

基于蛋白质组学大黄异病同治急性中风大鼠 脑物质的基础及相关机制

刘涛¹, 王杨², 崔寒尽², 唐涛^{2*}

(1. 新疆医科大学附属中医医院, 乌鲁木齐 830000; 2. 中南大学湘雅医院, 长沙 410008)

[摘要] **目的:**基于定量蛋白质组学和生物信息学分析,探索大黄异病同治急性中风的物质基础及机制。**方法:**采用线栓法制备缺血再灌注的缺血性中风(IS)大鼠模型和胶原酶来诱导的出血性中风(ICH)模型。将60只SD大鼠随机分为缺血性中风假手术组(Sham1),缺血性中风组(IS),出血性中风+大黄治疗组(DH1),出血性中风假手术组(Sham2),出血性中风(ICH)组和出血性中风+大黄治疗组(DH2),每组10只。IS, Sham1和DH1组在24 h后, ICH, Sham2和DH2组在48 h后,生理盐水灌注后取脑组织行定量蛋白质组学分析,鉴定差异表达蛋白(DEPs)。对共性DEPs进行生物信息学分析,并对相关的DEPs进行蛋白免疫印迹验证。**结果:**大黄调节急性中风疾病相关共性DEPs 21个(上调12个,下调9个)。京都基因和基因组百科全书(KEGG)分析显示,富集了肌萎缩侧索硬化症(ALS)通路,通路中包含神经丝蛋白轻链多肽(Nefl),神经丝蛋白中链多肽(Nefm),神经丝蛋白重链多肽(Nefh)。大黄异病同治急性中风共性机制主要包括能量代谢、离子稳态、突触相关蛋白的调节、细胞周期及神经形成。共性DEPs验证,大黄治疗后,GTP结合蛋白REM2(Rem2),酪氨酸3-单加氧酶(Th),Nefl和神经调制蛋白(Gap43)表达量与相应模型组比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。其中,治疗后Nefl表达为下调,而Rem2, Th和Gap43表达为上调,此结果与蛋白质组学检测结果一致。**结论:**该研究建立了大黄-异病同治-差异蛋白质表达谱,能量代谢、离子稳态、突触相关蛋白调节、细胞周期及神经形成是其共性机制。

[关键词] 大黄; 中风; 异病同治; 蛋白质组学

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)19-0160-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201923

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200725.1528.003.html>

[网络出版日期] 2020-7-27 08:32

Brain Material Basis and Relevant Mechanism of Acute Stroke Treated with Rhei Radix et Rhizoma Based on Homotherapy for Heteropathy Using Proteomics

LIU Tao¹, WANG Yang², CUI Han-jin², TANG Tao^{2*}

(1. Traditional Chinese Medicine Hospital Affiliated to Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China;
2. Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the material basis and mechanism of acute stroke treated with Rhei Radix et Rhizoma based on Homotherapy for Heteropathy using the analysis of proteomics and bioinformatics. **Method:** A total of 60 male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into ischemic stroke (IS) sham-operation group (Sham1), IS model group (IS), IS+ Rhei Radix et Rhizoma treatment group (DH1), ICH sham-operation group (Sham2), intracerebral hemorrhage (ICH) model group (ICH), and ICH + Rhei Radix et Rhizoma treatment group (DH2), with 10 rats in each group. After cerebral perfusion, the brain tissues were quantified by proteomic analysis, and differentially expressed proteins (DEPs) were identified. Specimens of IS, Sham1, and DH1 groups were collected at 24 hours, while those of ICH, Sham2, and DH2 groups were

[收稿日期] 20200121(001)

[基金项目] 新疆维吾尔自治区自然科学基金面上项目(2018D01C291)

[第一作者] 刘涛,博士,在读博士后,副主任医师,从事中西医结合老年病研究, E-mail: ltdoctor2001@126.com

[通信作者] *唐涛,博士,教授,主任医师,博士生导师,从事中西医结合脑病研究, Tel: 0731-84327122, E-mail: tangtaotay@csu.edu.cn

collected at 48 hours. The common DEPs were analyzed by bioinformatics, and the relevant DEPs were verified by Western blot. **Result:** Rhei Radix et Rhizoma regulated 21 common DEPs associated with acute stroke (including 12 up-regulated and 9 down-regulated). According to Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analysis, amyotrophic lateral sclerosis (ALS) pathway was enriched, and three proteins [Neurofilament light polypeptide (Nefl), Neurofilament medium polypeptide (Nefm), Neurofilament heavy polypeptide (Nefh)] involved in this pathway. Energy metabolism, ion homeostasis, regulation of synaptophysin, cell cycle and neurogenesis were the common mechanisms of "Homotherapy for Heteropathy". After treatment with Rhei Radix et Rhizoma, the expression levels of GTP binding protein REM2 (Rem2), tyrosine 3-monooxygenase (Th), Nefl and neuromodulin (Gap43) were significantly higher than those of the corresponding model group ($P < 0.05$). The expression of Nefl was down-regulated, while the expressions of Rem2, Th and Gap43 were up-regulated, which was consistent with the results of proteomics. **Conclusion:** Rhei Radix et Rhizoma-homotherapy-differential protein expression profile is established in this study. Energy metabolism, ion homeostasis, regulation of synaptophysin, cell cycle and neurogenesis are the common mechanisms.

