

脾胃湿热证大鼠模型血清蛋白质组学差异表达研究

廖荣鑫¹, 刘小虹², 许仕杰²

1. 广东药科大学附属第三医院, 广东 广州 510410; 2. 广州中医药大学, 广东 广州 510006

[摘要] 目的: 通过分析脾胃湿热证模型大鼠血清蛋白质的差异表达, 从蛋白质组学角度探讨脾胃湿热证的证候实质。方法: 应用血清蛋白质组学、生物信息学等系统生物学方法, 采用二维凝胶电泳(2-DE)分离技术分离脾胃湿热证模型大鼠血清蛋白质, 获得差异表达蛋白质, 利用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)和数据库鉴定差异表达蛋白质。结果: 发现12个具有明显表达差异的蛋白质斑点, 经鉴定可以确定的9个蛋白质分别是备解素B因子、凝血因子II、C-反应蛋白、alpha-胰蛋白酶抑制剂重链H4、载脂蛋白AI、重组人载脂蛋白AI、血小板凝血酶敏感蛋白、α-巨球蛋白、补体3。结论: 筛选出来的差异表达蛋白质主要涉及机体免疫、物质代谢、炎症反应及血液流变学等, 通过对脾胃湿热证模型大鼠蛋白质组差异表达的研究, 从理论和技术的角度为运用蛋白质组学对脾胃虚实证候实质的深入研究提供了借鉴。

[关键词] 脾胃湿热证; 血清蛋白质组学; 证候研究; 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2018) 07-0015-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2018.07.005

Study of Proteomic Differential Expression in Serum of Rat Models of the Spleen-stomach Damp-heat Syndrome

LIAO Rongxin, LIU Xiaohong, XU Shijie

Abstract: Objective: To discuss the essence of the spleen-stomach damp-heat syndrome from the perspective of proteomics by analyzing differential protein expression in serum of rat models of the spleen-stomach damp-heat syndrome. **Methods:** Applied the systematic biological methods including serum proteomics and bioinformatics, adopted the separation technology of two-dimensional gel electrophoresis(2-DE) to separate serum protein of rats in models of the spleen-stomach damp-heat syndrome, acquired the differentially expressed proteins, and identified the differentially expressed proteins by using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry(MALDI-TOF-MS) and database. **Results:** 12 protein spots which had remarkably differential expression were found, and 9 proteins were determined as properdin factor B, coagulation factor II, C-reactive protein, alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4, apolipoprotein AI, Recombinant human apolipoprotein AI, thrombospondin, α-macroglobulin and complement 3 by identification. **Conclusion:** The differentially expressed proteins screened above mainly involve body immunity material metabolism, inflammation and hemorheology. Through the proteomic research on differential protein expression in serum of rats in models of the spleen-stomach damp-heat syndrome, it provides references for the further study of the essence of the spleen-stomach damp-heat syndrome via proteomics from the perspective of theory and technology.

Keywords: Spleen-stomach damp-heat syndrome; Serum proteomics; Syndrome research; Animal experiment; Rats

脾胃湿热证是临床常见的脾胃实证, 中医认为其形成与气候、饮食内伤、疫气以及体质因素有关。由于脾胃湿热证的特殊致病因素及其病理变化的特点, 目前研究还处于笼统、多指标、不确定状态, 缺乏一个整体、统一的评价标准, 有待进一步多学科综合研究。证候蛋白质组学的提出, 为整体研究证候实质提供可能。血清中含有近万种蛋白质, 成分复杂, 包括各

种不同器官、组织和细胞分泌的多种蛋白质, 机体每一时间段的病理生理改变均可在血清中反映出来^[1]。因而从血清蛋白质组学的角度, 将蛋白质组学和中医证型研究结合起来, 探讨脾胃湿热证在某一时期的相关蛋白质, 对从整体水平研究、评价脾胃湿热证的实质具有重要的现实意义。本研究从动物模型入手, 对与脾胃湿热证模型大鼠相关的血清差异表达蛋白质进行

