

• 药理 •

桂枝汤有效部位 A 对致热大鼠 下丘脑蛋白质组双向电泳分析

姜楠, 霍海如, 李兰芳, 周军, 李沧海, 郭淑英, 姜廷良
(中国中医研究院中药研究所唐氏中药研究中心, 北京 100700)

摘要:目的: 观察桂枝汤有效部位 A 对酵母致热大鼠下丘脑组织蛋白质组的影响。方法: 采用双向凝胶电泳技术和计算机辅助的图像分析方法, 对蛋白质进行分离, 以模型组作为参考胶进行匹配。结果: 口服给予桂枝汤有效部位 A 后对发热大鼠有解热作用; 双向电泳图像分析显示桂枝汤有效部位 A 与模型组匹配率为 85%, 多个蛋白质点表达量有不同程度的改变。结论: 差异表达的蛋白质点可能与桂枝汤有效部位 A 解热作用有关。

关键词: 桂枝汤有效部位 A(Fr. A); 蛋白质组; 双向电泳; 发热

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2004)03-0014-04

Changes in Hypothalamus Proteins Levels of Yeast-Induced Febrile Rats Treated by Fr. A in Guizhi Tang

JIANG Nan, HUO Hai-ru, LI Lanfang, ZHOU Jun, LI Cang-hai, GUO Shu-ying, JIANG Ting-liang
(Tang Center for Herbal Medicine Research, Institute of Chinese Materia Medica,
China Academy of TCM, Beijing, 100700)

Abstract: Objective: To observe the differential expressed protein spots in hypothalamus in yeast-induced febrile rats and the febrile rats treated with Fr. A, an active fraction extracted from Guizhi Tang. Methods: Using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis(2-DE) and computer-assisted image analysis to separate and find the spots of interests. The febrile group gel was designated as reference gel. Results: The matching rate of the Fr. A treated group is 85% a few protein spots were changed more than 30 folds. Conclusion: The spots of interests may be identified as the proteins that associate with the febrile process, and/or the potential targets affected by Fr. A. They will be further analysed.

Key words: Fr. A; proteome; two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis(2-DE); febrile

桂枝汤, 被誉为《伤寒论》第一名方, 由桂枝、芍药、甘草、生姜、大枣组成(*Cinnamomum cassia* Presl., *Paeonia lactiflora* Pall., *Zingiber officinale* Rosc., *Ziziphus jujuba* Mill. *Glycyrrhiza aralensis*. Fisch) 是治疗太阳中风的主方, 能解肌发表, 调和营卫, 用于外感风寒表虚证。我室的前期研究工作证明桂枝汤对体温有双向调节作用, 对 cAMP、cGMP、PGE₂、神经递质(NE, 5-HT)、神经调质(蛙皮素)等多条信号转导通路有影响^[1-3]。本所化学室对桂枝汤进行了提取分离, 获得了有效部位 A(Fr. A)^[4]。以往的大量药理实验证明 Fr. A 对发热大鼠有降低体温的作用。为

进一步研究其作用的分子机制, 我们采用了蛋白质组学的研究方法对发热大鼠下丘脑蛋白进行了分离和分析, 通过分析差异表达的蛋白质点来推断发热特异性蛋白质点和 Fr. A 作用的靶点, 为进一步研究桂枝汤的解热作用机理提供依据^[5]。

1 材料和方法

1.1 药物与试剂 Fr. A 为淡黄色粉末, 由本所化学室从桂枝汤全方中分离提取, 对 Fr. A 经 LC/MS/MS 正、负离子扫描, 发现, 约 50 个不同对应主要分子量的指纹峰, 其中可能的已知物质约 25 个, 分别来自全方 5 个组成药味, 得率为 4%。鲜酵母购于河北马利食品有限公司, -20℃保存。固相 pH 梯度干胶条(IPGs, immobiline pH gradient Drystrip)、十二烷基磺酸钠(SDS)、二硫苏糖醇(DTT)、三羟甲基胺基甲烷(Tris)、溴酚蓝、过硫酸胺(APS)、甘氨酸、丙烯酰胺、

