

· 基础研究 ·

肾阴虚、肾阳虚模型大鼠股骨皮质骨差异
蛋白质表达的分析詹正烜¹ 郑乃熙¹ 张英杰¹ 王雯婷¹ 王 旭¹ 陈宝军¹ 赖兴泉¹ 黄露露¹ 苏友新^{1,2}

摘要 目的 研究肾阴虚、肾阳虚模型大鼠股骨皮质骨差异表达的蛋白质,从功能蛋白质组角度探讨肾阴虚、肾阳虚证的实质。**方法** 将 90 只大鼠按随机数字表法分为正常组、肾阴虚组和肾阳虚组,每组 30 只,获取造模成功且表现稳定大鼠的股骨皮质骨,分别进行皮质骨总蛋白的提取制备、双向电泳(2-DE)、凝胶图谱的获取与分析、差异蛋白的质谱分析及相关功能的生物信息学检索。**结果** 3 组大鼠股骨皮质骨总蛋白 2-DE 凝胶图谱可辨识蛋白点数目均为 470 个,与正常组比较,肾阴虚、肾阳虚组各有 12 个差异蛋白,其中有 6 个是肾阴虚、肾阳虚组共有的差异蛋白,4 个表达趋势一致,分别为表达上调的载脂蛋白 A-1、 α 烯醇化酶,表达下调的 GDP 解离抑制因子 β 、原肌球蛋白异构体 2 α -3 链;有 2 个蛋白表达趋势相反,Ⅰ型胶原 α -1 链在肾阴虚组中表达上调,在肾阳虚组中表达下调;线粒体热休克蛋白 60 在肾阴虚组中表达下调,在肾阳虚组中表达上调;肾阴虚、肾阳虚组各有 6 个各自的差异蛋白,其中肾阴虚组有 3 个蛋白表达上调,3 个蛋白表达下调;肾阳虚组 6 个蛋白表达均下调。**结论** 大鼠股骨皮质骨中,4 个共同且表达趋势一致的差异蛋白可以视为肾阴虚、肾阳虚证的共性功能蛋白质组;2 个表达趋势相反及 12 个肾阴虚、肾阳虚组各自的差异蛋白可归为相应证型的差异功能蛋白质组。

关键词 肾主骨;功能蛋白质组学;肾阴虚;肾阳虚;差异蛋白

Analysis of Differential Protein Expression in the Femoral Cortical Bone of Shen-yin Deficiency and Shen-yang Deficiency Model Rats ZHAN Zheng-xuan¹, ZHENG Nai-xi¹, ZHANG Ying-jie¹, WANG Wen-ting¹, WANG Xu¹, CHEN Bao-jun¹, LAI Xing-quan¹, HUANG Lu-lu¹, and SU You-xin^{1,2}

1 College of Rehabilitation Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou(350122); 2 Fujian Health College, Fuzhou(350101)

ABSTRACT Objective To explore the basis of Shen-yin and Shen-yang deficiency from the perspective of functional proteomes by examining the differential expression of proteins in the femoral cortical bone of Shen-yin deficiency and Shen-yang deficiency model rats. **Methods** Totally 90 rats were randomly allocated into the normal, Shen-yin deficiency, and Shen-yang deficiency groups according to random digit table, 30 in each group. Samples of the rat femoral cortical bone were successfully obtained from each group; total protein content of the cortical bone samples was extracted and prepared for two-dimensional gel electrophoresis (2-DE), followed by acquisition and analysis of gel profiles, mass spectrometry of differentially expressed proteins, and bioinformatics-based retrieval of the relevant functions of the extracted proteins. **Results** In the 2-DE gel of the femoral cortical bone, each of three group's discernible protein spots was 470. Compared with the normal group, there were 12 differentially expressed proteins both in the Shen-yin deficiency group and Shen-yang deficiency group. 6 of these 12 differential proteins were common in both groups; 4 of these proteins showed same trends in expression. ApoA- I and Eno1 were up-regulated; Arhgdib and Tpm3 were down-regulated. There were 2 proteins