[收稿日期] 2017-12-19

[作者简介] 廖荣鑫 (1975-), 男, 副研究员, 主要从事中西医结合肺系、脾胃疾病临床与基础研究。

探讨。

1 材料和方法

1.1 动物分组与模型制备 实验用动物为6周龄SPF级SD雄性大鼠20只,购自广州中医药大学实验动物中心,实验动物使用许可证号:SYXK(粤)2003-0001,批次:20060241,于广州中医药大学实验动物中心SPF级动物实验室饲养,体质量(178.27 ± 4.79)g。按照随机数字表将实验大鼠随机分为模型组和正常对照组,每组10只。模型组大鼠于造模前禁食12h,自由饮水,测定肛温、体质量、饮食量。造模时间共28天,采用肥甘饮食+造模箱+大肠杆菌造模法^[9]。肥甘饮食(在普通饲料中混入12%猪油,8%蜂蜜)喂养10天,然后置于造模箱[温度(33 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度85%~95%]8天,第19天开始灌胃,按10 mL/kg给予大肠杆菌1次,24 h后再加强感染1次(1 mL/200 g),移出置于实验动物中心自然环境中,12 h后开始灌服蒸馏水,40 mL/kg,每天2次,灌胃8天。正常对照组不予任何干预。

1.2 标本采集 第28天断头处死大鼠取全血,于4 $^{\circ}\text{C}$ 静置30 min后,以1 000 rpm的速度室温离心5 min,吸取上清液;置高速低温离心机,在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,以10 000 rpm的速度离心8 min,再吸取上清液,分装置-80 $^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱保存。

1.3 试剂和仪器 Sigma公司生产的3K18高速低温离心机;Amersham Pharmacia公司生产的IPGphor及附件、GS-710光密度透射扫描仪;Bio-Rad公司生产的Protean II垂直电泳单元及附件、Mini-PROTEAN电泳单元及附件;HITACHI公司生产的U-2001紫外分光光度计;北京四环科学仪器制造厂生产的恒温循环器HX-1055。实验中所用试剂有:三羟甲基氨基甲烷碱 Tris、十二烷基硫酸钠 SDS、Bromophenol blue、Ultra urea、IPG buffer(pH 4~7)、固相pH梯度干胶条(IPG strip, 13 cm, pH 3~10)(均购自 Amersham Pharmacia 公司);AAm、Bis、Gly(购自 Bio-Rad 公司);PMSF(购自 Merck 公司);TEMED、Pharmalyte(pH 3~10)、CHAPS(购自 Sigma 公司);IAA、G250/R250(Fluka 公司,批号:194863);LMW marker(购自华美生物工程公司,批号:20061458);二硫苏糖醇 DTT(购自 Promega 公司),BSA(购自中国医学科学院血液学研究所,批号:20061625)。

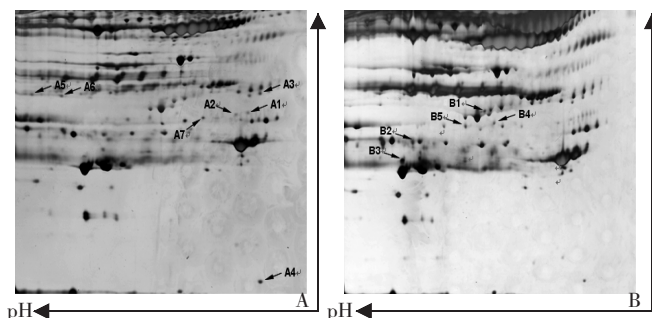
1.4 二维凝胶电泳(2-DE)分离和分析 考马斯亮蓝 G250 法^[10]测定血清蛋白质浓度,然后按等质量分别混和模型组和正常对照组的血清样本,以组间配对的方式同时进行2-DE分离。采用18 cm长,pH值为4~7的固相pH梯度干胶条,上样量为2.0 mg,以 Amersham Pharmacia Biotech 公司 IPGphor 水平电泳仪进行等电聚焦(isoelectric focusing, IEF)。IEF过程中采用滤纸片作为“盐桥”,设定250 V 30 min,500 V 30 min的低电压除盐过程,总电压时间积约为50 000 Vh。平衡后的胶条置12.5%浓度的SDS凝胶作第二相分离。以考马斯亮蓝G250对凝胶做胶体考染,用GS710光密度透射扫描仪扫描凝

胶并保存图像。每组实验重复3次,共获得6张2-DE凝胶图像。以Image Master 2DElite软件进行图像分析,设定表达量提高2倍为差异表达范围,获取最终有差异表达的蛋白质斑点信息。

