

差异蛋白质组学法探索大承气汤优化方 治疗便秘小鼠的生物学基础

陈银芳^{1,2}, 于小娟¹, 刘新辉¹, 余日跃^{1,3*}, 聂斌¹, 彭红¹, 刘红宁^{1,3}

(1. 江西中医药大学, 南昌 330004; 2. 湖南中医药大学, 长沙 410208;

3. 江西省中医病因生物学重点实验室, 南昌 330004)

[摘要] **目的:**应用差异蛋白质组学方法探索大承气汤优化方治疗便秘小鼠的生物学基础。**方法:**实验动物分为正常组、模型组及大承气汤优化方组。模型组、大承气汤优化方组小鼠按 $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃给予复方地芬诺酯混悬液以制备便秘模型,正常组小鼠则给予等量生理盐水。大承气汤优化方组按 $31 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃给予大承气汤优化方药液,正常组及模型组小鼠则给予等量生理盐水。完成药效指标检测后,处死动物,称取小鼠大肠组织,提取蛋白样品,经纳升级高效液相色谱联用线性离子阱/静电场轨道阱高分辨组合式质谱(NanoLC-LTQ Orbitrap Elite)系统分析检测,Protein Discovery 软件进行蛋白质搜库,Sieve v2.1 软件对所有样本蛋白进行相对定量分析。**结果:**与模型组相比,大承气汤优化方组小鼠的肠组织蛋白表达上调或下调且与正常组变化方向一致的有 77 个。经文献检索分析表明,以上蛋白生物学功能一方面集中于促进糖脂代谢、三羧酸循环、生物氧化及能量代谢等,由此增加机体对大肠蠕动的供能,另一方面表现为增强肠道平滑肌的收缩功能,以促进肠道蠕动,缓解便秘。**结论:**差异蛋白质组学法找出的相关蛋白靶点及其涉及的生物体调控通路极可能是大承气汤优化方治疗便秘小鼠的生物学基础。

[关键词] 差异蛋白质组学; 大承气汤; 便秘; 生物学基础; 复方地芬诺酯; 三羧酸循环

[中图分类号] R969.1;R285.5;R284.1;R945;Q493.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)14-0093-07

[doi] 10.13422/j.cnki.sjfx.2017140093

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170427.1023.012.html>

[网络出版时间] 2017-04-27 10:23

Discussion on Biological Basis of Constipated Mice Cured by Optimal Prescription of Da Chengqitang with Differential Proteomics

CHEN Yin-fang^{1,2}, YU Xiao-juan¹, LIU Xin-hui, YU Ri-yue^{1,3*},
NIE Bin¹, PENG Hong¹, LIU Hong-ning^{1,3}

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

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

3. Key Laboratory of Pharmacology of TCM of Jiangxi Province, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the biological basis of constipated mouse cured by optimal prescription of Da Chengqitang with differential proteomics. **Method:** Mice were randomly divided into normal group, model group and optimal prescription of Da Chengqitang group. Mice in the model group and optimal prescription of Da Chengqitang group were delivered compound diphenoxylate suspension with $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ to develop constipation model. While the normal mice were delivered the same volume of normal saline. Then, mice in optimal prescription of Da Chengqitang group were delivered with decoction at the dose of $31 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, other mice were

[收稿日期] 20161214(013)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81160424);江西省中医药科技计划项目(2015A247)

[第一作者] 陈银芳,讲师,从事蛋白质组学研究,Tel:0791-87118919,E-mail:157902106@qq.com

[通讯作者] *余日跃,教授,硕士生导师,从事中药药理学研究,Tel:0791-87118919,E-mail:yry59@126.com

delivered the same volume of normal saline. When finishing the experiment, proteins of large intestine were extracted, digested and detected by NanoLC-LTQ-Orbitrap system. The data was imported into Protein Discovery software to identify the proteins and all the raw data was analyzed by Sieve v2.1 software. **Result:** Compared with the model group, 77 significant difference proteins were found in optimal prescription of Da Chengqitang group, which the variation trend was consistent with the normal group. Literature retrieval and analysis showed that the biological functions of differential proteins focused on sugar and lipid metabolism, tricarboxylic acid cycle, biological oxidation and energy metabolism to provide energy for large intestine peristalsis and fortify contraction function of the intestinal smooth muscle. **Conclusion:** The above target proteins and their regulation pathways may be the biological basis of constipated mice cured by optimal prescription of Da Chengqitang.

