

二至丸对去卵巢所致AD小鼠海马蛋白质组学的影响

黄丽萍^{1,2}, 燕波¹, 侯敏¹, 孙梦盛¹, 何堃¹, 官扬¹,
姚丽华³, 周茂福^{1*}

(1. 江西中医药大学, 南昌 330004; 2. 江西省中药药理重点实验室, 南昌 330004;
3. 江西科技师范大学生命科学学院, 南昌 330013)

[摘要] 目的:应用蛋白质组学方法探究二至丸对去卵巢所致阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)小鼠的生物学基础的影响。方法:小鼠去卵巢后随机分为4组,分别为模型组、阳性药组、二至丸高、低剂量组,每组14只小鼠,另设14只为假手术组,术后6周开始给药,二至丸高、低剂量组分别用对应药物灌胃给药($2, 1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$);阳性药组隔天皮下注射苯甲酸雌二醇0.02 mg;假手术组与模型组灌胃等容量的蒸馏水,每日1次,持续给药32 d。取小鼠海马组织,提取蛋白, Nano-ESI液相-质谱联用系统检测蛋白, Protein Discovery软件鉴定蛋白, SIEVE软件对海马蛋白进行相对定量定性分析。PANTHER Classification System对差异蛋白进行基因本体(GO)分析, 京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集信号通路。结果:与模型组相比较, 正常组、二至丸高、低剂量组小鼠共有80多个差异表达蛋白, 通过GO分析发现这些蛋白可分为微管蛋白、热休克蛋白、能量代谢相关蛋白和脑保护相关蛋白等与AD相关的蛋白;KEGG分析发现以上差异蛋白共涉及20条信号通路, 以上差异蛋白可能是二至丸防治AD的靶点蛋白。结论:二至丸可能通过促进能量代谢与囊泡运输, 同时减少 $A\beta$ 的生成与神经细胞的氧化损伤来达到治疗AD的作用。

[关键词] 二至丸; 去卵巢; 阿尔茨海默病; 蛋白质组学; 基因本体分析; 京都基因与基因组百科全书分析

[中图分类号] R22; R24; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)17-0150-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181628

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180530.0951.001.html>

[网络出版时间] 2018-05-30 10:44

Effect of Erzhiwan on Hippocampus Proteomics of Mice of Ovariectomized-induced AD

HUANG Li-ping^{1,2}, YAN Bo¹, HOU Min¹, SUN Meng-sheng¹,
HE Kun¹, GUAN Yang¹, YAO Li-hua³, ZHOU Mao-fu^{1*}

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Nanchang 330004, China;

2. Key Laboratory of TCM Pharmacology of Jiangxi Province, Nanchang 330004, China;

3. College of Life Sciences, Jiangxi Science & Technology Normal University, Nanchang 330013, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of Erzhiwan on the biological basis of mice of ovariectomized-induced Alzheimer's disease (AD) by proteomic method. **Method:** Ovariectomized mice were randomly divided into model group, positive control group, high-dose Erzhiwan group and low-dose Erzhiwan group, with 14 mice in each group. Another 14 mice were included in the sham operation group. Six weeks later after the operation, the mice in the sham operation group and the model group were given the same volume of distilled water, high and low-

[收稿日期] 20180307(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81360205);江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ160802);江西中医药大学2016年重点学科青年教师培养计划与科学研究项目

[第一作者] 黄丽萍, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药神经药理学研究, Tel: 0791-87118919, E-mail: jxnchlp@163.com

