

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

方焕松¹, 刘友章^{2*}, 邱俊³, 冼绍祥², 丁玲¹

(1. 广州中医药大学, 广州 510405; 2. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405;
3. 华发新城社区卫生服务中心, 广东珠海 519000)

[摘要] 目的:探讨四君子汤对慢性心衰大鼠心肌组织蛋白质表达变化的影响。方法:SD 雄性大鼠 42 只,随机取 6 只作为正常组,其余 36 只复制慢性心力衰竭大鼠模型,造模成功后,分为四君子汤高、低剂量组(11.88, 2.97 g·kg⁻¹·d⁻¹),卡托普利组(100 mg·kg⁻¹·d⁻¹),正常组和模型组分别给予相同体积生理盐水,连续灌胃给药 1 月。分别留取各组左心室组织,双向凝胶电泳分离心肌蛋白,分析差异显示的蛋白,并对有显著差异的蛋白点进行胶内酶切和质谱鉴定。结果:与模型组比较,四君子汤组有 31 种蛋白质表达上调,28 种蛋白质表达下调,各选取 8 个差异显著(Volume 值相差≥1.5 倍)的蛋白进行质谱鉴定,通过整合去重,鉴定出 4 个蛋白:与能量代谢相关的 Suclg2 蛋白、丙酮酸脱氢酶复合体;与心肌细胞收缩功能相关的肌球蛋白轻链 2;与心肌细胞重构相关的丝氨酸蛋白酶抑制剂 A3N。结论:四君子汤可调节慢性心衰大鼠心肌组织多种蛋白表达,可能通过调节能量代谢、减少心肌重构、提高收缩功能而改善心功能。

[关键词] 四君子汤; 慢性心衰; 心肌蛋白质组学; Suclg2; 丝氨酸蛋白酶抑制剂; 丙酮酸脱氢酶; 肌球蛋白轻链

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)05-0152-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017050152

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161207.1150.046.html>

[网络出版时间] 2016-12-07 11:50

Effect of Sijunzi Tang on Proteomics of Myocardial Tissues In Rats With Chronic Heart Failure

FANG Huan-song¹, LIU You-zhang^{2*}, QIU Jun³, XIAN Shao-xiang², DING Ling²

(1. Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Guangdong 510405, China;
2. First Affiliated Hospital, Guangzhou University of TCM, Guangdong 510405, China;
3. HuaFa New Town Community Health Service Center, Zhuhai 519000, China)

[Abstract] **Objective:** To discuss the effect of Sijunzi Tang on the expression of myocardial proteins in rats with chronic heart failure. **Method:** Establishing Among 42 SD male rats, 6 rats were randomly selected as normal group, and the rest 36 rats were used to establish chronic heart failure rat models. After successful modeling, they were divided into Sijunzi Tang high-dose group and low-dose group (11.88, 2.97 g·kg⁻¹·d⁻¹) and Captopril group (100 mg·kg⁻¹·d⁻¹). Rats in blank group and model group received administration of the same volume of normal saline, continuous for 1 month. Left ventricular tissues were taken respectively from various groups, and two dimensional gel electrophoresis was used to isolate proteins of cardiac muscle, analyze the differential protein spots and conduct in-gel digestion and mass spectrum identification for the differential protein spots. **Result:** Compared with the model group, 31 proteins had up-regulated expression and 28 proteins had down-regulated expression in Sijunzi Tang group. 8 proteins which displayed significant difference were respectively

[收稿日期] 20161220(018)

[基金项目] 广州中医药大学中医内科学国家“特色重点学科建设项目”

[第一作者] 方焕松, 博士, 从事中医内科疑难病的诊治研究, Tel:13798182566, E-mail: fonghoso@163.com

[通讯作者] *刘友章, 教授, 博士生导师, 从事中医内科疑难病的诊治研究, E-mail: liu408@126.com

selected in each group (Volume ≥ 1.5) for mass spectrum identification and 4 proteins were identified as follows after integration and duplicate removal: Suclg2 protein and pyruvate dehydrogenase complex related to energy metabolism; myosin light chain 2 related to myocardial contraction function; and serine protease inhibitor A3N related to myocardial cell reconstruction. **Conclusion:** Sijunzi Tang could regulate the expression of a variety of myocardial proteins in chronic heart failure rats, probably by regulating the energy metabolism, reducing cardiac remodeling and improving systolic function and heart function.

