

· 基础研究 ·

基于 iTRAQ 技术研究丹参酮 II A 对高脂血症大鼠肝脏蛋白质的影响

马艺鑫^{1,2} 贾连群^{1,2} 宋 罔^{1,2} 王俊岩^{1,2} 冷 雪^{1,2} 张 妮^{1,2} 杨关林^{1,2}

摘要 目的 应用相对和绝对定量同位素标记技术(iTRAQ)研究丹参酮 II A 对高脂血症大鼠肝脏蛋白质组表达的影响,探讨丹参酮 II A 对肝脏保护的作用。**方法** 24 只 SD 大鼠随机分为空白对照组、高脂血症组和丹参酮组,每组 8 只。空白对照组每日给予普通大鼠饲料喂饲。高脂血症组和丹参酮组给予高脂饲料喂饲,4 周后丹参酮组予丹参酮 II A 磺酸钠 10 mg/(kg·d) 腹腔注射,空白对照组、高脂血症组给予等体积的磷酸盐缓冲生理盐水腹腔注射。用药 8 周后检测大鼠血脂、肝功能情况以及肝脏组织形态学变化。分离提取肝脏总蛋白,以 iTRAQ 试剂标记后进行质谱检测并以软件分析差异表达的蛋白质,用 Western blot 方法验证部分差异蛋白的表达趋势。**结果** 与空白对照组比较,高脂血症组血清 TC、TG、LDL-C、ALT、AST 水平升高($P < 0.01$),HDL-C 水平降低($P < 0.01$);与高脂血症组比较,丹参酮组血清中 ALT、AST 水平降低($P < 0.05$)。iTRAQ 技术分析发现:丹参酮组肝脏中 CES1、Apoa1、Acots2、3-KAT 及细胞色素 P450 家族 Cyp3a2、Cyp3a18、Cyp4a3、Cyp2b2、Cyp2c23 这 9 个差异蛋白表达量上调,Tkt 及 eNT 表达下调。Western blot 验证差异蛋白 CES1、Apoa1、Acots2 变化趋势与蛋白质组结果相一致。**结论** 丹参酮 II A 可能通过促进胆固醇逆向转运、脂肪酸氧化,改善肝脏代谢功能,减少肝脏脂质沉积,达到其肝脏保护作用。

关键词 丹参酮 II A;高脂血症;相对和绝对定量同位素标记;肝脏

Effects of Tanshinone II A on Liver Proteome Expression of Hyperlipidemia Rats by iTRAQ Technology MA Yi-xin^{1,2}, JIA Lian-qun^{1,2}, SONG Nan^{1,2}, WANG Jun-yan^{1,2}, LEN Xue^{1,2}, ZHANG Ni^{1,2}, and YANG Guan-lin^{1,2} 1 Key Laboratory of Ministry of Education for TCM Viscera State Theory and Applications, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang (110847); 2 Research Center for Translational Medicine of Traditional Chinese Medicine, Shenyang (110847)

ABSTRACT Objective To study the effects of Tanshinone II A on the liver proteome expression of hyperlipidemia rats by isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) technology, and to observe its protection for liver. **Methods** Totally 24 SD rats were randomly divided into the blank control group (C group), the high fat hyperlipidemia group (HFH group), and Tanshinone II A treatment group (TAN group), 8 in each group. Rats in the C group were fed with common forage. High fat forage was fed to rats in the HFH group the TAN group. Sodium Tanshinone II A sulfonate ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) was intraperitoneally injected to rats in the TAN group 4 weeks later. Equal volume of phosphate buffered saline was intraperitoneally injected to rats in the C group and the HFH group. After 8-week medication, blood lipid levels, liver function, and histomorphological changes of liver were detected. The total protein of liver was extracted and labeled by iTRAQ. Then differentially expressed proteins were detected by mass spectrometric detection and analyzed by software. The tendency of partial differentially expressed proteins

基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(No. 81202834);国家重点基础研究发展计划(“973”计划)资助项目(No. 2013CB531704)

作者单位:1. 辽宁中医药大学中医脏象理论及应用教育部重点实验室(沈阳 110847);2. 辽宁省中医转化医学研究中心(沈阳 110847)

