

桂枝汤对发热大鼠下丘脑蛋白质组影响初探

周 军, 李沧海, 霍海如, 姜 楠, 姜廷良
(中国中医研究院中药研究所唐氏研究中心, 北京 100700)

摘要:目的: 初步观察桂枝汤对发热大鼠下丘脑组织中蛋白质的差异表达, 为进一步探讨桂枝汤的解热分子机制奠定基础。方法: 应用蛋白质组技术, 对酵母发热大鼠模型和桂枝汤治疗组下丘脑组织中蛋白质表达进行比较, 观察其差异点。结果: 发现模型和治疗大鼠下丘脑蛋白表达有明显差异, 主要是蛋白表达量的增加和减少以及个别蛋白等电点的改变, 其中在给予桂枝汤后有 8 种蛋白(M_r/pI : 28.9 kD/4.47, 24.4 kD/6.28, 25.4 kD/6.39, 25.9 kD/6.39, 17.6 kD/7.38, 17.2 kD/7.43, 24.9 kD/7.39, 26.9 kD/7.59) 表达增强, 6 种蛋白(M_r/pI : 14.3 kD/4.83, 28.5 kD/4.39, 16.2 kD/4.11, 15.3 kD/6.7, 30.5 kD/7.09, 30.5 kD/7.13) 表达降低, 1 种蛋白(M_r/pI : 14.8 kD/5.4) 等电点发生了改变, 差异蛋白数量约占可分辨蛋白点的 2.3%, 本次实验未发现新的差异蛋白点。结论: 桂枝汤的解热作用可能与改变下丘脑组织中某些蛋白质的表达及修饰有关。

关键词: 桂枝汤; 蛋白质组; 双向电泳; 大鼠; 下丘脑; 发热

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2003)01-0031-04

Preliminary Study on the Changes of Hypothalamic Proteome Caused by Guizhi Tang in Fever Rats

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

Abstract: Aim: To further explore the molecular mechanism of antipyretic action of Guizhi Tang, the differences on the protein expression in hypothalamus of fever rats induced by yeast were analyzed preliminarily. Methods: Both the quantitative and qualitative changes of the protein expression in hypothalamus were compared between the model group and treated group with Guizhi Tang using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Results: There are obvious differences in expression of some proteins with a percentage of 2.3% among distinguishable spots. They changed mostly in volume and rarely in isoelectric point, of which, eight proteins (M_r/pI : 28.9 kD/4.47, 24.4 kD/6.28, 25.4 kD/6.39, 25.9 kD/6.39, 17.6 kD/7.38, 17.2 kD/7.43, 24.9 kD/7.39, 26.9 kD/7.59) enhanced in abundance, six proteins (M_r/pI : 14.3 kD/4.83, 28.5 kD/4.39, 16.2 kD/4.11, 15.3 kD/6.7, 30.5 kD/7.09, 30.5 kD/7.13) showed lower expression and one (M_r/pI : 14.8 kD/5.4) changed in isoelectric point. There was no unmatched protein spot. Conclusions: The changes in expression level and modification of some proteins may contribute to the antipyretic action of Guizhi Tang.

Key words: Guizhi Tang; proteome; two-D gel electrophoresis; rat; hypothalamus

蛋白质组学具有整体性、时间性和系统性的特点, 利用蛋白质组技术, 可从机体在特定时间、空间条件下的细胞、组织, 研究所有蛋白质的组成与调控的活动规律。迄今为止, 有关中药作用机理的蛋白质组学方面的研究报道较少。桂枝汤是张仲景《伤寒论》的名方, “调和营卫”是其作用的核心。本课题组以前的研究结果表明^[1, 2], 桂枝汤解热作用与下丘脑组织内钙调蛋白、腺苷酸环化酶等活性改变有关。为进一步探讨作用机制, 我们运用高信息量、高分辨率