[通信作者] *周茂福, 硕士, 教授, 硕士生导师, 从事中医老年病学研究, Tel: 0791-87118919, E-mail: maofuzhou@126.com

dose Erzhiwan groups were given the corresponding drugs by gavage, with the drug concentration of 2, 1 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, and the positive control group was injected with estradiol benzoate 0.02 mg every other day. The drug administration lasted for 32 days. Proteins were extracted from the mice's hippocampus, and detected by Nanol-ESI liquid-mass spectrometry system, and then identified by Protein Discovery software; and a quantitative analysis was made for the hippocampal proteins by SIEVE software. PANTHER Classification System was used for gene ontology (GO) analysis of differential proteins, and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) was used to enrich signal pathways. **Result:** Compared with the model group, there were more than 80 differentially expressed proteins in the normal group and the high and low-dose Erzhiwan groups. Through the GO analysis, these proteins could be divided into tubulin, heat shock protein, energy metabolism-related protein, brain protection-related proteins and other AD-related proteins. KEGG analysis found that the above differential proteins involved 20 signal pathways. These differential proteins may be the target for Erzhiwan in preventing and treating AD. **Conclusion:** Erzhiwan can promote the energy metabolism and vesicle transport, while reducing the production of $A\beta$ and the oxidative damage of neurons, so as to achieve the therapeutic effect of AD.

[**Key words**] Erzhiwan; ovariectomized; Alzheimer's disease; proteomics; gene ontology (GO) analysis; Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analysis

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 以进行性记忆和认知功能障碍为主要表现的精神性疾病。据报道随着老龄化程度的加重, AD 的发病率逐年上升。据统计全球共有约 4 600 万痴呆患者, 这一数量将以每 20 年递增 1 倍的速度逐渐增加, 预计到 2030 年将达到 7 470 万, 到 2050 年将达到 1 亿 3 150 万, 严重威胁老年人的生命安全, 给家庭和社会带来严重的经济负担^[1]。随着老龄化程度的加重, AD 发病率逐年上升, 严重威胁老年人的生命安全, 是继心脏病、癌症后的第 3 位死因, 产生严重的家庭和社会负担^[2]。现有药物能在一定程度上控制、缓解 AD 症状, 但现有治疗效果不理想, 因此寻找高效药物用以控制、延缓 AD 的发生和发展具有重要的社会意义。

二至丸由女贞子 (蒸) 和墨旱莲 (1:1) 2 味中药组成, 具有补益肝肾、滋阴之功效^[3]。前期研究发现二至丸可明显改善去卵巢所致 AD 小鼠的学习障碍, 但二至丸作用于去卵巢所致 AD 的分子机制尚不清楚。质谱法 (MS) 蛋白质组学的发展对多肽或蛋白质成分复杂的混合物的检测提供了有效帮助, 使检测实验中蛋白质的灵敏度、准确度和速度有所提升^[4]。蛋白质组学因其高通量及其高灵敏度故是目前研究中药作用机制的重要手段。本实验通过探究二至丸对去卵巢所致 AD 小鼠海马蛋白表达的影响, 来探究二至丸防治 AD 的分子作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雌性小鼠 72 只, 体质量 25 ~ 28 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。动

物生产合格证号 SCXK (湘) 2013-0004。本实验获得江西中医药大学实验动物伦理委员会批准 (动物伦理委员会编号 JZLLSC20160622001), 符合中国伦理委员会指导原则。

1.2 药物及试剂 二至丸, 购自江西药都樟树制药有限公司, 批号 20150803。研钵研磨后用双蒸水配成二至丸高剂量 $0.2 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 低剂量 $0.1 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 混悬液。苯甲酸雌二醇购自宁波市三生药业有限公司, 批号 S141201, 用芝麻油稀释至 $0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; RIPA 高效裂解液, 苯甲基磺酰氟 (PMSF), BCA 蛋白定量试剂盒 (美国 Thermo Scientific 公司, 批号分别为 RF234139, QE2016716, QH220534A); 测序级胰酶 (美国 Promega 公司, 批号 0000153715); 水合氯醛 (国药集团化学试剂有限公司, 批号 20130426)。