通讯作者:贾连群, Tel: 024-31205891, E-mail: jllq-8@163.com

DOI: 10.7661/j. cjim. 20170315. 041

were detected by Western blot. Results Compared with the C group, the levels of TC, TG, LDL-C, ALT, and AST increased ($P < 0.01$), and the HDL-C level decreased ($P < 0.01$) in the HFH group. Compared with the HFH group, the levels of ALT and AST decreased ($P < 0.05$) in the TAN group. iTRAQ technology analysis showed that 9 differentially expressed proteins such as CES1, ApoA1, Acots2-KAT, Acots3-KAT, and cytochrome P450 family proteins (Cyp3a2, Cyp3a18, Cyp4a3, Cyp2b2, Cyp2c23) were up-regulated in the TAN group. Expressions of Tkt and eNT were down-regulated in the TAN group. Results proved by Western blot (changing tendency of differentially expressed proteins such as CES1, ApoA1, Acots2) were consistent with proteome expression results. Conclusions Tanshinone II A might improve liver metabolism and reduce liver lipid deposition possibly by promoting counter transport of cholesterol and fatty acid oxidation, thus protecting the liver.

KEYWORDS Tanshinone II A; hyperlipemia; isobaric tags for relative and absolute quantitation; liver

随着人们生活水平的提高,高脂饮食所导致脂代谢紊乱对人们的健康构成严重威胁,是动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)等心血管疾病的主要病因之一。肝脏在脂质代谢中起着关键作用。丹参酮 II A 是活血化瘀药丹参的一种醇溶性成分,具有活血化瘀的作用。有研究表明,应用丹参酮 II A 等活血化瘀药物为主的方法改善肝脏脂质代谢紊乱取得了较好疗效^[1-3]。但是对于其疗效机制的研究尚不全面,蛋白质组学技术的出现,为探究丹参酮 II A 对肝脏保护作用的机制和原理提供了全新而且更加全面的方法。相对和绝对定量同位素标记(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)技术与高度敏感性和准确性的串联质谱及多维液相色谱联用技术已成为蛋白质定性和定量研究的主要工具之一^[4]。本实验以高脂血症大鼠肝脏组织为研究对象,用 iTRAQ 技术对丹参酮 II A 作用下肝脏组织的蛋白质组进行质谱检测,寻找和发现有明显表达差异的蛋白质,为阐明丹参酮 II A 对高脂血症大鼠肝脏蛋白质的影响提供实验依据。

材料与方法

1 动物 健康 SD 大鼠 24 只,SPF 级雄性,体重(300 ± 10) g,购买于北京维通利华实验动物技术有限公司,生产合格证号:SCXK(京)2012-0001。于辽宁中医药大学实验动物中心饲养,自由摄食与饮水。

2 试剂与仪器 丹参酮 II A 磺酸钠注射液购自上海第一生化药业有限公司;TG、TC、HDL-C、LDL-C、ALT、AST 测定试剂盒,均购自四川迈新生物技术有限公司;油红 O、乙腈、甲酸、三氯乙酸、丙酮、聚乙烯吡咯烷酮(PVPP)、二硫苏糖醇(DTT)、苯甲基磺酰胺(PMSF)、乙二胺四乙酸(EDTA)、四乙基溴化铵(TEAB)等均购自 Sigma 公司;iTRAQ 试剂购自 Applied

Biosystems 公司;BSA 蛋白定量测定试剂盒购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司;兔抗 Liver Carboxylesterase 1、a cyl-CoA Thioesterase 2、APOA1 BP、 β -actin 多克隆抗体购自 Abcam 公司;HRP 标记山羊抗兔 IgG(H+L)购自碧云天生物技术公司;化学发光底物购自 Thermo 公司。全自动生化分析仪(日本东芝公司)、电泳仪(Bio-Rad 公司)MALDI-TOF/TOF 质谱仪(Thermo 公司)、强阳离子交换柱(SCX, Phenomenex 公司)、HPLC(SHIMADZU 公司)、酶标仪(Thermo 公司)、F3 型全自动荧光与可见光凝胶成像分析系统(Syngene 公司)、垂直板电泳装置(Bio-Rad 公司)、Trans-Blot SD 半干转膜仪(Bio-Rad 公司)。