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81273888)

作者单位:1. 福建中医药大学康复医学院(福州 350122); 2. 福建卫生职业技术学院(福州 350101)

通讯作者:苏友新, Tel: 0591-88780999, E-mail: suyouxin777@hotmail.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20170417.060

showed opposite trends in expression. Colla I was up-regulated in the Shen-yin deficiency group and down-regulated in the Shen-yang deficiency group; Hsp60 was down-regulated in the Shen-yin deficiency group and up-regulated in the Shen-yang deficiency group. 6 unique differentially expressed proteins both of the Shen-yin deficiency and Shen-yang deficiency group. In these proteins, 3 were up-regulated and other 3 were down-regulated in the Shen-yin deficiency group. All of 6 proteins were down-regulated in the Shen-yang deficiency group. Conclusions In the rat femoral cortical bone, the 4 differentially expressed proteins that were common to both groups and showed similar trends in expression could be regarded as the common functional proteome of Shen-yin and Shen-yang deficiencies. The 2 differentially expressed proteins that were common to both groups but showed opposite trends in expression along with the 12 proteins that were unique to one of the two groups could be regarded as the differential functional proteomes of the corresponding deficiency syndromes.

KEYWORDS Shen governs the bone; functional proteomics; Shen-yin deficiency; Shen-yang deficiency; differentially expressed proteins

中医学“肾主骨”理论,阐述了“肾”与“骨”之间的密切联系,认为“肾”可直接调控骨的盛衰壮健;同时,“肾者…其充在骨”,说明骨是肾功能状态的外在表现部位之一,研究者也已从肾虚状态下骨组织生理病理变化多层次论证了中医学“肾主骨”的理论^[1-3]。随着蛋白质组学技术的广泛应用,现已明确骨组织结构与功能状态差别最终体现于其内在不同功能蛋白质的表达状态^[4],肾阴虚、肾阳虚证作为肾虚的主要证型,两者间的差异蛋白质表达是否存在共性及差异,这是急于求解的。本课题组前期已初步筛选出肾虚证大鼠股骨皮质骨差异蛋白质^[5],本实验基于“肾主骨”理论,将进一步对比肾阴虚、肾阳虚模型大鼠股骨皮质骨差异蛋白的表达,从功能蛋白质组角度进一步探讨肾阴虚、肾阳虚证的实质。

材料与方法

1 动物 90 只 3 月龄雄性 Wistar 大鼠, SPF 级,体重(210 ± 20)g,由上海斯莱克实验动物有限公司提供,动物许可证:SCXK(沪)2012-0002,实验动物质量合格证编号:2007000583560。委托福建中医药大学实验动物中心代购及饲养。动物实验过程遵守福建中医药大学关于动物实验的相关规定,严格按照国家机构关于实验动物卫生指导使用及符合国际伦理准则。

2 药物 甲状腺片(40 mg/片,山东省莱阳生物化学制药厂,批号:14080303)。氢化可的松注射液(2 mL:10 mg,福州海王福药制药有限公司,批号:1303051)。

3 主要试剂、仪器 大鼠环磷酸鸟苷(cGMP)及环磷酸腺苷(cAMP)ELISA 试剂盒(上海 Westang

Bio-tech 有限公司,批号:1503251、1312251); DTT、CHAPS、Bio-lyte、Mineral Oil、IAA、Tris HCl、30% AcyBis、AP、Tris、SDS 及 ReadyPrep 2-D Clean up Kit 试剂盒等(美国 Bio-Rad 公司,批号分别为:161-0601、161-0460、163-2093、163-2129、163-2109、161-0798、161-0154、161-0700、161-0716、161-0301、163-2130); Dnase、Rnase 酶(德国 Thermo 公司,批号:18047019、8080119);其他试剂均为国产分析纯。低温高速离心机(型号:D-37520,德国 Thermo 公司);等电聚焦仪(型号:10165-4000 型,美国 Bio-Rad 公司)、电泳仪(型号:164-5070 型,美国 Bio-Rad 公司)、垂直板电泳系统(型号:PROTEAN II xi 型,美国 Bio-Rad 公司);扫描仪(型号:Power Look 2100XL 型,台湾 UMAX 公司);酶联免疫检测仪(型号:M200 Pro 型,瑞士 Tecan 公司);Milli-Q 超纯水仪(型号:Heal Force SMART-N 型,香港力康公司);质谱仪(型号:Autoflex speed 型,美国 BRUKER 公司)。