收稿日期: 2003-11-21

基金项目: 国家自然科学基金重大研究计划, 项目资助号 90209006

IPG-Buffer Drystrip Cover fluid、琼脂糖、尿素、标准蛋白均购自 Amersham pharmacia Biotech 公司; N,N'-甲叉双丙烯酰胺、CHAPS 购自 Sigma 公司; 碘乙酰胺购自 ACROS 公司; 硫脲、无水醋酸钠、无水碳酸钠、硝酸银、硫代硫酸钠、戊二醛、乙醇、冰醋酸、甘油、甲酰胺均为国产分析纯或色谱纯。

1.2 仪器和软件 IPGphor 等电聚焦电泳仪、图像扫描仪及 PDQuest 7.0 软件、PROTEAN II Xicell 垂直电泳仪(购自伯乐公司)、恒温循环水浴箱(购自军事医学科学院)、高速台式离心机(购自上海医用分析仪器厂)、DY 89-1 型电动玻璃匀浆机(宁波新芝科器研究所)、WMY-01 数字温度计(上海医用仪表厂)。

1.3 动物 Wistar 大鼠, 雄性, 体重 165~ 185g, 由中国医学科学院实验动物中心提供, 合格证为 SCXK11-00-0006 号。

1.4 实验方法

1.4.1 分组及给药 选取基础肛温相近(37.0 ± 0.5 °C)的大鼠, 背部皮下注射 12% 鲜酵母悬液 2.4g/kg 体重, 诱致体温升高, 3.5h 后测肛温, 选取肛温升高 ≥ 0.8 °C 者, 随机分为 4 组, 即正常对照组、酵母模型组、酵母 + Fr. A 15.2 mg/kg 组。灌胃给药的药液容积为 10ml/kg, 对照组及模型组给同体积的蒸馏水。1h 后, 重复给药一次, 剂量同前。于第 1 次给药后 2h, 测肛温, 继而将动物快速断头取脑(1min 内), 干冰速冻, 于 -80 °C 冰箱保存备用。

1.4.2 组织蛋白质提取 冰冻状态下分离下丘脑组织, 称重, 置于匀浆器内, 加入裂解液(Tris 40mM, 尿素 7M, 硫脲 2M, 4% CHAPS, DTT 50mM, 1% IPG buffer 1.5%), 冰浴中匀浆, 1000rpm 离心 10min, 收集匀浆液, 液氮反复冻融 3 次, 再 45000g 离心 60min, 收集上清。用 Bradford 法测定蛋白质浓度, 并分装

粗提液。需要量的粗提液加入 5 倍体积丙酮溶液, -20 °C 沉淀过夜, 次日将样品置于室温直至不见结晶状物, 10000rpm 离心 55min。弃上清, 残余丙酮充分挥发后得到干燥沉淀, 于 -20 °C 存放备用, 直至电泳^[6]。

1.4.3 第一向固相 pH 梯度等电聚焦 样品管中加入 350μl 上样缓冲液(其中 7M 尿素、2% CHAPS、1% DTT、1% IPG buffer、2M 硫脲)。使用 17cm 的胶条, 每个胶条的上样量为 250 μg 蛋白, 被动重泡涨, 14h 后将胶条移到电泳槽中, 设置参数, 电压逐渐上升至 8000V。电泳结束后, 进行胶条的平衡。每根胶条放于 7ml 平衡母液中, 第一次平衡加入 1% DTT, 平衡 13min, 第二次平衡加入 4% 碘乙酰胺, 平衡 15min。平衡后将胶条用电泳缓冲液冲洗。

1.4.4 第二向垂直平板 SDS-PAGE 配制 13% 的均匀胶, 将平衡后的胶条移至凝胶上方, 加入 75 °C 左右的低熔点琼脂糖封胶液, 将 IEF 胶条推入与第二向胶结合。赶除气泡, 放入浸有分子量 MARKER 的滤纸片。以 16mA/gel 恒流 30min, 再以 30mA/gel 至电泳结束。银染采用伯乐公司的步骤进行。