3 动物模型制备及分组 24 只大鼠随机分为空白对照组、高脂血症组和丹参酮组,每组 8 只。空白对照组每日给予普通大鼠饲料饲喂。高脂血症组、丹参酮组予高脂饲料(6%蔗糖,1%谷氨酸钠,5%蛋黄粉,8%花生油,1.5%胆固醇,0.4%甲基硫氧嘧啶,0.2%胆盐,73.3%基础饲料)喂养^[5],临床常用药剂量为 $80 \sim 120 \text{ mg/70 (kg} \cdot \text{d)}$,本研究选用 $120 \text{ mg/70 (kg} \cdot \text{d)}$ 剂量,根据《中药药理实验方法》^[6],治疗组按人与大鼠体表面积比换算给药等效剂量,大鼠为人的 6.25 倍,即大鼠每天给药量为 $10 \text{ mg/(kg} \cdot \text{d)}$ 。4 周后丹参酮组予丹参酮 II A 磺酸钠 $10 \text{ mg/(kg} \cdot \text{d)}$ 腹腔注射,空白对照组、高脂血症组给予等体积的磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)腹腔注射。丹参酮组及高脂血症组继续给予高脂饲料喂饲,空白对照组则继续给予正常大鼠饲料喂养。给药 8 周后,所有大鼠禁食禁水,4%水合氯醛腹腔麻醉后腹主动脉取血并分离血清,同时,分离肝脏组织并保存于 -80°C 冰箱中。

4 指标检测及方法

4.1 血清指标检测 全自动生化分析仪检测 TC、TG、LDL-C、HDL-C 及 ALT、AST 含量。

4.2 HE 染色 用多聚甲醛固定肝脏,然后将切好的肝组织进行逐级脱水、浸蜡、包埋、切片和脱蜡,采用 HE 染色的方法,在光镜下观察肝脏结构变化。

4.3 油红 O 染色 将包埋后的肝脏固定于冰冻切片机上,行厚 5 μm 的横断面切片,4%多聚甲醛固定 5 min,浸入 60%异丙醇 40 s,浸入油红 O 工作液 15 min,60%异丙醇冲洗后蒸馏水冲洗 2 次,苏木素染色 5 min,蒸馏水冲洗 2 次,1%盐酸酒精分色 1 s,封片后在光镜下观察肝脏中脂质沉积情况。

4.4 iTRAQ 定量分析 首先从样品中提取蛋白,对提取后的蛋白样品进行还原烷基化处理,打开二硫键以便后续步骤充分酶解蛋白。用 Brandford 法进行蛋白的浓度测定,用 SDS-PAGE 检测。每个样品取等量蛋白 Trypsin 酶解,用 iTRAQ 试剂标记肽段,标记后的肽段等量混合。混合后的肽段使用强阳离子交换色谱 (Strong Cati on Exchange Choe-matography, SCX) 进行预分离,接着进行液相串联质谱 (liquid chromatography coupl ed with tan-dem mass spectrometry, LC-MS/MS) 分析。最后比较各蛋白在各样品之间的相对含量的关系,从而获得与实验相关的重要蛋白。

4.5 Western bolt 验证差异蛋白表达 称取 50 mg 肝脏组织提取总蛋白,BCA 蛋白定量法测定蛋白浓度,12% SDS-PAGE 凝胶电泳, PVDF 膜印迹。加入一抗 (1: 300) 4 ℃ 过夜,洗膜后加入二抗 (1:2 000) 室温孵育 1 h,以 β-actin 为内参,运用分析软件对蛋白点用带进行灰度值检测,以目的蛋白与内参蛋白灰度值的比值进行比较。

5 统计学方法 采用 SPSS 19.0 建立数据库,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。依据蛋白质丰度水平,当差异倍数达到 1.2 倍以上,且经统计检验其 P 值 < 0.05 时,视为差异蛋白^[7]。质谱分析选择大鼠数据库 IPI_rat_v3.87,取蛋白质评分 > 59 分、CI 在 95% 以上的数据。

