

· 基础研究 ·

清胰颗粒干预重症急性胰腺炎后胰腺蛋白组学
表达差异性研究杨元生^{1,2} 陈 垦¹ 叶 昇³ 石星亮¹ 杜政委¹ 崔淑兰⁴ 王 晖⁵

摘要 目的 观察清胰颗粒(Qingyi Granules, QYG)对牛黄胆酸钠(sodium tauro cholate, STC)诱导大鼠重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)胰腺组织中总蛋白表达变化的影响。方法 36 只 SD 大鼠经胰胆管逆行注射 5% STC 诱导 SAP,随机分为 SAP 组和 QYG 治疗组(QYG 组),每组 18 只。建模成功后,QYG 组每 12 h 1 次 QYG 对水(W:W=1:1)灌胃[1 mL/(100 g·只)],SAP 组以生理盐水替代,共给药 4 次。提取两组大鼠胰腺组织总蛋白行双向电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)、荧光染色和图谱分析,选择 48 h 两组间差异表达超过 4 倍的蛋白质点进行 MALDI-TOF/TOF 质谱分析和生物信息学分析,观察两组蛋白质点的差异。结果 5%STC 诱导出 SAP 大鼠模型,胰腺组织有典型病理学改变。经凝胶图像处理软件分析胰腺组织蛋白组学变化:48 h 时两组有 22 个差异点,用药后 5 个点蛋白上调,17 个点下调。48 h 时间点比较两组表达差异超过 4 倍且稳定的蛋白质斑点共有 9 个,质谱分析和数据库检索共鉴定出 7 种蛋白质,分别是丝氨酸蛋白酶抑制剂 b1a (39 kb)、丝氨酸蛋白酶抑制剂 b1a (43 kb)、硫氧还蛋白过氧化物酶-IV(Prx IV)、糜蛋白酶样蛋白(Clps)、 γ -肌动蛋白(Actg1)、谷氨酰-tRNA 合成酶(Eprs)、短链羟酰辅酶 A 脱氢酶(Hadhsc)。从功能分析,这些蛋白与 SAP 胰腺病理损伤过程中信号传导相关。结论 比较蛋白质组学能较好地反映 QYG 对 SAP 大鼠胰腺组织中差异表达蛋白的影响,研究差异表达蛋白有可能为 QYG 治疗 SAP 提供新的理论基础和分子靶点。

关键词 重症急性胰腺炎;胰腺组织;蛋白组学;质谱分析;清胰颗粒

Differentially Expressed Proteins of Severe Acute Pancreatitis Intervened by Qingyi Granule YANG Yuan-sheng^{1,2}, CHEN Ken¹, YE Sheng³, SHI Xing-liang¹, DU Zheng-wei¹, CUI Shu-lan⁴, and WANG Hui⁵

1 Department of Internal Medicine, College of Clinical Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou (510310), China; 2 Department of Gastroenterology, The Second Affiliated (Xinhai) Hospital of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou (510300), China; 3 Department of Oncology, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou (510310), China; 4 Outpatient Department, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou (510224), China; 5 Department of Pharmacology, College of Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou (510006), China

ABSTRACT Objective To observe the effects of Qingyi Granule (QYG) on the changes of total protein expressions in the pancreatic tissue of rats with severe acute pancreatitis (SAP) induced by sodium taurocholate (STC). Methods SAP was induced by retrograded injecting 5% STC from the gut-pancreatic duct in 36 Sprague-Dawley (SD) rats. Then they were randomly divided into the SAP group and the QYG treatment group (abbreviated as the QYG group), 18 in each group. After successful modeling, rats in the QYG group were administered with QYG water solution (W:W=1:1) once with an interval of 12 h (1 mL/100 g), while rats in the SAP group were administered with normal saline. The medication was performed four times. The total proteins were extracted from the pancreatic tissue of all rats to perform two-dimensional e-

基金项目:广东省科学事业计划基金资助项目(No. 2007A060305007);广东省科学事业计划基金资助项目(No. 2007B030702004);广州市科学技术基金资助项目(No. 2007Z3-E5011);广东省自然科学基金资助项目(No. 8151022401000012)