1.3 仪器 Orbitrap Elite 型质谱仪, EASY-nLC 1000 型液相仪, C_{18} 旋转柱, D-37520 型高速冷冻离心机 (美国 Thermo 公司); XS205DU 型分析天平 (瑞士梅特勒-托利多公司); ELX800 型吸收光酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药 取 72 只造模小鼠用 10% 水合氯醛溶液, 按照 $0.0048 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ 腹腔注射麻醉后, 无菌条件下经腰背部双侧切口进入腹腔, 除假手术外, 结扎卵巢下输卵管, 并切除双侧卵巢, 假手术组, 仅去除卵巢周围部分脂肪, 不结扎输卵管, 也不切除卵巢, 切口分层缝合^[5]。对去卵巢后的小鼠随机分为 4 组, 分别为模型组、阳性药组、二至丸高、低剂量组, 每组 14 只小鼠。另设 14 只为假手术组。术后

6 周开始给药,二至丸高、低剂量组分别用对应药物灌胃给药(生药量 $2,1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$);阳性药组隔天皮下注射苯甲酸雌二醇 $0.02 \text{ mg}/\text{只}$;假手术组与模型组均灌胃等容量的蒸馏水,每日 1 次,连续给药 32 d。

2.2 蛋白质组学 提取海马全蛋白,取海马蛋白样品加入 DTT 溶液进行还原反应,IAA 溶液烷基化,冰丙酮沉淀并清洗蛋白, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $14\,000 \times g$ 离心处理 10 min,取沉淀,重悬于碳酸氢铵溶液,加入测序级胰酶酶解过夜, C_{18} 小柱脱盐处理,真空冷冻干燥,甲酸水复溶, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $14\,000 \times g$ 离心 10 min,取上清液, Nano-ESI 的 LC-MS 联用系统对蛋白样品进行检测^[6]。

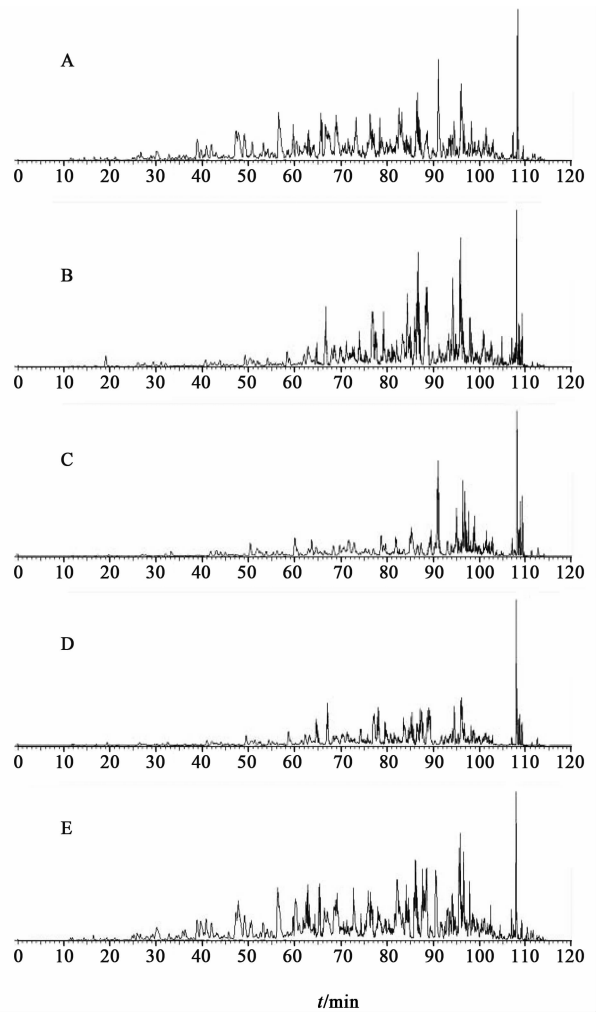
2.3 数据分析方法 将 LC-MS 所收集到的 RAW 文件导入 Protein Discovery 软件进行蛋白质鉴定, SIEVE 软件对海马蛋白进行相对定量定性分析。PANTHER Classification System 对差异蛋白进行 GO 分析, KEGG 数据库 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes database, <http://www.kegg.com>)^[7] 富集差异蛋白参与的信号通路。

