苯肼购自国药集团化学试剂有限公司, 生产批号 F20050927。丙烯酰胺 (批号 161-0107)、甲叉双丙烯酰胺 (批号 161-0201)、尿素 (批号 161-0731)、甘氨酸 (批号 161-0724)、碘乙酰胺 (批号 161-2109) 等均购

自 Bio-Rad Laboratories, 固相 pH 干胶条 (IPG DryStrip, pH3-10) 购自 GE Healthcare 生物科学部, 批号 17-6002-44。Ettan™ IPGphor™ 等电聚焦电泳仪, Ettan™ DALTSix 垂直板电泳仪, Image Master 2D Platinum-6.0 均为 Amersham 公司产品。P80MX 超速冷冻离心机为日本日立公司产品。4800 基质辅助激光解析—飞行时间质谱仪购自 Applied Biosystems。

1.3 动物与模型制备

6~8 周龄 Wistar 雌性大鼠, 体重 180~220g, 由浙江中医药大学实验动物研究中心提供, 许可证号 SCXK(沪)2003-0003。按随机数字表法分 3 组, 每组 6 只。血虚证模型组大鼠在第 1、4、7d 皮下注射 2% 乙酰苯肼生理盐水注射液^[2], 第 1d 10ml/kg 体重, 第 4、7d 剂量减半, 第 4d 起给予生理盐水灌胃。治疗组大鼠同前造模, 于第 4d 起给予四物汤灌胃, 连用 7d。正常组用等剂量生理盐水连续灌胃 7d。实验结束, 检测外周血象, 断头处死大鼠, 称肝、脾湿重。

1.4 肝线粒体蛋白质提取

取肝脏用 MSHE 缓冲液冲洗, 4℃ 匀浆。匀浆液 4℃ 2300r/min 离心 5min 后取上清再 9600r/min 离心 10min, 取沉淀重悬于 5ml MSHE 及 30% Percoll 的纯化液上, 36900r/min, 8℃ 离心 30min。收集密度在 1.052~1.075g/ml 之间的悬液, 加 40ml MSHE, 4℃, 7500r/min 离心 10min 去除 Percoll, 取沉淀先后用 150mmol/L 氯化钾溶液 30ml 和 MSHE40ml 各洗涤两次后 7500r/min, 4℃ 离心 10min。再取沉淀加入裂解液, 置冰上超声并孵育 2h 后, 10440r/min 离心 30min, 取上清用 2-D 试剂盒测定蛋白质浓度, 分装置 -80℃ 保存。

1.5 双向电泳、图像扫描

第一向等电聚焦采用 Ettan™ IPGphor 等电聚焦 450μl 体系, 用 24cm、pH3-10 的 IPG 胶条, 将各组蛋白质的样品各取 200μg 和水化液混合后共 450μl, 均匀放入电泳。当聚焦到 8 万 V/h 时停止, 经两步平衡后进行垂直电泳。电泳结束后, 每块胶用 250ml 银染液银染。银染后的凝胶扫描成 TIFF 格式文件。

1.6 胶内酶解、质谱分析和数据搜索

参照文献^[4]方法。制作制备胶, 切取目标点用双蒸水冲洗后加入脱色工作液约 50μl 进行脱色, 用 100mmol/L 碳酸氢铵冲洗数次后用 100% 纯乙腈脱水后冷冻干燥。接着加入 50μl 含 10mmol/L 二硫苏糖醇的 100mmol/L 碳酸氢铵于 57℃ 还原 1h, 室温冷却, 去除过量液体, 快速加入用 100mmol/L 碳酸氢铵配制的 55mmol/L 碘乙酰胺, 室温暗处烷基化 30min。完成后用 100mmol/L 碳酸氢铵冲洗 2 次, 再用纯乙腈脱水后

加入等体积的 100mmol/L 碳酸氢铵冷冻干燥。加入约 10μl 的用 25mmol/L 碳酸氢铵配成 0.1g/L 的甲苯磺酰苯丙氨酸氨甲酰-胰蛋白酶溶液让胶块吸收, 再加入 20μl 不含酶液的缓冲液覆盖, 37℃ 酶解 28h。酶解后的肽用 50μl 5% 三氟乙酸 (TFA)、50% 乙腈 (ACN) 萃取 2 次, 合并萃取液冷冻干燥。冻干样品用 10μl 0.1% TFA/50% ACN 溶解, 打靶, 进行基质辅助激光电离飞行时间质谱分析。用 MASCOT 软件在蛋白质数据库中搜索肽质量指纹谱数据并确定蛋白质。