的蛋白质组技术, 观察酵母发热大鼠给予桂枝汤后其下丘脑组织蛋白质组的变化, 通过比较其差异表达, 以探讨桂枝汤解热作用的分子机制。

1 材料和方法

1.1 药物与试剂 桂枝汤组成药材的桂枝 *Cinnamomum cassia* Presl., 芍药 *Paeonia lactiflora* Pall., 甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch., 生姜 *Zingiber officinale* Rosc., 大枣 *Ziziphus jujuba* Mill. 均经生药学鉴定。按原方比例(10: 10: 7: 10: 10)配齐药物, 加相当于药材量 6 倍的冷水浸泡 1 h, 煮沸 30 min, 过滤。药渣加 4 倍量水继续煎煮, 煮沸 20 min, 过滤。合并两次药

液,浓缩至相当于饮片 1g/ml。鲜酵母购于北京第二食品厂, - 40℃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、IPG-Buffer、Drystrip Cover fluid、琼脂糖、尿素、标准蛋白、三氟乙酸,以上试剂均购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司; N, N'-甲叉双丙烯酰胺、考马斯亮蓝 G-250、CHAPS, 购自 Sigma 公司; 碘乙酰胺, 购自 ACROS 公司; 40% 两性电解质(pH 3~ 9.5), 购自军事医学科学院; DNase I、RNase A, 购自晶美生物; 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、甲醇、甘油、甲醛等均为国产分析纯或色谱纯。

1.2 主要仪器和软件 IPGphor 等电聚焦电泳仪、图像扫描仪及 ImageMaster 2D Elite 图像分析软件(瑞典 Amersham Pharmacia Biotech 公司), Protein II 垂直电泳仪(Bio-Rad), 恒温循环器(军事医学科学院), AB 204-E 型分析天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司), DY 89-1 型电动玻璃匀浆机(宁波新芝科器研究所), Centrifuge 5402 低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司), 高速台式离心机(上海医用分析仪器厂), WMY-01 数字温度计(上海医用仪表厂)。

1.3 实验方法

1.3.1 样品制备 Wistar 大鼠, 雄性, 体重 170~190g, 由中国医学科学院动物研究中心提供。选取基础肛温在 36.5 ± 0.5 ℃ 范围的大鼠, 以 12% 鲜酵母悬液(2.4/kg 体重) 背部皮下注射诱导体温升高, 3.5 h 后测肛温, 选取肛温升高 ≥ 0.8 ℃ 者, 随机分为 2 组, 即酵母模型组、酵母+桂枝汤(10g/kg) 组。灌胃给药, 模型组给等体积蒸馏水。给药 1 h 后测肛温, 重复给药一次, 剂量同前。2 h 后再次测肛温, 即将大鼠快速断头取脑, 干冰速冻, - 70℃ 冻存。

参照文献^[3]改进, 取冻存下丘脑组织称取约 50 mg 放入匀浆器中, 加入 2 ml 匀浆液(8 mol/L 尿素, 4% CHAPS, 100 mmol/L DTT, 40 mmol/L Tris-base, 0.5% 两性电解质 pH 3~ 9.5), 冰水浴下匀浆 30 s, 加入 20 μg/ml DNase I 和 5 μg/ml RNase A, 4℃ 作用 15 min 后, 4℃ 下 12000 r/min 离心 30 min, 收集上清液即为蛋白质粗提物。考马斯亮蓝法测定蛋白含量。

1.3.2 实验步骤 用 IPGphor IEF System 进行一向等电聚焦, 蛋白上样量 1mg, 其中 8 M 尿素、0.02% CHAPS、0.02 M DTT、0.05% IPG 缓冲液。将聚焦后

的 IPG 胶条在 SDS 平衡缓冲液中, 于摇床上振荡平衡两次 15 min × 2, 其中第一种平衡液中加入 20 mM DTT, 第二种平衡液中加入 100 mM 碘乙酰胺。取出平衡后的 IPG 胶条, 在 PROTEIN II xi Cell 上进行垂直 SDS-PAGE 第二向, 用浓度为 13% 的聚丙烯酰胺凝胶分离。在 14~ 15℃ 条件下 40 mA 恒流电泳, 直至溴酚蓝前沿到达玻璃板底部为止。凝胶在自动染色仪上进行硝酸银染色^[4], 获得凝胶图。