3 结果

3.1 总离子流图 各组小鼠的 TIC 图见图 1。各组小鼠的 TIC 图除响应强度有差异外峰形总体差异不大。

3.2 二至丸对去卵巢 AD 小鼠的海马蛋白组学影响 实验结果发现二至丸组小鼠与模型组相比较,共有 80 多个差异表达蛋白,其中包含微管蛋白、热休克蛋白、能量代谢相关蛋白和脑保护相关蛋白等与 AD 相关的蛋白,见表 1。

3.3 差异蛋白 GO 分析 GO 分析主要包括生物进程、细胞组分、分子功能 3 个基因本体术语分类。其中分子功能是基因产物个体的功能,如催化活性、转运活性、结合活性等;生物进程本论是指分子功能有序组合达到更广泛的生物功能,包括细胞增殖与凋亡、代谢过程、应激反应等;细胞组分主要是指亚细胞结构、定位及大分子复合物等^[8]。通过对差异蛋白进行 GO 分析,分析差异蛋白在细胞组成、分子功能、生物过程的占比,有利于进一步探寻二至丸改善去卵巢所致 AD 小鼠学习记忆能力的作用机理,结果见图 2~4。差异蛋白在细胞分布最多,共有 43 种,其次为细胞器 33 种,膜 17 种,高分子配合物 8 种,突触 6 种和细胞连接 1 种。分子功能分析显示差异蛋白大部分具有催化活性,其次为结构分子活性,结合和转运活性等。差异蛋白参与细胞进程的最多,共有 44 种,其次参与代谢过程的 32 种,定位



A. 假手术组; B. 模型组; C. 苯甲酸雌二醇组; D. 二至丸高剂量组; E. 二至丸低剂量组

图 1 各组小鼠海马蛋白样品的 TIC

Fig. 1 TIC of hippocampal protein sample in mice from each group

19 种,生物调节 10 种等。

3.4 KEGG 数据库信号通路富集分析 分析结果显示差异蛋白共涉及到 20 条信号通路,参与的信号通路见表 2。其中参与 carbon metabolism, microbial metabolism in diverse environments 与 protein processing in endoplasmic 信号通路的蛋白最多,其次是 Alzheimer's disease, glycolysis/gluconeogenesis 与 legionellosis 等。

4 讨论

蛋白质组学是一门全景式研究蛋白质组成及其动态变化的新兴科学,是从整体的角度研究生物机体、组织、细胞甚至细胞器基因编码的全部蛋白质,包括蛋白的组成、种类、分布、功能、代谢特征及其动态变化规律等,改变了以往研究的模式和方法,使研究重点逐渐转为真正执行生命活动的蛋白质表达

表 1 二至丸对去卵巢所致 AD 小鼠海马蛋白组学的影响

Table 1 Effect of Erzhiwan on hippocampus proteomics of mice suffered from ovariectomized-induced AD