作者单位:1. 广东药学院临床医学院内科学教研室(广州 510310);2. 广东药学院附属第二医院(新海医院)消化内科(广州 510300);3. 中山大学附属第一医院肿瘤科(广州 510000);4. 广东药学院附属门诊部(广州 510224);5. 广东药学院中药学院药理学教研室(广州 510006)

通讯作者:陈 垦, Tel:020-34055856, E-mail:chenkenck@126.com

electrophoresis, fluorescent staining, and atlas analysis. The protein dots with differential expressions more than four times between each other in 48 h gel pictures were chosen and used for MALDI-TOF/TOF mass chromatographic analysis and biological information analysis. Results The 5% STC induced SAP model rats had typical pathological changes in the pancreatic tissue. The proteomics changes of the pancreatic tissue were analyzed by gel image manipulation software. Twenty two disparate points were detected between two groups at 48 h, 5 points of the protein were up-regulated and 17 points were down-regulated of the total after QYG intervention. Nine protein spots expressed differently more than 4 times and stably at 48 h, 7 kinds of proteins have been identified by mass chromatographic analysis and Data Base Retrieval, and they were Serpinb1a 39 kDa protein, Serpinb1a 43 kDa protein, Prdx4 Prx IV, Clps, γ -actin (Actg1), Eprs and Hadhsc. Those proteins were involved in signal transmit during the process of SAP pancreas – pathological injury analyzed from their functions. Conclusions Proteomics can well reflect the effects of QYG on differential expression proteins in the pancreatic tissue of rats with SAP. Studying differential expression proteins may provide a new theoretical basis and molecule target for QYG treating SAP.

KEYWORDS severe acute pancreatitis; pancreatic tissue; proteomics; mass chromatographic analysis; Qingyi Granule

重症急性胰腺炎 (severe acute pancreatitis, SAP) 为临床常见急危重症, 近年来发病率有上升趋势, SAP 易并发全身炎症反应综合征 (systemic inflammatory response syndrome, SIRS) 和多器官功能障碍综合征 (multiple organ dysfunction syndrome, MODS), 病死率高达 30%。然而其发病机制目前尚未研究清楚, 进一步探索 SAP 病理生理过程, 尤其是胰腺病变早期事件是必要的。近年来, 由于蛋白质组学技术灵敏度高、通量大、重复性好的特点, 使其在疾病诊断和寻找药物治疗靶点方面得到了广泛应用, 但在 SAP 发病机理及药物干预研究方面鲜见报道。清胰颗粒 (Qingyi Granules, QYG) 组方源于院内制剂清胰汤, 已被临床验证为治疗 SAP 的有效经验方^[1]。本研究通过对模型大鼠胰腺组织总蛋白行双向电泳 (two-dimensional electrophoresis, 2-DE)、图谱和质谱分析, 并探讨 QYG 对 SAP 大鼠胰腺组织中蛋白表达影响, 找出 SAP 病变中关键蛋白, 为进一步探索 QYG 治疗 SAP 的机制奠定基础。

材料与方法

1 动物 8 周龄 SD 大鼠, 雌雄不限, 体重 (220 ± 15) g, 购自广东省医学实验动物中心, 合格证号: 2008A020。

2 药物、仪器与试剂 清胰颗粒 (含大黄、柴胡、黄芪、芒硝、白芍和木香等), 广东药学院院内制剂, 5 g/包; 4800 MALDI-TOF/TOF 串联时间飞行质谱仪、GPS Explore V3.6 数据分析软件 (STC, 美国 Applied Biosystems 公司); MASCOT (V2.1, Matrix Science, London, U.K) 蛋白质质谱检索软件; Ettan

IPGphor 等电聚焦仪、Image Scanner 扫描仪、Image Master 图像分析软件、固相 pH 梯度干胶条 (pH3 – 10 NL, 13cm)、荧光染色试剂盒 (Deep purple) 均购自 GE 公司; 胰蛋白酶 (Trypsin, Promega 公司); 牛黄胆酸钠 (sodium tauro cholate, STC, 美国 Sigma 公司); 戊巴比妥钠 (德国进口分装); 其他试剂为国产分析纯。