[**Key words**] differential proteomics; Da Chengqitang; constipation; biological basis; compound diphenoxylate; tricarboxylic acid cycle

便秘是以排便次数减少、粪便量减少、粪便干结、排便费力为特点的临床常见多发病症,可由多种疾病引起,包括功能性疾病和器质性疾病,不少药物亦可引起便秘^[1]。大承气汤为张仲景《伤寒论》泻下中药的代表方,由大黄、厚朴、枳实、芒硝 4 味中药组成^[2],主治阳明腑实证、大便不通、频转矢气、脘腹痞满。该方对临床各种原因所致便秘有极好的疗效,但作用机制尚不够明确^[3-4]。

差异蛋白质组学是一种通过蛋白质的差异表达分析,明确疾病病理变化过程或治疗干预作用机制,从而在短期内获得有关生命活动的“全景式信息”的方法^[5]。差异蛋白质组学这种从整体角度分析不同状态下机体蛋白质表达的动态演变过程,其研究方法与中医辨证论治、中药方剂多靶点综合调节的方式十分契合。侯敏等^[6]采用差异蛋白质学方法探究了覆盆子乙酸乙酯提取物对去卵巢阿尔茨海默病 AD 模型小鼠海马蛋白组表达的影响,结果显示包含热休克蛋白、微管蛋白、能量代谢相关蛋白和脑保护相关蛋白在内的 66 个差异表达蛋白可能与覆盆子乙酸乙酯提取物调节 AD 有关。另外,本课题组前期应用基于 LTQ-Orbitrap 技术的差异蛋白质组学方法探索了人参干预“气虚”大鼠的生物学基础,结果发现能量代谢相关蛋白、糖代谢相关蛋白、电解质平衡及物质转运相关蛋白、炎症相关蛋白和细胞骨架相关蛋白等 26 个靶蛋白及其涉及的生物体调控通路可能是人参对机体“气虚”证候发挥补气作用的生物学基础^[7]。

前期已采用自适应设计法探索了大承气汤组方配伍对小鼠便秘模型的治疗效果,并筛选得出较原方效果更好的优化方^[8]。但由于中药方剂复杂,便秘病证原因多样,其优化方的作用机制并不甚清楚。因此,本实验应用差异蛋白质组学方法考察大承气

汤优化方治疗便秘小鼠调节的靶点蛋白,并结合生物学功能分析,以探索该方治疗作用的可能生物学基础。

1 材料

EASY-nLC 1000 型纳升级超高效液相色谱仪, LTQ Orbitrap Elite 型组合式质谱仪和 D-37520 型高速冷冻离心机(美国 Thermo 公司);AR-5120 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司);CentriVap® 型离心浓缩仪(美国 Labconco 公司);ELX800 型吸收光酶标仪(美国 Bio-Tek 公司)。

大黄颗粒剂、厚朴颗粒剂、枳实颗粒剂(广东一方制药有限公司,批号分别为粤 20150214,粤 20150318,粤 20150125),芒硝(北京鹤元堂医药科技有限公司,批号 150111,经江西中医药大学邓可众副教授鉴定,符合 2015 年版《中国药典》的相关要求),复方地芬诺酯片(常州康普药业有限公司,批号 1503030),放射性免疫沉淀反应试验(RIPA)高效裂解液、碘代乙酰胺、二硫苏糖醇、苯甲基磺酰氟(PMSF)和二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒(美国 Thermo 公司,批号分别为 QB212494, QG218722, QH220967, QI2072743, QH220534A),测序级胰蛋白酶(美国 Promega,批号 0000162579),碳酸氢铵粉末(美国 Sigma-Aldrich 公司,批号 BCBN6056V)。

SPF 级昆明种小鼠 30 只,体重(21 ± 1) g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,合格证号 SCXK(湘)2011-0003。实验经江西中医药大学动物实验伦理委员会批准,批准号 20150323。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药 将健康小鼠按体重随机分成正常组、模型组和大承气汤优化方组(前期研究对大承气汤采用类似于序贯设计,可时时对试