编号	名称	G/M	D/M	J/M	Y/M
P62737	actin, aortic smooth muscle	2.05	1.91	2.29	0.62
P68033	actin, alpha cardiac muscle 1	1.93	2.03	2.33	0.62
P68134	actin, alpha skeletal muscle	1.93	2.03	2.33	0.62
P63268	actin, gamma-enteric smooth muscle	2.05	1.91	2.29	0.62
Q8BFZ3	beta-actin-like protein 2	1.62	1.61	2.01	0.47
P57780	alpha-actinin-4	2.02	1.06	1.06	0.39
A2AGT5	cytoskeleton-associated protein 5	1.09	2.07	3.05	0.57
Q7TPR4	alpha-actinin-1	2.71	1.92	2.89	0.46
O08553	dihydropyrimidinase-related protein 2	1.35	1.63	2.41	0.51
P35802	neuronal membrane glycoprotein M6-a	1.46	1.78	2.95	0.55
O35658	complement component 1Q subcomponent-binding protein, mitochondrial	2.55	1.56	1.97	0.41
Q9CQI3	glia maturation factor beta	1.21	2.85	3.89	0.19
Q62048-2	astrocytic phosphoprotein PEA-15	2.27	1.68	1.63	0.32
Q91YS8	calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 1	2.70	1.50	1.55	0.17
Q61286-2	transcription factor 12	1.81	3.70	2.47	0.32
P46735	unconventional myosin-Ib	1.71	2.28	2.56	0.56
Q62188	dihydropyrimidinase-related protein 3	1.69	1.68	3.36	0.50
P17742	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	1.39	2.58	2.63	0.56
P11798-2	calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha	2.41	1.74	1.14	0.57
Q91ZZ3	beta-synuclein	1.53	1.57	2.28	0.45
Q923T9	calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit gamma	2.19	2.22	2.35	0.60
Q60865	caprin-1	2.78	0.98	1.76	0.27
P63242	eukaryotic translation initiation factor 5A-1	2.00	2.67	4.37	0.39
Q62418-3	drebrin-like protein	0.85	0.52	0.41	0.25
P52480	pyruvate kinase PKM	1.78	1.58	2.51	0.47
P17751	triosephosphate isomerase	1.46	1.72	2.24	0.50
P47857-3	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, muscle type	2.33	1.29	1.74	0.35
Q9WUA3	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, platelet type	1.78	1.61	3.34	0.38
P63017	heat shock cognate 71 kDa protein	1.24	1.41	2.29	0.45
P07901	heat shock protein HSP 90-alpha	1.28	1.35	2.49	0.45
P11499	heat shock protein HSP 90-beta	1.48	1.42	2.20	0.52
Q9CQN1	heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	1.51	1.38	3.14	0.46
Q61699	heat shock protein 105 kDa	3.89	1.10	0.85	0.38
P17156	heat shock-related 70 kDa protein 2	1.18	1.60	2.68	0.47
P10637	microtubule-associated protein tau	1.32	1.55	2.17	0.43
A2AGT5	cytoskeleton-associated protein 5	1.09	2.06	3.04	0.57
Q6ZWR6	nesprin-1	35.04	9.65	3.97	1.38
P14873	microtubule-associated protein 1B	1.25	1.72	3.03	0.53
P62897	cytochrome c, somatic	1.22	1.34	2.31	0.41
Q62425	cytochrome c oxidase subunit NDUF44	1.53	2.04	3.22	0.42
Q8CAY6	acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic	10.13	3.71	3.65	0.61
Q3TRM8	hexokinase-3	2.29	1.26	1.52	0.54
O08528	hexokinase-2	2.29	1.26	1.52	0.54