4 动物分组与模型制备 采用随机数字表法将大鼠分为正常组、肾阴虚组、肾阳虚组,每组 30 只。适应性喂养 1 周后,正常组大鼠予生理盐水灌胃,每次 3 mL/只,每天 1 次。肾阴虚组大鼠予甲状腺片混悬液(40 mg/mL)灌胃,每次 3 mL/只,每天 1 次,连续 15 天^[6]。肾阳虚组大鼠予氢化可的松注射液(2.5 mg/100 g)臀部肌肉注射,每天 1 次,连续 15 天^[5]。每组动物自由饮食、饮水。模型鉴定成功后^[7],继续观察大鼠 3 周,取模型稳定的大鼠进行实验。

5 模型鉴定及标本获取 干预 15 天内观察各组大鼠活动、反应、弓背、毛色及饮食、饮水等一般情况,第 15 天测量大鼠体重、肛温;每组随机抽取 5 只

大鼠,检测血清 cAMP、cGMP 和 cAMP/cGMP 比值^[8];干预结束后 21 天对大鼠一般情况和体重、肛温等进行稳定性评价。确定模型成功及表现稳定后,放血处死大鼠,在冰上操作,迅速取下其股骨干,剔除软组织及骨膜,并用骨剪剪开,用超纯水将骨髓冲洗干净,将组织放入 5 mL 的 Eppendorf 管中,标记后置于 -80 ℃ 冰柜中保存备用。

6 皮质骨总蛋白提取与制备 取股骨皮质骨样本 1 g,放在盛有液氮的研钵里研磨粉碎后转入 5 mL Eppendorf 管中,并加入 1.5 mL 样品裂解液,于 4 ℃ 冰箱中裂解提取蛋白质 4 h;然后置于低温高速离心机以 14 000 r/min 离心 30 min,吸取上清液;每 1 mL 上清液加入 2 μL Dnase 和 2 μL Rnase,冰上放置 15 min,再离心 30 min,吸取上清液;按 2-D clean-up 试剂盒操作说明书提纯浓缩蛋白;Bradford 法^[9]测定蛋白浓度并计算上样蛋白体积。

7 双向凝胶电泳 根据美国 Bio-Rad 公司的 2-DE 操作指南进行操作。第一向为 IEF 电泳,等电聚焦完成后进行两次胶条的平衡及润洗,然后进行第二向 SDS-PAGE 电泳。

8 凝胶蛋白点染色及差异表达蛋白点靶定 电泳结束后,将 2-DE 凝胶进行考马斯亮蓝染色。之后置于脱色液中多次脱色至蛋白点明显且背景干净,用 Umax 扫描仪获取图谱。

应用 PD Quest 8.0 分析软件进行凝胶图谱蛋白点检测,每组选取 3 张较为清晰的 2-DE 凝胶图谱,进行既定面积大小剪切,尽量去除背景及横纵条纹,然后对同一组的 3 张图谱进行组内一致性分析,由系统自动进行斑点检测和初步匹配,确保选择的点存在且无遗漏。运用分析组管理器,以正常组为参考,进行组间比较,建立蛋白点体积之间比较变化达 1.5 倍以上的集合,并设置 *t* 检验达 99% 为有统计学意义^[10,11],进行蛋白点自动检测,靶定上调或者下调达 1.5 倍以上的蛋白点。