[Key words] Sijunzi Tang; chronic heart failure; myocardial proteomics; Suclg2; serine proteinase inhibitor; pyruvate dehydrogenase; myosin light chain

慢性心力衰竭是一种不同病因引起器质性心血管病的主要综合征^[1],本课题前期实验^[2]结果显示“四君子汤”能明显改善慢性左心衰模型大鼠的心功能,现进一步观察“四君子汤”对慢性心衰模型大鼠心肌组织蛋白组学的影响。

本研究从中医“心脾相关”理论出发,探讨四君子汤对慢性心衰心肌组织蛋白组学的影响,实验鉴定出 4 种差异蛋白,经过 uniprot 及文献检索蛋白功能,推测四君子汤改善心衰大鼠心功能的作用机制可能如下:丝氨酸蛋白酶抑制剂是一类单链蛋白质,其基本功能是防止不必要的蛋白水解,调节丝氨酸蛋白酶的水解平衡,若蛋白酶的水解反应失控将导致严重的疾病或者功能紊乱^[3]。在人类及动物血液中的丝氨酸蛋白酶抑制剂,与凝血、纤溶以及血压调节等有关。Coronado 等^[4]通过研究发现鞣酮和白介素-1 β 能使心肌中丝氨酸蛋白酶抑制剂 A3N (serpina3n) 的表达上调,从而增加柯萨基病毒性心肌炎模型小鼠的心肌重构。Ang 等^[5]研究发现 serpina3n 通过抑制颗粒酶 B 介导核心蛋白聚糖的降解,能增加胶原蛋白重构和增强动脉外膜,从而减少腹主动脉瘤模型小鼠的动脉破裂率和死亡率。本研究结果发现丝氨酸蛋白酶抑制剂 A3N 表达的下调,可能会减少心肌重构和胶原蛋白重构,从而防止心脏向失代偿进展。

1 材料

1.1 动物 动物 SD 雄性大鼠 42 只,体重 180 ~ 220 g,由中山大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(粤)2011-0029。本研究获得广州中医药大学动物伦理委员会批准下进行。

1.2 药物及试剂 药品四君子汤(人参 9 g,白术 9 g,茯苓 9 g,炙甘草 6 g),由广东省中医研究所制剂室制备,并浓缩至含生药 1.188 g·mL⁻¹ 的浓缩液备用。卡托普利片(中美上海施贵宝制药有限公司,批号 1111031H);尿素,硫脲,3-[(3-胆固醇氨基丙基)二甲基氨基]-1-丙磺酸,甲叉二丙烯酰胺,碘乙

酰胺,胰酶(美国 Sigma 公司,批号分别为 S0130, 1508-65-3, 1508-76-6, 149845-06-7, 12777-70-8, 84605-18-6);蛋白酶抑制剂(PMSF),胎牛血清(BSA),考马斯亮蓝 G-250,溴酚蓝, *N,N,N',N'*-四甲基乙二胺(TEMED)(上海生工公司);二硫苏糖醇(DTT),三羟甲基氨基甲烷,丙烯酰胺,甘氨酸,甘油(美国 Amresco 公司);十二烷基硫酸钠(SDS,美国 Promega 公司),质谱基质(HCCA,美国 ABI 公司),磷酸、冰醋酸、无水乙酸钠、乙醇、乙二胺四乙酸二钠(广州化学试剂厂)。

1.3 仪器 H5050R 型冷冻离心机(湘仪集团), JY96-IIN 型超声仪(SCIENTZ),EttanIPGghor 3 型等电聚焦仪(美国 GE 公司),Typhoon 9400 型激光扫描仪(美国 GE 公司),LNG-L96 型真空干燥机(华利达集团),Ultraflex III TOF/TOF 型质谱仪(德国布鲁克公司)。

