

脾阳虚证模型大鼠回肠的比较蛋白质组学探析

于 漫 吕 凌 王彩霞 贾连群

摘要 目的 基于蛋白质组学技术筛选与脾阳虚证相关的差异蛋白质,为进一步从分子水平上探讨脾阳虚证的本质提供有力的实验依据。**方法** SPF 级 SD 大鼠 36 只,随机分为正常对照组(16 只)和脾阳虚证组(20 只)。采用饮食不节、劳倦过度及苦寒伤阳药联合应用的方法,塑造脾阳虚证模型大鼠。分离、提取脾阳虚证组与正常对照组大鼠回肠的总蛋白,行双向凝胶电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)技术,应用 Delyder™ 2D 6.5 图像分析软件识别差异蛋白点,应用 MALDI 串联飞行时间质谱(MALDI-TOF/TOF)技术获得相应肽质量指纹图, Mascot 搜库鉴定差异蛋白质。**结果** 经过统计学和模糊数学判定,脾阳虚大鼠模型造模成功。蛋白质组学初步鉴定,得到涉及细胞骨架、能量代谢及信号传导等多方面的差异表达的蛋白质 8 个,其中 4 个表达上调的蛋白分别是:结蛋白(desmin)、角蛋白 8(cytokeratin8, CK8)、丙酮酸激酶(pyruvate kinase, PK)、埃兹蛋白(ezrin);4 个表达下调的蛋白分别是:甘油醛三磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、角蛋白 19(cytokeratin19, CK19)、角蛋白 1(cytokeratin1, CK1)、肌动蛋白(actin)。**结论** 脾阳虚证状态下机体能量代谢速率减慢,能量生成减少,回肠绒毛蛋白结构变化,吸收消化功能减弱,这可能是脾阳虚证的病理机制。

关键词 脾阳虚证;比较蛋白质组学;回肠

Comparative Proteomics Analysis of the Ileum of Pi-yang Deficiency Model Rats YU Man, LU Ling, WANG Cai-xia, and JIA Lian-qun Basic Medicine College, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang (100847), China

ABSTRACT Objective Based on proteomics technology, Pi-yang deficiency syndrome (PYDS) correlated differential proteins were screened, thus providing powerful experiment reliance for exploring the essence of PYDS. **Methods** Totally 36 SD rats of SPF grade were randomly divided into the normal control group ($n=16$) and the PYDS group ($n=20$). The PYDS model rats were induced by improper diet, overstrain, and administration of yang impairing bitter cold herbs. The total proteins of the ileum were separated and extracted from rats in the PYDS group and the normal control group. The differential protein dots were identified using Delyder™ 2D 6.5 image analysis software by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) technology. The finger print map of corresponding peptide qualities was obtained by applying MALDI TOF/TOF. The differential proteins were identified using Mascot search library. **Results** Judged by statistics and fuzzy mathematics, Pi-yang deficiency rat model was successfully established. Eight proteins with differential expressions involving cell skeleton, energy metabolism, and signal transduction, and so on were obtained. Of them, there were 4 up-regulated proteins, i.e., desmin, cytokeratin8 (CK8), pyruvate kinase (PK), and ezrin. Four down-regulated proteins were glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), cytokeratin19 (CK19), cytokeratin1 (CK1), and actin. **Conclusion** The pathogenesis of PYDS might be slowed energy metabolism rate, reduced energy production, changed structure of ileal villin, and weakened absorbing and digestive functions.

KEYWORDS Pi-yang deficiency syndrome; comparative proteomics; the ileum

脾居于中焦,为“后天之本”、“气血生化之源”。

脾主运化水谷精微,而这一功能主要依托于脾阳的温煦。脾阳虚衰,势必会导致机体代谢活动无法正常进行,出现水谷不化,食欲不振等消化系统疾病,也会伴有一些倦怠乏力等能量代谢方面的疾病。近年对脾阳虚证的研究已经涉及了内分泌、神经、免疫、消化等多

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30973689)

作者单位:辽宁中医药大学基础医学院(沈阳 110847)

通讯作者:王彩霞, Tel: 13940063583, E-mail: Wang_cai_@

个方面,实验手段多样,指标广泛,而蛋白质组学因其从整体上探究蛋白质与中医学理论的“整体观”不谋而合^[1],因此在众多先进技术中脱颖而出。本研究基于蛋白质组学技术,筛选与脾阳虚证相关的差异蛋白质,旨在进一步挖掘和揭示脾阳虚证的证候本质,期望获得脾阳虚证的特异性指标,为其证候本质研究提供有力的实验证据。