结 果

1 各组大鼠血清中血脂与肝功能水平比较

(表 1) 与空白对照组比较,高脂血症组与丹参酮组 TC、TG、LDL-C、ALT、AST 水平升高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), HDL-C 水平降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$); 与高脂血症组比较,丹参酮组血清中 ALT、AST 水平降低 ($P < 0.05$), TC、TG、LDL-C、HDL-C 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2 各组大鼠肝脏病理形态学变化比较 (图 1) HE 染色结果显示:空白对照组大鼠肝脏组织结构正常,肝细胞大小均匀,细胞形态结构清晰,核圆、居中,核仁清晰可见;高脂血症组大鼠肝细胞形态不规则,细胞肿胀且脂肪空泡样变性严重,部分细胞核界限不清或消失;丹参酮组肝细胞排列层次较规则,形态结构较清晰,肝细胞水肿及空泡样改变程度减轻,核仁基本清晰可见。

油红 O 染色结果显示:空白对照组大鼠肝脏无油红着色的脂质沉积;高脂血症组大鼠肝细胞中油红着色的脂滴明显增多,且呈弥漫性分布;丹参酮组大鼠肝细胞中脂滴油红着色程度减轻。

3 丹参酮 II A 对大鼠肝脏蛋白质组表达的影响

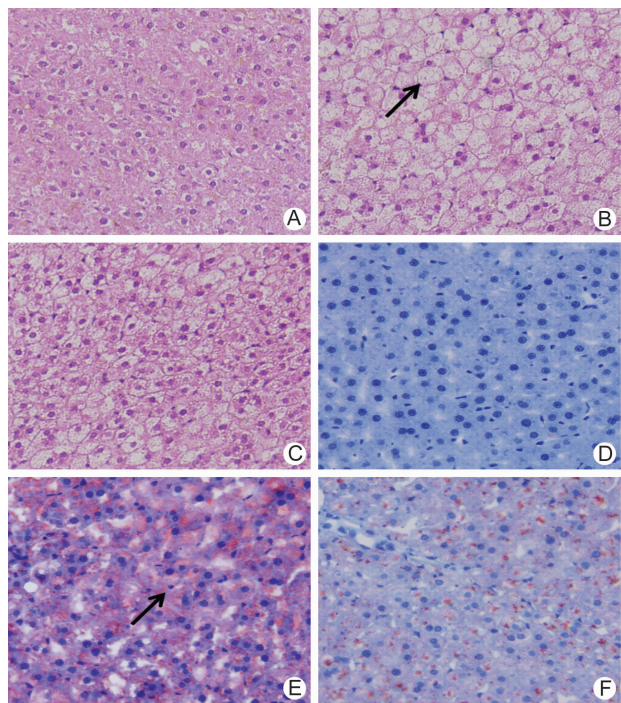
3.1 蛋白定量分析 (图 2) 结果显示了 3 次重复蛋白定量平均值分布情况,横坐标表示差异倍数经过以 2 为底数的对数转化后的值, > 0 的为表达量上调, < 0 的为表达量下调。本次蛋白定量结果高脂血症组与空白对照组比较,得到 312 个上调蛋白和 173 个下调蛋白,共计 485 个差异蛋白,丹参酮组与高脂血症组相比较共得到 106 个上调蛋白和 146 个下调蛋白,共计 252 个差异蛋白。

3.2 差异蛋白功能分析 (表 2) 在上述结果的基础上,对两组的差异蛋白取交集进行分析,根据 GO 生物过程归类,共筛选出 13 个差异蛋白。按照参与的生物过程不同,可分为 3 类,第 1 类是胆固醇逆向转运相关蛋白,包括肝脏羧酸酯酶 1 (carboxylesterase 1, CES1), 载脂蛋白 A1 (Apolipoprotein A-1, Apoa1); 第 2 类是脂肪酸氧化相关蛋白包括酰辅酶 A 硫解酶 2 (Acyl-CoA thioesterases 2, Acots2), 3 - 酮脂酰辅酶 A 硫解酶 (3-ketoacyl-CoA thiolase, 3-KAT); 第 3 类是与内源性物质代谢密切相关的细胞色素 P450 酶家族中的 Cyp3a2、Cyp3a18、Cyp4a3