[Key words] Rhei Radix et Rhizoma; stroke; homotherapy for heteropathy; proteomics

异病同治是指“病”虽不同,但病机和证候相似,而采取“同治”之法。缺血性中风(IS)与出血性中风(ICH)在急性期亦存在共性病机即“痰瘀交结,气血逆乱,腑气不通”。大黄药性苦、寒,归脾、胃、大肠、肝、心包经。《神农本草经》:“下瘀血……荡涤肠胃,推陈致新。”《药性论》:“利水肿,破痰实,冷热积聚,宿食,利大小肠……破留血。”大黄及其为大黄为君的复方针对急性IS和ICH共同病机,能有效治疗急性IS和ICH取得较好疗效^[1-4]。然而,大黄治疗急性IS和ICH共性病机尚不清楚。目前,系统生物学技术的发展已成为中药现代化研究的热点,并为中医药复杂体系的研究提供了崭新的思路与方法^[5]。随着人类基因组计划的完成和功能基因组时代的到来,蛋白质组学(proteomics)作为系统生物学的重要组成部分,对阐明生命的本质及疾病的发生机制尤其重要,为中医药现代化发展带来新的契机^[5-6]。蛋白质组学之“整体、动态、网络”的特点,与中医理论“整体观念”“辨证论治”和中药作用“整体调节”和“多层次、多靶点”等思想不谋而合^[6-7]。因此,本研究拟运用定量蛋白质组学方法,分析大黄干预急性IS和ICH大鼠脑组织的蛋白质变化,以期发现大黄异病同治急性中风的潜在靶标蛋白,通过生物信息挖掘揭示其分子机制,并建立“大黄-异病同治-差异蛋白质表达谱”。最后对主要蛋白质进行蛋白免疫印迹(Western blot)验证。

1 材料

1.1 动物 本研究采用清洁级SD雄性大鼠,6~7周龄,体质量180~200 g,60只,购于湖南斯莱克景达

实验动物有限公司,合格证号SCXK(湘)2013-0004。所有动物寄养中南大学实验动物学部提供。所有实验均得到了中南大学动物伦理委员会的批准,批号201403164。

1.2 试剂 戊巴比妥钠(上海试剂二厂,批号810923);裂解液RIPA(上海碧云天公司,批号0521181805);8-plex iTRAQ试剂盒(AB Sciex公司,货号4381664);胰酶(Promega公司,货号V5280),TEAB,BCA定量试剂盒,Ⅷ型胶原酶(Sigma公司,货号分别为T418,QPBCA,C0773);GTP结合蛋白REM2(Rem2),酪氨酸3-单加氧酶(Th),Nefl,神经调制蛋白(Gap43), β -肌动蛋白(β -actin)抗体(Proteintech公司,批号25371-1-AP,66334-1-Ig,60189-1-Ig,16971-1-AP,60008-1-Ig)。

1.3 仪器 TS-92型摇床(中国江苏其林贝尔公司);164-5050型电泳仪(美国Bio-Rad公司);DYCZ-24EN型电泳槽,DYCZ-40A型转膜仪(北京六一仪器厂);LTD JY96-II N型超声仪(宁波新芝生物科技股份有限公司);Spectrum SHANHAI 765Pc型分光光度计(上海光谱仪器有限公司);Chicago型立体定位仪(美国Stoelting Co.);LC-20AD型高效液相色谱(日本岛津公司);Ultimate 3000型液相色谱,Q Exactive质谱仪(美国Thermo Scientific公司)。

2 方法

2.1 动物模型

2.1.1 实验动物ICH造模 ICH模型采用国际公认的注射胶原酶来诱导的脑出血模型。整个造模过

程参照前期课题组标准^[8]。

2.1.2 实验动物 IS造模 采用公认的线栓法制备缺血再灌注(MCAO)的IS大鼠模型。整个造模过程参照前期课题组标准^[9]。

2.2 中药制备 本研究所需道地药材大黄1次性购齐,源于中南大学湘雅医院中药房(货号2015101605,甘肃,中国),由中南大学药学系彭雷教授鉴定为蓼科植物大黄 *Rheum palmatum* 的干燥根和根茎。药材按以下过程处理,打粉,100℃双蒸水浸泡10~15 min,用2层纱布2次滤液,于4℃冰箱密封保存备用。大黄提取液制备的主要过程、相关参数及质量控制参考前期研究^[8,10]。

2.3 分组与给药 将60只SD大鼠采用随机数字表法随机分为缺血性中风假手术组(Sham1组),缺血性中风组(IS组),出血性中风+大黄治疗组(DH1组),出血性中风假手术组(Sham2组),出血性中风组(ICH组)和出血性中风+大黄治疗组(DH2组),每组10只。剂量选择根据前期研究^[8,10],Sham1组双蒸水灌胃,4 mL/次,2次/d。IS组双蒸水灌胃,4 mL/次,2次/d。DH1组大黄3 g·kg⁻¹·d⁻¹灌胃,4 mL/次,2次/d。Sham2组,双蒸水灌胃,4 mL/次,2次/d。ICH组双蒸水灌胃,4 mL/次,2次/d。DH2组大黄3 g·kg⁻¹·d⁻¹灌胃,4 mL/次,2次/d。

2.4 留取标本 大鼠称质量,按50 mg·kg⁻¹腹腔注射3%戊巴比妥钠麻醉;麻醉后沿着剑突下行横向切口,钝性分离并暴露膈肌,剪开膈肌,勿损伤心脏,剪断左侧肋骨,暴露心脏。于心尖左缘向升主动脉方向进针,置入升主动脉,固定针头,钳夹腹主动脉。剪开右心耳,快速滴入生理盐水,直至右心耳流出清澈生理盐水后,开颅取脑。最后,将患侧一半脑组织迅速放入液氮速冻,随后转移至-80℃超低温冰箱保存备用。

