

• 药理 •

# 血府逐瘀汤对气滞血瘀证大鼠血清 蛋白质组表达的影响

苗 兰<sup>1</sup>, 潘映红<sup>2</sup>, 任建勋<sup>1</sup>, 刘建勋<sup>1\*</sup>

(1. 中国中医科学院西苑医院, 北京 100091; 2. 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

[摘要] 目的: 观察血府逐瘀汤对气滞血瘀证模型大鼠血清蛋白质组表达的影响, 初步探讨血府逐瘀汤在分子水平的作用机理。方法: 复合因素制作大鼠气滞血瘀证模型, 采集正常大鼠、气滞血瘀证大鼠及血府逐瘀汤治疗组大鼠的血清, 应用一种简单的方法去除血清中的白蛋白, 利用双向凝胶电泳分离血清总蛋白, 通过 Image Master 2D Elite 6.01 凝胶图像分析软件分析 2-DE 图谱, 比较各组间蛋白表达谱的改变情况。结果: 正常组大鼠血清蛋白质点为(354±20), 模型组大鼠血清的蛋白质点为(347±37), 治疗组大鼠的蛋白质点数为(360±35), 软件分析确定的差异蛋白点有7个, 其中模型组大鼠血清与正常组相比有1个蛋白质下调, 5个蛋白质上调, 1个蛋白表达缺失, 而给予血府逐瘀汤后可改善这些改变及缺失的蛋白质的表达水平。结论: 血府逐瘀汤治疗气滞血瘀证的作用机制可能与这些差异表达的蛋白有关, 这为血府逐瘀汤作用的分子机理研究提供了新的思路。

[关键词] 蛋白质组; 血府逐瘀汤; 血清; 大鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)04-0024-05

## Effect of the Xuefuzhuyv Decoction on Serum Proteome of Rat with Syndrome of Qi-stagnancy and Blood Stasis

MIAO Lan<sup>1</sup>, PAN Ying-hong<sup>2</sup>, REN Jian-xun<sup>3</sup>, LIU Jian-xun<sup>1\*</sup>

(1. Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China;

2. The National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement (FCRI), Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS), Beijing 100081, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the impact of Xuefuzhuyv Decoction on serum proteome of rat with syndrome of Qi-stagnancy and blood stasis and to investigate the molecular mechanism of Xuefuzhuyv Decoction. **Methods:** The rat models with syndrome of Qi-stagnancy and blood stasis were established by combined methods. The rat serum was collected from normal group, model group and treated group. A simple method was employed to remove the high abundance albumin in serum. Proteomic protocol included proteome separation with two dimensional gel electrophoresis (2-DE), gel image analysis with Image Master 2D Elite 6.01 system, and identification of the different proteins between the three groups. **Results:** (354±20) proteins had been observed in normal group serum, (347±37) in model group serum, and (360±35) in treated group serum. Compared with normal group, seven changed proteins were determined: one protein decreased, five proteins increased and one protein lost in rat serum of model group, but these changes could

[收稿日期] 2007-10-22

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(90709001);“十一五”科技支撑计划资助项目(2006BAI08B01-06)

[通讯作者] \* 刘建勋, Tel: 010-62874049; E-mail: liujx0324@sina.com

be improved by treating Xuefuzhuo Decoction. **Conclusions:** The molecular mechanism of Xuefuzhuo Decoction which could treat the rat with syndrome of Qi-stagnancy and blood stasis may associated with those different proteins, and it will provide a new idea for study of molecular mechanism of Xuefuzhuo Decoction.