1.7 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件分析, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 计量资料组间比较采用单因素方差分析。银染图谱经 Image Master 2D Quant Platinum 6.0 软件进行点识别, 匹配及差异蛋白质分析。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况、外周血细胞学、肝脾形态学结果

模型组大鼠在实验第 2d 即出现萎靡, 团缩弓腰, 进食减少, 口唇、眼睑苍白, 易脱毛, 大便干黑等血虚症状。治疗组大鼠外观状态较快恢复。表 1 示, 与正常组比较, 模型组大鼠红细胞 (RBC) 和血红蛋白 (HGB) 均明显降低 ($P < 0.01$), 白细胞 (WBC)、网织红细胞 (RCT) 计数明显升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 治疗组 RBC、HGB、RCT 均较明显上升, WBC 降低 ($P < 0.01$)。正常组大鼠肝脏外观柔嫩, 颜色鲜红, 大小适中; 模型组大鼠肝、脾外观明显肿大、颜色暗黑; 湿重明显升高。治疗组大鼠肝、脾湿重比模型组轻 ($P < 0.05$) (见表 2)。

表 1 各组大鼠外周血细胞学结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	RBC ($\times 10^{12}/L$)	HGB (g/L)	WBC ($\times 10^9/L$)	RCT ($\times 10^{10}/L$)
正常组	6	6.80 ± 0.30	131.83 ± 4.54	8.76 ± 1.86	12.37 ± 0.67
模型组	6	2.94 ± 0.17*	75.80 ± 3.68*	20.93 ± 3.34*	20.76 ± 1.26*
治疗组	6	4.12 ± 0.26△	101.00 ± 3.01△	10.52 ± 1.54△	46.43 ± 3.85△

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

表 2 各组大鼠肝脏、脾脏湿重比较 ($\bar{g}, \bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	肝脏	脾脏
正常组	6	6.13 ± 0.30	0.89 ± 0.16
模型组	6	7.42 ± 0.55*	1.94 ± 0.17*
治疗组	6	6.85 ± 0.39△	1.64 ± 0.22△

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

2.2 银染图谱分析、质谱鉴定结果

分析 3 次凝胶的平均蛋白质点数: 对照组 762 个, 模型组 684 个, 治疗组 756 个, 其中所有图谱共有的点有 593 个。多数蛋白质点集中于碱性和中性区域 (见图

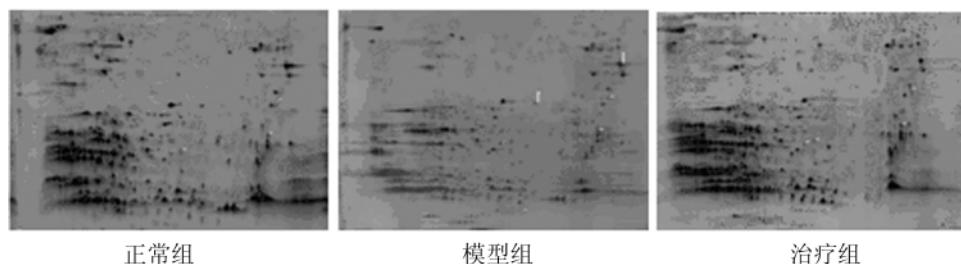


图 1 3 组大鼠肝线粒体蛋白质双向电泳图谱

注:上样量 200 μ g, pH3-10, 24cm, IPG 胶条的 pH 梯度由左向右为 10~3。

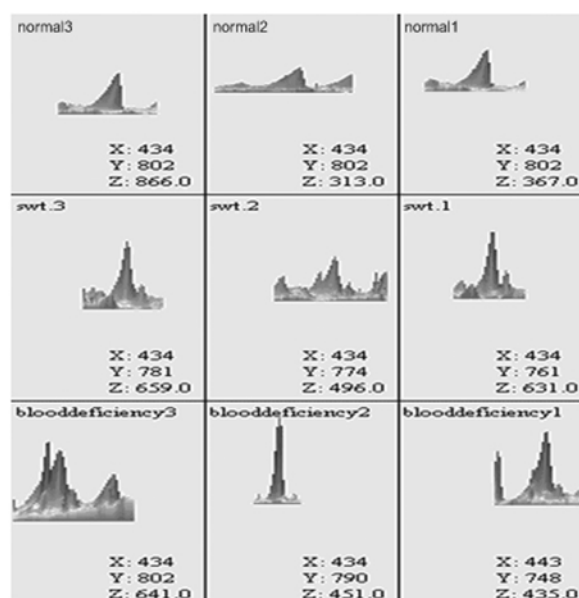


图 2 蛋白质点抑制素的三维图与柱状图

注:XYZ 坐标值分别表示等电点、分子量、像素强度值,柱状图中 B 线表示集中趋势, A、C 线表示分散间隔,模型组 a、b、c 点值明显高于正常组 g、h、i 与治疗组 d、e、f 点值。