验结果进行动态性优化的自适应设计法得出的优化方,处方为大黄 7 g,厚朴 0 g,枳实 7 g,芒硝 1.5 g),每组 10 只。各组动物禁食不禁水 12 h,模型组、大承气汤优化方组小鼠按 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃给予复方地芬诺酯混悬液以制备便秘模型,正常组小鼠则给予等量生理盐水。大承气汤优化方组按 $31 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (以生药量计)灌胃给予大承气汤药液,正常组及模型组小鼠则灌胃等量生理盐水。

2.2 蛋白质样品处理^[7]

2.2.1 全蛋白的提取 后颈椎脱臼处死小鼠后,精密称取小鼠大肠组织 0.12 g,置于 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷的研钵中,粗略研磨后加入裂解液[RIPA 高效裂解液-PMSF(100:1)] 1 mL,液氮中研磨成浆液后,转移至 1.5 mL 离心管中,摇床上 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 中速摇晃 40 min,使组织充分裂解。于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $14\ 000 \times g$ 离心处理 40 min,弃去沉淀,上清液即为大肠组织蛋白。每组各选取 3 只动物提取蛋白样品,作为蛋白质组数据分析的生物复本。采用 BCA 法测定样品总蛋白浓度。

2.2.2 蛋白质的酶解 取上述蛋白样品 $30 \text{ }\mu\text{L}$,加入适量二硫苏糖醇溶液,保证其终浓度最终达到 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,于 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴 60 min。加入适量碘代乙酰胺溶液,保证其终浓度为 $55 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,避光反应 45 min。加入 5 倍量冰丙酮, $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 沉淀过夜。样品离心($4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $14\ 000 \times g$, 10 min,下同),弃去上清液,加入丙酮 1.0 mL,涡旋混匀,离心,弃去上清液。反复 3 次以清洗蛋白质。将蛋白质重悬于 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸氢氨溶液 $500 \text{ }\mu\text{L}$ 中,按照酶-蛋白(1:50)加入测序级胰蛋白酶, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴酶解过夜。加入适量 5% 乙酸,使 $\text{pH} < 6$ 以终止酶解反应。

2.2.3 样品的除盐及冻干 酶解完的样品按 Pierce C_{18} Spin Columns 说明书中步骤进行脱盐处理,样品洗脱液经离心浓缩仪冷冻干燥, $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.2.4 样品的检测 取 0.1% 甲酸溶液 $50 \text{ }\mu\text{L}$ 复溶冻干样品,离心,上清液注入 NanoLC-LTQ-Orbitrap 联用系统对蛋白样品进行检测。色谱条件为 EASY-Spray C_{18} 色谱柱($75 \text{ }\mu\text{m} \times 15 \text{ cm}$, $3 \text{ }\mu\text{m}$), Acclaim PepMap[®] 100 C_{18} 预柱($75 \text{ }\mu\text{m} \times 2 \text{ cm}$, $3 \text{ }\mu\text{m}$),流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-0.1% 甲酸乙腈溶液(B)梯度洗脱(0~10 min, 5%~10% B; 10~65 min, 10%~22% B; 65~100 min, 22%~32% B; 100~110 min, 32%~90% B; 110~120 min, 90% B),进样量 $3 \text{ }\mu\text{L}$,流速 $250 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

质谱条件为正离子模式,喷雾电压 2.1 kV,毛细管温度设定 $250 \text{ }^{\circ}\text{C}$,一级图谱开启 FTMS(静电场轨道阱)扫描模式,IT(离子阱)模式下 35% 的碰撞能量,采用 DDA(data dependent acquisition)TOP20 方式采集二级质谱信息,扫描范围 m/z 300~1 800。