3 方法

3.1 分组 36 只 SD 大鼠, 随机分成 SAP 组和 QYG 组, 每组 18 只。QYG 组建模后每 12 h 1 次 QYG 1 g 对水 1 mL (W: W=1:1) 灌胃 [1 mL/(100 g · 只)], SAP 组以生理盐水替代, 共给药 4 次。术后每 24 h 取 6 只大鼠处死, 24 h 和 72 h 两个时间点大鼠胰腺蛋白组学研究由课题组其他成员完成, 本实验完成 48 h 时间点大鼠胰腺组织蛋白组学研究和分析。

3.2 SAP 模型的建立 SD 大鼠术前禁食 12 h, 自由饮水, 经腹腔注射 3% 戊巴比妥钠 (1 mL/100 g) 麻醉满意后, 开腹寻找到胰胆管, 5 号针头经十二指肠乳头逆行插入胰胆管, 无损伤静脉夹临时阻断胰胆管下端后加压注射 5% STC (0.1 mL/100 g) 诱导大鼠 SAP 模型, 注毕 2 min 拔针, 观察胰腺充血、水肿但无出血后复位胰腺和十二指肠, 关腹, 术后禁食不禁饮水, 具体操作流程和细节参照文献 [2]。

3.3 样品处理及组织总蛋白的提取 取大鼠胰腺组织, 迅速放入预冷 PBS 中漂洗, 洗除血液, 吸尽残液, 放入培养基冰浴, 取 100 mg 组织充分剪碎, 加入裂解液 450 μ L、苯甲基磺酰氟 (phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF, 200 mmol/L) 1.35 μ L 低温下匀浆并超声波震碎后 4℃ 下 20 000 r/min 离心 30 min, 取上清液移至新 EP 管, 按蛋白质纯化试剂盒

说明书进行纯化蛋白,再蛋白浓度测定。

3.4 双向凝胶电泳与图像采集分析 将蛋白样品均匀加入等电点聚焦(isoelectric focusing, IEF)专用的胶条槽,放入 IPG 干胶条行第一向电泳,IEF 参数设置为:30 V,12 h;500 V,1 h;1 kV,1 h;8 kV 至总数为 64 kV·h;2 kV 保持 10 h。IEF 结束后,平衡胶条,将胶条转移至 12.5%的 SDS-PAGE 胶面上行第二向电泳,参数设置为:恒流 15 mA/胶,15 min 后改为 30 mA/胶,直至电泳指示剂到达凝胶底部。凝胶按 Deep purple 说明书进行染色,使用 Image Scanner 扫描图片,Image Master 软件进行图谱分析,寻找差异点,使用 student-test 法选取蛋白斑点表达差异 >2 , $P < 0.05$ 的斑点作为差异表达蛋白。

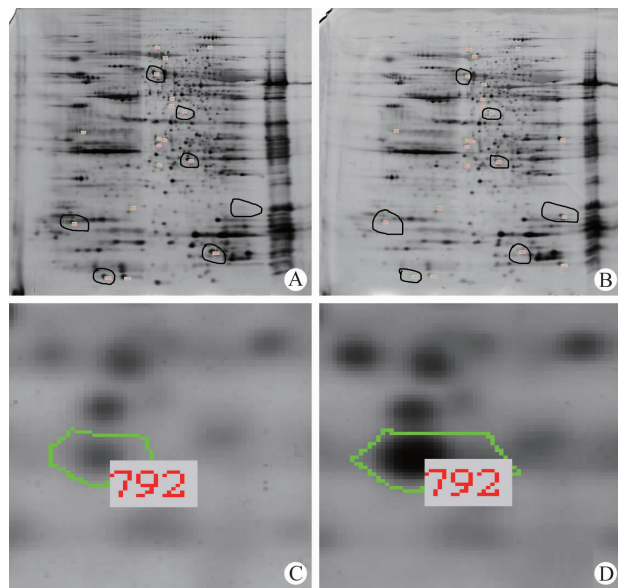
3.5 质谱图的获取与质谱数据的分析 将染色的凝胶放入 Spot handling work station 进行全自动蛋白质斑点切取、胰酶消化、萃取、样品手工除盐后在质谱靶上进行 MALDI-TOF/TOF 分析,获得肽质量指纹图谱 PMF 和 4 个最高离子峰的肽段 MS/MS 图谱。获得一级和二级质谱数据使用 GPS Explore 软件分析,并整合成一个文件使用 Mascot 软件在 IPI-Human 数据库中进行搜索,参数设置为:种属 Homosapiens 肽段;母离子质量容差:30~60 ppm;片段离子质量容差:0.2~0.3 Da;去除已知的角蛋白污染峰,蛋白质检索得分 >60 的认为是成功鉴定的蛋白质。