2 方法

2.1 造模方法 随机留取 6 只作为正常组,其余 36 只参照文献[6-7]采用 10% 乌拉坦(0.7 g·kg⁻¹)腹腔麻醉,左上腹切口,使腹主动脉充分暴露,在双肾动脉上方 0.5 cm 处将 8 号针头与腹主动脉共同结扎,拔除针头,造成腹主动脉管腔环形缩窄约 50% ~ 60%,缩窄 8 周。术后青霉素 5 万 U/只肌肉注射 1 周,预防感染。正常组大鼠同法打开腹腔,但不进行腹主动脉结扎,其余操作同上。8 周后检测血流动力学指标,左室舒张末压(LVEDP) ≥ 15 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa),判断心衰模型构建成功。

2.2 给药方法 造模成功后,四君子汤高、低剂量组分别按 11.88, 2.97 g·kg⁻¹·d⁻¹,卡托普利组剂量为 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹,正常组和模型组分别给予相同体积生理盐水,连续灌胃给药 1 月。

2.3 心肌组织蛋白提取 末次给药 24 h 后,各组大鼠脱颈椎处死,打开腹腔,分别留取各组左心室组织。选取四君子汤高剂量组和模型组等量心肌组织,经研磨、裂解、溶解、超声处理后收集上清液。将

上清液分装,加入丙酮沉淀过夜。沉淀完的蛋白质低温高速离心,自然干燥,即得到处理后的蛋白质团块, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.4 心肌组织蛋白质双向电泳

2.4.1 一向等电聚焦

①蛋白质团块重溶及上样:干燥蛋白质团块经再水化、超声助溶,用 Bradford 法定量总蛋白含量。吸取相应量的蛋白质上样,银染 $100\text{ }\mu\text{g}$, 质谱胶(考染) $1\text{ }200\text{ }\mu\text{g}$ 。②干胶条泡胀:吸取离心后样品上清液加到水化盘,加样长约 22 cm 。取出胶条,胶面朝下,酸性端朝顶端将胶条放入水化盘的槽中,加入覆盖油 1.2 mL 于支持膜上保湿,调节室内温度为 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 让胶条泡胀 ($10\sim 12\text{ h}$), 记录下胶条的号码。③等电聚焦:取出胶条吸干覆盖油,胶面朝上放入等电聚焦盘中。装上电极板,运行程序为 S1 stp $300\text{ V }0:30\text{ Hr}$, S2 stp $700\text{ V }0:30\text{ Hr}$, S3 stp $1\text{ }500\text{ V }1:30\text{ Hr}$, S4 grd $9\text{ }000\text{ V }3:00\text{ Hr}$, S5 stp $9\text{ }000\text{ V }4:00\text{ Hr}$, 整个聚焦过程所用总电压为 52 kWh 。跑完等电聚焦以后,取出胶条,吸干覆盖油,胶面朝上放入平衡管, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.4.2 二向垂直电泳

①平衡:取出胶条复温,加入去离子水 10 mL 左右洗掉覆盖油。每支平衡管加入平衡液 8 mL , 加二硫苏糖醇(DTT)平衡 15 min , 倒净后加入碘乙酰胺(IAA)平衡 15 min 。②SDS-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳:将 IPG 胶条置于 SDS-PAGE 胶顶部,以 0.80% 低熔点琼脂糖封胶。置入垂直电泳槽进行二向垂直电泳。二向电泳的程序为 S1 $2\text{ W/gel }45\text{ min}$, S2 17 W/gel , 溴酚蓝从前沿至玻璃板下缘为止,约 4.5 h 。SDS-PAGE 分离后,凝胶用银染法染色或考马斯亮蓝法显影。