表 1 各组大鼠血清中血脂与肝功能水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)
空白对照	8	1.00 ± 0.18	0.74 ± 0.079	0.91 ± 0.16	0.55 ± 0.11	36.47 ± 5.18	91.95 ± 19.78
高脂血症	8	1.86 ± 0.12 **	0.94 ± 0.079 **	1.34 ± 0.05 **	0.39 ± 0.03 **	106.67 ± 21.97 **	146.30 ± 25.65 **
丹参酮	8	1.77 ± 0.13 **	0.90 ± 0.082 **	1.23 ± 0.10 **	0.45 ± 0.06 *	86.15 ± 24.55 * ^Δ	116.39 ± 124.12 * ^Δ

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与高脂血症组比较, ^Δ $P < 0.05$

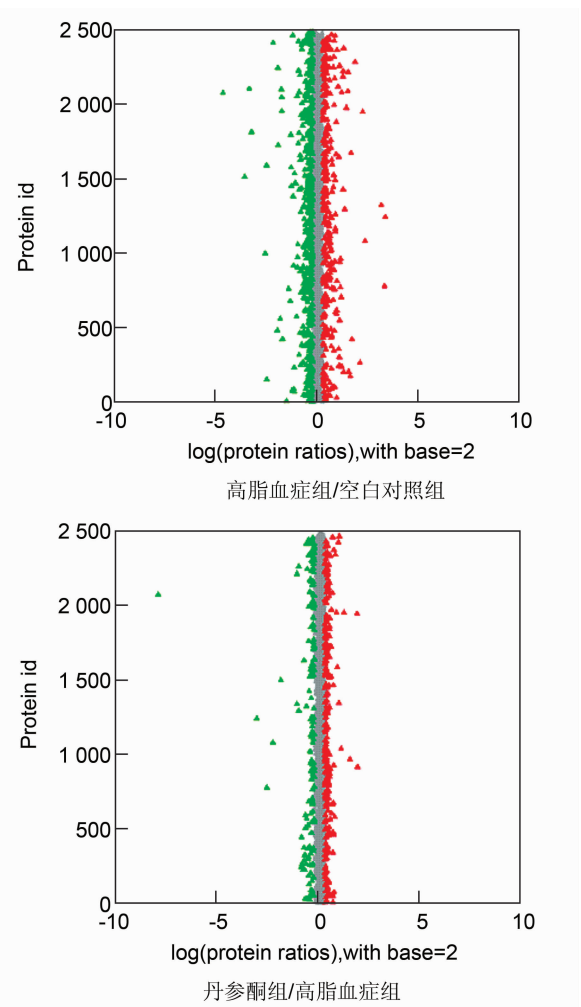


注:A~C 为 HE 染色;D~F 为油红 O 染色;A 为空白对照组;B 为高脂血症组;C 为丹参酮组;D 为空白对照组;E 为高脂血症组;F 为丹参酮组;箭头所指为肝细胞

图 1 各组大鼠肝脏组织形态学结果 (×200)

Cyp2b2、Cyp2c23。此外,还鉴定出一些其他蛋白,如肿瘤疾病高表达蛋白转酮醇酶(transketolase, Tkt)和胞外 5′核苷酸酶(5′-nucleotidase, eNT)。

4 各组大鼠肝组织 CES1、Apoa1、Acots2 蛋白表达比较(表 3) 与空白对照组比较,高脂血症组 Acots2、CES1 及 Apoa1 表达水平均下调($P<0.01$,