[ **Key words** ] proteome; Xuefuzhuo Decoction; serum; rat

血府逐瘀汤载于清·王清任所著的《医林改错》，有活血祛瘀、疏肝行气止痛之功。现代医学研究报告，血府逐瘀汤有改善微循环，降低血管阻力，改善神经营养代谢，促进损伤组织修复，抑制结缔组织代谢，减少瘢痕形成等作用<sup>[1]</sup>。临床多用于治疗胸痹心痛突然发作(心绞痛急性发作)，也可医治全身各个部位之血脉瘀滞病证，广泛用于内外妇儿各科疑难病证。研究证明血府逐瘀汤可以通过降低缩血管因子水平、提高舒血管因子水平、减少细胞黏附分子等多种途径改善血管功能，提高不稳定型心绞痛的临床疗效<sup>[2]</sup>。黏附分子参与细胞的信号转导与活化、细胞的伸展和移动、细胞的生长及分化、炎症、血栓形成等一系列重要生理和病理过程。而血府逐瘀汤能够降低血瘀证大鼠血管内皮细胞黏附分子蛋白(ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1, iNOS)的表达及其 mRNA 的表达，且量效关系明显<sup>[3]</sup>。此外，血府逐瘀汤还能很好的抵抗氧自由基的损害，抑制脂质过氧化反应，缓解心肌的缺血、缺氧现象，减轻再灌注对心肌的损伤，使酶的外漏减少，在保护心肌细胞上起到很好的作用<sup>[4]</sup>。

蛋白质组的比较研究有助于对细胞调控网络的理解，因而它是药物靶标识别和确认、药物的作用机理研究和药理学或毒性效应的检测和推断的有用工具<sup>[5]</sup>，也为中医药现代化研究提供了新启示、新方法。利用蛋白质组技术，分析经中药处理过的组织、细胞或体液表达的蛋白质组，并比较治疗前后蛋白质组的表达差异、鉴定其中发生相应变化的蛋白质，从蛋白质组水平上对中药的多环节、多靶点调整作用进行研究，可揭示中药单方、复方的作用机制，阐明药物作用的物质基础及内在的配伍规律，这无疑是中医药走向世界、进一步发展所必需的<sup>[6]</sup>。本实验室前期采用复合方法制作大鼠气滞血瘀动物模型<sup>[7]</sup>，在此基础上，本实验考察血府逐瘀汤对气滞血瘀证模型大鼠血清蛋白质组表达的影响，旨在从分子水平上探讨血府逐瘀汤活血祛瘀的作用机制。

## 1 材料

**1.1 药物制备** 血府逐瘀汤，由桃仁 120 g，红花 90

g，当归 120 g，生地黄 150 g，川芎 100 g，赤芍 100 g，牛膝 120 g，桔梗 90 g，柴胡 90 g，枳壳 90 g，甘草 60 g 组成，药物购自中国中医科学院西苑医院中药房，130 g 药物清水漂洗 2 次，加双蒸水 2 000 mL 浸泡 30 min 后煎煮 30 min，收集煎煮液，药渣再加水 1 500 mL 煎煮 20 min，合并两次滤液，浓缩至每 mL 含生药 1.6 g，分装备用。

**1.2 实验动物** 健康、雄性 SD 大鼠 30 只，SPF 级，体重(200±20) g，由北京维通利华实验动物中心提供，动物合格证号：SCXK(京)2002-0003。

**1.3 仪器及试剂** Ettan IPGphor 等电聚焦系统、Ettan DALT six 垂直电泳系统、Image Scanner 白光扫描仪及 Image Master 2D Elite v6.01 软件均为 GE 医疗集团产品。SGD-1 声、光、电刺激仪，由中国中医科学院西苑医院基础研究室研发；RS-20 II 型低温冷冻离心机，Tomy Seiko 公司生产。

固相 pH 梯度干胶条(pH=4~7, 24 cm)、固相 pH 梯度缓冲液 IPG buffer、矿物油、丙烯酰胺 N, N'-甲叉双丙烯酰胺、四甲基乙二胺、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、过硫酸铵、十二烷基磺酸钠(SDS)、3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸(CHAPS)、甘氨酸、尿素(Urea)、硫脲(Thiourea)、苯甲基磺酰氟、低熔点琼脂糖均购自 GE 医疗集团；碘乙酰胺(IAA)、二硫苏糖醇(DTT)、脱氧核糖核酸酶和核糖核酸酶等购自 Sigma 公司；考马斯亮蓝 G-250 及溴酚蓝为 Amersco 公司产品；其它常用试剂为国产分析纯，实验用水为去离子水。