材料与方法

1 动物及分组 SPF 级 SD 大鼠 36 只,雌雄各半,体重(190 ± 19)g,鼠龄 3 个月,购买于北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2006-0009。雌雄分笼适应性喂养 5 天,标准固体饲料喂饲,室温 $20 \sim 23^\circ\text{C}$ 。将大鼠按照雌雄和体重,随机分为正常对照组(16 只)和脾阳虚证组(20 只)。

2 试剂及药物 试剂:IPG 胶条、丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、碘乙酰胺、CHAPS(Bio-Rad 公司,美国),DIGE 染料试剂盒(GE Healthcare 公司,美国),丙酮及乙腈(ACN,J.T.Baker 公司,美国),甘氨酸、赖氨酸、考马斯亮蓝、尿素、硫脲(Amresco 公司,美国),冰醋酸、硫酸铵、硫代硫酸镁、丙三醇、三氯乙酸(北京化工厂)。药物:番泻叶(批号:0901201)购于辽宁中医药大学附属医院药局。

3 仪器及设备 TS-8 型转移脱色摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);139 BR 垂直电泳仪、526 BR 等点聚焦仪(Amersham 公司,美国);QL-901 涡旋混合器(其林贝尔仪器制造有限公司);THE-C 恒温振荡器(江苏太仓市试验设备厂);MV-LTISKAN.MK3 酶标仪(Thermo 公司,美国);4800 质谱分析仪(ABI 公司,美国);超声波细胞粉碎机隔音箱(宁波新芝生物科技股份有限公司);DH-II 旋转混合仪(宁波新芝生物科技股份有限公司);一向聚焦仪(GE Healthcare 公司,美国);85-2 型恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器有限公司)。

4 方法

4.1 模型建立及评估 采用脾阳虚复合因素造模方法进行模型塑造^[2],造模共分两个阶段(不含适应性喂养阶段),每个阶段 8 天。第 1 阶段采用猪油(1 mL/100 g)、甘蓝[100 g/(只·天)]单双日轮流灌胃,并配合游泳耐力极限,建立脾气虚模型。第 2 阶段(造模第 13 天)在此基础上,加入苦寒伤阳的番泻叶(1 mL/100 g)灌胃连续 8 天,建立脾阳虚模型(图 1)。

运用模糊数学中简单模式识别方法建立模糊数学模型^[3],即把不同权数 a_i 相应地乘以各评价因素的隶

属度 S_i ,再相加,得出每一大鼠造模程度的隶属度值,按最大隶属原则进行识别,在判断之前先规定一个阈值:范围为 $0 \sim 1$,若 $S \text{ 脾虚} < \lambda$,则认为不能识别;若 $S \text{ 脾虚} \geq \lambda$,则认为可识别,并配合脾阳虚证大鼠形体略见渐瘦,粪便时软时干,偶有便溏,后期进食量明显减少,饮水量也相应减少,倦怠,懒动,眯眼,弓背等形态学表现对模型进行综合标准判。符合标准者将进入下一阶段的实验。

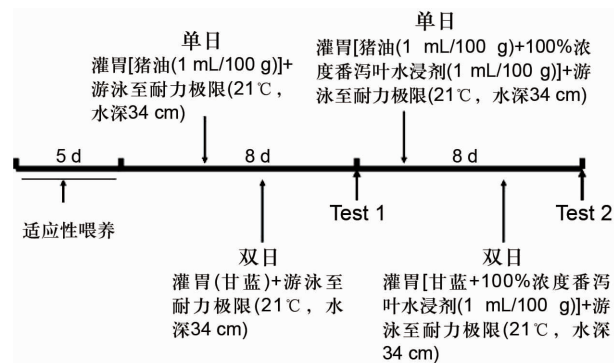


图 1 脾阳虚大鼠造模、饲养方法及模型判定时间点

4.2 样品制备 将所有实验动物用 4% 水合氯醛腹腔注射麻醉后,断头处死,分离回肠组织,在冰浴条件下,按 1:10 体积加入细胞裂解液,同时加入蛋白酶抑制剂,超声破碎组织,135 000 r/min 4°C 离心 20 min,吸取上清,采用考马斯亮蓝染色法^[4](Bradford 法)对蛋白质定量,根据浓度高低及用途的不同对上清进行分装, -80°C 保存。