注:红色为表达量上调;绿色为表达量下调

图 2 高脂血症组/空白对照组与丹参酮组/高脂血症组蛋白质丰度分布图

表 2 各组大鼠肝脏差异蛋白表达倍数变化情况

序号	蛋白编码	蛋白名称	GO 生物过程	表达情况及变化倍数			
				高脂血症组/ 空白对照组	丹参酮组/ 高脂血症组	高脂血症组/ 空白对照组	丹参酮组/ 高脂血症组
1	IPI00195148	肝脏羧酸酯酶 1	脂质转运和代谢等	↓	↑	0.71	1.45
2	IPI00197703	载脂蛋白 A1	胆固醇转运等	↓	↑	0.69	1.42
3	IPI00421885	酰辅酶 A 硫解酶 2	长链脂肪酸分解代谢等	↓	↑	0.82	1.32
4	IPI00370596	3-酮脂酰辅酶 A 硫解酶	长链脂肪酸代谢等	↓	↑	0.35	2.17
5	IPI00327991	Cytochrome P450 2c23	花生四烯酸代谢等	↓	↑	0.66	1.21
6	IPI00213641	Cytochrome P450 3a18	睾酮-6-β 羟化酶活性等	↓	↑	0.71	1.29
9	IPI00203318	Cytochrome P450 4a3	亚油酸及月桂酸代谢等	↓	↑	0.48	1.86
10	IPI00196764	Cytochrome P450 3a2	药物代谢等	↓	↑	0.55	1.29
11	IPI00193234	cytochrome P450 2b2	细胞酮代谢类固醇代谢等	↓	↑	0.25	1.82
12	IPI00231139	转酮醇酶	磷酸核糖生物合成的过程	↑	↓	1.21	0.82
13	IPI00204348	胞外 5′核苷酸酶	AMP 的分解过程	↑	↓	1.30	0.79

表 3 各组大鼠肝组织 CES1、Apoa1、
Acots2 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Acost 2	Apoa1	CES1
空白对照	3	1.02 ± 0.08	0.97 ± 0.04	0.95 ± 0.03
高脂血症	3	0.62 ± 0.06 **	0.80 ± 0.08 *	0.83 ± 0.04 *
丹参酮	3	0.86 ± 0.16 Δ	0.95 ± 0.08 Δ	1.01 ± 0.07 $\Delta\Delta$

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与高脂血症组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

$P < 0.05$);与高脂血症组比较,丹参酮组 CES1、Apoa1 及 Acots2 表达水平均上调($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

讨 论

高脂血症是造成 AS 的主要危险因素之一,细胞内胆固醇聚集和脂类沉积是 AS 形成过程中的主要因素。课题组前期研究发现,丹参酮 II A 具有减少肝脏脂类沉积的作用^[8],但目前尚缺乏对其肝脏保护作用整体机制水平的研究。

蛋白质组学技术在整体水平上对蛋白质的作用模式、功能机理、调节控制以及蛋白质间的相互关系进行研究,可以较为全面地反映问题的本质,已广泛的应用到中药的现代化研究中^[9]。定量蛋白质组学的研究主要集中在对蛋白质差异表达或者表达量的变化进行比较研究的相对定量蛋白质组学研究,iTRAQ 技术具有较好的定量效果、较高的重复性,并且能够通过同位素标记准确把握差异表达蛋白的动态变化,已经在生命科学的各个领域得到了非常广泛的应用^[4]。

本研究利用 iTRAQ 技术发现,高脂血症大鼠肝脏胆固醇代谢、脂肪酸氧化及细胞色素 P450 酶家族等相关蛋白表达发生了明显的改变,提示高脂血症模型大鼠存在胆固醇代谢、脂肪酸代谢及内源性物质代谢功能异常。与模型组比较,丹参酮组减少了肝脏脂质的沉积,逆转了差异蛋白的表达。

其中 CES1 与 Apoa1 这两个差异蛋白与胆固醇代谢密切相关。CES1 是丝氨酸水解酶多基因家族的重要一员,在胆固醇逆向转运中发挥着重要的作用^[10]。胆固醇酯的积聚导致泡沫细胞的形成和 AS 的发生,细胞质中脂质小滴胆固醇酯的水解代谢是巨噬细胞胆固醇逆向转运过程的重要步骤,CES1 含有胆固醇酯水解酶活性,可以有效水解巨噬细胞中的胆固醇酯,减少细胞内胆固醇酯的聚集及泡沫细胞的形成,增强巨噬细胞胆固醇逆向转运过程,减轻粥样动脉硬化^[11,12]。此外,CES1 对脂代谢也有一定的影响。