2.5 凝胶扫描与图像分析

采用激光扫描仪 Typhoon 9400,以 200 dpi 的分辨率, 256 灰阶对考染凝胶进行扫描,利用 ImageMaster 2D platinum 5.0 软件进行分析。采用二维校正法确定蛋白点相对分子质量和等电点。

2.6 肽谱分析

选取各组凝胶中 Volume 值相差 ≥ 1.5 倍的蛋白斑点,攫取下来,经洗涤、还原、烷化、胶内酶切、低温真空离心等处理后,与 HCCA 基质混匀,点于样品靶,室温干燥,用德国布鲁克(Bruker Dalton) Ultraflex III TOF/TOF 质谱仪进行质谱分析。用软件 Flex Analysis (Bruker Dalton) 过滤基线峰、识别信号峰。利用 Bio Tools (Bruker Dalton) 软件搜索 NCBI 数据库,寻找匹配的相关蛋白质,同时查询其功能,来明确鉴定的蛋白质为何种蛋白质。

3 结果

3.1 对双向电泳蛋白分辨率和匹配率的影响

用 24 cm IPG 干胶条 ($\text{pH }4\sim 7$) 和 12.5% 聚丙烯酰胺凝胶进行双向电泳,模型组和四君子汤高剂量组各重复 1 次,凝胶经考染、扫描后,计算机图像分析,模型组可分辨蛋白点为 (1615 ± 7) 个,匹配率为 82.26% , 四君子汤组可分辨蛋白点为 (1583 ± 60) 个,匹配率为 82.27% 个,凝胶图像见图 1。分别以每组中的一张胶作为参考胶,其余胶与之匹配,平均匹配率为 $(80.4 \pm 1.9)\%$ 。

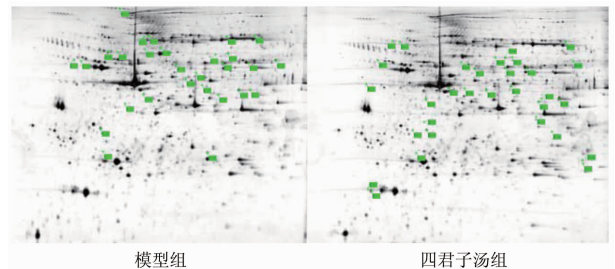


图 1 四君子汤对双向电泳蛋白分辨率和匹配率的影响

Table 1 Effect of Sijunzi Tang on two-dimensional electrophoresis protein resolution and matching rate

3.2 对心肌组织蛋白质表达的影响

对两组胶进行差异性分析,结果显示,各组间蛋白质斑点发生显著性变化,四君子汤组与模型组相比较,表达明显差异的点共 59 个,其中表达明显增强的点有 31 个,表达明显降低的有 28 个。两组蛋白点的 Volume 值相差 ≥ 1.5 倍时,认为有显著差异。对其中有显著差异的 16 个蛋白质点进行质谱分析,运用 Mascot 软件搜索 NCBI 数据库,鉴定分值 (Score) > 61 认为差异有显著性 ($P < 0.05$)。共有 15 个点得到阳性鉴定,通过整合重复蛋白点后,确认 4 个为差异蛋白点,其中四君子汤高剂量组与模型组相比,表达上调的点有 2 个: Suclg2 蛋白 (Suclg2 蛋白)、肌球蛋白轻链 2 (myosin regulatory light chain 2); 表达下调的点有 2 个: 丝氨酸蛋白酶抑制剂 A3N (Serine protease inhibitor A3N), 丙酮酸脱氢酶复合体 (Pdhx protein)。差异蛋白点的鉴定分值、等电点、相对分子质量和 Volume 值变化见表 1。

4 讨论

丙酮酸脱氢酶复合体 (Pdhx) 是生物体内催化丙酮酸转变成乙酰辅酶 A 的 3 种酶及 5 种辅酶的组合,是糖有氧氧化过程中的一组限速酶,在线粒体呼吸链能量代谢中的作用至关重要。脂肪酸氧化代谢和葡萄糖氧化代谢之间存在相互反馈调节关系,脂肪酸氧化代谢增强可以抑制葡萄糖氧化^[8]。