4.3 双向凝胶电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE) 按照 Gorg A 等^[5]的方法,取 150 μg 总蛋白提取物与水化上样缓冲液、1% DTT 和 0.5% ~ 1% 两性电解质,共计 450 μL 混匀制成待测样品,并在聚焦盘中进行线性连续加样,将事先处理好的 24 cm IPG 预制胶条放入聚焦盘,将聚焦盘平放于 IPGphor 仪器上,设定等电聚焦参数,注意正负极,聚焦结束后直接将胶条放于 20 mL 平衡缓冲液 I (含 1% DTT)、II (含 2.5% 碘乙酰胺)中各振荡 15 min,进行第二向电泳前的平衡。将配制好的凝胶溶液超声脱气 5 min 后,加入 TEMED 及硫酸铵,混匀灌胶,用含少量溴酚蓝的 0.2% 琼脂糖密封液,将平衡好的 IPG 胶条完全覆盖,设定电泳参数,进行十二烷基硫酸钠一聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)。

4.4 双向凝胶图像扫描、导图及分析 将考马斯亮蓝染色后的凝胶,用多功能成像系统进行扫描,应用软件 Delyder™ 2D 6.5 对导出的图片进行调整和

校准、检定和定量蛋白点、注释蛋白点及像素、匹配图像、分析和整合数据等一系列处理,获得双向电泳实验结果,从而指导下一步的实验去向。

4.5 质谱分析及数据库查询 经过酶切、点靶,利用 MALDI 串联飞行时间质谱 (MALDI-TOF/TOF) 技术,使用 Mascot 搜库,挑选出达到 59 分以上的点,进一步根据质谱分析得出的蛋白质点的结果与名称,查询与中医脾阳虚证相关的差异蛋白,获得最终结果。

4.6 统计学方法 采用统计软件 SPSS 10.0 进行数据的统计处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;等级资料采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

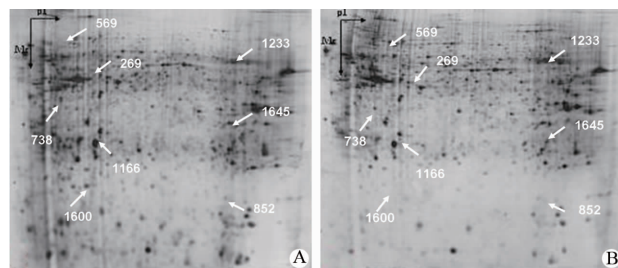
结 果

1 脾阳虚模型评价结果 脾阳虚证组大鼠相较于正常对照组,逐渐出现体重减轻、肛温及食量下降、粪便溏泻、倦怠懒动、皮毛干枯、蜷缩聚堆、眯眼弓背等症状。采用模糊数学中模式识别方法,将检测及观察所得数据带入公式中,得到综合评分值在 0.7000 ~ 0.8093 之间。当 λ 值取 0.7 时,全部达到造模要求。脾阳虚组有 2 只大鼠分别于第 10 天和第 15 天死亡。模型成功率为 94.4%。成功模型大鼠继续进行蛋白质组学检测。

2 2-DE 图谱及差异蛋白质点分析结果 (图 2 - 4,表 1) 在相同的条件下,进行了 3 次 2-DE 实验,通过 Delyder™ 2D 6.5 软件对 2-DE 图谱部分区域进