1.3.3 二维凝胶图像扫描与分析 采用 ImageMaster 2D Elite 图像分析软件分析双向电泳获得的二维凝胶图谱。以一张胶为参考胶, 另一张以之比较, 据蛋白斑点的大小、形状、位置等参数, 软件将不同图谱中的相同斑点匹配, 匹配不上的斑点则视为差异点。斑点蛋白质的等电点和分子量, 根据 IPG 胶条 pH 标示和标准蛋白来推算。各蛋白质的相对含量, 以其占总蛋白质的百分比来表示。

2 结果

2.1 桂枝汤对酵母发热大鼠的解热作用 体温升高值计算: 药后 1 h、2 h 肛温值 - 药前肛温值(即酵母致热 3.5 h 后)。实验数据采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间差异用 *t* 检验。

由表 1 中可见, 注射酵母后 3.5 h 两组体温均升高近 2℃。给予桂枝汤后 1 h、2 h 肛温持续下降, 而酵母组肛温则持续升高, 二者比较有显著差异($P < 0.01$)。

表 1 酵母发热大鼠及给予桂枝汤组肛温变化值(℃, $\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	给药前	给药后 1 h	给药后 2 h
模型组	1.98 ± 0.32	2.45 ± 0.29	2.55 ± 0.29
给药组	1.96 ± 0.23	1.64 ± 0.32*	1.26 ± 0.47*

注: 与模型组比较 * $P < 0.01$

2.2 双向电泳图谱及分辨率 酵母性发热及其给药大鼠下丘脑组织 2-DE 图谱见图 1(a、b)。图中从左至右为等电点增加, 从下至上为分子量增加。a 胶可分辨蛋白质点为 668 个, b 胶可分辨蛋白质点为 654 个。以 a 胶为参考胶, b 胶与之匹配, 其匹配率为 70.03%。图 2 为 a、b 胶的匹配图。

2.3 发热及其桂枝汤给药大鼠下丘脑组织蛋白质的表达变化 通过 ImageMaster 2D Elite 图像分析软件分析, 发现酵母性发热大鼠在给予桂枝汤后凝胶图象显示: 8 种蛋白表达水平明显升高, 6 种蛋白表达水平明显下降, 还有 1 种蛋白有明显的等电点改变(等电点由 5.43 改变为 4.93)。差异蛋白点的放大图谱如图 3。差异蛋白点的等电点、分子量和蛋白增减量见表 2、3、4。