表 1 四君子汤对心肌组织蛋白质表达的影响

Table 1 Effect of Sijunzi Tang on myocardial tissue protein expression

编号	序列号	分值	等电点	相对分子质量/Da	蛋白名称	Volume 值差异/倍
C12	gi1133777117	156	5.31	45 624	丝氨酸蛋白酶抑制剂 A3N	1.672 81
C13	gi160688224	101	8.83	41 036	酶复合体	1.929 45
D14	gi159808474	94	5.64	41 980	Suclg2 蛋白	6.666 14
D31	gi1386869343	118	4.86	18 868	肌球蛋白轻链 2	1.799 72

Calvani 等^[9]研究发现缺血再灌注期间脂肪酸的氧化迅速恢复成为能量主要来源,丙酮酸氧化被抑制。丙酮酸脱氢酶复合体表达下降的原因可能是四君子汤改变心肌的供氧或者供能底物,使脂肪酸的氧化代谢增强,抑制了糖酵解,增加了葡萄糖的有氧氧化,从而改善心肌的能量代谢。

Suclg2 蛋白属于琥珀酰辅酶 A 连接酶家族,琥珀酰辅酶 A 是三羧酸循环的重要组成成分,催化该循环中唯一发生在底物水平磷酸化的步骤,使琥珀酰辅酶 A 转化成琥珀酸盐,它有 α 和 β 两种亚基构成, β 亚基决定二磷酸鸟苷 (GDP) 和二磷酸腺苷 (ADP) 的底物特异性, α 亚基由 Suclg1 基因编码, β 亚基由 Sucla2 和 Suclg2 编码,Sucla2 决定 ADP 的特异性亚基,Suclg2 决定 GDP 的特异性亚基^[10]。三羧酸循环是生物机体获取能量的主要方式,是糖、脂肪和蛋白质三种主要有机物在体内彻底氧化的共同代谢途径,Suclg2 的表达水平与心肌的能量代谢水平有密切联系。Miller 等^[11]研究发现 Suclg2 基因敲除的患者和控制成纤维细胞都表现出线粒体 DNA 数量的显著减少和核苷二磷酸激酶、环氧化酶活性的显著降低。本研究结果表明四君子汤能显著提高心肌组织 Suclg2 的表达,而本课题组早期研究发现四君子汤可以改善脾虚模型大鼠心肌线粒体的功能,修复损伤线粒体,并能增加线粒体数量^[12],其作用机制可能与此有关。

肌球蛋白轻链 2 (MLC-2) 的作用是调控肌肉收缩^[13-14],MLC-2 基因敲除小鼠的 mRNA 和蛋白分别减少了 50% 和 25%,心脏功能和肌纤维组织均受损,说明 MLC-2 能影响心肌收缩功能^[15-17]。Margossian 等^[18]检测发现扩张性心肌病 (DCM) 患者心室肌肌球蛋白轻链 2 (VMLC-2) 含量明显下降甚至消失,而 Trahair 等^[19]在研究扩张性心肌病终末期心衰患者时发现心室肌 VMLC-1 的含量下降,但 VMLC-2 无明显变化。郎希龙等^[20]通过研究风湿性心脏病 (RHD) 心衰时心室肌中肌球蛋白轻链 (VMLC) 的变化,发现与正常组相比,RHD 心衰患

者 VMLC-1, VMLC-2 含量,均显著低于对照组,以 VMLC-2 含量下降最明显。由此可见,心肌收缩蛋白功能低下,与心衰的发生发展密切相关。本研究中四君子汤组 MLC-2 的表达升高,可能会使心肌的收缩功能得到提高,从而改善心功能。

综上所述,本研究心肌组织蛋白表达显著变化的蛋白中,与心肌能量代谢相关的有 2 个,与心肌重构和收缩功能相关的有 2 个,说明四君子汤可能通过改善慢性心衰心肌组织的能量代谢、减少心肌重构、提高其收缩功能,从而改善慢性心衰模型大鼠的心功能。

[参考文献]

[1] 王吉耀. 内科学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2005:123.