2.3 数据处理 将 LC-MS 所采集到的原始数据 RAW 文件导入 Protein Discovery 软件进行搜库匹配蛋白。小鼠蛋白质 Fasta 格式的数据库下载自 <http://www.uniprot.org/>(UniProtKB/Swiss-Prot 2016.1.10)。搜库参数基本设置为母离子质量偏差 $\pm 20 \text{ ppm}$,碎片离子质量偏差 $\pm 0.5 \text{ Da}$,蛋白质酶解类型为胰蛋白酶,最多允许 2 个漏切位点,肽序列氨基酸的固定修饰为半胱氨酸的烷基化修饰(carbamidomethyl:C + 57.021 Da),可变修饰为甲硫氨酸氧化修饰(oxidation:M + 15.995 Da),Target FDR(假阳性率)为 0.01 高可信度肽段匹配蛋白。运用 Sieve v2.1 软件对不同组别的蛋白进行非标记的相对定量分析。

3 结果

3.1 蛋白样品的 TIC 各组样品经 NanoLC-LTQ-Orbitrap 组合式高分辨串联质谱仪检测,总离子流(TIC)图见图 1。结果显示样品中肽段分离均匀合理、信息丰富、质谱信号高,说明蛋白样品的制备方法以及液相分离、质谱检测条件均较为适宜。

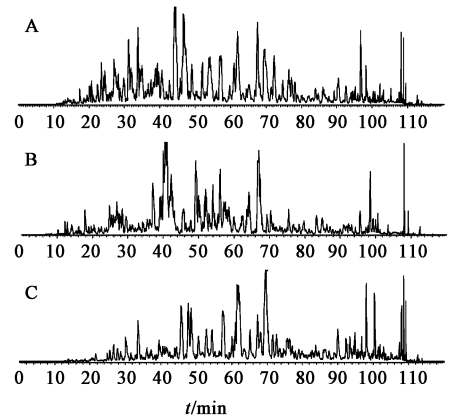


图 1 正常组(A),模型组(B)和大承气汤优化方组(C)小鼠大肠组织蛋白质的 TIC

Fig. 1 TIC of tissue proteins of rat large intestine in normal group (A), model group (B) and optimal prescription of Da Chengqitang group (C)

3.2 差异蛋白质的分析 以模型组为参照,把正常组与大承气汤优化方组的比值 ≥ 1.5 或 ≤ 0.5 认为是表达量有差异意义的蛋白。根据 Sieve v2.1 软件分析结果,寻找到正常组及大承气汤优化方组小鼠的肠组织蛋白表达上调的有 77 个,见表 1。

表 1 正常组、大承气汤优化方组与模型组小鼠大肠组织的差异蛋白

Table 1 Different proteins of rat large intestine tissue in normal group, model group and optimal prescription of Da Chengqitang group