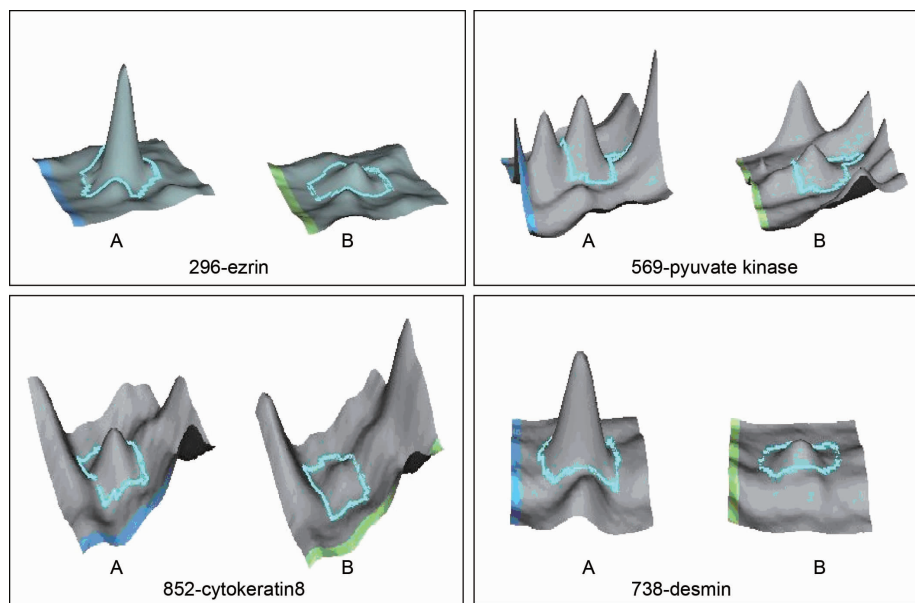
行放大分析后发现,脾阳虚证组与正常对照组间总蛋白分布模式基本相似,其蛋白点集中分布都出现在 pI 5 ~ 8 和 Mr 4 ~ 70 KD 范围区域内 (图 2)。

利用 2-DE 结合 MALDI-TOF/TOF 技术分析脾阳虚大鼠回肠蛋白质组改变,使用 Mascot 搜库,除去假定未知蛋白和重复的蛋白,剩下 8 个差异表达的蛋白点 ($P < 0.05$),其中 4 个表达上调,4 个表达下调。靶点序号 (SSP) 738 的结蛋白 (desmin)、852 的角蛋白 8 (cytokeratin8, CK8)、569 的丙酮酸激酶 (pyruvate kinase, PK)、296 的埃兹蛋白 (ezrin) 为上调蛋白;SSP 1233 的甘油醛三磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、1166 的角蛋白 19 (cytokeratin19, CK19)、1645 的角蛋白 1 (cytokeratin1, CK1)、1600 的肌动蛋白 (actin) 为下调蛋白 (图 3、4)。经过初步鉴定,将其按照蛋白质功能的不同归于细胞骨架、能量代谢及信号传导 3 大类别。具体鉴定的蛋白情况见表 1。