9 质谱分析及相关功能的生物信息学检索 将差异蛋白点手动切胶,酶解,除盐点样后进行基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)技术定性差异表达的蛋白质,在 Uniprot 及 NCBI 蛋白质数据库中,按照组织来源,选取的生物品种为大鼠,查找质谱鉴定得到的已知蛋白的主要生物功能。

10 统计学方法 应用 SPSS 20.0 统计软件分析数据,计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠一般情况及肛温、体重比较(表 1) 造模干预第 15 天及干预结束后第 21 天,与正常组比较,肾阴虚组大鼠出现躁动、易惊、怕人、爪甲与耳朵颜色变红、饮水增加,大便干结等表现;肾阳虚组大鼠出现活动减少、反应迟钝,爪甲与耳朵颜色变淡、饮水减少,弓背蜷缩、喜扎堆等表现。

与正常组同期比较,造模干预第 15、21 天后肾阴虚组大鼠肛温升高(*P* < 0.05),体重下降(*P* < 0.01);肾阳虚组肛温降低(*P* < 0.01),体重下降(*P* < 0.01)。

表 1 各组大鼠肛温、体重比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	时间	肛温(℃)	体重(g)
正常	30	干预前	38.12 ± 0.30	254.10 ± 14.69
		干预第 15 天	38.13 ± 0.33	305.67 ± 18.35
		干预结束后第 21 天	38.13 ± 0.34	371.90 ± 18.56
肾阴虚	30	干预前	38.12 ± 0.24	250.57 ± 15.88
		干预第 15 天	38.33 ± 0.25 *	277.03 ± 13.50 **
		干预结束后第 21 天	38.34 ± 0.23 *	312.26 ± 20.75 **
肾阳虚	30	干预前	38.11 ± 0.39	253.93 ± 15.50
		干预第 15 天	37.17 ± 0.37 **	267.48 ± 15.53 **
		干预结束后第 21 天	37.33 ± 0.31 **	290.63 ± 14.59 **

注:与正常组同期比较, **P* < 0.05, ***P* < 0.01

2 各组大鼠干预第 15 天 cAMP、cGMP 的含量比较(表 2) 造模干预 15 天,与正常组比较,肾阴虚组大鼠血清 cAMP 含量及 cAMP/cGMP 比值均升高(*P* < 0.01);肾阳虚组大鼠血清 cAMP 含量下降, cGMP 含量升高, cAMP/cGMP 比值降低(*P* < 0.05, *P* < 0.01)。

表 2 各组大鼠干预第 15 天 cAMP、cGMP 的含量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	cAMP (pmol/mL)	cGMP (pmol/mL)	cAMP/cGMP
正常	5	36.20 ± 2.98	8.00 ± 1.33	4.65 ± 1.03
肾阴虚	5	75.74 ± 10.34 **	8.26 ± 1.37	9.45 ± 2.35 **
肾阳虚	5	23.44 ± 7.23 *	26.18 ± 1.62 **	0.89 ± 0.26 **

注:与正常组比较, **P* < 0.05, ***P* < 0.01

3 凝胶蛋白点差异的辨识与分析结果(图 1、2) 通过对正常组与肾阴虚组骨组织蛋白质双向电泳凝胶图谱比较分析,检测到 12 个明显差异表达蛋白质点,以正常组为参考,其中点 6 602、1 504、4 302、6 104、4 108、5 803 为上调表达蛋白,点 1 309、1 207、1 102、3 105、4 008、6 706 为下调表达蛋白;通过对正常组与肾阳虚组骨组织蛋白质双向电泳凝胶图谱比较分析,检测到 12 个明显差异表达蛋白质点,以正常组为参考,其中点 6 104、4 108、6 706 为上调表