1.5 差异蛋白质的质谱分析和数据库检测 切取差异表达蛋白质斑点,经水洗、脱色处理后进行胶内酶切和萃取,获得蛋白质的肽混合样品,再以美国ABI公司的Voyager DE STRMALDI-TOF质谱仪对处理好的样品进行质谱检测,获取肽质量指纹图谱(peptide mass fingerprint, PMF)。以 Mascot 软件搜索 NCBI 和 EMBL 等数据库,查询 PMF 所对应蛋白质及相关信息。

2 结果

2.1 血清蛋白质差异表达蛋白分布图 见图1。在模型组大鼠和正常对照组大鼠血清中共找出12个表达量具有显著差异的蛋白质斑点。



注:所有标为An($n=1, 2, 3, \dots$)的点表示模型组和正常对照组比较上调的点,即是说,正常对照组没有或表达量低而模型组表达量增加。所有标为Bn($n=1, 2, 3, \dots$)的点表示模型组和正常对照组比较下调的点,即是说,正常对照组有而模型组没有或者表达量降低。

图1 血清蛋白质差异表达蛋白分布图位置(A为上调图;B为下调图)

2.2 血清差异表达蛋白质情况 见表1。按照在图像中检测到的序号来分,分别为点5、16、52、74、120、153、191、196、211、208、263、281。通过对PMF的数据库检索,12个血清差异蛋白质中除3个血清差异蛋白质未获得满意的PMF图谱,故无法检出其具体物质,其余9个可获得数据库的匹配信息,分别为备解素B因子、凝血因子II、C-反应蛋白、 α -胰蛋白酶抑制剂重链H4、载脂蛋白AI、重组人载脂蛋白AI、血小板凝血酶敏感蛋白、 α -巨球蛋白、补体3。

3 讨论

近年来,蛋白质组学作为后基因时代的标志,目前已运用到包括疾病标志物研究、作用机制研究、药物作用靶点研究、个性化医疗等多个领域中^[11]。将蛋白质组学引入到中医证候的研究,主要通过对同一疾病不同证候和同一证候不同疾病的组

表1 血清差异表达蛋白质情况

点位	编号	序列覆盖	标量	计算 π 值	中文名	表达
5	gij46237594	432	8 643.1	6.57	备解素 B 因子	上调 ↑
16	gij12621076	418	71 792.2	6.28	凝血因子 II	上调 ↑
74	gij8393197	129	25 736.8	4.89	C-反应蛋白	下调 ↓
153	gij59808174	273	103 861.8	5.82	alpha-胰蛋白酶抑制剂重链 H4	下调 ↓
191	gij6978515	358	30 100.2	5.52	载脂蛋白 AI	上调 ↑
196	gij55747	469	30 126.2	5.52	重组人载脂蛋白 AI	上调 ↑
208	gij33340123	414	133 579.4	4.74	血小板凝血酶敏感蛋白	上调 ↑
263	gij21955142	519	168 421.9	6.46	α -巨球蛋白	下调 ↓
281	gij8393024	205	187 825.0	6.12	补体 3	下调 ↓

织或细胞不同的蛋白质表达谱进行分析,发现证候间的相同及差异之处,进而揭示中医证候的本质,蛋白质组学的整体性、复杂性、动态性、信息化的特点和中医学的理念不谋而合^[9]。袁宏伟等^[6]运用蛋白质组学研究发现冠心病心肾阴虚证的内在基础,并找出了证型间的差异表达蛋白。孟庆宏等^[7]分别从中医证和蛋白质组的概念、内涵、特点、共性等几个方面对将蛋白质组学引入中医证候的研究进行了探讨,认为将蛋白质组学引入到中医证候学研究,为中医证候物质和功能基础研究提供了新思路,对揭示中医证的现代科学内涵具有重要意义。