2.5 脑组织样本处理

2.5.1 提取蛋白 往样本中加入裂解液RIPA 400 μL,反复吹打裂解细胞。裂解后予以超声处理,4℃,12 000 r·min⁻¹,离心20 min,收集上清液。

2.5.2 BCA法蛋白质定量 分别取1 g·L⁻¹ BCA对照品溶液1,2,4,6,8,10 μL,绘制标准曲线,样品取1~2 μL,双复管测定。每支管加入去离子水100 μL,BCA染液100 μL,涡旋振荡20 s,60℃反应1 h,在波长575 nm处测定吸光度A。

2.5.3 蛋白酶切 在蛋白质定量后,取蛋白质200 μg置于离心管中;加入还原剂4 μL,60℃反应1 h;加入半胱氨酸阻断剂2 μL,室温反应10 min;将

还原烷基化后的蛋白溶液置于超滤管中,12 000 r·min⁻¹,4℃离心20 min,弃废液;加入1 mol·L⁻¹三乙基碳酸氢铵缓冲液(TEAB)100 μL,4℃,12 000 r·min⁻¹离心20 min,弃废液,收集管底部溶液,重复3次;更换收集管,在超滤管中加入胰蛋白酶(按胰蛋白酶-蛋白质量1:100),2 h,再加胰蛋白酶(胰蛋白酶-蛋白质量1:50),加入1 mol·L⁻¹ TEAB使终体积为50 μL,37℃反应过夜;次日,4℃,12 000 r·min⁻¹离心20 min,酶解消化后的肽段溶液离心于收集管底部;在超滤管中加入1 mol·L⁻¹ TEAB 50 μL,4℃,12 000 r·min⁻¹离心20 min,与上步合并,收集管底部共得到酶解后的样品100 μL。

2.5.4 iTRAQ试剂标记 本实验采用每组4只大鼠患侧大脑半球,分别提取蛋白并进行质量控制。质控合格后,每组由4只脑组织标本混合而成,具体过程参考前期研究^[10]。取出8-plex iTRAQ试剂盒,平衡至室温,将iTRAQ试剂离心至离心管管底;向每管iTRAQ中加入异丙醇150 μL,振荡,离心至离心管管底;取样品(100 μg酶解产物)50 μL转移到新的离心管中;将iTRAQ试剂添加到样品中,振荡,离心至离心管底部,室温反应2 h;加入超净水100 μL终止反应;混合标记后的样品,振荡,离心至离心管底部;真空冷冻离心干燥后,冷冻保存待用。

2.6 第一维高效液相分离 采用岛津岛津LC-20AD液相系统,C₁₈色谱柱(2 mm×150 mm,3 μm)对样品进行液相分离。将标记后抽干的混合肽段用buffer A(25 mmol·L⁻¹ NaH₂PO₄,25% ACN,pH 2.7)4 mL复溶。进柱后以200 μL·min⁻¹的速率进行梯度洗脱,先在5% buffer B(25 mmol·L⁻¹ NaH₂PO₄,1 mol·L⁻¹ KCl,25% ACN,pH 2.7)中洗脱7 min,紧跟着一个20 min的直线梯度使buffer B由5%上升至60%,最后在2 min内使buffer B的比例上升至100%并保持1 min,然后恢复到5%平衡10 min。整个洗脱过程在214 nm/280 nm进行监测;根据峰型和时间共收取24个组分,用50% TFA酸化,真空干燥后,进行二维反相液质联用分析。

2.7 二维反相液质联用分析 干燥的样品分别用buffer A(5% ACN,0.1% FA)复溶至约0.5 g·L⁻¹,2万 r·min⁻¹离心10 min,除去不溶物质。每个组份上样5 μL(蛋白2.5 μg),通过LC-20AD型纳升液相色谱仪(岛津公司)分离。采用Q-Exactive串联质谱分析,母离子分辨率70 000 MWFH。肽段筛选采用标准化碰撞能量(NCE)为28 eV,子离子碎片分辨率17 500 MWFH。一级扫描和二级扫描范围分别

为 m/z 350~1 800, 200~2 000; 离子源电压 1.6 kV, 扫描模式正离子模式。动态排除设定为 60 s, 内相同的母离子 MS/MS 不超过 2 次。自动增益控制通过离子阱 (Orbitrap) 来实现, 对 Orbitrap 内控制聚集量在 3 eV 以上的离子进行二级扫描鉴定。

2.8 蛋白质组数据分析 本研究采用 DAVID 6.8 在线数据库 (<https://david.ncicrf.gov/>) 进行差异表达蛋白 (DEPs) 的生物信息学挖掘, 主要进行 KEGG 分析。