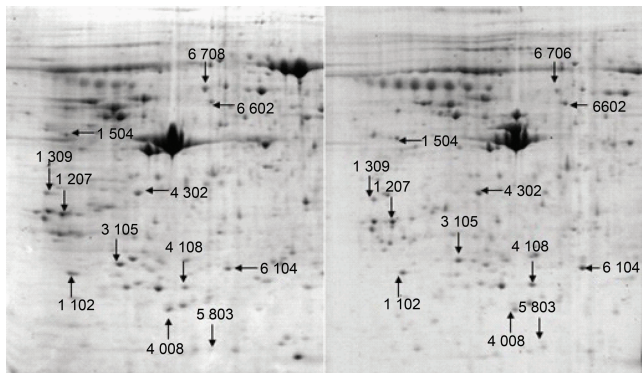


图 1 正常组 - 肾阴虚组大鼠股骨干皮质骨差异蛋白点标识

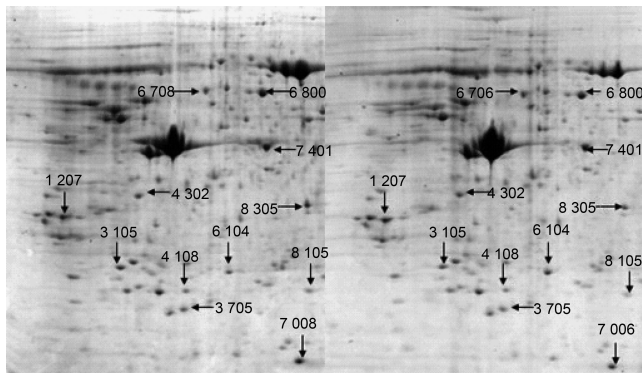


图 2 正常组 - 肾阳虚组大鼠股骨干皮质骨差异蛋白点标识

达蛋白,点 1 207、4 302、3 105、3 705、7 006、8 105、8 305、7 401 为下调表达蛋白;综合分析,扣除 6 个在肾阴虚、肾阳虚组中均有差异表达的蛋白,肾阴虚、肾阳

虚及正常大鼠间股骨干皮质骨蛋白质组图谱间差异表达的蛋白质共 18 个。

4 差异蛋白质的 MAIDI-TOF-MS 质谱鉴定及生物信息学检索结果(表 3) 用 Uniprot 及 NCBI 蛋白质数据库检索质谱鉴定后 18 个差异蛋白。

5 具体差异表达的蛋白 肾阴虚、肾阳虚组差异蛋白中,有 6 个蛋白为肾阴虚、肾阳虚组共同的差异蛋白,其中有 4 个表达趋势一致,分别为表达上调的 ApoA-1、Eno1,表达下调的 Arhgdib、Tpm3;另有 2 个蛋白表达趋势相反,Colla I 在肾阴虚组中表达上调,在肾阳虚组中表达下调;Hsp60 在肾阴虚组中表达下调,在肾阳虚组中表达上调。

此外,肾阴虚组中 Vim、Gc、Dut 等 3 个蛋白表达上调,AnxA1、Pcna、Tpt1 等 3 个蛋白表达下调;肾阳虚组 AnxA3、Ltk、Pkm2、Sri、Atp5a、Pdia3 等 6 个蛋白表达均下调。

讨 论

“肾主骨”是中医“藏象”学说的重要内容之一,肾充则骨强,肾虚则骨衰,也就是说骨组织的生理、病理变化和肾的功能状态存在着对应关系。那么,只要明确一些能从本质上反映骨组织功能状态的指标,就有望对肾与骨内在本质联系及肾虚(肾阴虚、肾阳虚)证候的本质进行更深一步阐释。随着蛋白质组学技术在中医学相关研究中的广泛应用,目前已经认识到中医“证”的实质与疾病个体特定的功能蛋白质组及其基因