## 2 实验方法

**2.1 分组及模型制备** 30 只 SD 大鼠随机分为 3 组，正常组、模型组、治疗组，10 只/组，各组给予不同的干预措施。模型制备的具体方法见参考文献<sup>[7]</sup>。

**2.2 标本采集** 取 1 mL 血液，4℃放置 30 min 后，离心(3 000 r·min<sup>-1</sup>, 15 min)。取上清转移至 Ep 管，离心(7 500 r·min<sup>-1</sup>, 30 min)，取上清，从 10 份血清样品中各吸取 100 μL 血清合并，得到正常、模型动物及给药动物的血清样品。

**2.3 血清样品预处理** 每次取血清 200 μL，加入

NaCl 终浓度 0.1 mol/L, 4℃放置 1 h, 加入乙醇终浓度至 42%, 4℃放置 1 h, 16 000 g 离心 45 min, 保存沉淀。同时取上清, 用 0.8 mol/L 乙酸钠, pH4, 调上清 pH 值至 5.7, 4℃放置 1 h, 16 000 g 离心 45 min, 取沉淀, 并与前次沉淀均置于 -80℃保存备用<sup>[8]</sup>。用改良的 Bradford 法测大鼠血清总蛋白浓度。

**2.4 双向凝胶电泳** 取适量蛋白样品与水化上样缓冲液 (5 mol·L<sup>-1</sup> Urea, 2 mol·L<sup>-1</sup> Thiourea, 4% CHAPS, 1% DTT, 0.2% IPG buffer) 充分混合。上样总体积 450 μL, 加入 IPG 持胶槽, 将 24 cm, pH 4~7 的 IPG 干胶条去掉保护膜后, 靠近条形码端置于阳极, 胶面朝下放入持胶槽中, 加上覆盖液, 盖好持胶槽盖子, 放在等电聚焦仪上。水化和聚焦均在 20℃进行, 等电聚焦极限电流为 50 mA/gel, 聚焦程序: 30 V 水化 12 h; 500 V 1 h; 1 000 V 1 h; 线性升压到 8 000 V; 8 000 V 聚焦 12 h, 最终达 90 000 V·h。第一向等电聚焦结束后, 迅速拿出胶条放在平衡液 I (6 mol·L<sup>-1</sup> Urea, 0.375 mol·L<sup>-1</sup> Tris, 20% 甘油, 2% SDS, 2% DTT) 中平衡 15 min, 在平衡液 II (6 mol·L<sup>-1</sup> Urea, 0.375 mol·L<sup>-1</sup> Tris, 20% 甘油, 2% SDS, 2.5% IAA) 中平衡 15 min。将平衡后的胶条转移至 0.75 mm 厚的分离胶 (12T) 上端, 用 0.5% 的低熔点琼脂糖封胶, 开启循环冷却系统, 进行 SDS-PAGE 分离。电泳采用恒功率方式, 起始功率 5 W/gel, 电泳 45 min 后, 用 20

W/gel 继续分离, 至溴酚蓝前沿迁移至距凝胶底边 1 cm 处停止。凝胶采用胶体内考染法染色。

**2.5 图像采集分析** 染色后的凝胶用 Image master Lab scan 扫描仪以及 Lab Scan 扫描软件进行扫描获取图像, 利用 Image Master 2D Elite 6.01 分析软件进行分析, 图像分析过程包括灰度校正、蛋白点的检测、凝胶自动匹配及手动矫正、差异蛋白质点的比较分析。数据分析使用的是分组统计学和类别统计学方法, 分组统计学包括散点图、集中趋势和离差的描述统计学、因子分析及探索法聚类; 类别统计学方法包括重叠测量和统计学 *t* 检验。软件分析主要考察每块凝胶中的总蛋白质点数、蛋白点的缺失和出现以及多块凝胶之间蛋白点的表达丰度变化。