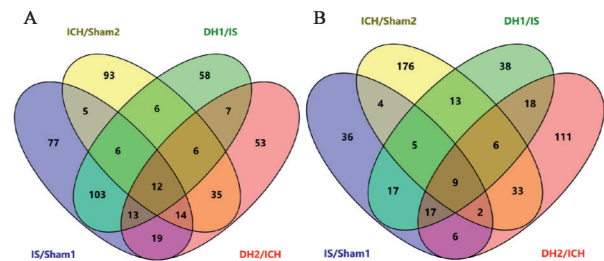
2.9 Western blot 检测相关蛋白表达 将脑组织置于加入了液氮的研钵中, 均匀碾碎后, 加入适量裂解液, 转移至 1.5 mL 离心管, 混合物匀浆后放在冰上裂解 30 min, 4 °C, 12 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min。收集上清液作为样液, 根据课题组前期实验方法^[10] 进行分析。取适量样液, 根据 BCA 法检测其总蛋白浓度。根据蛋白定量结果, 加入双蒸水调整样品浓度, 使其蛋白含量一致为 50 μg ; 加入适量 5 \times 蛋白电泳上样缓冲液, 并使其终浓度为 1 \times 蛋白电泳上样缓冲液, 最终上样量为 10 μL ; 上样前将样品置于沸水中煮 5~10 min, 使蛋白变性; 加入电泳液后, 调整电压 80~100 V 进行电泳分离。然后转膜到聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上。PVDF 膜用封闭液 (5% 牛血清白蛋白, TBST 配置) 封闭, 室温下摇床孵育 2 h。PVDF 膜分别与如下一抗孵育, Rem2 (1:1 000); Nefl (1:1 000); Th (1:3 000); GAP43 (1:1 500); β -actin (1:5 000)。用 TBST 冲洗 3 次, 再用 HRP 标记的二抗, 兔抗 (R) 1:6 000, 鼠抗 (M) 1:5 000, 与 PVDF 膜孵育 90 min。之后用 ECL kit 来检测抗原-抗体-过氧化物酶混合物的量, 同时通过曝光到柯达胶卷可视化不同蛋白条带。最后, 用 Image Lab 图像分析软件定量条带的灰度值, 以确定 Rem2, Nefl, Th 和 Gap43 的相对表达量。蛋白质的表达量以相对值与 β -actin 的比值表示。

2.10 统计学方法 所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。统计分析运用软件 SPSS 23.0 进行。Western blot 比较使用单因素方差分析, 方差齐时, 两两比较选取 LSD 模式; 方差不齐时, 改用 Kruskal-Wallis H 检验, 两两比较用 Nemenyi 法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大黄调节急性期中风模型大鼠 DEPs 变化 本实验共检测了急性期 IS 疾病相关 DEPs 345 个 (上调 96, 下调 249); 急性期 ICH 疾病相关 DEPs 425 个 (上调 248, 下调 177); 大黄治疗 IS 后筛选 DEPs 334 个

(上调 211 个, 下调 123 个); 大黄 ICH 治疗后, 鉴定了 DEPs 361 个 (上调 159 个, 下调 202 个), 见图 1。四者取交集后, 大黄调节急性中风疾病相关共性 DEPs 21 个 (上调 12 个, 下调 9 个)。见表 1。



A. 大黄上调急性中风疾病相关共性 DEPs; B. 大黄下调急性中风疾病相关共性 DEPs

图 1 大黄调节急性期中风大鼠 DEPs 的变化

Fig. 1 Changes of DEPs in acute stroke rats regulated by Rhei Radix et Rhizoma

本研究采用热图对大黄调节急性中风疾病相关共性 21 个 DEPs 进行分析, 颜色程度反映蛋白质表达值, 绿色越深表示下调越明显, 红色越深提示上调越明显。本研究随机选取酪氨酸 3-单加氧酶 (Th), 神经丝蛋白轻链多肽 (Nefl), 神经调制蛋白 (Gap43) 和 GTP 结合蛋白 REM2 (Rem2) 进行 Western blot 验证。见图 2。

3.2 DEPs 的 KEGG 分析 将大黄调节的急性期 IS 和 ICH 疾病相关的 21 个 DEPs 导入 DAVID 6.8 在线数据库进行 KEGG 分析。结果显示, 仅富集了肌萎缩侧索硬化症 (ALS) 通路, 通路中包含 Nefh, Nefm 和 Nefl 蛋白。该研究提示, 在急性中风时, 大黄能够调节氧化应激指标通过 ALS 通路中 Nefh, Nefm 和 Nefl 蛋白治疗神经受损。见图 3。

3.3 大黄异病同治急性中风的共性机制 根据以上生物信息学分析, 结合 DEPs 的具体功能, 绘制了大黄异病同治急性中风的共性机制的示意, 见图 4。这提示大黄可通过调节急性中风的能量代谢、离子稳态、突触相关蛋白、细胞周期及神经形成来发挥脑保护作用, 其中在调节神经形成中主要通过 ALS 信号通路。共性机制中能量代谢包括 L-乳酸脱氢酶 (Ldha), Th 和柠檬酸裂解酶 β 亚基样蛋白 (Clyb1); 离子稳态包括钠/钙交换器 1 (Slc8a1); 突触相关蛋白: 突触融合蛋白 (Stx7), 突触结合蛋白 II (Syb2), 钠和氯依赖性甘氨酸转运体 2 (Slc6a5) 和前脑啡肽- α (Penk); 细胞周期, 富含谷氨酰胺的四肽重复序列蛋白 α (Sgta) 和组蛋白 H2A (Hist2h2ab); 神经形成 Gap43, 髓鞘碱性蛋白 (Mbp), 髓鞘相关少突

表 1 大黄调节急性期 IS 及 ICH 模型大鼠共性 DEPs 的表达情况

Table 1 Expressions of common DEPs in rats with acute IS and ICH regulated by Rhei Radix et Rhizoma