表 3 18 个差异蛋白质谱鉴定及生物信息学检索结果

编号	蛋白名称	主要生物功能
1 504	波形蛋白(vimentin,Vim)	构成细胞骨架
4 302	I 型胶原 α-1 链[collagen alpha-1(I) chain, Colla I]	构成细胞外基质结构、参与胶原的合成
3 105	GDP 解离抑制因子 β(Arhgdib)	调控 GDP 解离活性
3 705	LOC683667 蛋白(sri)	调控钙离子转运、DNA 代谢
7 006	白细胞酪氨酸激酶受体(leukocyte tyrosine kinase receptor, Ltk)	合成 ATP、调控细胞凋亡
8 305	膜联蛋白 A3(annexin A3, AnxA3)	调控细胞分化与凋亡
7 401	丙酮酸激酶同工酶(pyruvate kinase M2, Pkm2)	催化糖酵解、合成 ATP
6 706	线粒体热休克蛋白 60(heat shock protein 60, Hsp60)	参与炎症反应、合成 ATP
6 800	蛋白质二硫键异构酶 A3(protein disulfide-isomerase A3, Pdia3)	催化蛋白中二硫键氧化还原反应
4 108	α 烯醇化酶(alpha-enolase, Eno1)	催化糖酵解
5 803	脱氧尿苷三磷酸酶(deoxyuridine triphosphatase, Dut)	参与核苷酸代谢、修复 DNA
6 602	维生素 D 结合蛋白(vitamin D-binding protein, Gc)	参与维生素 D 转运
1 309	增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, Pcna)	调控 DNA 复制
1 207	原肌球蛋白异构体 2α-3 链(tropomyosin alpha-3 chain, Tpm3)	维持细胞骨架的完整
1 102	翻译控制肿瘤蛋白(translationally-controlled tumor protein, Tpt1)	参与钙及微管蛋白结合、抗细胞凋亡
6 104	载脂蛋白 A-1(apolipoprotein A-1, ApoA-1)	参与从肝脏排泄胆固醇的逆向运输过程
4 008	膜联蛋白 A1(annexin A1, AnxA1)	参与钙/磷脂结合、促进膜融合及胞吐
8 105	线粒体 ATP 合酶亚基 α(ATP synthase subunit alpha, Atp5a)	参与能量代谢

组的表达水平密切相关,疾病个体的肾虚状态体现于其功能蛋白质组的表达状况。基于上述认知,本研究借助于蛋白质组学的技术与方法,通过研究肾阴虚、肾阳虚证模型大鼠股骨皮质骨功能蛋白质表达的差异,进一步探讨肾阴虚、肾阳虚证的实质。

肾阴虚、肾阳虚证是临床最常见肾虚证型,为研究这两种肾虚状态下股骨皮质骨蛋白表达的差异,本实验参考经典造模方法,复制的肾阴虚、肾阳虚证大鼠符合模型鉴定标准^[7],提示模型成功且稳定,接近临床肾阴虚、肾阳虚的基本证候表现,可供本研究选用。

通过文献梳理,按照功能分类,肾阴虚、肾阳虚证模型大鼠股骨皮质骨出现的 18 个差异表达的蛋白质大致可分为 4 类:(1) 化学反应催化类 5 个:如 Pkm2、Atp5a、Pdla3、Dut、Eno1;(2) 细胞骨架类 3 个:Vim、Colla I、Tpm3;(3) 物质转运类 3 个:Sri、ApoA-I、Gc;(4) 细胞增殖、凋亡调节类 7 个:AnxA1、AnxA3、Arhgdib、Ltk、Tpt1、Hsp60、Pcna。这 18 个蛋白的差异表达可能通过影响能量、脂类、钙磷代谢、细胞分化与凋亡等功能而引发肾阴虚、肾阳虚证证候表现。