### 3 结果

**3.1 双向凝胶电泳重复性分析** 采用 24 cm, pH4~7 的 IPG 分离正常健康大鼠, 模型大鼠和治疗组大鼠去除白蛋白后的血清蛋白, 每组样品分别进行 3 次双向电泳 (图 1)。用 Image Master 2D Elite 6.01 软件进行蛋白质点的灰度图像分析统计, 检测出正常组大鼠血清 2-D 图的平均蛋白质点数为 (354±20), 蛋白点相关系数为 0.863; 模型组的平均蛋白质点数为 (347±37), 蛋白点相关系数为 0.890; 治疗组的平均蛋白质点数为 (360±35), 蛋白点相关系数为 0.896 (图 2)。

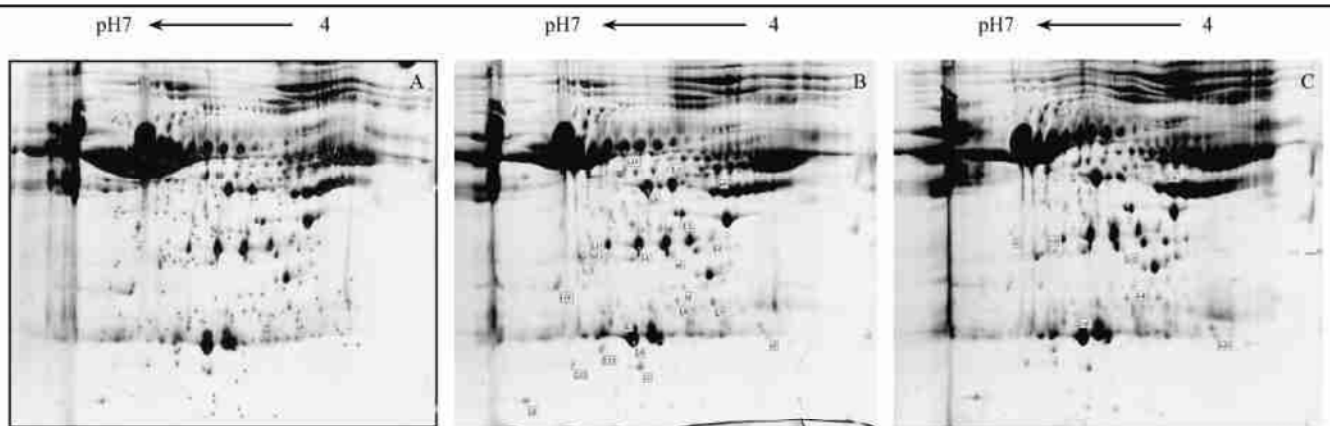


图 1 双向电泳图谱

A 是正常大鼠血清 2-D 图, s1 表示模型组缺失的蛋白点; B 为模型大鼠血清 2-D 图, 其中 u1~ u5 表示上调的蛋白点, d1 为下调的蛋白点, L 是蛋白点匹配时所需的地界标; C 为治疗大鼠血清 2-D 图, 其中 2-d1~ d5 2-u1 及 s2 分别对应模型组中的 u1~ u5 d1 和 s1, 表示给予血府逐瘀汤后差异点的表达有所恢复。

**3.2 双向凝胶图谱差异蛋白的分析** 进行正常组、模型组及治疗组大鼠血清图像分析时, 选择其中的一块凝胶作为参照胶, 其他凝胶与参照胶相匹配, 平均匹配上的蛋白点数为 (285±12), 匹配率为

76.2%。将每组凝胶上的每个蛋白点根据其面积、灰度值及蛋白点的光密度值等参数进行统计分析, 可得出如图 3 (仅提供了所有差异点的数据) 的数据, 其中左边柱状图上 3 条竖线表示 3 组样品, 其长