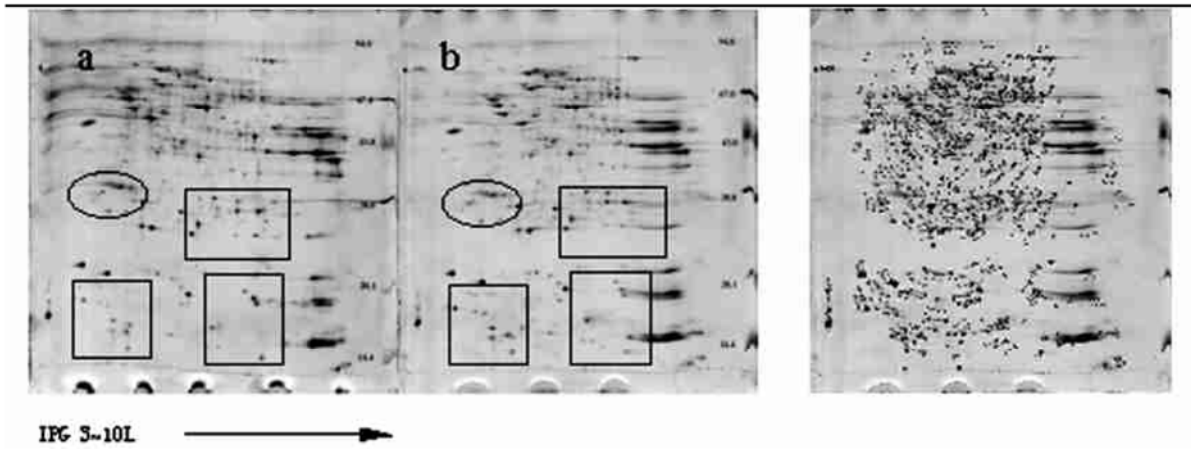


图1 酵母发热大鼠(b)与桂枝汤治疗大鼠(a)
下丘脑组织蛋白双向电泳图

图2 a、b胶匹配图

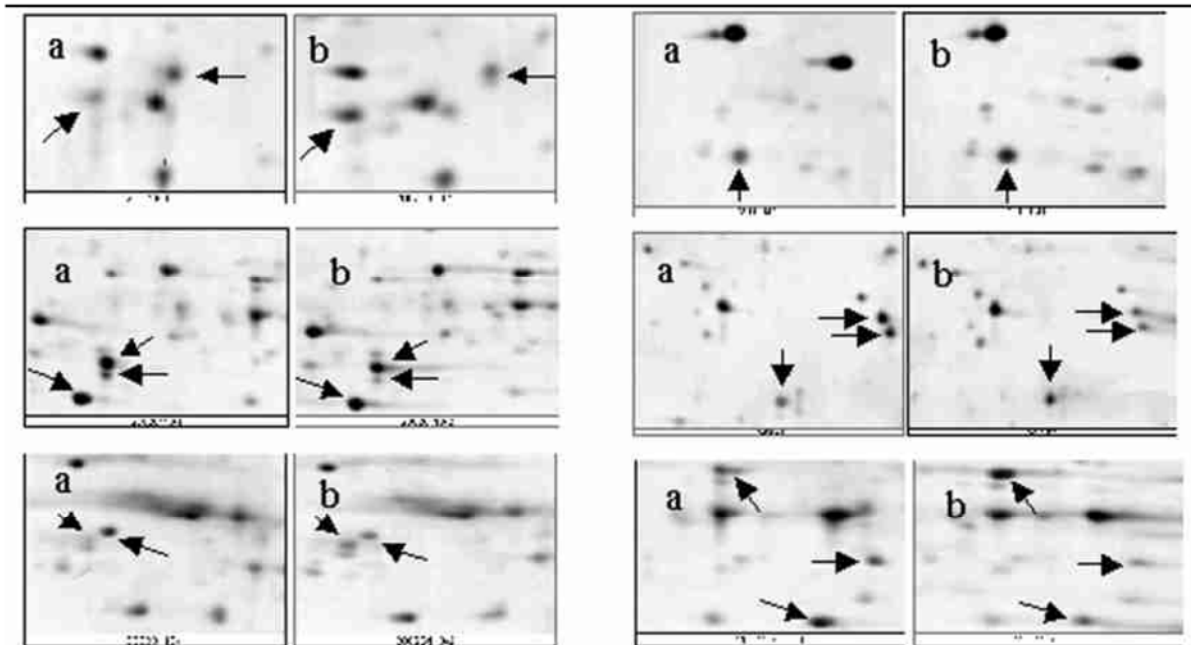


图3 蛋白质差异点的放大比较图

表2 给药后表达增强的蛋白点

蛋白斑点序号	等电点(pI)	分子量(Mr/Kd)	增加量(%)
148	4.47	28.937	243.8
1066	6.28	24.429	21.6
466	6.39	25.403	1349.4
465	6.39	25.912	37.4
188	7.38	17.632	899.3
192	7.43	17.200	382.3
165	7.39	24.909	452.9
159	7.59	26.947	179.5

表3 给药后表达减弱的蛋白点

蛋白斑点序号	等电点(pI)	分子量(Mr/Kd)	减少量(%)
1045	4.83	14.253	79.4
727	4.39	28.540	79.4
199	4.11	16.162	68.5
203	6.70	15.339	69.8
507	7.09	30.541	71.2
508	7.13	30.541	89.0