1.4.5 凝胶扫描和图像分析 染色后的胶用扫描仪扫描, 用 PDQuest7.0 软件进行图像分析, 得到各个点的等电点、分子量、相对含量等信息。以模型组胶作为参考胶, 其他胶与之进行匹配, 寻找差异蛋白点。

2 结果

2.1 Fr. A 对发热大鼠的解热作用 根据各组药前肛温值(即酵母致热 3.5h 后)与药后 2h 肛温值, 进行 t 检验。如表 1 所示, 酵母致热 3.5h 后体温明显升高, 药后 2h 肛温与模型组比较有非常显著性差异 (P < 0.01)。

表 1 Fr. A 对酵母致热大鼠, 肛温的影响(̄x ± s, n = 8)

组别	剂量(mg/kg)	肛温(°C)		
		基础	酵母致热后 3.5h	给药后 2h
正常组	-	37.03 ± 0.34	37.11 ± 0.35	37.55 ± 0.37*
模型组	-	37.00 ± 0.33	38.62 ± 0.39	39.18 ± 0.30
Fr. A 组	15.2	37.23 ± 0.27	38.60 ± 0.34	38.70 ± 0.93*

注: 与模型组相比较* * P < 0.01

2.2 2-DE 图谱分析 2-DE 电泳图谱分析显示(图 1~ 3), 模型组与 Fr. A 组匹配率为 85%, 发现若干表达量增加、降低或新出现的差异表达的蛋白质点, 其中, 给药后蛋白质点 3225, 3419, 3518, 3714, 4132, 4301, 4501, 4606, 4633, 5616 和 6601 相对含量下调趋

于正常, 占有下调变化点的 25%; 蛋白质点 2218, 2237, 2410, 3205, 3401 和 5627, 相对含量上调趋于正常, 占有上调变化点的 12%; 差异蛋白的放大图谱如图 4~ 5 所示, 差异蛋白点的等电点、分子量和相对含量及增减的百分比见表 2。

3 讨论

中医药学有几千年丰富的
的临床治疗经验, 以往的研究
证明了中药复方的特点是
活性多组分, 通过多靶点、多
途径而发挥作用, 对机体的
调节通过整和作用完成。如
我室的前期工作证明, 桂枝
汤对多条信号转道通路有影
响, 作用于多个信号转导元
件, 对 PGE₂ 的合成代谢关键
酶, 如 PLA₂, COX-2, 15-PGDH
等有抑制、刺激或/和合成的
作用。随着生命科学研究技
术的进步, 可以通过蛋白质
组学的研究方法更全面和深
入的研究其作用的分子机
制。

在后基因组时代, 全世
界的科研工作者普遍认识到
对蛋白质的研究在生命科学
研究中的重要性, 并在 1994
由澳大利亚科学家 Wilkins
和 Williams 提出了蛋白质组
学这个概念。蛋白质组(proteomics) 系一个基因组、
一种生物或一种细胞组织所表达的全套蛋白质。对