度表示蛋白的丰度, 3 条横线表示蛋白所选参数的平均值, 右边的表格是以蛋白体积为参数的数据表, 与柱状图对应。根据这些数据和柱状图选择蛋白体积百分比值差异大于两倍以上蛋白作为差异蛋

白, 发现气滞血瘀证大鼠血清与正常相比有 1 个蛋白质下调, 5 个蛋白质上调, 1 个蛋白表达缺失, 而给予血府逐瘀汤后可改善这些改变及缺失的蛋白质的表达水平(图 4)。

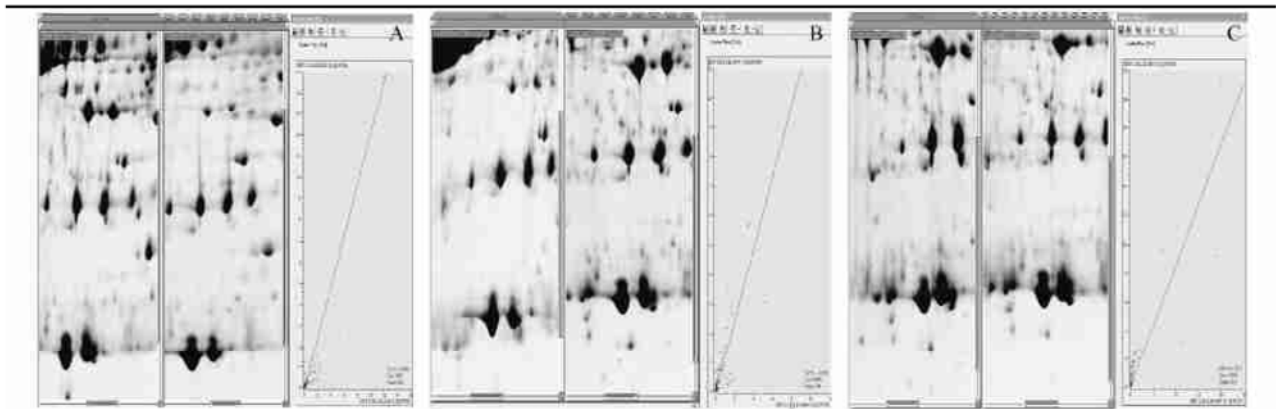


图 2 表示大鼠血清 2-D 图谱重复性的散点图  
A: 正常组; B: 模型组; C: 治疗组。

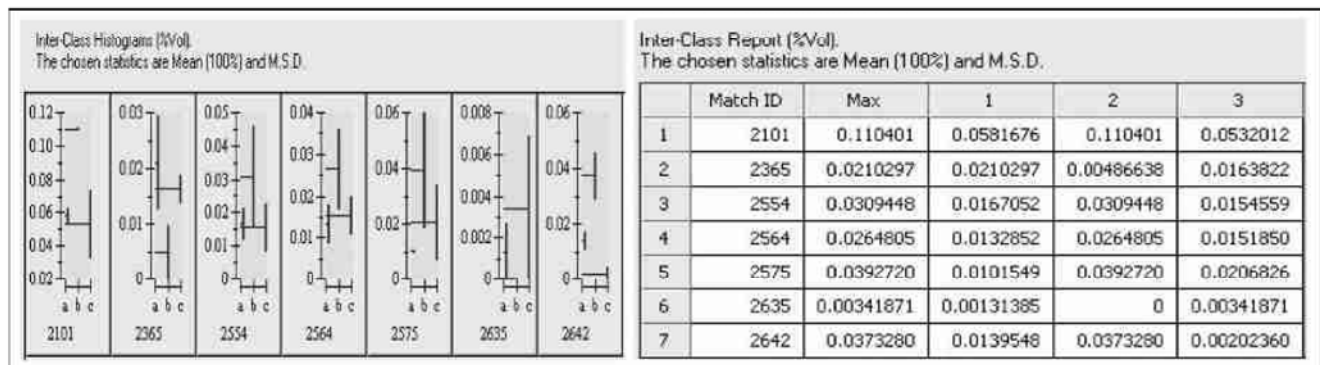


图 3 正常组、模型组及治疗组重复 3 次后, 软件统计分析后所得的差异蛋白的柱状图和数据表

2101 2365 等代表每个差异点的 ID 号, 2101 是 u4 2-d4, 2365 是 d1 2-u1, 2554 是 u3 2-d3, 2564 是 u1 2-d1, 2575 是 u5 2-d5, 2642 是 u2 2-d2, 2635 是 s1 s2。