结 果

1 大鼠 SAP 的判定 建模后大鼠出现精神状态变差、活动减少,呈痛苦蜷缩状,饮水减少等表现。处死 48 h 两组 SAP 大鼠,肉眼和光镜下观察胰腺实质有不同程度的出血、水肿、坏死及钙化灶形成,胰腺旁见少量组织坏死和体积不等的腹水。光镜下见胃肠、肝脏、肺和肾脏等器官有水肿、渗出、点状出血和坏死。模型结果与本课题组以往诱导的 SAP 模型相符^[3]。

2 双向电泳凝胶图像分析结果(图 1) 每张胶得到 $>1\,000$ 个蛋白质点,将相同时段两组凝胶电泳图谱进行蛋白质斑点匹配分析和重复性分析发现蛋白质斑点在相同位置上均有较好的重复性。经凝胶图像处理软件分析胰腺蛋白组学变化:48 h 时间点 QYG 组与 SAP 组共有 22 个差异点,其中 5 个点蛋白上调,17 个点下调。

3 质谱分析结果(图 2) 从 48 h 点两组模型胰腺组织的 2-DE 图谱中比较选取表达差异超过 4 倍且稳定的蛋白斑点 9 个进行 MALDI-TOF-MS/MS 分析,得到蛋白质点的肽质量指纹图 PMF,9 个点共获取



注:A、B 分别为 48 h 时间点 SAP 组与 QYG 组的胰腺 2-DE 图,C、D 为两者的蛋白差异点

图 1 胰腺组织双向电泳(2-DE)图谱

7 张 PMF,如丝氨酸蛋白酶抑制剂(Serpin b1a) 39 kDa 蛋白的 PMF 图(图 2)。质谱分析和数据库检索共鉴定出 7 种蛋白质,包括 Serpin b1a 39 kDa 蛋白、Serpin b1a 43 kDa 蛋白、硫氧还蛋白过氧化物酶-IV (Prx IV)、糜蛋白酶样蛋白(ClpS)、 γ -肌动蛋白(Actg1)、谷氨酰-脯氨酰 tRNA 合成酶(Eprs)、短链羟酰辅酶 A 脱氢酶(Hadhsc)。该结果显示差异表达蛋白以小分子蛋白为主,且有同源异构现象,推测在 SAP 病变过程中有许多蛋白质出现结构变异,导致胰腺腺泡细胞功能失调或者障碍,最终使疾病恶化发展。

4 蛋白质鉴定结果(表 1) 应用 PMF 数据,通过 Masco 查询软件搜索 IPI-Human (V3.36) 数据库,进行蛋白质点的肽质量指纹谱与蛋白质数据库的比较来鉴定蛋白质,其中匹配分数大于 60 分的共有 7 个,详见表 1。