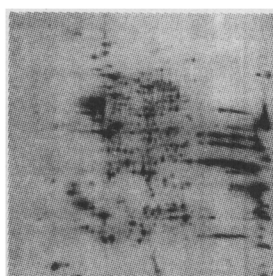


图 1 正常组下丘脑
组织蛋白

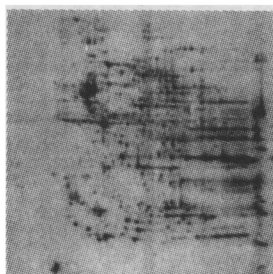


图 2 模型组下丘脑
组织蛋白

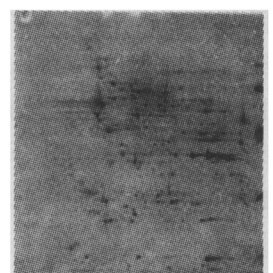


图 3 Fr. A 组下丘脑
组织蛋白

表 2 Fr. A 组与模型组之间主要差异表达的蛋白质点

蛋白点序号	分子量(KD)	等电点	变化百分比(%)*
SSP 3009	23.65	5.60	561.74
SSP 3225	30.86	5.91	159.27
SSP 3403	41.99	5.50	68.87
SSP 3417	45.00	5.86	33.77
SSP 3419	41.87	5.95	778.36
SSP 3518	55.81	5.84	135.08
SSP 3628	60.64	5.87	245.42
SSP 3714	76.06	5.63	938.98
SSP 4132	29.76	6.57	271.44
SSP 4301	39.22	6.00	229.66
SSP 4501	55.18	5.99	253.87
SSP 4511	55.53	6.24	279.38
SSP 4605	68.06	6.06	300.55
SSP 4633	59.00	6.60	89.27
SSP 5401	41.57	6.65	63.21
SSP 5616	63.08	6.97	211.94
SSP 6123	29.51	7.91	55.45
SSP 6601	66.00	7.24	422.09
SSP 2122	27.45	4.98	- 96.58
SSP 2123	26.72	5.30	- 89.28
SSP 2218	34.99	5.19	- 61.31
SSP 2237	30.59	4.88	- 85.58
SSP 2410	45.86	5.11	- 75.33
SSP 2501	47.54	4.72	- 71.66
SSP 2514	47.10	4.99	- 84.33
SSP 2530	47.00	5.09	- 83.37
SSP 2722	97.92	5.32	- 62.68
SSP 2723	98.39	5.38	- 88.77
SSP 2837	127.17	5.04	- 81.49
SSP 3205	32.36	5.46	- 63.11
SSP 3221	35.16	5.80	- 44.15
SSP 3312	37.55	5.67	- 67.89
SSP 3314	36.05	5.70	- 56.99
SSP 3401	41.72	5.44	- 71.91
SSP 4114	26.83	6.22	- 43.32
SSP 5105	30.08	6.79	- 39.09
SSP 5202	33.69	6.69	- 56.14
SSP 5215	35.19	7.10	- 66.87
SSP 5627	59.41	7.15	- 56.21
SSP 6203	33.97	7.33	- 61.72
SSP 6402	42.32	7.26	- 53.59
SSP 6407	41.28	7.39	- 65.94
SSP 7101	25.60	7.97	- 75.19
SSP 7522	47.65	8.43	- 53.97

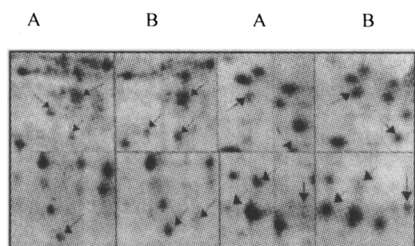


图 4 正常组(A)和模型组(B)主要差异蛋白点

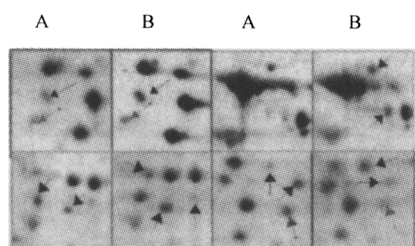


图 5 Fr. A 组(A)和模型组(B)主要差异蛋白点

注: * 变化百分比正值表示 Fr. A 组中的蛋白质点的相对含量高于模型组, 负值表示低于模型组

蛋白质组相关问题的研究即为蛋白质组学。双向电泳(2-DE)是目前使用最为广泛的技术,该技术建立于 20 世纪 70 年代,采用固定的载体两性电解质后重复性也得到了很大的提高,在检测技术上也有了较大的改进,出现了多种染色和鉴定的方法。本次实验样品提取过程中使用了硫脲和大浓度的尿素进行溶解,增加了样品的溶解性,并用丙酮进行浓缩处理,去除了核酸等杂质对电泳的影响。使用被动重泡胀的方法,保证了等电聚焦的完全。多次实验观察,分辨率较好,可以得到清晰的 2-DE 图谱。但酸性端蛋白质点略少,且碱性端略有脱尾,对样品的提取和电泳过程还可进一步完善^[7-8]。