注:A 为正常对照组;B 为脾阳虚组;箭头所指为各个差异蛋白靶点序号

图 2 大鼠回肠蛋白质考马斯亮蓝染色 2-DE 图谱



注:A 为脾阳虚组;B 为正常对照组;下图同

图 3 表达上调的蛋白质 3D 图

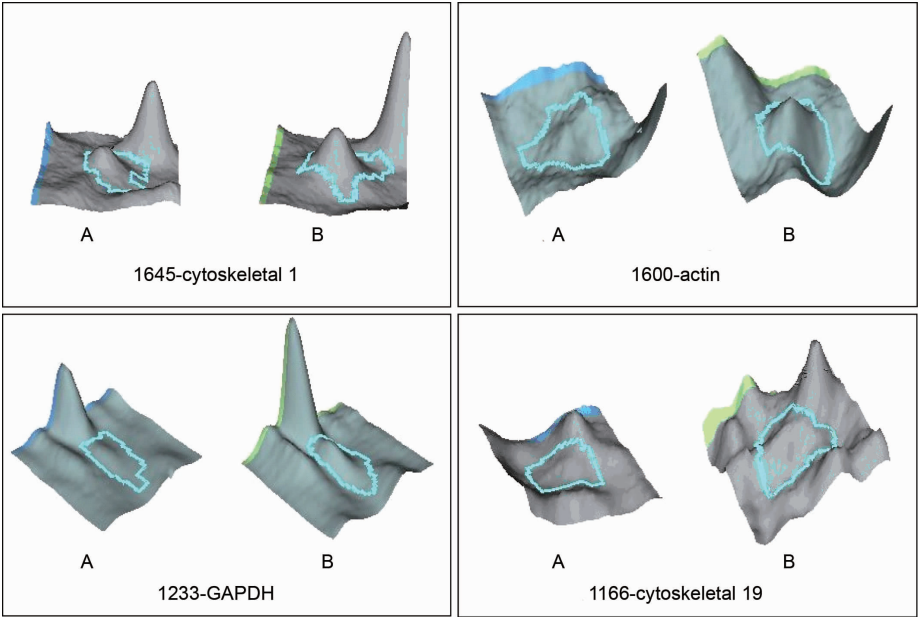


图4 表达下调的蛋白质 3D 图

表 1 Mascot 搜库脾阳虚相关蛋白质结果				
SSP	蛋白质名称	细胞归类	蛋白打分	表达情况
738	结蛋白	细胞骨架	269	↑
852	角蛋白 8	细胞骨架	249	↑
569	丙酮酸激酶	物质代谢	160	↑
1233	3-磷酸甘油醛脱氢酶	物质代谢	97	↓
1166	角蛋白 19	细胞骨架	330	↓
296	埃兹蛋白	细胞骨架	95	↑
1645	角蛋白 1	细胞骨架	105	↓
1600	肌动蛋白	细胞骨架	194	↓

注：↓表示该蛋白点在脾阳虚组表达下调；↑表示该蛋白点在脾阳虚组表达上调

讨 论

中医学认为脾脏为“后天之本”、“气血生化之源”。《脾胃论·卷上·脾胃虚实传变论》提到“元气之充足，皆由脾胃之气所伤，而后能滋养元气。若胃气之本弱，饮食自倍，则脾胃之气既伤，而元气亦不能充，而诸病之所由生也。”说明了脾主运化功能的重要性。现代中医学者秉承中医学理论，结合现代实验技术手段，从物质能量代谢、消化吸收功能、内分泌调节及其免疫形态等多角度，多方面对脾虚证进行了深入研究，为探索其本质提供了有力证据^[6]。随着后基因组学时代的到来，作为核心的蛋白质组学技术因其自身具有的整体性、多样性、动态性及其技术上的高通量、高分辨率等优势特点，近几年被广泛应用于中医药的研究中来^[6,7]。本课题基于蛋白质组学技术，筛选鉴定脾阳虚大鼠与正常大鼠回肠的差异蛋白质，得到涉及细胞骨架、能量代谢及信号传导 3 大方面的 8 个差异

蛋白,为进一步探讨脾阳虚证病理机制提供有力证据。

PK 是糖酵解途径中的主要限速酶之一,有 4 种类型的同工酶,根据其分布的部位不同,将其分为 L 型、M1 型、M2 型和 R 型。近年来,在对于 M2 型的研究中发现^[8,9],其不仅大量分布于脾脏中,同时在一些消化系统肿瘤的诊断及治疗中也存在一定的意义。本次研究发现,脾阳虚组与正常对照组比较,脾阳虚模型大鼠回肠中 PK 的表达呈上调趋势, GAPDH 的表达呈下调趋势,而两者均参与糖酵解中生成 ATP 的反应过程。在此过程中, PK 是催化磷酸烯醇丙酮酸(phosphoenolpyruvic acid, PEP)和 ADP 转变成丙酮酸和 ATP 的关键酶,而关键酶 PK 活性的改变将直接影响合成 ATP 的反应速度。同时,另一种为 ATP 合成提供高能磷酸键的化合物—1,3 - 二磷酸甘油酸的转化需要 GAPDH 的催化。综上,笔者认为,脾阳虚证模型大鼠表现的倦怠嗜卧,精神不振等有关能量代谢方面的症状,很有可能与 PK 及 GAPDH 的异常表达有关。

Actin 是微丝的主要成分,有 ATP 结合位点,具有 ATP 酶活性,能催化 ATP 的水解^[10]。微丝作为细胞骨架的组成部分之一,在细胞收缩(如肌细胞)和物质运输过程中发挥作用。脾阳虚组相较于正常组 actin 的表达量下调,说明微丝结构发生变化,从而进一步影响实验大鼠回肠部分的功能改变。笔者推测,actin 的表达量下降很可能会影响到小肠绒毛的结构,进而影响其消化吸收功能,这可能是脾阳虚证时表现出消化吸收功能障碍的原因之一。

Ezrin 是 ERM 家族(ezrin、radixin、moesin、merlin)中的一种膜细胞骨架蛋白,主要存在于细胞浆中,起到参与细胞骨架的构成、细胞间的识别及信号转导的作用。有研究指出^[11,12],在磷酸化的作用下,出现活化现象的 ezrin 与 CD44 等跨膜蛋白相连,参与黏附分子介导的细胞黏附功能并维持细胞表面的形态发育等。这也可能与脾阳虚证时 ezrin 的表达上调的机制相同。