Xu J 等^[13]研究发现,当 CES1 降低时,肝脏会增加脂肪的生成,导致肝脏 TG 和血浆 TG 水平升高。在 Quiroga AD 等^[14]的实验中,CES1 敲出的小鼠会出现肝脏脂肪变性,小鼠的肥胖及高脂血症水平会增加。Apoa1 是高密度脂蛋白的重要蛋白质组分,主要生物学作用是激活卵磷脂胆固醇酰基转移酶(lecithin cholesterol acyltransferase,LCAT)。在外周组织中,Apoa1 为游离胆固醇和磷脂的受体,能促进胆固醇的摄取,并且能够将 HDL 中的胆固醇酯转移到肝脏之中进行代谢,阻止了胆固醇在外周组织中的聚积,起到了其抗 AS 的作用^[15]。高脂血症组大鼠的肝脏中,CES1 及 Apoa1 这两个蛋白的表达明显降低,给予丹参酮 II A 后,这两种蛋白均有一定程度的上调,提示丹参酮 II A 可能通过上调 CES1 与 Apoa1 来促进胆固醇逆向转运,从而减少 AS 的发生。

脂肪酸在肝脏线粒体 β 氧化的减少是脂代谢紊乱发生的机制之一^[16]。当脂肪酸氧化受到抑制时,会加速肝脏脂肪变性的发展^[17]。高脂血症引起大鼠肝 3-KAT 及 Acots2 表达的降低。3-KAT 使底物 3-酮脂酰-CoA,催化形成乙酰-CoA 和少了 2 碳原子的脂酰-CoA,是脂肪酸-氧化的最后一步^[18]。当 3-KAT 受到抑制时,脂肪酸氧化也受到抑制^[19]。Acots2 位于线粒体基质,能够通过水解长链脂酰-CoA,生成游离脂肪酸及 CoASH,加速肝脏线粒体中脂肪酸氧化^[20]。与高脂血症组比较,丹参酮组能够有效的逆转这种降低。提示丹参酮可能通过促进脂肪酸 β 氧化而改善脂代谢紊乱,减少脂质沉积。

高脂血症大鼠模型也引起了肝脏细胞色素 P450 家族 Cyp3a2、Cyp3a18、Cyp4a3 Cyp2b2、Cyp2c23 表达的降低。细胞色素 P450 酶活性改变,可促成肝脏的损伤和癌症^[21]。严重肝病患者的肝脏细胞色素 P450 水平及相应的酶活性低于正常水平^[22]。丹参酮给药后,5 种蛋白均有不同程度的上升,提示丹参酮IIA 可能通过调节细胞色素 P450 酶家族蛋白的表达来改善肝脏对内源性物质的代谢功能。

另外,本研究还发现了两种在肿瘤疾病中过表达的蛋白 Tkt、eNT 表达升高。在多种肿瘤中过表达,与肿瘤的发生发展密切相关。Tkt 是为肿瘤细胞增值提供能量及核苷酸的戊糖磷酸途径的限速酶,Tkt 活性的增加在肝细胞癌的发生和发展中起到了重要作用^[23]。给药后 Tkt、eNT 两种蛋白的表达均有所下降,这两种蛋白表达改变的具体机制还有待进一步探究。

本研究结果表明,丹参酮 II A 可能通过促进胆固醇逆向转运及脂肪酸 β 氧化,改善内源性物质代谢及

肝脏脂质沉积,改善了肝功能,对肝脏产生了一定的保护作用。该结果印证了课题组对丹参酮ⅡA 的前期研究,并且证实了应用蛋白质组学探讨中药现代化作用机制的可能,为今后的深入研究提供了可行性。