#### 4 讨论

蛋白质组分析在药物的安全性评价、作用靶标和耐药性机制研究, 以及在疾病动物模型研制和中医药现代化研究等方面已有广泛的应用<sup>[9]</sup>。为了研究血府逐瘀汤的分子作用机制, 我们应用蛋白质组学技术初步分析了血府逐瘀汤对气滞血瘀证模型大鼠血清蛋白表达谱的影响。首先, 采用 Colantonio 等人方法去除血清中的高丰度白蛋白<sup>[8]</sup>。与其它去除高丰度蛋白的方法相比, 此种方法仅去除了—种高丰度蛋白, 但操作简便, 成本低廉, 2-DE 分离效果尚可接受。随后, 3 组样品分别采用 24 cm, pH4~ 7 范围的固相 IPG 胶条, 重复进行了 3 次双向电泳分离

(图 1)。为了分析凝胶的相似性或者由于染色强度、样品上样量等的变化引起的实验结果的误差, 生成了关于蛋白点群的散点图。散点图能够通过搜索来自两组凝胶的蛋白点值(例如光密度 OD, % OD)之间的线性依赖关系而给出关于这两组蛋白点值之间的相互关系, 其中变量  $x$  是来自—张凝胶的蛋白点值,  $y$  是另一张凝胶(参照凝胶)的对应的值, 凝胶重复性好坏是通过相关系数 Corr 给出的, Corr 绝对值越接近 1 说明重复得越好。双向电泳的分离效果—般可从蛋白点数、凝胶匹配率和相关系数等几个方面考虑, 蛋白点数反映了双向电泳分离的分辨率和灵敏度, 凝胶匹配率和相关系数不同程度的反映