续表 1

编号	名称	G/M	D/M	J/M	Y/M
Q91WD5	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial	3.61	1.51	1.70	0.15
Q9CQZ5	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 6	2.98	1.72	1.74	0.31
P62821	Ras-related protein Rab-1A	1.41	1.46	2.11	0.47
P61027	Ras-related protein Rab-10	1.59	1.811	2.72	0.52
Q9D1G1	Ras-related protein Rab-1B	1.81	1.88	2.40	0.55
P63011	Ras-related protein Rab-3A	1.49	1.70	2.55	0.52
O35963	Ras-related protein Rab-33B	1.77	2.11	3.43	0.54
P35283	Ras-related protein Rab-12	1.77	2.11	3.43	0.54
P55258	Ras-related protein Rab-8A	1.77	2.11	3.43	0.54
P56371	Ras-related protein Rab-4A	1.775	2.11	3.43	0.54
P61028	Ras-related protein Rab-8B	1.77	2.11	3.43	0.54
P62823	Ras-related protein Rab-3C	1.77	2.11	3.43	0.54
Q504M8	Ras-related protein Rab-26	1.77	2.11	3.43	0.54
Q6PHN9	Ras-related protein Rab-35	1.77	2.11	3.43	0.54
Q8BHC1	Ras-related protein Rab-39B	1.77	2.11	3.43	0.54
Q8BHD0	Ras-related protein Rab-39A	1.77	2.11	3.43	0.54
Q8CG50	Ras-related protein Rab-43	1.77	2.11	3.43	0.54
Q8K386	Ras-related protein Rab-15	1.77	2.11	3.43	0.54
Q91V41	Ras-related protein Rab-14	1.77	2.11	3.43	0.54
Q91ZR1	Ras-related protein Rab-4B	1.77	2.11	3.43	0.54
P61294	Ras-related protein Rab-6B	18.41	6.06	3.81	0.86
Q923S9	Ras-related protein Rab-30	1.77	2.11	3.43	0.54
Q9JKM7	Ras-related protein Rab-37	1.77	2.11	3.43	0.54
Q8K0T0	reticulon-1	1.16	1.77	3.01	0.50
Q62277	synaptophysin	0.98	1.76	2.95	0.51
Q9ES97-3	reticulon-3	1.66	2.15	3.50	0.48
P46096	synaptotagmin ⁻¹	1.47	1.09	2.36	0.25
P61205	ADP-ribosylation factor 3	1.53	2.76	2.50	0.35
P84078	ADP-ribosylation factor 1	1.53	2.79	2.59	0.35
P61750	ADP-ribosylation factor 4	1.81	1.69	2.62	0.46
P84084	ADP-ribosylation factor 5	1.81	1.69	2.62	0.46
P39053-3	dynamin ⁻¹	1.34	1.28	2.13	0.47
Q8BZ98	dynamin-3	1.22	1.32	2.01	0.56
P23819-4	glutamate receptor 2	2.01	1.63	4.50	0.22
P23818	glutamate receptor 1	1.29	4.453	2.91	0.44
P32299-2	B2 bradykinin receptor	1.35	2.48	4.09	0.50
P60904	DnaJ homolog subfamily C member 5	2.19	2.37	4.93	0.28
Q8CGK7	guanine nucleotide-binding protein G(olf) subunit alpha	2.09	1.55	2.65	0.59
Q3V3I2	guanine nucleotide-binding protein G(t) subunit alpha-3	2.09	1.55	2.65	0.59
P50149	guanine nucleotide-binding protein G(t) subunit alpha-2	2.09	1.55	2.65	0.59
P27601	guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13	2.09	1.55	2.65	0.59
P27600	guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-12	2.09	1.55	2.65	0.59
P20612	guanine nucleotide-binding protein G(t) subunit alpha-1	2.09	1.55	2.65	0.59

注:J/M 表示假手术组与模型组蛋白含量比值;Y/M 表示苯甲酸雌二醇组与模型组蛋白含量比值;G/M 表示二至九高剂量组与模型组蛋白含量比值;D/M 表示二至九低剂量组与模型组蛋白含量比值。