从本研究筛选出的9个差异蛋白质可以看出,脾胃湿热证模型大鼠差异表达的蛋白主要涉及机体免疫、物质代谢、炎症反应及血液流变学等方面。与脾胃湿热证免疫调节有关的蛋白有补体3、 α -巨球蛋白、备解素B因子。补体3、 α -巨球蛋白表达均下降,备解素B因子表达上调,三者共同作用分别从激素调节、B淋巴细胞介导的免疫和受体分解等方面共同发挥作用,引起机体免疫力下降,和已有关于脾胃湿热证免疫力下降的诸多研究结果^[8-10]是一致的。《素问》认为:“脾胃为水谷之海”、“脾胃为后天之本”,脾胃功能衰弱,脾胃运化水谷精微功能失调,则正气受损,是易于感受外邪而发病的基础。因此,研究提示的免疫调节蛋白表达下降,引起机体免疫功能减低,可能是脾胃湿热证正气不足,易受邪而发病的实质所在。

与机体炎症反应有关的蛋白质有alpha-胰蛋白酶抑制剂重链H4和C-反应蛋白。C-反应蛋白是反映炎症反应的指标^[11],alpha-胰蛋白酶抑制剂重链H4是感染、炎症、创伤时常发生急性期反应蛋白^[12]。在脾胃湿热证大鼠血清中,C-反应蛋白表达下调,alpha-胰蛋白酶抑制剂重链H4表达上调。C-反应蛋白表达下降及alpha-胰蛋白酶抑制剂重链H4表达上调,这一结果与杨春波等^[9]发现脾胃湿热证涉及的病种中,以炎症性疾病占大多数,尤其与以循环系统障碍、渗出为主的急性期炎症和亚急性期炎症更为密切,说明脾胃湿热证炎症的存在并不易愈合。

与机体营养物质代谢有关的蛋白质有重组人载脂蛋白AI

及载脂蛋白AI,二者在调节脾胃湿热证机体的脂肪代谢以及胰岛素的释放等方面发挥着重要的作用。重组人载脂蛋白AI及载脂蛋白AI表达均增强,提示机体脂肪蓄积太多,载脂蛋白表达增强,代偿性加快脂类在机体内的代谢,和模型动物使用高糖高脂饲料后表现为饮食减少、体质量增加有关;与中医理论的脾主运化功能失常引起脾胃运化水谷功能下降,水湿内停的理论一致。

与血液流变学有关的蛋白质有凝血因子II、血小板凝血酶敏感蛋白,二者表达均增强。凝血因子II是凝血酶原被激活形成凝血酶过程中释放的产物,若增高提示体内有凝血酶形成。脾胃湿热患者存在着凝血方面的异常。研究表明慢性胃病不同证型都存在血流变的异常,脾胃湿热证最突出,曹代娣^[13]研究表明,血液流变异常程度为脾胃湿热型>肝郁气滞型>脾胃虚弱型。郑家铨等^[14]研究发现脾胃湿热证存在着高血黏、高血凝、高血细胞压积等特点。凝血因子II、血小板凝血酶敏感蛋白在脾胃湿热证的表达均增强,说明脾胃湿热证在血液流变学上具有高凝、高黏的特点,与先前学者的相关研究报道^[15]相一致。

本研究从动物模型出发,初步探讨了和脾胃湿热证相关的血清特异表达蛋白质,这些蛋白主要涉及机体免疫、物质代谢、炎症反应及血液流变学等方面,和现有的脾胃湿热证的相关研究结果是一致的,证实了从蛋白质组的角度来研究脾胃湿热证实质是可行的。中医证型的形成和发展是多种因素共同作用的结果,今后还需要进一步将脾胃湿热证相关的动物模型、临床病例的血清或者组织差异表达蛋白质结合起来比较分析,对不同的差异表达蛋白进行鉴定和功能验证,更深入地探讨脾胃湿热证的相关蛋白质,以阐释脾胃湿热证的实质。

[参考文献]

- [1] 钟小兰,吕志平,钱令嘉,等.肝郁证模型大鼠血清蛋白质组的差异表达研究[J].中华中医药杂志,2006,21(7):399-401.
- [2] 吴仕九,杨运高.温病湿热证动物模型的研制及清热祛