由于肾阴虚、肾阳虚是肾虚证的主要表现形式,而不同肾虚证型常有共性的证候表现,两组中差异表达一致的 4 个蛋白可视为肾阴虚、肾阳虚证共性功能蛋白质组,包括上调表达的 ApoA-1、Eno1,下调表达的 Arhgdib、Tpm3。其中 ApoA-1 为物质转运类蛋白,调控细胞内胆固醇及磷脂外流,而持续的胆固醇外流则易引起脂代谢障碍^[12],有报道指出,载脂蛋白与骨代谢联系密切^[13],这可能与肾阴虚、肾阳虚证常伴有骨代谢异常的临床表现有关;Eno1 为化学反应催化类蛋白,催化糖酵解过程中的关键酶,在细胞能量代谢过程中发挥重要作用^[14],其上调表达常提示可能存在细胞能量代谢失衡的情况;Arhgdib 为细胞增殖、凋亡调节类蛋白,对启动细胞凋亡起关键作用,该蛋白表达下调不仅可诱导细胞凋亡^[15],同时还参与调节能量代谢;以上 2 个蛋白均涉及细胞能量代谢,能量代谢又与体温变化密切相关,而肾虚证常伴有虚热或虚寒等症状,故推测细胞能量代谢异常可能是肾阴虚、肾阳虚证体温差异的主要原因之一^[16,17]。Tpm3 为细胞骨架类蛋白,其表达下调可使细胞骨架重组,形态发生变化^[18],甚至凋亡,组织功能得不到正常发挥,从而影响机体生长发育。本研究中模型大鼠常伴有生长发育迟缓,体重降低等表现,可能与这一类蛋白的差异表达有关。因此,这 4 个表达趋势一致的蛋白可能与肾阴虚、肾阳虚证的发生密切相关。

此外,肾阴虚、肾阳虚证实质的区别,可能与两组

差异功能蛋白质组有关,这主要包括肾阴虚、肾阳虚证之间 2 个共有及 12 个独自的差异蛋白。2 个共有的但表达趋势相反的差异蛋白:Colla I 是骨组织的重要组成部分,直接影响骨的结构、功能及代谢^[19],本研究中该蛋白在肾阴虚和肾阳虚组中表达趋势相反,这可能是不同肾虚状态^[3]骨量下降程度差异的原因之一。目前已有证据表明,肾虚证与肝细胞 Hsp60 表达密切相关,而不同肾虚证型能量代谢存在差异^[16,17],本研究发现骨组织 Hsp60 在肾阴虚、肾阳虚组中存在不同表达趋势,外在表现为动物模型体温的差异,故该蛋白可能是肾阴虚、肾阳虚证实质差异之一。12 个独自的差异蛋白:肾阴虚组中 Vim、Gc 可调节骨细胞活性,两者上调表达能促进成骨、影响骨量^[20,21];Anxa1 参与钙/磷脂结合,在骨髓间充质干细胞定向分化为成骨细胞的过程中表达下降^[22],既往研究发现肾阳虚证骨量下降程度比肾阴虚证明显^[3],笔者推测本研究中这 3 个独自的差异蛋白一定程度上产生不同肾虚状态骨量下降程度的差异。肾阳虚组中 Ltk、Pkm2、Atp5a 等蛋白主要与能量代谢有关,这 3 个独自的差异蛋白表达下调可能影响机体能量代谢,从而表现肾阳虚证“虚寒”的证候特点,产生肾阴虚、肾阳虚证在体温变化方面的差异。其他 6 个独自的差异蛋白也可能通过复杂的蛋白网络共同影响肾阴虚、肾阳虚证的发生发展,对此将在今后进行更深入的研究。

综上所述,大鼠股骨皮质骨共存在 18 个差异蛋白,其中 4 个共同且表达趋势一致的蛋白可视为肾阴虚、肾阳虚证的共性功能蛋白质组;Colla I、Hsp60,以及 Vim、Gc、Dut、Atp5a 等 14 个差异蛋白可视为肾阴虚、肾阳虚证的差异功能蛋白质组。如果在大鼠的血液中存在这些差异蛋白且表达趋势与骨组织一致,就可以将其作为肾虚证诊断和防治的血清标志物开展进一步研究,为临床肾虚证血清标志物的筛选提供实验依据。

参 考 文 献

- [1] 沈自尹.“肾的研究”通过“与时俱进”而不断进取[J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(8): 946-949.
- [2] 王国栋, 莫文. 308 例骨密度结果及与“肾虚、气虚、血瘀证”相关性的分析[J]. 中国骨质疏松杂志, 2011, 17(8): 720-722.
- [3] 郭素华, 李洪成, 邹才华, 等. 肾虚证与骨密度的关系[J]. 中国中西医结合杂志, 1995, 15(11): 655-657.
- [4] 吴永祥, 苏伟. 骨科的蛋白质组学研究技术与进展[J]. 微创学, 2009, 4(1): 48-50.
- [5] 王艺茹, 王雯婷, 李亚楠, 等. 肾阳虚大鼠股骨皮质骨差异蛋白质表达分析[J]. 福建中医药, 2015, 46(6): 50-53.