蛋白登记号	蛋白质名称	基因名	IS /Sham1	DH1 /IS	ICH /Sham2	DH2 /ICH
B5DEN4	L-lactate dehydrogenase	Ldha	0.717	1.475	0.660	2.694
P04177	tyrosine 3-monooxygenase	Th	0.695	1.586	0.648	1.393
O70593	small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein alpha	Sgta	0.693	1.362	0.685	1.374
F1LP80	neurosecretory protein VGF	Vgf	0.682	1.832	0.368	3.167
Q01728	sodium/calcium exchanger 1	Slc8a1	0.644	1.495	0.559	1.556
Q9WTY2	GTP-binding protein REM 2	Rem2	0.626	1.882	0.373	5.353
D3ZC31	protein RGD1560608	RGD1560608	0.576	1.456	0.536	1.515
P04094	proenkephalin-A	Penk	0.576	1.696	0.475	1.655
P07936	neuromodulin	Gap43	0.560	3.072	0.721	1.701
D3ZWE0	histone H2A	Hist2h2ab	0.386	51.04	0.573	50.27
A0A0G2K0M8	neural cell adhesion molecule 1	Ncam1	0.372	2.437	0.619	1.649
O70257	syntaxin-7	Stx7	0.269	3.473	0.679	2.287
Q63327	myelin-associated oligodendrocyte basic protein	Mobp	1.408	0.726	1.347	0.683
Q510K3	citrate lyase subunit beta-like protein, mitochondrial	Clyb1	1.490	0.658	1.400	0.564
A0A0G2K3Z9	uncharacterized protein	N/A	1.503	0.681	1.741	0.474
F1LRZ7	neurofilament heavy polypeptide	Nefh	1.895	0.474	1.607	0.204
P12839	neurofilament medium polypeptide	Nefm	1.997	0.493	1.572	0.255
P19527	neurofilament light polypeptide	Nefl	2.239	0.317	1.493	0.253
P02688	myelin basic protein	Mbp	3.051	0.229	1.475	0.120
G3V6M3	synaptotagmin II	Syt2	3.152	0.479	1.338	0.523
P58295	sodium- and chloride-dependent glycine transporter 2	Slc6a5	8.954	0.078	2.455	0.099

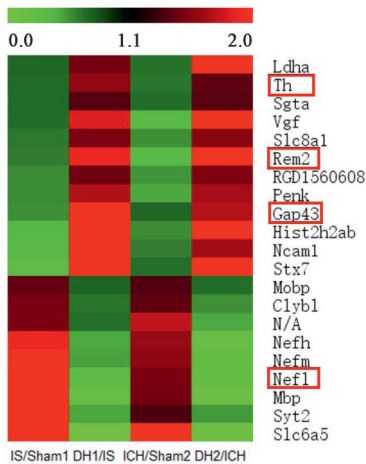


图 2 大黄调节急性期中风大鼠共性 DEPs 的热图分析

Fig. 2 Heat map analysis of common DEPs in acute stroke rats regulated by Rhei Radix et Rhizoma

胶质细胞碱性蛋白(Mobp), Nefl, 神经丝蛋白中链多肽(Nefm), 神经丝蛋白重链多肽(Nefh), 神经细胞黏附分子 1(Ncam1)和神经分泌蛋白(Vgf)和

Rem2。

3.4 共性 DEPs 的验证 本研究选择了 Rem2, Th, Nefl 和 Gap43 进行 Western blot 验证, 其中, 大黄治疗后 Nefl 表达为下调, 而 Rem2, Th 和 Gap43 表达为上调, 此结果与蛋白质组学检测结果一致。见图 5。

与 Sham1, Sham2 组比较, IS, ICH 组 Rem2, Th, Gap43 显著降低 ($P < 0.01$), Nefl 显著升高 ($P < 0.01$); 与 IS, ICH 组比较, 大黄组 Rem2, Th, Gap43 表达明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); Nefl 表达明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。大黄治疗后能促进 Nefl 表达量增加, 而使 Rem2, Th 和 Gap43 表达量降低。见表 2。

4 讨论

本研究基于 iTRAQ 的定量蛋白质组学方法分析了大黄异病同治急性期 IS 和 ICH 大鼠的共性 DEPs 的变化。结果显示, 蛋白质组学的 DEPs 数据很好的描述了异病同治的物质基础。基于此方法,

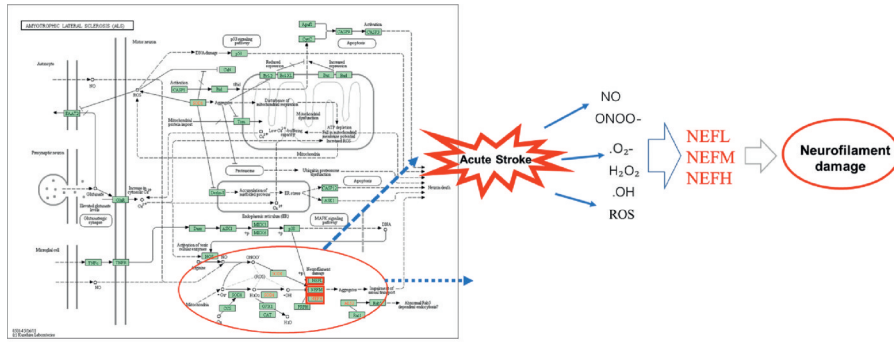


图3 ALS信号通路及示意

Fig. 3 ALS signaling pathway and schematic diagram

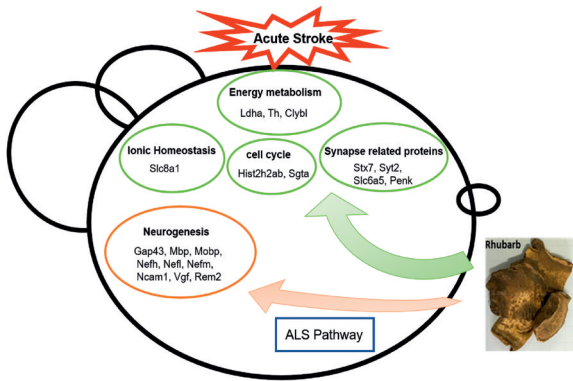


图4 大黄异病同治急性中风的共性机制示意

Fig. 4 Schematic diagram of common mechanism of acute stroke treated with Rhei Radix et Rhizoma based on Homotherapy for Heteropathy