讨 论

尽管目前对 SAP 的发病机理有了一定认识,但对 SAP 胰腺病变早期事件了解甚少,确切发病机制仍不清楚,且病程演变受多因素影响,如胰酶自身消化、炎症反应、免疫调节等。蛋白质是执行基因功能的载体,在疾病的发生、发展中扮演重要角色。胰腺低分子量蛋白组学分析是研究急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)病理学过程的补充手段^[4],可鉴别胰腺组织损伤变化特征及发现新的可能的 AP 生物标记^[5],用该技术对 AP 患者血清学分析有助于鉴别轻型急性胰腺炎(mild acute pancreatitis, MAP)和 SAP^[6]。

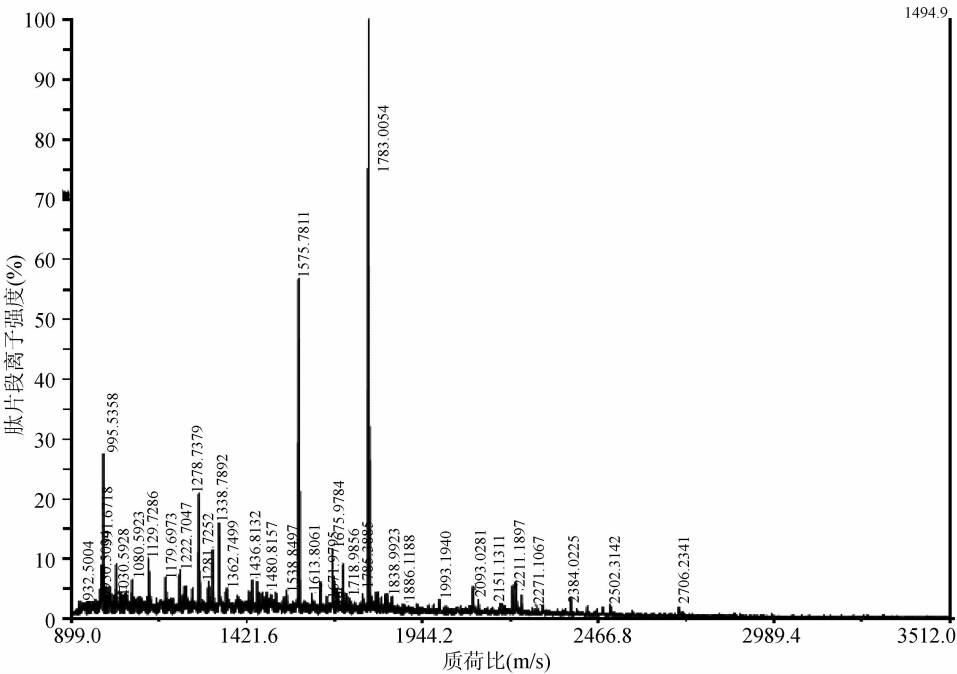


图 2 差异表达蛋白 Serpin b1a 39 kDa 的肽质指纹图

表 1 48 h 时间点 QYG 组与 SAP 组两组间差异蛋白点的鉴定结果

编号	IPI-Human	蛋白名称	评分	分子量	等电点	表达水平	功能
1	IPI00565582	丝氨酸蛋白酶抑制剂 b1a (43 kb)	354	43 016.0	6.20	↓	代谢
2	IPI00777187	丝氨酸蛋白酶抑制剂 b1a (39 kb)	210	39 144.0	6.48	↑	代谢
3	IPI00208209	硫氧还蛋白过氧化物酶-IV	96	30 988.0	6.18	↑	代谢
4	IPI00212799	糜蛋白酶样蛋白	250	12 244.0	8.04	↓	代谢
5	IPI00476855	谷氨酰-脯氨酰 tRNA 合成酶	68	166 675.9	7.44	↓	代谢
6	IPI00764461	γ-肌动蛋白	70	75 165.9	8.54	↓	结构
7	IPI00205157	短链羧酰辅酶 A 脱氢酶	62	34 425.9	8.83	↓	代谢