表4 给药后等电点改变的蛋白点

蛋白斑点序号	等电点(pI/L)	分子量(M/kD)	改变后等电点(pI/L)
206	5.43	14.8	4.93

3 讨论

蛋白质组学是近年来生命科学研究中一门重要的新兴学科,其借助双向电泳高分辨率的特点,将组织或细胞的蛋白质进行分离,然后应用生物质谱等技术对分离蛋白做出鉴定。由于基因只是遗传信息的载体,蛋白质才是生命活动的执行者,因而蛋白质组学的研究技术日益为生命科学所重视。运用蛋白质组的研究手段,通过对正常、病理状态下和给予药物后组织或细胞中蛋白质在表达数量、表达位置和修饰状态的差异点的比较,则可发现与这种病理状态相关的蛋白质、疾病的特异蛋白质,探索药物作用的蛋白靶点。蛋白质组是指“一个细胞或一个组织基

因组所表达的全部蛋白质”,这一概念体现了其具有整体性、动态性和系统性的特点,它与中医学所倡导的整体观念和动态的“证”的思想是一致的,因而借助蛋白质组技术从证候、方药入手研究中医学,应是中医药现代化研究的重要途径。

酵母诱导的大鼠发热模型是研究发热的经典模型,它通过皮下注射酵母悬液而使机体产生和释放内生致热源,进一步影响下丘脑体温调节中枢而导致体温升高。我们利用该模型探讨了正常、发热和给予桂枝汤大鼠下丘脑组织中蛋白质的差异表达(正常与模型大鼠方面的内容将另文阐述)。由酵母发热和给药大鼠电泳图谱的匹配率(70.03%),可见所表达蛋白质点的位置、形态、染色程度和表达数量等方面基本吻合。经初步图象分析显示,酵母发热大鼠给予桂枝汤后其蛋白表达有不少差异点出现,差异蛋白数量约占可分辨率蛋白质点的2.3%。其差异主要表现为蛋白表达量的增加和减少,以及个别等电点的改变,但本次实验未见到明显的新蛋白质点出现。所现差异蛋白的等电点多在4~7L之间,个别蛋白等电点的改变,有可能是给予桂枝汤后某些蛋白质分子发生修饰所致。本实验双向凝胶电泳图谱显示的蛋白质分子量在13~33 kD之间,为一些中低相对分子量蛋白质。这些蛋白质或许是在细胞信号转导过程中起作用的调节蛋白,有可能是桂枝汤发挥解热功用的靶点。

我们以往的研究表明,桂枝汤对酵母性发热大鼠的解热作用,与其下调下丘脑中升高的腺苷酸环化酶、单胺氧化酶等酶的活性有关^[1,2],这些酶都是蛋白质。此项实验中所呈现的差异蛋白是否为上述酶或热休克蛋白、钙调蛋白等,以及这些差异蛋白是何种蛋白质、桂枝汤如何调节了这些蛋白的表达,均有待进一步研究。这里,我们仅粗略地就下丘脑中的总蛋白作了探讨,若能改进提取方法获取更多的蛋白质或分别对细胞膜与细胞质蛋白质进行研究,则可更好地展示桂枝汤发挥解热作用的靶蛋白,以深入揭示其解热分子机制,这是我们今后的研究内容。

参考文献:

- [1] 霍海如,谭余庆,周爱香,等.桂枝汤有效部位A对下丘脑热休克蛋白含量的影响[J].中国中药杂志,2000,25(10):619-621.
- [2] 齐云,霍海如,郭淑英,等.发热及低体温大鼠下丘脑中腺苷酸环化酶活性与环一磷酸腺苷含量的变化[J].中国病理生理杂志,2002,18(4):371-373.
- [3] 兰彦,钱小红,王阁,等.蛋白组分析中蛋白质分步提取方法的建立[J].生物化学与生物物理学进展,2001,28(3):415-418.
- [4] 郭尧君.蛋白质电泳实验技术[M].北京:科学出版社,1999.142.