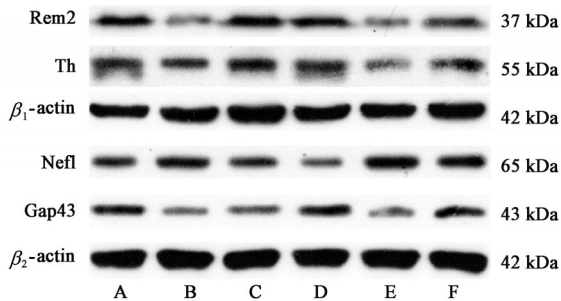


图5 相关DEPs蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of differentially expressed proteins

大黄异病同治急性期IS和ICH共性DEPs有21个(上调12,下调9)被鉴定。KEGG分析提示,仅仅肌萎缩侧索硬化症(ALS)一条通路被富集。随机抽取Rem2, Th, Nefl和Gap43进行Western blot验证,结果和蛋白组学检测结果一致。这些结果从蛋白质水平,揭示了大黄异病同治急性期中风的共性物质基础及分子机制,也丰富了异病同治现代科学内涵。

4.1 大黄异病同治急性中风的物质基础 本研究结果显示,大黄异病同治急性期IS和ICH共性DEPs有21个(上调12,下调9),其中蛋白编码为A0A0G2K3Z9暂未有蛋白命名。共性DEPs具体为Ldha, Th, Sgta, Vgf, Slc8a1, Rem2, 蛋白RGD1560608, Penk, Gap43, Hist2h2ab, Ncam1, Stx7, Mobp, Clybl, Nefl, Nefm, Nefh, Mbp, Syt2, Slc6a5等蛋白。因此,以上21个蛋白质即为大黄异病同治急性中风的物质基础。

Ldha, Th和Clybl蛋白属能量代谢相关蛋白。Ldha是一种有氧糖酵解途径中的关键酶,位于细胞的线粒体,亦在糖异生中发挥重要作用^[11-12]。Th在神经元细胞中表达,参与了儿茶酚胺代谢^[13]。Clybl是一种代谢酶,能够编码苹果酸/β-甲基苹果酸合成酶,将乙氧基化物和乙酰辅酶A转化为苹果酸酯,

表2 大黄干预急性期中风相关差异表达蛋白Western blot验证($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Western blot validation of acute stroke-related DEPs treated with Rhei Radix et Rhizoma($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Rem2	Th	Nefl	Gap43
Sham1	-	0.49±0.09	0.35±0.03	0.15±0.07	0.42±0.10
IS	-	0.16±0.08 ¹⁾	0.17±0.10 ¹⁾	0.32±0.10 ¹⁾	0.18±0.09 ¹⁾
DH1	3	0.35±0.14 ²⁾	0.30±0.05 ²⁾	0.19±0.06 ²⁾	0.33±0.04 ²⁾
Sham2	-	0.47±0.08	0.41±0.03	0.12±0.06	0.31±0.05
ICH	-	0.19±0.08 ³⁾	0.14±0.06 ³⁾	0.37±0.05 ³⁾	0.14±0.07 ³⁾
DH2	3	0.33±0.06 ⁴⁾	0.30±0.09 ⁵⁾	0.19±0.07 ⁵⁾	0.27±0.10 ⁴⁾

注:与Sham1组比较¹⁾P<0.01;与IS组比较²⁾P<0.05;与Sham2组比较³⁾P<0.01;与ICH组比较⁴⁾P<0.05,⁵⁾P<0.01。

或乙氧基化物和丙酰辅酶A转化为 β -甲基苹果酸^[14]。因此,大黄可能通过调节Ldha, Th和Clybl蛋白,改善急性中风的脑能量代谢而发挥神经保护作用。

Stx7, Syt2, Slc6a5和Penk蛋白均为突触相关性蛋白。Stx7是一种跨膜蛋白,是突触的主要组成之一,在含有神经递质的囊泡运输中起着重要作用^[15]。Syt2是一种完整的膜蛋白,主要存在于脑内的突触小泡上,被认为参与了 Ca^{2+} 调节的胞吐作用^[16]。Slc6a5基因定位于染色体11p15.1,为59 886 bp,包含18个外显子,编码 Na^+/Cl^- 依赖的甘氨酸转运体,它是一个完整的细胞膜糖蛋白,通过调节突触间隙甘氨酸影响神经传递功能^[17]。Penk是一种阿片肽前体分子,具有调节运动,疼痛知觉、情感的行为功能^[18]。以上突触相关性蛋白的调节过程,可能就是大黄异病同治急性中风的作用机制之一。

Gap43, Mbp, Mobp, Nefh, Nefl, Nefm, Ncam1, Vgf和Rem2蛋白与神经形成密切相关。Gap43亦称为神经生长相关蛋白43,参与了神经元的形成和再生的调控,Gap43的表达与突触结构可塑性之间关系亦密切^[19]。Mbp是中枢神经系统髓鞘的主要蛋白质,由少突胶质细胞合成,在急性脑损伤时表达增加,且与脑损伤的程度呈正相关^[20]。Mobp是一种特异性髓鞘蛋白,仅在中枢神经系统(CNS)白质中表达,尤其是在致密髓鞘中表达,主要分布在髓鞘的主要密集区,在稳定CNS髓鞘中起着重要作用^[21]。Nefl, Nefm和Nefh构成神经丝,它们是轴突细胞骨架蛋白的主要组成部分^[22]。Ncam1能够促进少突胶质细胞分化,髓鞘修复及脱髓鞘后运动功能恢复^[23]。Ncam1亦在促进脊髓轴突伸长,嗅成鞘细胞(OEC)迁移起着关键作用^[24]。Vgf是一种神经生长因子诱导肽,可被脑源性神经营养因子显著诱导,广泛表达在中枢神经系统中,并被证明与抑郁症有关^[25]。蛋白Rem2属于小的GTP结合蛋白的RGK(Rem, Rad, Gem/Kir)亚家族成员之一,与 Ca^{2+} 电流调节及细胞骨架的重构有关^[26]。Rem2主要在脑组织中表达,在兴奋性和抑制性突触的发育中起着重要作用^[27]。在急性中风时,大黄改善神经功能可能是调节Gap43, Mbp, Mobp, Nefh, Nefl, Nefm, Ncam1, Vgf和Rem2有关。