- [6] 梁汝圣, 徐宗佩. 大鼠肾阴阳虚模型建立方法[J]. 吉林中医药, 2008, 28(9): 685-687.
- [7] 张子怡, 陈宝军, 张英杰, 等. 肾阳虚、肾阴虚证大鼠模型的建立与稳定性观察[J]. 福建中医药, 2015, 46(1): 51-54.
- [8] 杜江, 李楠, 王和鸣. 肾虚模型造模方法及相关指标[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(50): 9433-9436.
- [9] Antharavally BS, Mallia KA, Rangaraj P, et al. Quantitation of proteins using a dye-metal-based colorimetric protein assay[J]. Anal Biochem, 2009, 385(2): 342-345.
- [10] Nabeshi H, Oikawa S, Inoue S, et al. Proteomic analysis for protein carbonyl as an indicator of oxidative damage in senescence-accelerated mice[J]. Free Radic Res, 2006, 40(11): 1173-1181.
- [11] Santos PM, Benndorf D, Sá-Correia I. Insights into *Pseudomonas putida* KT2440 response to phenol-induced stress by quantitative proteomics[J]. Proteomics, 2004, 4(9): 2640-2652.
- [12] 蔡晓燕, 董光富. 脂代谢及血清骨钙素水平与骨质疏松症的相关性分析[J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(6): 711-712.
- [13] 王景, 李小梅, 洪苑. 脂代谢及血清脂联素水平与绝经后骨质疏松症的相关性研究[J]. 实用妇产科杂志, 2014, 30(11): 828-830.
- [14] 刘养奇, 邢军明, 李戈楠, 等. α -烯醇酶与消化系统肿瘤的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2014, 22(11): 2738-2740.
- [15] Ma L, Xu G, Sotnikova A, et al. Loss of expression of LyGDI (ARHGDI B), a rho GDP-dissociation inhibitor, in Hodgkin lymphoma[J]. Br J Haematol, 2007, 139(2): 217-223.
- [16] 沃兴德, 丁慧登, 卢德赵, 等. 甲亢型肾阴虚大鼠肝线粒体蛋白质组的研究[J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(12): 2469-2471.
- [17] 卢德赵, 沃兴德, 沃立科, 等. 甲状腺切除的肾阳虚大鼠肝线粒体蛋白质组的研究[J]. 中医药学报, 2008, 36(4): 11-15.
- [18] Caldwell BJ, Lucas C, Kee AJ, et al. Tropomyosin isoforms support actomyosin biogenesis to generate contractile tension at the epithelial zonula adherens[J]. Cytoskeleton (Hoboken), 2014, 71(12): 663-676.
- [19] 曹飞, 沈彬, 杨静, 等. 过表达 COLIA1 cDNA 腺病毒感染 TT 型成骨细胞株后对其生物学性能影响的研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(5): 461-465.
- [20] 宋雄波, 吴江怡, 黄术, 等. 调节软骨细胞骨架蛋白对成软骨表型的影响[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(21): 2137-2141.
- [21] 冯娟, 夏维波. 维生素 D 结合蛋白研究进展[J]. 国际内分泌代谢杂志, 2016, 36(3): 209-213.
- [22] Zhang AX, Yu WH, Ma BF, et al. Proteomic identification of differently expressed proteins responsible for osteoblast differentiation from human mesenchymal stem cells[J]. Mol Cell Biochem, 2007, 304(1): 167-179.

(收稿:2016-11-30 修回:2017-04-02)

责任编辑:白霞