- 湿法机理的探讨[J]. 中国中医药科技, 1999, 6(2): 65-67.
- [3] Candiano G, Bruschi M, Musante L, et al. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis[J]. Electrophoresis, 2004, 25(9): 1327-1333.
- [4] 王常松, 傅晓晴, 刘清华, 等. 中医证蛋白质组学研究探析[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(3): 535-537.
- [5] 王新贤, 殷海波, 姜泉, 等. 蛋白质组学在中医证候学研究中的应用进展[J]. 世界中医药, 2017, 12(8): 1965-1969.
- [6] 袁宏伟, 杜武勋, 朱明丹, 等. 冠心病心气虚弱证/心肾阴虚证血清蛋白质组学特征研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(4): 1014-1016.
- [7] 孟庆宏, 王常松, 傅晓晴, 等. 蛋白质组学技术引入中医证理论的可行性研究[J]. 中医学报, 2011, 26(2): 170-172.
- [8] 杨春波, 黄可成, 肖可成, 等. 脾胃湿热证的临床研究-400例资料分析[J]. 中医杂志, 1994, 35(7): 425-427.
- [9] 尹思源, 张光华, 张磊, 等. 慢性胃脘痛证候分布规律的调查(附115例典型病例分析)[J]. 泸州医学院学报, 1995, 18(2): 109-111.
- [10] 周正, 黄志新, 劳绍贤. 脾胃湿热证的现代研究进展[J]. 湖南中医药导报, 2003, 9(6): 65-67.
- [11] Choi-Miura NH, Takahashi K, Yoda M, et al. The novel acute phase protein, IHRP, inhibits actin polymerization and phagocytosis of polymorphonuclear cells[J]. Inflamm Res, 2000, 49(6): 305-310.
- [12] Venugopal SK, Devaraj S, Jialal I. Effect of C reactive protein on vascular cell: evidence for a proinflammatory, proathrogenic role[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2005, 14(1): 33-37.
- [13] 曹代娣. 胃脘痛的宏观辨证与微观结合的初步探讨[J]. 辽宁中医杂志, 1994, 21(2): 54-55.
- [14] 郑家铿, 张群豪, 许少锋, 等. 慢性胃病脾胃湿热证与脾气虚证的血液流变学观察[J]. 福建中医学院学报, 1994, 4(2): 6-8.
- [15] 侯冬梅, 刘勤社, 郭安阳. 慢性萎缩性胃炎中医证型与血液流变学的关系[J]. 中国中西医结合脾胃杂志, 1997, 5(1): 14-16.
- (责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)

不同工艺冰荷洗剂药理实验研究

欧少福¹, 刘瑞连², 首弟武²

1. 张家界市中医医院, 湖南 张家界 427000; 2. 湖南省中医药研究院, 湖南 长沙 410005

[摘要] 目的: 采用抗炎与致敏实验优选冰荷洗剂的制备工艺。方法: 选用相同的药材采用不同的提取工艺分别制备冰荷洗剂。采用二甲苯致小鼠耳肿胀法及外涂2, 4-二硝基氯苯致豚鼠皮肤致敏实验筛选冰荷洗剂的最佳制备工艺。结果: 与空白对照组比较, 冰荷洗剂水提组、冰荷洗剂醇提组、冰荷洗剂部分水提部分醇提组及冰荷洗剂挥发油组小鼠耳肿胀度均显著降低, 耳肿胀抑制率显著升高, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。模型组的致敏率为100%, 而冰荷洗剂水提组、冰荷洗剂醇提组、冰荷洗剂部分水提部分醇提组及冰荷洗剂挥发油组豚鼠致敏率均为0。与空白对照组比较, 模型组豚鼠致敏率较高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 冰荷洗剂水提组、冰荷洗剂醇提组、冰荷洗剂部分水提部分醇提组及冰荷洗剂挥发油组豚鼠致敏率较低, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论: 提取挥发油工艺为冰荷洗剂最佳制备工艺。

[关键词] 冰荷洗剂; 抗炎作用; 致敏实验; 制备工艺; 动物实验; 小鼠; 豚鼠

[中图分类号] R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2018) 07-0018-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2018.07.006

Pharmacological Experiment Study of Binghe Lotion Under Different Technologies

OU Shaofu, LIU Ruilian, SHOU Diwu

Abstract: Objective: To optimize the preparation technology of Binghe lotion by anti-inflammatory and sensitization tests.

[收稿日期] 2018-03-19

[基金项目] 湖南省中医药科研计划项目 (201875)

[作者简介] 欧少福 (1973-), 男, 主任医师, 主要从事中医内科及药理研究。

[通信作者] 首弟武, E-mail: shyyx9228@sohu.com.