本研究基于以上发现,旨在应用 QYG 干预 SAP 后观察胰腺组织蛋白组学变化。本课题组前期工作已对 24 h 时间点大鼠胰腺组织蛋白组学进行初步探讨^[2],取得了一定成效,现对 48 h 时间点两组模型胰腺组织进行蛋白组学分析,共发现差异表达蛋白 22 个点,选定表达差异较大且稳定的 9 个点进行质谱分析,最终鉴定出 7 种蛋白,这些表达有差异的蛋白是从模型大鼠胰腺组织中比较分析而来,故可认为是 SAP 相关蛋白。

已被鉴定的 48 h 时间点 QYG 组与 SAP 组有差异表达蛋白质为:Serpin b1a 43 kDa 和 Serpin b1a 39 kDa 为分子量不同的 Serpin b1a 肽片段,Serpin b1a 亚型可能有抑制特异血浆蛋白酶为机体提供保护作用^[7],在先天免疫中也有重要作用^[8],在鼠类大肠炎模型中表达上调^[9],但目前尚未见到 Serpin b1a 与 SAP 发病的相关报道。本组中 Prx IV 表达增多,其功能为参与核转录因子抑制因子-κappaB (inhibitor of nuclear factor κappa B, I-κappaB)磷酸化和氧化还原反应。核转录因子-κappaB (nuclear fac-

tor κappaB, NF-κappaB)在 SAP 早期即被大量激活并调控 TNF-α 表达^[10],I-κappaB 磷酸化下调 NF-κappaB。而 Wang HQ 等^[11]发现 TNF 相关编程性细胞死亡诱导配位在转录水平抑制 Prx IV 基因表达,也有可能促进细胞死亡。本组中 Eprs、ClpS、Hadhsc 和 Actg1 表达均减少。Eprs 可延迟转录 γ-激活抑制因子 (gamma-activated inhibitor of translation, GAIT)通路激活^[12],对炎症反应消除有抑制作用。ClpS 有酶激活剂活性作用,与 ClpA 相互作用,经 ClpAP 路径以 N 端法则降解基序促进蛋白质降解^[13]。Hadhsc 潜在具有调节胰岛素分泌作用^[14],突变该基因可导致家族性胰岛机能亢进低血糖症。Actg1 参与细胞骨架组成和钙离子反应。由此推测 Serpin b1a 43 kDa、Prx IV 和 Eprs 参与了 SAP 早期炎症反应调节,而 Serpin b1a 39 kDa 可能与微循环障碍和免疫调节相关,过度炎症反应可能抑制 Prx IV 表达,使病情恶化;ClpS 可能参与激活各种消化酶,值得作为 SAP 治疗靶点进一步研究;而 Actg1 也许参与腺泡细胞钙离子平衡调节。

中药治疗 SAP 历史悠久, QYG 由清胰汤组方加减并转变剂型而来, 清胰汤为临床治疗 SAP 的有效经验方, 其主要功效为: 清热解毒、通里攻下、活血化瘀和利胆等。经 QYG 干预 48 h 后胰腺组织中 Serpin b1a 43 kDa 和 Serpin b1a 39 kDa 的表达被逆转, 前者被下调, 后者和 Prx IV 均明显上调; Prx IV 使过氧化物易于从内质网上清除^[15], 而 Eprs、ClpS、Hadhsc、Actg1 表达均被下调。SAP 时胰腺存在微循环障碍及再灌注损伤, 部分血浆蛋白经受损的血管渗透进入胰腺组织中, 经 QYG 治疗后胰腺微循环得到改善, 蛋白质渗出减少, 病理损伤较 48 h SAP 组减轻, 临床症状改善明显。本组蛋白组学变化得出 QYG 能有效改善胰腺循环, 促进有毒有害物质排泄, 减轻 SAP 炎症反应和氧化应激, 减少蛋白酶的激活。研究表明 SAP 早期予 QYG 干预能减轻胰腺病理损伤, 缩短病程, 改善预后, 尚可能有稳定腺泡细胞膜和减轻钙超载作用。