蛋白质	N/M	Y/M	生物学功能
α -enolase(α -烯醇酶)	2.19	1.69	糖酵解
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(甘油醛-3-磷酸脱氢酶)	6.10	4.84	糖酵解
L-lactate dehydrogenase A chain(L-乳酸脱氢酶 A 链)	8.87	6.02	糖酵解
phosphoglycerate mutase 1(磷酸葡萄糖变位酶 1)	3.01	2.60	糖酵解
pyruvate kinase M(丙酮酸激酶 M)	9.05	6.23	糖酵解
phosphoglycerate kinase 1(磷酸甘油酸激酶 1)	9.70	7.05	糖酵解
L-lactate dehydrogenase C chain(L-乳酸脱氢酶 C 链)	13.14	7.64	糖酵解
γ -enolase(γ -烯醇化酶)	1.86	1.64	糖酵解
β -enolase(β -烯醇化酶)	1.86	1.64	糖酵解
aldose reductase(醛糖还原酶)	6.44	5.00	糖酵解
fructose-bisphosphate aldolase A(果糖二磷酸醛缩酶 A)	7.61	5.25	糖酵解
carboxylesterase 1C(羧酸酯酶 1C)	6.60	1.79	脂代谢蛋白
carboxylesterase 1E(羧酸酯酶 1E)	6.60	1.79	脂代谢蛋白
liver carboxylesterase 1(肝羧酸酯酶 1)	6.60	1.79	脂代谢蛋白
carboxylesterase 1D(羧酸酯酶 1D)	6.60	1.79	脂代谢蛋白
selenium-binding protein 1(硒结合蛋白 1)	4.01	3.02	脂代谢蛋白
selenium-binding protein 2(硒结合蛋白 2)	4.01	3.02	脂代谢蛋白
D- β -hydroxybutyrate dehydrogenase, mitochondrial(D- β -羟丁酸脱氢酶, 线粒体)	6.42	2.54	脂代谢蛋白
very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial(极长链特异性的酰基辅酶 A 脱氢酶, 线粒体)	4.73	3.91	脂代谢蛋白
A-kinase anchor protein 9(A-激酶锚定蛋白 9)	4.62	3.15	脂代谢蛋白
citrate synthase, mitochondrial(柠檬酸合成酶, 线粒体)	7.12	4.29	三羧酸循环蛋白
phosphoglycerate kinase 1(磷酸甘油酸激酶 1)	9.70	7.05	三羧酸循环蛋白
aconitate hydratase, mitochondrial(乌头酸水合酶, 线粒体)	3.54	2.69	三羧酸循环蛋白
malate dehydrogenase, mitochondrial(苹果酸脱氢酶, 线粒体)	3.02	1.76	三羧酸循环蛋白
malate dehydrogenase, cytoplasmic(苹果酸脱氢酶, 胞质)	3.54	2.76	三羧酸循环蛋白
isocitrate dehydrogenase [NADP]cytoplasmic(异柠檬酸脱氢酶[辅酶]胞质)	8.66	5.46	三羧酸循环蛋白
cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial(细胞色素 C 氧化酶亚基 5A, 线粒体)	5.89	3.62	生物氧化蛋白
peroxiredoxin-5, mitochondrial(过氧化物酶-5, 线粒体)	4.87	2.65	生物氧化蛋白
electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial(电子转移黄素蛋白 α 亚基, 线粒体)	9.61	6.20	生物氧化蛋白
electron transfer flavoprotein subunit beta[电子转移(传递)黄素蛋白 β 亚基]	3.05	1.88	生物氧化蛋白
retinal dehydrogenase 1(视黄醛脱氢酶 1)	9.59	3.43	生物氧化蛋白
aldehyde dehydrogenase, cytosolic 1(醛脱氢酶, 胞浆 1)	9.59	3.43	生物氧化蛋白
carbonyl reductase [NADPH]1(羰基还原酶[NADPH]1)	3.74	2.04	生物氧化蛋白
aldehyde dehydrogenase, mitochondrial(醛脱氢酶, 线粒体)	4.62	1.86	生物氧化蛋白
aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial(乙醛脱氢酶 X, 线粒体)	3.99	2.28	生物氧化蛋白
transitional endoplasmic reticulum ATPase[过渡时期内质网腺苷三磷酸酶(ATP 酶)]	2.01	2.04	能量代谢蛋白
calreticulin(钙网蛋白)	2.26	3.06	能量代谢蛋白
calmodulin(钙调蛋白)	4.96	2.46	能量代谢蛋白
guanosine diphosphate-mannose 4,6 dehydratase(二磷酸鸟苷-甘露糖 4,6-脱水酶)	11.65	5.41	能量代谢蛋白