1)。通过所有图谱中共有的蛋白质点进行统计学分析,如果成组蛋白质的表达量差异超过 1.2 倍(增加或降低),并且 9 块胶中蛋白质表达量变化的趋势相一致(见图 2),则该蛋白质表达差异应该是由实验处理所引起,而不是样品材料和操作过程所带来的误差。根据这个原则共找到 20 个差异蛋白,用基质辅助激光电离质谱进行检测确定了 14 个蛋白质点(见表 3)。其中有 6 个相邻点经鉴定结果为 ATP 合酶的 $\alpha\beta$ 亚单位,2 个点为丙酮酸脱氢酶 E1 组分的亚单位;且变化趋势一致。表 3 显示,模型组与治疗组大鼠肝线粒体中蛋白表达量的比较,四物汤治疗后,血虚大鼠肝线粒体中蛋白表

表 3 经基质辅助激光电离质谱鉴定的蛋白质

蛋白质名称	分子量	理论等电点	治疗组/模型组
热休克蛋白 60	60917.4	5.91	2.30
抑制素	29801.9	5.57	-2.06
还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶	27360.9	6.23	-2.79
电子转移黄素蛋白	34929.5	8.62	2.20
三磷酸腺苷合酶	59716.6	9.22	2.50
二氢硫辛酸脱氢酶	54004.1	7.96	-2.78
丙酮酸脱氢酶 E1 组分	38957.0	6.20	-2.02
烯酰辅酶 A 水合酶	31496.2	8.39	2.02
三功能酶	82460.6	9.11	2.30
氨甲酰磷酸合酶 I	164475.5	6.33	3.50
谷氨酸脱氢酶	61377.3	8.05	-2.68
延伸因子 Tu	49477.0	7.23	-2.50
3-巯基丙酮酸硫基转移酶	32919.4	5.88	2.98
过氧化氢酶	59719.5	7.07	-2.89

注:治疗组/模型组为表达量比值,正值表示治疗组表达量增高,负值表示治疗组表达量下降。

达量明显改善。

3 讨论

高通量、规模化的蛋白质组研究技术为中医证型、方药的分子生物学机理研究提供了新的工具,蛋白质组学显示了总蛋白质表达的优势。研究显示,四物汤治疗血虚证后一些伴侣分子表达量改变,脂类、蛋白质分解代谢加强,糖类分解代谢减缓。四物汤可逆转 APH 所致热休克蛋白 60 (Hsp60)、电子转移黄素蛋白 (ETF) 下调,抑制素 (PHB)、过氧化氢酶和 NADH 脱氢酶上调。Hsp60、PHB 均为分子伴侣,应激条件下可提高细胞应急耐受能力。PHB 与某些肿瘤^[5]和退行性疾病的发生有关。应激状态下 PHB 上调提示线粒体内氧化呼吸链受到毒物抑制,线粒体功能受损^[6-7]。过氧化氢酶是机体清除过氧化氢的主要抗氧化酶类。NADH 脱氢酶位于电子传递链的上游,如果线粒体功能受损,电子传递酶的功能受到抑制,则可使上游的 NADH 脱氢酶堆积,影响三磷酸腺苷 (ATP) 的合成^[8]。ETF 在线粒体内膜上,常和黄素脱氢酶或细胞

色素结合成复合物,是 11 种一级脱氢酶与电子传递链发生关联的枢纽。APH 诱导后损伤了细胞正常结构和功能,抑制线粒体内氧化呼吸链,而引起相关酶类及分子伴侣表达异常。四物汤治疗后改善了这些酶类及分子伴侣的异常表达,提示四物汤使血虚动物细胞防御损伤能力加强,即修复受损的线粒体结构,清除自由基,抗氧化作用,稳定线粒体结构,保护线粒体功能,使得电子传递和氧化磷酸化在线粒体内膜上正常进行。三磷酸腺苷合酶更增加,以促增 ATP 的产量,提高能量储备。