参 考 文 献

- [1] 朱志刚. 化痰活血方治疗高脂血症的理论与药效研究[D]. 南京:南京中医药大学, 2016.
- [2] 张智芳. 从对 HDL 亚型分布及功能的影响探讨芍药胶囊抗动脉粥样硬化的作用机制[D]. 北京:北京中医药大学, 2016.
- [3] Jia LQ, Zhang N, Xu Y, et al. Tanshinone II A affects the HDL subfractions distribution not serum lipid levels: Involving in intake and efflux of cholesterol[J]. Arch Biochem Biophys, 2016, 592: 50–59.
- [4] 朱宇伟, 于庆云, 刘培, 等. 蛋白质组学在中医药科学研究中的应用进展[J]. 中国现代中药, 2016, 18(5): 661–665.
- [5] 林卫华, 郑定仙, 冯丁山, 等. 大鼠实验性高脂血症模型分析[J]. 中国热带医学, 2010, 10(3): 324–325.
- [6] 陈奇主编. 中药药理实验方法[M]. 北京:人民卫生出版社, 1994: 206.
- [7] Luo J, Tang S, Peng X, et al. Elucidation of cross-talk and specificity of early response mechanisms to salt and PEG-simulated drought stresses in *Brassica napus* using comparative proteomic analysis [J]. PLoS One, 2015, 10(10): e0138974.
- [8] 王俊岩, 朱美林, 冷雪, 等. 丹参酮ⅡA 对 ApoE 基因敲除小鼠肝脏脂质沉积的影响及机制[J]. 遵义医学院学报, 2014, 37(1): 94–98.
- [9] 杨欣, 王秋红, 王蒙, 等. 基于 iTRAQ 技术结合 2D-LC-MS/MS 研究黄连对 CYP450 同工酶表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(4): 731–736.
- [10] 童金英, 易银沙, 曹蓬荣, 等. 人羧酸酯酶 1 结构和功能的研究进展[J]. 生物工程学报, 2012, 28(12): 1414–1422.
- [11] Igarashi M, Osuga J, Uozaki H, et al. The critical role of neutral cholesterol ester hydrolase 1 in cholesterol removal from human macrophages [J]. Circ Res, 2010, 107(11): 1387–1395.
- [12] Li J, Wang Y, Matye D J, et al. Sortilin 1 modulates hepatic cholesterol lipotoxicity in mice via functional interaction with liver carboxylesterase 1[J]. J Biol Chemistry, 2017, 292(1): 146–160.
- [13] Xu J, Li Y, Chen WD, et al. Hepatic carboxylesterase 1 is essential for both normal and farnesoid X receptor-controlled lipid homeostasis [J]. Hepatology, 2014, 59(5): 1761–1771.
- [14] Quiroga AD, Li L, Trötschmüller M, et al. Deficiency of carboxylesterase 1/esterase-X results in obesity, hepatic steatosis, and hyperlipidemia [J]. Hepatology, 2012, 56(6): 2188–2198.
- [15] Ikenaga M, Higaki Y, Saku K, et al. High-density lipoprotein mimetics: a therapeutic tool for atherosclerotic diseases [J]. J Atheroscler Thromb, 2016, 23(4): 385–394.
- [16] 娜日苏, 包纳日斯. 非酒精性脂肪肝的发病机制与流行病学研究进展[J]. 中国医药指南, 2016, 14(3): 39–40.
- [17] Liu W, Baker RD, Bhatia T, et al. Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis [J]. Cell Molec Life Sci, 2016, 73(10): 1969–1987.
- [18] Palir N, Ruiter JP, Wanders RJ, et al. Identification of enzymes involved in oxidation of phenylbutyrate [J]. J Lipid Res, 2017: jlr. M075317.
- [19] Ussher JR, Keung W, Fillmore N, et al. Treatment with the 3-ketoacyl-CoA thiolase inhibitor trimetazidine does not exacerbate whole-body insulin resistance in obese mice [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2014, 349(3): 487–496.
- [20] Moffat C, Bhatia L, Nguyen T, et al. Acyl-CoA thioesterase-2 facilitates mitochondrial fatty acid oxidation in the liver [J]. J Lipid Res, 2014, 55(12): 2458–2470.
- [21] He X, Feng S. Role of metabolic enzymes P450 (CYP) on activating procarcinogen and their polymorphisms on the risk of cancers [J]. Curr Drug Metab, 2015, 16(10): 850–863.
- [22] Brodie MJ, Boobis AR, Bulpitt CJ, et al. Influence of liver disease and environmental factors on hepatic monooxygenase activity *in vitro* [J]. Eur J Clin Pharmacol, 1981, 20(1): 39–46.
- [23] Xu IM, Lai RK, Lin SH, et al. Transketolase counteracts oxidative stress to drive cancer development [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2016, 113(6): E725–E734.

(收稿:2015-09-11 修回:2017-02-20)

责任编辑:白霞

英文责编:张晶晶