Cytokeratin 是细胞骨架的中间丝蛋白家族中最复杂的一类,是在上皮细胞发生、分化、成熟过程中逐渐形成的,与上皮细胞有着密不可分的关系。目前已知的角蛋白已达 30 余种,其不但可以维持上皮细胞及细胞器结构功能的完整,还可以参与多种蛋白质的合成、细胞内的信号转导,调节细胞间的黏附和运动功能^[13]。而本次研究发现差异表达的 CK1、CK19 以及 CK8,很有可能是导致肠绒毛上皮结构形态及功能变化的关键因素,而肠绒毛的这种变化,将会直接影响消化吸收功能。这可能是脾阳虚时运化功能减退的机制之一。

Desmin 是主要中间纤维蛋白之一,尤其是在维持心肌细胞形态、参与细胞内物质、信息及能量交换等方面起到重要作用。近些年的研究发现 desmin 的表达异常不仅可影响细胞骨架结构,还能限制线粒体间的能量传递^[14]。由此,笔者推测,本研究中回肠组织中 desmin 呈上调表达,很有可能限制线粒体间的能量传递,导致机体产能不足,能量物质缺乏,从而表现倦怠乏力、精神萎靡等症状,同时伴随的产热量下降将会导致机体畏寒怕冷的症状。这些正是脾阳虚的典型症状,所以 desmin 很有可能是脾阳虚证的关键因素之一。

总之,这些蛋白质的差异性表达可能与脾阳虚证的病理机制有关,为进一步揭示中医脾阳虚证的本质研究提供新的思路和线索,也为从分子水平上揭示脾阳虚证的本质提供了有力的实验依据。

参 考 文 献

[1] Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, et al. Progress with gene product mapping of the Mollicutes: mycoplasma genitalium [J]. Electrophoresis, 1995, 16(7): 1090 - 1094.

[2] 蔓素云,王耀斌.脾虚证动物模型造模研究方法及治疗概述[J].辽宁中医学院学报, 2002, 4(4): 257 - 258.

[3] 陈雷,李德新,崔家鹏,等.用模糊数学中模式识别方法进行脾气虚大鼠模型评价的实验研究[J].中国中医基础医学杂志, 2006, 12(2): 118 - 120.

[4] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analyst Biochem, 1976, 72(1 - 2): 248 - 254.

[5] Gorg A, Obermaier C, Boguth G, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients [J]. Electrophoresis, 2000, 21(6): 1037 - 1053.

[6] 王彩霞,李德新,王淑娟,等.脾虚衰老大鼠红细胞膜 ATP 酶活性及海马神经元 PKC 活性的变化[J].中医药学刊, 2005, 23(8): 1362 - 1364.

[7] 李德新,易杰.脾虚证大鼠肝、脾组织蛋白激酶 C 活性变化的比较研究[J].中国中西医结合杂志, 2004, 24(6): 229 - 231.

[8] Schneider J, Bitterlich N, Schulze G. Improved sensitivity in the diagnosis of gastrointestinal tumors by fuzzy logic based tumor marker profiles including the tumor M2-PK [J]. Anticancer Res, 2005, 25(3A): 1507 - 1515.

[9] Lftner D, Mesterharm J, Akrivakis C, et al. Tumor type M2 pyruvate kinase expression in advanced breast cancer [J]. Anticancer Res, 2000, 20(6D): 5077 - 5082.

[10] 贺淹才.肌动蛋白和肌动蛋白基因的研究进展[J].生命的化学, 2002, 22(3): 248 - 250.

[11] 卢航青,郑杰.埃兹蛋白:生物学特征及其在肿瘤转移中的作用[J].细胞生物学杂志, 2005, 27(3): 257 - 262.

[12] 吴文峰,辛军,伍伯聪,等.埃兹蛋白和上皮型钙黏蛋白在肾透明细胞癌的表达及意义[J].现代医药卫生, 2010, 26(18): 2731 - 2733.

[13] 李广志,白兆震.角蛋白的分子生物学研究及其单克隆抗体的应用[J].国外医学皮肤性病学分册, 1996, 22(3): 146 - 148.

[14] 陈小波,余祖滨,闵家新,等.大鼠心肌挫伤后细胞结蛋白破坏与钙超载的实验研究[J].第三军医大学学报, 2011, 33(10): 991 - 993.

(收稿:2012-07-22 修回:2012-10-23)