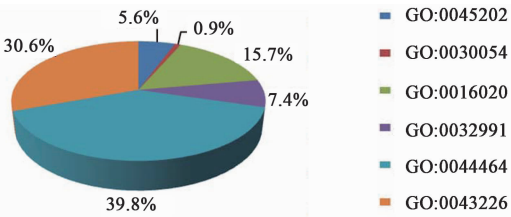


图 2 差异蛋白细胞组成分析

Fig. 2 Cellular Component analysis result of differential proteins

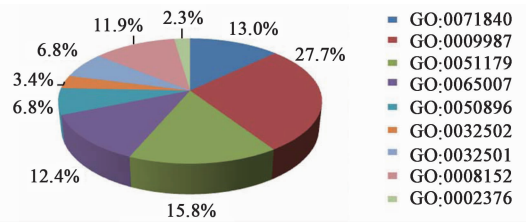


图 4 差异蛋白生物过程分析

Fig. 4 Biological Process analysis result of differential proteins

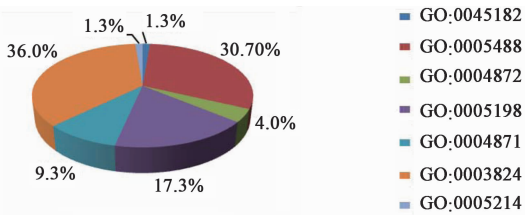


图 3 差异蛋白分子功能分析

Fig. 3 Molecular Function analysis result of differential proteins

AD 的病理机制以及探究药物的分子作用机制等方面表现出巨大的优势与前景。蛋白质组学研究方法和中医基础理论具有趋同性,均强调从“整体”角度来揭示和阐明疾病发生的本质。本实验通过对去卵巢所致 AD 小鼠的海马蛋白质组学分析来探究二至丸防治 AD 的分子机制。

在此次实验中二至丸高、低剂量组小鼠与模型组相比较,共有 80 多个差异表达蛋白,通过 GO 分析发现,从细胞组成来看,差异蛋白主要定位于细胞

规律及生物功能的研究^[9-11]。蛋白质组学在揭示

表 2 KEGG 数据库信号通路富集分析

Table 2 Result of KEGG database signal path enrichment analysis

通路名称	参与蛋白数量/个	涉及蛋白名称
carbon metabolism	6	Acat2, Hk2, Hk3, Pfkp, Pkm, Tpi1
microbial metabolism in diverse environments environments	6	Acat2, Hk2, Hk3, Pfkp, Pkm, Tpi1
diverse environments		
protein processing in endoplasmic reticulumendoplasmic reticulum	6	Dnajc5, Hsp90aa1, Hsp90ab1, Hspa2, Hspa8, Hsph1
Alzheimer s disease	5	Mapt, Ndufa4, Ndufa6, Ndufs2, RTN3
glycolysis/ gluconeogenesis	5	Hk2, Hk3, Pfkp, Pkm, Tpi1
legionellosis	5	Arf1, Hspa2, Hspa8, Rab1, Rab1b
fructose and mannose metabolism	4	Hk2, Hk3, Pfkp, Tpi1
antigen processing and presentation	4	Hsp90aa1, Hsp90ab1, Hspa2, Hspa8
vascular smooth muscle contraction	4	Acta2, Actg2, Gna12, Gna13
AMPK signaling pathway	4	Pfkp, Rab10, Rab14, Rab8a
parkinson s disease	4	Gna1, Ndufa4, Ndufa6, Ndufs2
estrogen signaling pathway	4	Hsp90aa1, Hsp90ab1, Hspa2, Hspa8
phototransduction	3	Gnat1, Gnat2, Gnat3
galactose metabolism	3	Hk2, Hk3, Pfkp
carbohydrate digestion and absorption	3	Gnat3, Hk2, Hk3
type II diabetes mellitus	3	Hk2, Hk3, Pkm
long - term depression	3	Gna12, Gna13, Grial
synaptic vesicle cycle	3	Dnm3, Rab3a, Syt1
biosynthesis of amino acids	3	Pfkp, Pkm, Tpi1
butirosin and neomycin biosynthesis	2	Hk2, Hk3

成分、细胞器、细胞膜及突触等。分子功能最多为催化活性、绑定与结构分子活动等。差异蛋白参与最多的生物学过程为细胞进程,其次为代谢过程,生物调节,定位及免疫系统过程等。从上述差异蛋白参与细胞组成、分子功能、生物过程的占比分析,二至丸主要通过调控细胞成分、催化活性和细胞进程改善去卵巢所致 AD 小鼠的学习记忆能力。

