



平肝潜阳方治疗前后高血压病肝阳上亢证大鼠 肾上腺组织蛋白表达变化的蛋白质组学研究

张莺, 陈泽奇, 钟广伟

中南大学湘雅医院中西医结合研究所, 湖南 长沙 410008

目的:从蛋白质组学水平探讨大鼠高血压肝阳上亢证发生机制及平肝潜阳方治疗肝阳上亢证的分子机制, 为治疗高血压肝阳上亢证寻找新的药物标志蛋白提供理论和实验依据。

方法:以自发性高血压大鼠(spontaneous hypertensive rat, SHR)加灌服附子汤法制备高血压肝阳上亢证大鼠模型, 二维凝胶电泳分离大鼠肾上腺蛋白质, 获得差异表达蛋白质; 利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)和数据库分析鉴定差异表达蛋白质。

结果:高血压肝阳上亢证大鼠模型复制成功, 平肝潜阳方治疗后易激惹程度和结膜充血减轻, 收缩压下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。通过点检测后, 发现 12 个具有明显表达差异的蛋白质斑点, 经鉴定可以确认的蛋白质点有 8 个, 其中 2 个蛋白点为同一蛋白。其中异柠檬酸脱氢酶、类固醇合成急性调节蛋白在模型组表达较正常组上调, 在治疗组重新下调至前水平; 铁轻链蛋白、Tu 翻译延长因子、鸟苷酸解离抑制因子、黄素还原酶、Basic 转录因子 3 在模型组表达较正常组下调, 在治疗组重新上调至前水平。

结论:成功鉴定了高血压肝阳上亢证大鼠平肝潜阳方治疗前后肾上腺组织差异表达蛋白, 为深入研究高血压病肝阳上亢证的病理机制及平肝潜阳方治疗的分子机制奠定了基础。

关键词:高血压; 肝阳上亢证; 平肝潜阳方; 蛋白质组学; 肾上腺; 大鼠

中图分类号: R966; **文献标识码:** A; **文章编号:** 1672-1977(2008)07-0729-09

Zhang Y, Chen ZQ, Zhong GW. *J Chin Integr Med / Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*. 2008; 6(7): 729-737.

Received October 29, 2007; published online July 15, 2008.

Free full text (PDF) is available at www.jcimjournal.com.

Indexed/abstracted in and full text link-out at PubMed.

Forward linking and reference linking via CrossRef.

DOI: 10.3736/jcim20080714

Open Access

Adrenal protein expressions after Pinggan Qianyang Formula treatment in hypertensive rats with liver-yang hyperactivity: a comparative proteomic analysis

Ying ZHANG, Ze-qi CHEN, Guang-wei ZHONG

Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan Province 410008, China

Objective: To explore the pathogenic mechanism of liver-yang hyperactivity type of hypertension and to observe the effects of Pinggan Qianyang Formula (PGQYF), a compound of traditional Chinese herbals for calming the liver and suppressing yang, so as to provide experimental evidence for new marker proteins of drug therapy.

Methods: A rat model of liver-yang hyperactivity was prepared with spontaneous hypertensive rats (SHRs) by administration of *Aconiti Praeparatae* Decoction. Adrenal proteins were separated by 2D gel electrophoresis (2-DE). The differentially expressed proteins were identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and database analysis.

基金项目: 国家自然科学基金面上资助课题(青年基金)(No. 30500644, No. 30407211)

Correspondence: Guang-wei ZHONG; Tel: 0731-4327284; E-mail: zgw7512@sina.com

Results: The rat model of liver-yang hyperactivity was successfully reproduced, and the PGQYF could decrease the grades of irritability, conjunctival congestion and systolic blood pressure of the rats ($P < 0.05$, $P < 0.01$). After analysis, twelve obviously differentially expressed proteins were found, eight of which were identified. The expression levels of isocitrate dehydrogenase and steroidogenic acute regulatory protein in the untreated group were up-regulated as compared with those in the normal control group, and down-regulated in the treatment group. The expression levels of ferritin light chain, elongation factor Tu, Rho GDP disassociation inhibitor 1, flavin reductase and basic transcription factor 3 in the untreated group were down-regulated as compared with those in the normal control group, and up-regulated in the treatment group.

Conclusion: Differentially expressed adrenal proteins in SHRs with liver-yang hyperactivity are successfully identified. This approach may lay a foundation for the further investigation of pathogenic mechanisms in hypertension with liver-yang hyperactivity and the mechanisms of PGQYF treatment.