续表 1

蛋白质	N/M	Y/M	生物学功能
ATP synthase subunit beta, mitochondrial (ATP 合酶 β 亚基, 线粒体)	4.08	2.24	能量代谢蛋白
heat shock cognate 71 kDa protein (热休克同源 71 kDa 蛋白)	5.88	4.73	能量代谢蛋白
heat shock-related 70 kDa protein 2 (热休克相关的 70 kDa 蛋白 2)	6.96	5.29	能量代谢蛋白
60 kDa heat shock protein, mitochondrial (60 kDa 热休克蛋白, 线粒体)	5.44	3.67	能量代谢蛋白
UMP-CMP kinase (UMP-CMP 激酶)	5.23	2.84	能量代谢蛋白
adenosylhomocysteinase (腺苷高半胱氨酸酶)	8.49	5.32	能量代谢蛋白
profilin-1 (前纤维蛋白-1)	8.08	5.04	肠运动蛋白
myosin light polypeptide 6 (肌球蛋白轻多肽 6)	3.04	3.95	肠运动蛋白
destrin (解聚蛋白, 肌动蛋白解聚因子)	4.06	2.85	肠运动蛋白
transgelin-2 (转凝蛋白)	3.88	3.59	肠运动蛋白
talin-1 (踝蛋白-1)	1.61	1.61	肠运动蛋白
cytoskeleton-associated protein 4 (细胞骨架相关蛋白 4)	0.50	0.21	其他
inositol monophosphatase 1 (肌醇单磷酸酶 1)	0.71	0.32	其他
peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (肽基脯氨酰顺反异构酶)	4.27	3.81	其他
stress-70 protein, mitochondrial (应激蛋白 70, 线粒体)	2.94	2.38	其他
polypeptide <i>N</i> -acetylgalactosaminyltransferase 3 (多肽 <i>N</i> -乙酰氨基半乳糖转移酶 3)	8.08	6.70	其他
thioredoxin (硫氧还蛋白)	4.73	3.91	其他
α -1-antitrypsin 1-1 (α -1-抗胰蛋白酶 1-1)	5.58	2.88	其他
α -1-antitrypsin 1-2 (α -1-抗胰蛋白酶 1-2)	5.58	2.88	其他
α -1-antitrypsin 1-3 (α -1-抗胰蛋白酶 1-3)	5.58	2.88	其他
α -1-antitrypsin 1-4 (α -1-抗胰蛋白酶 1-4)	5.58	2.88	其他
small ubiquitin-related modifier 2 (小泛素相关修饰物 2)	0.53	0.12	其他
small ubiquitin-related modifier 3 (小泛素相关修饰物 3)	0.53	0.12	其他
annexin A1 (膜联蛋白 A1)	3.30	3.25	其他
chloride intracellular channel protein 1 (氯离子通道蛋白)	8.03	6.18	其他
translationally-controlled tumor protein (TCTP, 翻译控制肿瘤蛋白)	5.45	4.88	其他
proteasome activator complex subunit 1 (蛋白酶体激活因子复合物亚基 1)	3.22	2.17	其他
elongation factor 1- α 1 (延伸因子 1- α 1)	2.04	2.03	其他
protein disulfide-isomerase (蛋白质二硫键异构酶)	6.14	4.07	其他
protein disulfide-isomerase A3 (蛋白质二硫键异构酶 A3)	3.67	3.25	其他
dihydropyrimidinase-related protein 2 (二氢嘧啶相关蛋白 2)	3.48	2.52	其他
immunoglobulin γ -2B chain C region (免疫球蛋白 γ -2B 链 C 区)	0.72	0.22	其他
protein S100-A10 (蛋白 S100-A10)	0.77	0.11	其他
glutathione <i>S</i> -transferase P 1 (谷胱甘肽 <i>S</i> -转移酶 P1)	4.46	2.69	其他
glutathione <i>S</i> -transferase P 2 (谷胱甘肽 <i>S</i> -转移酶 P2)	4.46	2.69	其他
lysozyme C-2 (溶解酶素 C-2)	0.48	0.04	其他
golgin subfamily A member 3 (高尔基体蛋白 A 亚基 3)	0.34	0.44	其他
branched chain amino acid aminotransferase, mitochondrial (支链氨基酸转氨酶, 线粒体)	0.49	0.05	其他

注: N 表示正常组, M 表示模型组, Y 表示大承气汤优化方组。

4 讨论

蛋白质是构成细胞的基本有机物, 是最重要的

生命物质基础, 生命活动的主要承担者。机体机能状态的变化必定是相应一系列功能蛋白改变的

结果。寻找机体受干预和调节所影响的蛋白承载的生物学功能可有效地揭示药物起效的可能作用路径和机制。便秘模型小鼠经大承气汤优化方的干预后大肠组织受影响的蛋白按其生物学功能可归为以下几大类。

4.1 糖代谢相关蛋白 与模型组小鼠相比较,大承气汤优化方组小鼠大肠组织中的 α -烯醇酶,丙酮酸激酶 PKM,磷酸甘油酸激酶 1,磷酸葡萄糖变位酶 1, γ -烯醇化酶等蛋白^[7]的表达量均显著升高,这些物质均是糖酵解过程中的关键酶或主要限速酶。提示大承气汤优化方可促进糖酵解,增加机体供能作用,促进大肠平滑肌收缩。