Slc8a1是多种细胞类型的细胞内 Ca^{2+} 循环的关键(包括生理和病理过程),具有双向调节 Ca^{2+}

跨细胞膜移动和维持细胞 Ca^{2+} 稳态作用^[28]。众所周知,在急性中风时脑细胞中存在着 Ca^{2+} 稳态失衡现象。而在本研究中大黄上调了Slc8a1表达,可能是通过维持细胞 Ca^{2+} 稳态而发挥了神经保护作用。Sgta蛋白是一种富含谷氨酰胺的四肽重复序列(TPR)的新型蛋白,参与各种生物过程,包括细胞周期、蛋白质折叠、转录、蛋白质运输、激素受体信号等,Sgta缺乏可能导致部分细胞周期阻滞 G_2/M 期,而有丝分裂阻滞导致细胞分裂不全^[29]。H2A是一种位于染色体上的与DNA结合的碱性蛋白质,在细胞的周期和脑神经发育上起着重要作用^[30]。因此,大黄可能通过调节Sgta和H2A蛋白,间接影响细胞周期而发挥神经保护作用。

此外,RGD1560608蛋白是质谱解谱时的预测蛋白,目前暂无此蛋白的功能报道。蛋白编码A0A0G2K3Z9暂未有蛋白命名,亦没有关于此编码蛋白的功能报道。因此,这两个蛋白虽参与了大黄异病同治急性中风的过程,但具体功能是本课题组今后研究的方向。

4.2 大黄异病同治急性中风的信号通路 本研究对大黄异病同治急性期IS和ICH大鼠的共性DEPs进行KEGG分析提示,仅仅肌萎缩侧索硬化症(ALS)一条通路被富集,且Nefl, Nefm和Nefh蛋白质富集在ALS通路中。

ALS通路(<http://www.genome.jp/kegg/pathway/hsa/hsa05014.html>)是由54个基因(包括假基因半胱天冬酶-12)构成。在ALS通路图上,共有35个蛋白质实体,包括膜受体、胞浆蛋白或分泌蛋白、激酶、磷酸酶、蛋白酶和蛋白通道,他们在ALS发病的不同阶段有不同程度的直接/间接作用,导致运动神经元的失活^[31]。在ALS通路图上(见图3),笔者发现,①一氧化氮(NO)通过超氧化物歧化酶1(SOD1)作用于Nefl, Nefm和Nefh蛋白质导致神经损伤;②线粒体内活性氧(ROS)的产生,通过SOD1导致神经损伤。众所周知,在各种类型的中风中均有大量的自由基产生。在IS后,由缺血激活的一氧化氮合酶(NOS)产生的NO分子可与过氧化物结合,同时产生一种强有力的氧化剂—过氧亚硝酸根^[32]。然而,氧化应激不仅参与了ICH的病理过程,而且参与了ICH病理生理反应的各个重要阶段^[33]。综上所述,大黄异病同治急性中风参与了ALS通路中的氧化应激过程达到神经保护作用。

[参考文献]