Keywords: hypertension; liver-yang hyperactivity; Pinggan Qianyang Formula; proteomics; adrenal gland; rats

原发性高血压病(essential hypertension, EH)是一种常见的心血管系统疾病,具有发病率高和并发症多的特点。随着我国经济的发展和人民生活水平的提高,高血压的发生率较 10 年前明显增加^[1]。长期患高血压可导致患者心、脑和肾等脏器发生器质性病变及功能损害,并最终导致这些器官的功能衰竭。中国 11 省市人群血压水平与 10 年心血管病发病危险的前瞻性研究结果显示,高血压是中国人人群脑血管病发病和死亡最重要的危险因素^[2]。肝阳上亢证是高血压病的常见证型,据统计,高血压病中肝阳上亢证约占 87.33%^[3]。平肝潜阳法是治疗高血压病肝阳上亢证的传统治法,不仅能有效降低患者的血压水平,还极大地改善患者的生存质量,降低患者并发症的发生。为了进一步揭示高血压肝阳上亢证的发生机制及平肝潜阳法治则的作用机制,本研究从蛋白质组学水平展开研究,复制高血压肝阳上亢证大鼠模型,利用比较蛋白质组学的技术和方法,分析治疗前后肾上腺组织蛋白表达的差异,寻找差异表达蛋白点。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 正常健康 Sprague Dawley(SD)雄性大鼠 10 只,清洁级,8 周龄,体质量(200±10)g,由中南大学湘雅医学院实验动物部提供,许可证号为医动字第 20-010 号;自发性高血压大鼠(spontaneous hypertensive rat, SHR)20 只,雄性,清洁级,8 周龄,体质量(200±10)g,由上海斯莱克公司提供,许可证号为 SCXK(沪)2003-0003。

1.1.2 主要试剂 2D Quant 蛋白定量试剂盒、固相 pH 梯度(immobilized pH gradients, IPGs)干胶条(IPG Strip, pH 3-10, 24 cm)、IPG 缓冲液(pH 3-10)和覆盖液均由 Amersham Biosciences 公司提供;二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、丙烯酰胺、

甘氨酸、苯甲基磺酰氟化物(phenylmethyl sulfonyl fluoride, PMSF)、3-[3-(胆酰胺基丙基)二甲氨基]丙磺酸盐{3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamino]-propanesulfonate, CHAPS}、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、N,N,N',N'-四甲基乙二胺(tetramethylethylenediamine, TEMED)、考马斯亮蓝和琼脂糖均由 Sigma 公司提供;低分子量标准蛋白质由上海伯奥生物制品公司提供;Tris-base 为 USB 公司分装;碘乙酰胺由 Fluka 公司提供;磷酸和无水甲醇等均由湖南师范大学试剂厂提供。

1.1.3 实验仪器 Ettan IPG-phor II 等电聚焦仪、Ettan DALT II System 垂直电泳槽及光密度扫描仪(Amersham 公司),Elx800 全自动酶标仪(DIALAB 公司),PDQuest 7.0 分析软件(Bio-Rad 公司),真空冷冻干燥机(Savant 公司),Applied Biosystem Voyager DE STR Biospectrometry™ Workstation System 4307 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)仪(ABI 公司),二道生理记录仪(成都仪器厂),清醒小动物血压测量器(中南大学湘雅医学院心脏生理研究室)。

1.1.4 实验药物 附子汤由单味药制附子 60 g 组成,先将药物浸泡 30 min,煎煮两次后再将药液合并浓缩为含生药 0.1 g/ml。平肝潜阳方(Pinggan Qianyang Formula, PGQYF)由天麻 10 g、钩藤 20 g、石决明 30 g、牡蛎 30 g 和牛膝 10 g 等组成。石决明先煎 20 min,钩藤后下,煎煮两次后再将药液合并,浓缩为含生药 0.1 g/ml。以上中药均由中南大学湘雅医院中药房提供。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型及分组 正常 SD 大鼠 10 只为正常对照组;SHR 大鼠 20 只完全随机(随机排列表

法)分为模型组和 PGQYF 组。正常对照组大鼠连续灌服蒸馏水 42 d,于第 43 天处死。PGQYF 组及模型组参照鄢东红等^[4]方法,连续灌服附子汤 21 d,1 次/d,4 ml/d,复制成高血压肝阳上亢证模型。模型组自第 22 天起改为灌服蒸馏水,连续 21 d。PGQYF 组在同一时间灌服 PGQYF 4 ml/d,连续 21 d。分别于造模前、第 3 周末和第 6 周末,观察大鼠的外观及易激惹程度、饮水量和血压变化。易激惹程度分为Ⅲ级:Ⅰ级指捉持颈部时尖叫、惊跳;Ⅱ级指捉持颈部时咬人;Ⅲ级指提尾时尖叫、惊跳,甚至咬人或同笼大鼠频繁打斗。大鼠收缩压(systolic blood pressure, SBP)测定方法采用杨绿化等^[5]报道的尾动脉搏动法。各组动物均于第 43 天腹腔注射 10%水合氯醛(4 ml/kg)麻醉,快速剖腹,冰上剥离肾上腺,迅速将肾上腺用冰生理盐水冲洗干净,装在标记好的冻存管中放入液氮中保存备用。