4.2 脂代谢相关蛋白 环磷酸腺苷(cAMP)依赖性蛋白激酶 A(PKA)能通过 A 型激酶锚定蛋白靶向亚细胞位点进而引导并放大 cAMP 信号的生物学效应^[8]。而依赖于 cAMP 蛋白激酶系统能够激活脂肪酶,促进脂肪动员,增加机体的功能。此外,在 DNA 存在的前提下, β -羟丁酸脱氢酶(β -HBDH)能够催化 β -羟丁酸(β -HB),使 β -HB 氧化成乙酰乙酸和还原型辅酶 I(NADH),这是酮体的生成过程。与模型组小鼠相比较,大承气汤优化方组小鼠大肠组织中的 A-激酶锚定蛋白 9,极长链特异性的酰基辅酶 A 脱氢酶,*D*- β -羟丁酸脱氢酶、硒结合蛋白、羧酸酯酶的表达量均显著升高。提示大承气汤可能会促进脂肪的水解释放能量,使其中一部分能量被大肠组织氧化利用,以促进大肠的运动,进而起泻下通便作用。

4.3 三羧酸循环相关蛋白 三羧酸循环作为三大营养物质(糖类、脂类、氨基酸)代谢联系的通路,是人体及其他需氧生物普遍存在的代谢途径^[9]。三羧酸循环中,异柠檬酸能被异柠檬酸脱氢酶所催化,这个反应是不可逆的,同时也是三羧酸循环中的限速步骤。与模型组小鼠相比较,大承气汤优化方组小鼠大肠组织中的异柠檬酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶、乌头酸水合酶、柠檬酸合成酶、磷酸甘油酸激酶 1 的表达量均显著升高,说明大承气汤可能会促进三羧酸循环,进而利于糖酵解过程及脂肪动员,以便能够迅速为大肠平滑肌收缩提供一部分能量,促进大肠的运动。

4.4 生物氧化相关蛋白 有机物质在生物体细胞内氧化分解产生二氧化碳、水,并释放出大量能量的过程称为生物氧化,主要为机体提供可利用的能量。细胞色素 C 氧化酶属于呼吸链中具有传递氢或电子功能的 4 种复合体中的 1 种——复合体 IV。过氧

化物酶-5(Prx V)是一类过氧化物酶^[10],属于非典型 Prx,不仅具有清除活性氧(ROS)的作用,而且对小胶质细胞中一氧化氮的生成与清除具有重要的调控作用。电子转移黄素蛋白存在于生物体细胞线粒体膜上,起传递电子作用。与模型组小鼠相比较,大承气汤优化方组小鼠大肠组织中的生物氧化蛋白的表达量均显著升高,由此可见,大承气汤优化方组可能会促进生物氧化过程,进而为机体提供可利用的能量,而其中一部分能量被大肠组织利用,以促进大肠的运动,加速泻下通便作用。

4.5 能量代谢相关蛋白 腺苷三磷酸酶,简称 ATP 酶,是能催化 ATP 水解产生 ADP 和无机磷酸并释放自由能的酶。ATP 合酶作为最小的蛋白质分子转动马达^[11],在细胞内催化能源物质 ATP 的合成。与模型组小鼠相比较,大承气汤优化方组小鼠大肠组织中的能量代谢及相关通路上的蛋白 ATP 酶,钙调蛋白,ATP 合酶 β 亚基及腺苷高半胱氨酸酶等的表达量均显著升高。提示大承气汤可促使物质分解释放出能量而为大肠平滑肌收缩提供机械能。