发热是一个复杂的病理过程,有多种因子参与其中。我们以往的实验发现桂枝汤有效部位 A 能抑制内生致热原(IL-1、TNF、IFN)发热^[9],能调控下丘脑 PGE₂ 含量及其诱导的发热,改变 PLA₂ 和 15-PGDH,调控异常体温使之趋向正常水平^[10-12]。但调控 PGE₂ 合成、代谢等靶点、环节尚不完整和清晰。通过应用蛋白质组学的方法,较全面的分析致热后大鼠下丘脑和给予 Fr. A 后的下丘脑蛋白的改变,将从分子水平分析 Fr. A 可能的作用途径和靶点,更有利于证明 Fr. A 对各个 PGE₂ 代谢酶的影响。

在本次实验中,通过对双向电泳图谱分析,发现了若干差异表达的蛋白质点。给予 Fr. A 后,蛋白质点 3225, 3419, 3518, 3714, 4132, 4301, 4501, 4606, 4633, 5616 和 6601 相对含量下调趋于正常,蛋白质点 2218, 2237, 2410, 3205, 3401 和 5627 相对含量上调趋于正常,推测这些蛋白质点既与 Fr. A 作用的机制有关并可能参与了发热的病理过程,但还需要进一步通过质谱分析以及蛋白质数据库查询等方法来鉴定这些差异蛋白质点,判断它们是何种蛋白质以及可能的功能及生物学意义,期望从中发现与体温调节关键酶活性改变相关的蛋白质点,探讨 Fr. A 解热的蛋白质组学基础,为其解热机理研究提供更有力的实验依据。

参考文献:

[1] 姜廷良,霍海如,谭余庆. 桂枝汤及其有效部位双向调

节作用的机理研究[M]. 中药药理与临床研究进展. 北京: 军事医学科学出版社, 2002. 187-204.

- [2] 齐云,李沧海,郭淑英,等. 桂枝汤对体温双向调节作用机理探讨——对发热及低体温大鼠下丘脑 PGE₂ 含量及 COX 活性的影响[J]. 中药药理与临床, 2001, 17(6): 1-3.
- [3] 李沧海,霍海如,姜廷良,等. 桂枝汤对发热及低温大鼠下丘脑 15-羟基前列腺素脱氢酶活性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9(1): 27-30.
- [4] 曹进,戴德舜,王义明,等. 桂枝汤 A 部分有效成分指纹图谱归属[J]. 中国实验方剂学杂志, 2001, 7(3): 1-4.
- [5] 王大东. 蛋白质与蛋白质组学[J]. 国外医学分子生物学分册, 2000, 22(3): 129-133.
- [6] Staudenmann W, Hatt PD, Hoving S, et al. Sample handling for proteome analysis[J]. Electrophoresis, 1998, 19(6): 901-908.
- [7] Klose J, Kobalz U. Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome[J]. Electrophoresis, 1995, 16: 1034-1059.
- [8] Nohkura K, Morita N, Kuriki T. Application of an automated apparatus for two-dimensional electrophoresis, Model TEP-1, for microsequence analyses of proteins[J]. Electrophoresis, 1992, 13(6): 701-707.
- [9] 富杭育,周爱香,郭淑英,等. 桂枝汤对白细胞介素 1、干扰素、肿瘤坏死因子所致发热的作用[J]. 中药药理与临床, 1994, 10(3): 1-3.
- [10] 富杭育,周爱香,查显元,等. 桂枝汤对体温双向调节作用的机理探讨——对下丘脑前列腺素 E₂ 的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 1993, 13(11): 667-669.
- [11] 齐云,李沧海,郭淑英,等. 桂枝汤对体温双向调节作用机理研究——对发热及低体温大鼠下丘脑 PGE₂ 含量及 COX 活性的影响[J]. 中药药理与临床, 2001, 17(6): 1-3.
- [12] 齐云,霍海如,田甲丽,等. 桂枝汤对发热及低体温大鼠下丘脑中腺苷酸环化酶和磷酸二酯酶活性的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2001, 21(3): 203-205.