- [1] TANG T, LI X Q, WU H, et al. The property of nao yi-an granule (脑溢安颗粒) in increasing nestin immunoreactive neural stem cells in rat brains with intracerebral hemorrhage [J]. *Chin J Integr Med*, 2004, 10(4):284-288.
- [2] 马建功. 大黄、三七配伍为主治疗急性出血性中风81例[J]. *中医研究*, 2009, 22(1):33-34.
- [3] 潘海珍. 单味大黄治疗缺血性脑中风的临床疗效观察[J]. *中国医药指南*, 2013, 11(32):515-516.
- [4] 颜娟, 郑茂东, 崔玉环, 等. 大黄酚脂质体对脑缺血再灌注损伤小鼠体内抗氧化作用的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38(3):703-704.
- [5] JI Q, ZHU F S, LIU X, et al. Recent advance in applications of proteomics technologies on traditional chinese medicine research [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015:983139.
- [6] BAI G, HOU Y Y, JIANG M, et al. Integrated systems biology and chemical biology approach to exploring mechanisms of traditional chinese medicines[J]. *Chin Herbal Med*, 2016, 8(2):99-106.
- [7] SUO T, WANG H, LI Z. Application of proteomics in research on traditional chinese medicine [J]. *Expert Rev Proteomics*, 2016, 13(9):873-881.
- [8] WANG Y, PENG F, XIE G, et al. Rhubarb attenuates blood-brain barrier disruption via increased zonula occludens-1 expression in a rat model of intracerebral hemorrhage [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(1):250-256.
- [9] LIN X, LIU T, LI P, et al. iTRAQ-based proteomics analysis reveals the effect of rhubarb in rats with ischemic stroke [J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018:6920213.
- [10] LIU T, ZHOU J, CUI H J, et al. iTRAQ-based quantitative proteomics reveals the neuroprotection of rhubarb in experimental intracerebral hemorrhage[J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 232:244-254.
- [11] PAVENTI G, PIZZUTO R, PASSARELLA S. The occurrence of l-lactate dehydrogenase in the inner mitochondrial compartment of pig liver[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 489(2):255-261.
- [12] VALVONA C J, FILLMORE H L. Oxamate, but not selective targeting of LDH-A, inhibits medulloblastoma cell glycolysis, growth and motility [J]. *Brain Sci*, 2018, 8(4):56.
- [13] KOKUBUN S, SATO T, YAJIMA T, et al. Distribution of postganglionic neurons which contain dopamine β -hydroxylase, tyrosine hydroxylase, neuropeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide in the human middle cervical ganglion[J]. *Tissue Cell*, 2019, 58:42-50.
- [14] STRITTMATTER L, LI Y, NAKATSUKA N J, et al. CLYBL is a polymorphic human enzyme with malate synthase and β -methylmalate synthase activity [J]. *Hum Mol Genet*, 2014, 23(9):2313-2323.
- [15] MALIK N, NIRUJOGI R S, PELTIER J, et al. Phosphoproteomics reveals that the hVPS34 regulated SGK3 kinase specifically phosphorylates endosomal proteins including Syntaxin-7, Syntaxin-12, RFIP4 and WDR44[J]. *Biochem J*, 2019, 476(20):3081-3107.
- [16] MONTES-CHINEA N I, GUAN Z, COUTTS M, et al. Identification of a new SYT2 variant validates an unusual distal motor neuropathy phenotype[J]. *Neuro Genet*, 2018, 4(6):e282.
- [17] 董丽婷, 张志珺, 徐治, 等. SLC6A5基因多态性对抗抑郁剂疗效的影响[J]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2015, 9(21):3849-3853.
- [18] 刘燕, 赵永烈, 刘金民. 散偏汤对偏头痛模型大鼠中脑、三叉神经节 CGRP、PENK 基因、蛋白表达的影响 [J]. *中国中医急症*, 2018, 27(8):1325-1328, 1336.
- [19] 宓丹, 潘冲, 陈雪. 眼针对脑缺血再灌注损伤大鼠 Nesting、GAP43 蛋白表达影响 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2018, 20(10):119-122.
- [20] 司肖曼, 李小梅, 程坤, 等. 注射用丹参多酚酸对进展性脑梗死患者血清 MMP-9、S100B、MBP 的影响 [J]. *药物评价研究*, 2019, 42(2):250-253.
- [21] SCHAFER I, MULLER C, LUHMANN H J, et al. MOBP levels are regulated by Fyn kinase and affect the morphological differentiation of oligodendrocytes [J]. *J Cell Sci*, 2016, 129(5):930-942.
- [22] CAMPOS-MELO D, HAWLEY Z C E, STRONG M J. Dysregulation of human NEFM and NEFH mRNA stability by ALS-linked miRNAs [J]. *Mol Brain*, 2018, 11(1):43.
- [23] WERNEBURG S, FUCHS H L S, ALBERS I, et al. Polysialylation at early stages of oligodendrocyte differentiation promotes myelin repair [J]. 2017, 37(34):8131-8141.
- [24] TANG Y Y, GUO W X, LU Z F, et al. Ginsenoside R_{g1} promotes the migration of olfactory ensheathing cells via the PI3K/Akt pathway to repair rat spinal cord injury[J]. *Biol Pharm Bull*, 2017, 40(10):1630-1637.
- [25] 朱益丰, 陈素珍, 袁勇贵. 惊恐障碍患者血清 VGF 水平的对照研究 [J]. *医学信息*, 2019, 32(24):57-59.
- [26] DOWNS A G, SCHOLLES K R, HOLLIS D M. Localization of Rem2 in the central nervous system of

- the adult rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *J Chem Neuroanat*, 2016, 78: 87-95.
- [27] MOORE A R, RICHARDS S E, KENNY K, et al. Rem2 stabilizes intrinsic excitability and spontaneous firing in visual circuits [J]. *eLife*, 2018, 7: e33092.
- [28] LARICCIA V, AMOROSO S. Calcium- and ATP-dependent regulation of Na/Ca exchange function in BHK cells: Comparison of NCX1 and NCX3 exchangers [J]. *Cell Calcium*, 2018, 73: 95-103.
- [29] BENARROCH R, AUSTIN J M, AHMED F, et al. The roles of cytosolic quality control proteins, SGTA and the BAG6 complex, in disease [J]. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2019, 114: 265-313.
- [30] SRIVASTAVA A, MCGRATH B, BIELAS S L. Histone H2A monoubiquitination in neurodevelopmental disorders [J]. *Trends Genet*, 2017, 33(8): 566-578.
- [31] 苏丹丹, 张勇, 毕方方, 等. 肌萎缩侧索硬化患者的脑脊液存在差异表达蛋白: 基于串联质谱标签方法 [J]. *南方医科大学学报*, 2019, 39(4): 428-436.
- [32] LIU Y, FENG S, SUBEDI K, et al. Attenuation of ischemic stroke-caused brain injury by a monoamine oxidase inhibitor involves improved proteostasis and reduced neuroinflammation [J]. *Mol Neurobiol*, 2020, 57(2): 937-948.
- [33] NEVES J D, VIZUETE A F, NICOLA F, et al. Glial glutamate transporters expression, glutamate uptake, and oxidative stress in an experimental rat model of intracerebral hemorrhage [J]. *Neurochem Int*, 2018, 116: 13-21.

[责任编辑 张丰丰]