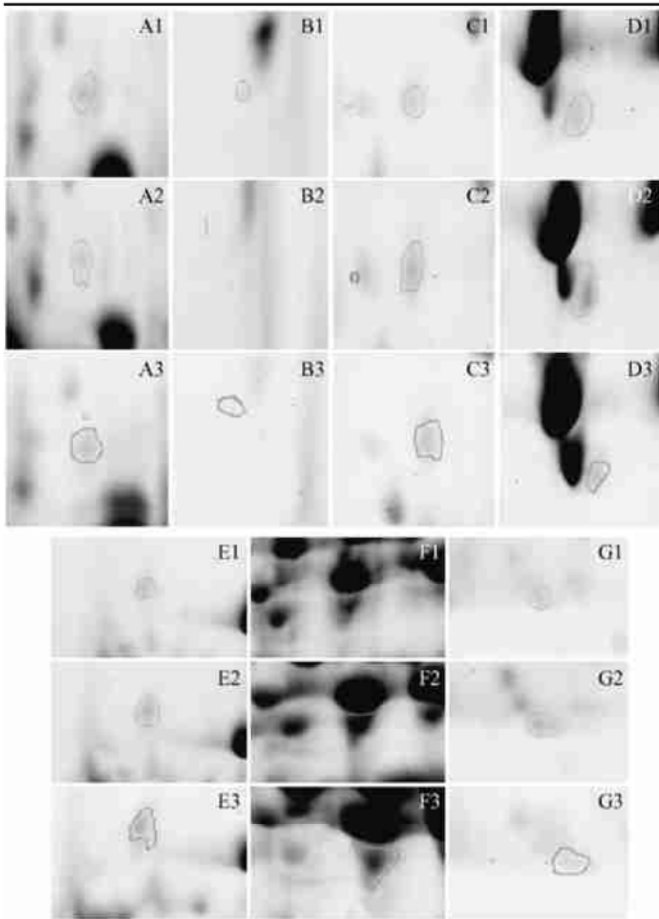


图 4 正常组、模型组及治疗组重复 3 次后,软件统计分析后所得的所有差异蛋白,从 A 到 G 上面均为正常组,中间的均为模型组,下面是治疗组,在模型组中:A 为下调点,B 为模型组中缺失的点,C-G 分别为 5 个上调点;治疗组与其相反。

了双向电泳分离的重现性。凝胶图像经软件统计分析,检测出正常组、模型组和治疗组大鼠血清图像的平均蛋白质点数分别为(354±20)、(347±37)和(360±35),匹配上的蛋白点数为(285±12),匹配率为 76.2%,蛋白点相关系数为 0.863、0.890 和 0.896(图 2),表明 3 组凝胶的分离度和重复性较好。根据统计数据选择蛋白体积百分比值的差异大于两倍以上点,发现气滞血瘀证大鼠血清与正常大鼠相比有 1 个蛋白质下调,5 个蛋白质上调,1 个蛋白表达缺失,而给予血府逐瘀汤后可改善这些改变及缺失的蛋白质的表达水平。我们推测,血府逐瘀汤的作用机理可能与这些差异蛋白点相关。在统计分析的过

程中还发现,模型组与正常组相比很多蛋白上调达不到两倍以上,但是呈现上调趋势,在给予血府逐瘀汤后均有改善的趋势。预计在制造模型时可能使一些转录因子激活,致使与信号转导、凝血机制启动等这些重要的病理过程相关的蛋白的表达量改变,而这些蛋白可能与血府逐瘀汤多靶点、多途径调控作用的机制相关。有关上述差异蛋白质的进一步研究质谱分析鉴定正在进行中。

#### [参考文献]

- [1] 林志群. 血府逐瘀汤临床病案举隅[J]. 时针国医国药, 2000, 11(12): 1120-1121.
- [2] 王宝祥, 董雪梅, 郭爱民, 等. 血府逐瘀汤对不稳定型心绞痛患者血管内皮功能的影响[J]. 中西医结合学报, 2006, 4(3): 256-259.
- [3] 陈利国, 陈畅宏, 屈 援, 等. 血逐瘀汤对血瘀证大鼠血管内皮细胞黏附分子表达的影响[J]. 山东中医药大学学报, 2006, 30(5): 395-398.
- [4] 吴素焕, 李利平, 武变瑛, 等. 血府逐瘀汤对心肌缺血再灌注损伤保护作用的研究[J]. 河北职工医学院学报, 2006, 23(1): 1-3.
- [5] 施孟如, 沃兴德, 卢德赵. 蛋白质组学和中医药研究[J]. 浙江中医学院学报, 2004, 28(6): 82-85.
- [6] 邢建宇, 许 波. 蛋白质组学与中医药现代化研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2006, 4(2): 141-143.
- [7] 任建勋, 林成仁, 王 敏, 等. 多因素整合建立气滞血瘀证动物模型研究[J]. 中药药理与临床, 2007, 2(5): 210-211.
- [8] Colantonio DA, Dunkinson C, Bovenkamp DE, et al. Effective removal of albumin from serum[J]. Proteomics, 2005, 5(15): 3831-3835.
- [9] 马增春, 王升启. 蛋白质组技术的研究进展及其在药物研究中的应用[J]. 中华国际医药杂志, 2003, 2(1): 37-40.