KEGG 数据库通路富集化结果显示差异蛋白共涉及到 20 条信号通路,其中有 5 种蛋白直接参与 Alzheimer's disease 信号通路且这些蛋白表达水平显著上调。其中 Reticulon 3 是一种囊泡运输相关蛋白,在人体中广泛表达,尤其在大脑中的表达量最高,具有抑制 BACE1 活性和淀粉样前体蛋白加工的功能^[12]。有研究表明细胞内 RTN 家族成员的表达量提高,在 APP 囊泡运输过程中,抑制 APP 被 BACE1 剪切,从而在源头减少 A β 的量^[13-14]。Ndufa4, Ndufa6 与 Ndufs2 均是能量代谢相关蛋白,研究发现自由基氧化损伤 AD 大鼠脑 NADH 脱氢酶活性有下降趋势^[15]。在此次试验中,与模型组小鼠相比二至丸给药组小鼠海马内 Reticulon 3, Ndufa6 与 Ndufs2 表达含量大幅上升,提示二至丸可能是通过上调 Reticulon 3, Ndufa6 与 Ndufs2 的表达来减少 A β 的生成与减少神经细胞的氧化损伤,从而达到改善模型组小鼠 AD 样病变的作用。

本文研究发现,二至丸可能是通过促进能量代谢与囊泡运输,同时能够减少 A β 的生成与神经细胞的氧化损伤来达到治疗 AD 的作用。本文从蛋白质组层面对二至丸治疗去卵巢所致 AD 机制进行了分析和解释,研究结果有将利于对二至丸治疗 AD 作用及机制的更深入研究。

[参考文献]

[1] 应侠,吴振,雷严,等. 阿尔茨海默病的发病机制及治疗药物研究进展[J]. 中国药房, 2014, 25(33): 3152-3155.
[2] 李林. 中国阿尔茨海默病研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2015, 29(5): 765-783.
[3] 蔡秀江,黄美艳,丁安伟,等. 二至丸考源及药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23):

272-275.

[4] Angel T E, Aryal U K, Hengel S M, et al. Mass spectrometry based proteomics: existing capabilities and future directions[J]. Chemi Soc Rev, 2012, 41(10): 3912-3928.
[5] 李海,杨洁,黄炳臣,等. 山茶籽茶麸醇提物对去卵巢阿尔茨海默病大鼠学习记忆和脑源性神经营养因子的影响[J]. 中国妇幼保健, 2016, 31(11): 2384-2837.
[6] 侯敏,傅应军,刘超,等. 覆盆子有效部位对去卵巢 AD 小鼠海马蛋白组学影响研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(15): 2895-2900.
[7] Wixon J, Kell D. The Kyoto encyclopedia of genes and genomes--KEGG[J]. Yeast, 2000, 17(1): 48-55.
[8] 刘庆山,陈小玉,庄述娟. 基因表达谱芯片技术进展及其在中药网络药理学研究中的应用[J]. 时珍国医国药, 2014, 24(2): 502-504.
[9] 方焕松,刘友章,邱俊,等. 四君子汤对慢性心衰大鼠心肌组织蛋白质组学影响的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(5): 152-156.
[10] Kuhajda F P, Pizer E S, LI J N, et al. Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase [J]. Proc Nat Acad Sci U S A, 2000, 97(7): 3450-3454.
[11] YU Y, Morin P J, HANW F, et al. Regulation of fatty acid synthase expression in breast cancer by sterol regulatory element binding protein-1c[J]. Exp Cell Res, 2003, 282(2): 132-137.
[12] WAN Q, KUANG E, DONG W, et al. Reticulon 3 mediates Bcl-2 accumulation in mitochondria in response to endoplasmic reticulum stress[J]. Apoptosis, 2007, 12(2): 319-328.
[13] HU X Y, SHI Q, ZHOU X D, et al. Transgenic mice overexpressingreticulon 3 develop neuritic abnormalities [J]. EMBO J, 2007, 26(11): 2755-2767.
[14] SHI Q, Marguerite P, ZHOU X D, et al. Preventing formation of reticulon 3 immunoreactive dystrophic neurites improves cognitive function in mice [J]. J Neurosci, 2013, 33(7): 3059-3066.
[15] 邱宏,金国琴,张学礼,等. 调心方对氧化损伤型类 AD 大鼠能量代谢的影响[J]. 中药药理与临床, 2002, 18(1): 18-21.

[责任编辑 周冰冰]