4.6 肠运动相关蛋白 平滑肌纤维是以“肌丝滑动”^[12]的原理进行来收缩。平滑肌细胞内的收缩系统是由粗丝与细丝组成,粗丝含肌球蛋白,细丝主要为肌动蛋白。粗丝与细丝相互平行,两者的相对滑动过程需要 ATP 供能。肌原纤维粗丝的组成单位——肌球蛋白在肌肉运动中起着重要作用(其存在于平滑肌中)。肌球蛋白是一种多功能蛋白质,其作为细胞骨架的分子马达,主要功能是为肌肉收缩提供动力。肌丝滑动学说认为肌肉收缩就是肌动蛋白细丝与肌球蛋白粗丝相互滑动的结果。解聚蛋白^[13]是一种可使肌动蛋白解聚的蛋白质,与肌动蛋白纤维结合并引起肌动蛋白纤维的快速解聚形成球状肌动蛋白单体。转凝蛋白又称 SM22 α 蛋白^[14],是一种血管平滑肌细胞特异性蛋白,同时也是重要的细胞骨架相关蛋白,参与平滑肌细胞骨架的重构和表型调节,主要是通过与肌动蛋白的相互作用来实现这一功能。踝蛋白(talin)^[15-16]能够像分子铰链一样,将肌动蛋白微丝与整合素连接起来,同时也是一种细胞骨架蛋白质。talin-1 为参与细胞骨架和质膜连接的磷蛋白质,可与黏着斑蛋白结合。与模型组小鼠相比较,大承气汤优化方组大肠组织中的前纤维蛋白-1,肌球蛋白轻多肽 6,解聚蛋白,转凝蛋白及 talin-1 的表达量均显著升高,说明大承气汤可能使平滑肌的收缩频率加快且持久,来促进小鼠大肠的运动,进而使粪便更迅速地排出,起到泻下的

作用。

综上所述,大承气汤优化方调节便秘小鼠所影响的蛋白主要生物功能一方面集中于增加糖脂代谢、三羧酸循环、生物氧化及能量代谢以促进机体对大肠蠕动的供能,另一方面表现为增加肠道平滑肌收缩功能,以促进肠道蠕动,缓解便秘。

[参考文献]

[1] 中华医学会消化病学分会胃肠动力学组,中华医学会外科学分会结直肠肛门外科学组. 中国慢性便秘诊治指南(2013,武汉)[J]. 胃肠病学,2013,18(10):605-612.

[2] 余日跃,朱家谷,谢文光,等. 均匀设计法对大承气汤泻下作用的实验研究[J]. 中药药理与临床,1999,15(5):7-9.

[3] 谢明征. 多器官功能障碍综合征大鼠小肠神经-cajal 间质细胞——平滑肌网络损伤和大承气汤防治作用实验研究[D]. 大连:大连医科大学,2012.

[4] 李君仪,竹林,向瑾,等. 大承气汤主要成分在急性胰腺炎大鼠的组织分布特征[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(1):82-87.

[5] 李礼,樊小农,付静静,等. 差异蛋白质组学在中医药领域研究路线及应用现状[J]. 中国中医基础医学杂志,2015,21(12):1602-1606.

[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] 陈银芳,傅应军,刘超,等. 基于 NanoLC-LTQ-Orbitrap 技术的蛋白质组学探索人参干预“气虚”大鼠的生

物学基础[J]. 中国中药杂志,2016,41(19):3649-3654.

[8] 陈银芳,余日跃,业康,等. 均匀设计-偏最小二乘回归结合因子分析探索大黄-厚朴组分配伍的规律[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(13):14-18.

[9] 林燕华,刘爱华,李学军. A 型激酶锚定蛋白的结构和生物学功能[J]. 生理科学进展,2005,36(3):241-244.

[10] 张恒耀,纪少秀,陈秋. 浅谈三羧酸循环与精气的生化[J]. 成都中医药大学学报,2014,37(4):94-95.

[11] 章波,向渝梅,白云. 抗氧化蛋白 Peroxiredoxin 家族研究进展[J]. 生理科学进展,2004,35(4):352-355.

[12] 杨福愉. ATP 合酶:一个最小的蛋白质分子转动马达[J]. 医学分子生物学杂志,2005,2(4):243-249.

[13] Seow C Y, Paré P D. Ultrastructural basis of airway smooth muscle contraction [J]. Can J Physiol Pharmacol,2007,85(7):659-665.

[14] 田磊,廖明芳,李冀洲,等. 细胞骨架蛋白中 ADF/cofilin 蛋白家系的作用:如何与肌动蛋白结合及发挥解聚作用? [J]. 中国组织工程研究与临床康复,2009,13(50):9941-9945.

[15] DONG L H, LV P, HAN M. Roles of SM22 α in cellular plasticity and vascular diseases[J]. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets,2012,12(2):119-125.

[16] Haining A W, Lieberthal T J, Del Río Hernández A. Talin; a mechanosensitive molecule in health and disease [J]. FASEB J,2016,30(6):2073-2085.

[责任编辑 刘德文]