[2] 邱俊, 刘友章, 王超, 等. 从四君子汤对慢性心衰模型大鼠心功能的影响探讨“心脾相关”[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(10): 2564-2566.

[3] Mangan M S, Kaiserman D, Bird P I. The role of serpins in vertebrate immunity [J]. Tissue Antigens, 2008, 72(1): 1-10.

[4] Coronado M J, Brandt J E, Kim E, et al. Testosterone and interleukin-1 β increase cardiac remodeling during coxsackievirus B3 myocarditis via serpin A 3n [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012, 302(8): 1726-1736.

[5] Ang L S, Boivin W A, Williams S J, et al. Serpina3n attenuates granzyme B-mediated decorin cleavage and rupture in a murine model of aortic aneurysm [J]. Cell Death Dis, 2011, 2(9): 1-10.

[6] Ganguly P K, Lee S L, Beamish R E, et al. Altered sympathetic system and adrenoceptors during the development of cardiac hypertrophy [J]. Am Heart J, 1989, 118(3): 520-525.

[7] 胡咏梅, 李法琦, 罗羽慧, 等. 腹主动脉缩窄大鼠模型制作及临床意义 [J]. 重庆医科大学学报, 2004, 29(3): 322-324.

[8] 秦少强. 心肌能量代谢与老年缺血性心力衰竭 [J]. 吉林医学, 2008, 29(19): 1685-1687.

[9] Calvani M, Reda E, Arrighi-Martelli E. Regulation by

- carnitine of myocardial fatty acid and carbohydrate metabolism under normal and pathological conditions [J]. *Basic Res Cardiol*, 2000, 95(2):75-83.
- [10] Sakamoto O, Ohura T, Murayama K, et al. Neonatal lactic acidosis with methylmalonic aciduria due to novel mutations in the SUCLG1 gene [J]. *Pediatr Int*, 2011 (53):921-925.
- [11] Miller C, Wang L Y, Ostergaard E, et al. The interplay between SUCLA2, SUCLG2, and mitochondrial DNA depletion [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1812(5):625-629.
- [12] 刘友章, 王昌俊, 周俊亮, 等. 长期脾虚模型大鼠细胞线粒体的研究 [J]. *中医药学刊*, 2006, 24(3):391-393.
- [13] Seguchi O, Takashima S, Yamazaki S, et al. A cardiac myosin light chain kinase regulates sarcomere assembly in the vertebrate heart [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(10):2812-2824.
- [14] Moss R L, Fitzsimons D P. Myosin light chain 2 into the mainstream of cardiac development and Contractility [J]. *Circ Res*, 2006, 99(3):225-227.
- [15] Blanchard E M, Iizuka K, Christie M, et al. Targeted ablation of the murine alpha-tropomyosin Gene [J]. *Circ Res*, 1997, 81(6):1005-1010.
- [16] Rethinasamy P, Muthuchamy M, Hewett T, et al. Molecular and physiological effects of alpha-tropomyosin ablation in the mouse [J]. *Circ Res*, 1998, 82(1):116-123.
- [17] Bozzo C, Stevens L, Toniolo L, et al. Increased phosphorylation of myosin light chain associated with slow-to-fast transition in rat soleus [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003, 285(3):C575-583.
- [18] Margossian S S, White H D, Caulfield J B, et al. Light chain 2 profile and activity of human ventricular myosin during dilated cardiomyopathy Identification of a causal agent for impaired myocardial function [J]. *Circulation*, 1992, 85(5):1720-1733.
- [19] Trahair T, Yeoh T, Cartmill T, et al. Myosin light chain gene expression associated with disease states of the human heart [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1993, 25(5):577-585.
- [20] 郎希龙, 朱家麟, 张宝仁, 等. 风湿性心脏病患者心肌肌球蛋白轻链的变化 [J]. *第二军医大学学报*, 1999, 20(5):325-326.

[责任编辑 周冰冰]