综上所述, 蛋白组学和质谱分析技术是研究 SAP 发病机理和药物作用机制的有效工具。本研究得出 7 个 SAP 相关蛋白, 它们可能参与 SAP 的启动、炎症扩散和并发症发生, Prx IV 和 Clps 有可能成为 SAP 病情评估和治疗靶点的生物标记。本研究显示 QYG 治疗 SAP 为一多效方剂, 针对 SAP 病变中炎症反应、氧化应激和免疫调节等多个环节起调节作用, 减轻胰腺损伤, 加快康复进程。本课题组正在进一步横向细化时间段研究 SAP 大鼠胰腺组织中蛋白组学变化, 并纵向深入探讨差异表达蛋白的分子功能, 同时探索 QYG 对 SAP 蛋白组学及其表达差异蛋白分子通路的影响。

参 考 文 献

- [1] 吴瑞乔, 陈越, 刘良培, 等. 清胰汤与皮硝联合应用治疗急性重症胰腺炎临床观察[J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 27(10): 924-926.
- [2] 龙友明, 肖小玉, 陈垦, 等. 大鼠重症急性胰腺炎胰腺蛋白组学的初步研究[J]. 广东药学院学报, 2010, 26(3): 309-311.
- [3] 谢文瑞, 阳小雅, 陈垦, 等. NBD 多肽对大鼠重症急性胰腺炎作用的初步研究[J]. 中华胰腺病学杂志, 2009, 9(3): 184-186.
- [4] Lassout O, Pastor CM, Fétaud-Lapierre V, et al. Analysis of the pancreatic low molecular weight proteome in an animal model of acute pancreatitis[J]. J Proteome Res, 2010, 9(9): 4535-4544.
- [5] Fétaud V, Frossard JL, Farina A, et al. Proteomic profiling in an animal model of acute pancreatitis[J]. Proteomics, 2008, 8(17): 3621-3631.
- [6] Papachristou GI, Malehorn DE, Lamb J, et al. Serum proteomic patterns as a predictor of severity in acute pancreatitis[J]. Pancreatology, 2007, 7(4): 317-324.
- [7] Ragan EJ, An CJ, Yang CT, et al. Analysis of mutually exclusive alternatively spliced serpin-1 isoforms and identification of serpin-1 proteinase complexes in *Manduca sexta* hemolymph[J]. J Biol Chem, 2010, 285(38): 29642-29650.
- [8] Benarafa C, Priebe GP, Remold-O'Donnell E. The neutrophil serine protease inhibitor serpinb1 preserves lung defense functions in *Pseudomonas aeruginosa* infection[J]. J Exp Med, 2007, 204(8): 1901-1909.
- [9] Naito Y, Takagi T, Okada H, et al. Identification of inflammation-related proteins in a murine colitis model by 2D fluorescence difference gel electrophoresis and mass spectrometry[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2010, 25(1): S144-S148.
- [10] 王念林, 陈垦, 龙友明, 等. 核因子- κ B 在大鼠急性坏死性胰腺炎中作用的实验研究[J]. 胰腺病学, 2005, 5(2): 93-96.
- [11] Wang HQ, Du ZX, Liu BQ, et al. TNF-related apoptosis-inducing ligand suppresses PRDX4 expression[J]. FEBS Lett, 2009, 583(9): 1511-1515.
- [12] Jia J, Arif A, Ray PS, et al. WHEP domains direct noncanonical function of glutamyl-prolyl tRNA synthetase in translational control of gene expression[J]. Mol Cell, 2008, 29(6): 679-690.
- [13] De Donatis GM, Singh SK, Viswanathan S, et al. A single ClpS monomer is sufficient to direct the activity of the ClpA hexamer[J]. J Biol Chem, 2010, 285(12): 8771-8781.
- [14] Martens GA, Vervoort A, Castele MV, et al. Specificity in beta cell expression of L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, short chain, and potential role in down-regulating insulin release[J]. J Biol Chem, 2007, 282(29): 21134-21144.
- [15] Tavender TJ, Bulleid NJ. Peroxiredoxin IV protects cells from oxidative stress by removing H_2O_2 produced during disulphide formation[J]. J Cell Sci, 2010, 123(15): 2672-2679.

(收稿: 2010-11-11 修回: 2012-09-21)