血虚模型大鼠进食减少,机体能量供给短缺。四物汤治疗后,其物质与能量代谢均得到改善,主要表现为:①四物汤治疗后,肝线粒体中二氢硫辛酸脱氢酶和丙酮酸脱氢酶表达降低。模型组中这两个指标表达增高。这两种酶是丙酮酸脱氢酶复合体的组成部分,催化丙酮酸脱羧反应,促进三羧酸循环和氧化磷酸化,释放能量。推测四物汤可能缓解葡萄糖分解代谢,为机体保存了一定的能源。②四物汤治疗后脂肪酸分解代谢加速:三功能酶(MTP)、烯酰辅酶 A 水合酶的表达量增加。糖代谢发生障碍时机体需动用脂肪氧化分解供给能量。脂肪酸 β -氧化是体内脂肪酸分解的主要途径。烯酰 CoA 水合酶催化脂肪酸 β 氧化第二步加水反应。MTP 是由 4 个 α 亚单位和 4 个 β 亚单位组成的八聚体酶复合物。催化脂肪酸 β 氧化 4 步循环反应中的第三步,是脂肪酸氧化过程的关键酶^[9]。结果表明,四物汤可促使脂肪酸分解以应激机体能量不足。③四物汤治疗后,蛋白质分解代谢加速:氨甲酰磷酸合酶 I (CPS-I)、3-巯基丙酮酸硫基转移酶合成增加。3-巯基丙酮酸硫基转移酶可反映人体内胱氨酸代谢情况以及缺铁性贫血,它催化 3-巯基丙酮酸脱去硫基转变成丙酮酸的反应是半胱氨酸分解代谢的关键步骤。CPS-I 是尿素合成关键酶。四物汤治疗后延伸因子 T_u 、谷氨酸脱氢酶(GLDH)表达降低。延伸因子 T_u 使氨基酸-转移 RNA 进入受体位点合成肽链,促进蛋白质合成。

肝细胞受损时 GLDH 可明显升高。提示肝细胞在四物汤的治疗下得到修复,肝脏缺血缺氧状态得以改善。

综上所述,四物汤使血虚证模型大鼠血虚征象改善,受损肝脏得到修复;还可保护细胞免受损伤,清除自由基和过氧化物,维持线粒体结构的稳定,保护线粒体功能;使血虚动物糖分解代谢减缓,为机体保存一定的能源;脂类、蛋白质分解代谢加强,ATP 合成加快,以应激机体能量不足,从蛋白质分子水平改善血虚动物的虚损状况。

参考文献

- [1]郭平,马增春,李鹰飞,等. 四物汤对放射线致血虚证小鼠骨髓蛋白质表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(9): 893 - 896.
- [2]杨岚,祝彼得,彭成. 血虚证动物模型的标准化研究初探[J]. 实验动物科学与管理, 2006, 23(1): 9 - 13.
- [3]徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2002: 58 - 70.
- [4]卢德赵,沃兴德,施孟如,等. 肾上腺切除的肾虚大鼠肝线粒体蛋白质组的研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2008, 14(5): 350 - 353.
- [5]Manjeshwar S, Branam DE, Lerner MR, et al. Tumor suppression by the prohibitin gene 3' untranslated region RNA in human breast cancer[J]. Cancer Res, 2003, 63(17): 5251 - 5256.
- [6]郭维,黄文彦,徐虹. Prohibitin 的研究进展[J]. 国外医学生理病理科学与临床分册, 2005, 25(3): 254 - 257.
- [7]任哲,钱令嘉,杨志华. 氧化应激心肌细胞 prohibitin 表达与分布变化及其生物学意义[J]. 中国应用生理学杂志, 2007, 3(2): 173 - 177.
- [8]王镜岩,朱圣庚,徐长法. 生物化学(下册)[M]. 3 版. 北京:高等教育出版社, 2002: 121 - 128.
- [9]黄圣兵,宋玮,林其谁. 大鼠电子传递黄素蛋白-泛醌氧化还原酶 cDNA 的克隆、功能表达和细胞定位[J]. 中国科学 C 辑(生命科学), 2005, 35(1): 77 - 86.

(收稿日期: 2009-03-23; 修回日期: 2009-06-30)

[编辑: 行之]

(上接第 156 页)

- [4]袁敬柏,董绍英,王阶,等. 2689 例冠心病心绞痛证候要素的文献统计分析[J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 13(5): 100 - 101.
- [5]王阶,邢雁伟,姚奎武,等. 冠心病心绞痛中医证候要素研究及临床应用[J]. 湖北中医学院学报, 2009, 11(3): 3 - 5.
- [6]李宇航. 谈“证候要素”与“方剂要素”[J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(2): 117 - 120.
- [7]Cesar LA, Gowdak LH, Mansur AP. The metabolic treat-

ment of patients with coronary artery disease: effects on quality of life and effort angina[J]. Curr Pharm Des, 2009, 15(8): 841 - 849.

- [8]荆鲁,王阶,王停. 西雅图量表评价血府逐瘀汤及其拆方治疗冠心病稳定性心绞痛的疗效观察[J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 27(1): 18 - 20.

(收稿日期: 2009-06-25; 修回日期: 2009-0-0)

[编辑: 黄健]