1.2.2 肾上腺组织蛋白质的提取及浓度测定 每只大鼠 2 只肾上腺标本混合液氮,置于研磨管,加入组织裂解液 0.2 ml 研磨,静置 1 h,12 000 r/min 4 ℃离心 60 min,取 5 μ l 上清液用于测定总蛋白质浓度,其余上清液冻存于-80 ℃备用。蛋白质定量按照 GENMED Bradford 蛋白质浓度定量试剂盒产品说明书进行。

1.2.3 蛋白质二维凝胶电泳分离 主要参考 IPGhor™等电聚焦系统操作指南进行。在 20 ℃自动进行水化和聚焦,总电压时间积为 70 020 V·h,30 V 低电压泡胀 12 h 后进行等电聚焦电泳(isoelectric focusing, IEF)^[6],然后经过 120 V 1 h,500 V 1 h,1 000 V 1 h,5 000 V 1 h,最后稳定在 8 000 V 下进行。将胶条进行两步平衡后,转入预先灌制好的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)胶(13% SDS-PAGE 胶配制参照文献^[7])上,在垂直电泳槽(Ettan DALT six electrophoresis unit)上进行第 2 向电泳。将经过第 2 向垂直板 SDS-PAGE 电泳的聚丙烯酰胺胶从制胶板中分离,参照文献^[8]进行考马斯亮蓝染色。在相同条件下,采用相同上样量,同一标本的总蛋白质样品分别进行 3 次重复性检测。

1.2.4 凝胶图像分析 用 Image Scanner 扫描仪及 Lab Scan 扫描软件进行扫描,获取图像。以 PDQuest 7.0 分析软件进行图像分析。为消除误

差,将同组的 3 张二维凝胶电泳(2-dimensional gel electrophoresis, 2-DE)凝胶拟合成 1 张平均胶,然后进行组间比较。以正常组 2-DE 凝胶为参考胶,模型组及治疗组与之匹配,寻找差异蛋白点。参照 Paulson 等^[9]方法,蛋白质表达水平上升或下降 200%的点选择为目标点,进行鉴定。

1.2.5 蛋白质的胶内酶解 蛋白质的胶内酶解参照 Fernandez 等^[10]的方法并加以改进,冷冻抽干仪抽干后用 MALDI-TOF-MS 测定肽质量指纹图谱。将萃取后冻干的样品用萃取工作液约 4 μ l 溶解,用 Tips 反复在样品液中吸进压出,进行多次循环操作,使样品充分混匀,取 0.6 μ l 点于点样板上,每点上再加 0.6 μ l α -氰基-4-羟基肉桂酸基质工作液置空气中自然风干。肽段样品用 MALDI-TOF-MS 检测,获得的混合物肽片段质量指纹图谱通过 <http://www.matrixscience.com> 在 Swiss-prot 数据库搜索进行蛋白鉴定。

1.3 统计学方法 使用 SPSS 13.0 软件包进行统计学分析,计量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较采用方差分析及 q 检验,计数资料比较用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 大鼠外观及易激惹程度变化 模型组和 PGQYF 组大鼠在附子汤灌胃 3 周后,其易激惹程度发生了变化,多表现为Ⅲ级,且大部分出现了结合膜充血,与正常对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);经 PGQYF 治疗后(第 6 周末),其易激惹程度及结合膜充血均较前好转,易激惹程度多表现为Ⅰ和Ⅱ级,结合膜充血大鼠数亦较前减少,与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 1。

2.2 大鼠饮水量变化 模型组和 PGQYF 组大鼠用附子汤灌胃 3 周后,饮水量均较造模前明显增加,与正常对照组及造模前比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);PGQYF 组大鼠经治疗 3 周后,饮水量较治疗前及模型组明显减少($P < 0.01$),与正常对照组接近($P > 0.05$)。见表 2。

2.3 大鼠血压动态变化 模型组和 PGQYF 组大鼠经附子汤灌胃 3 周后,其 SBP 均较造模前明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);PGQYF 组大鼠经中药 PGQYF 治疗 3 周后,收缩压均较治疗前下降,与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),与造模前比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3。

表 1 各组大鼠外观及易激惹程度变化

Table 1 Changes of appearance and grades of irritability of the rats in different groups

(Cases)

Group	n	3 weeks				6 weeks			
		Grade of irritability			Conjunctival congestion	Grade of irritability			Conjunctival congestion
		I	II	III		I	II	III	
Normal control	10	1	0	0	0	1	0	0	0
Untreated	10	1	2	7	9	2	2	6	8
PGQYF	10	1	1	8	9	4	3	3	3

表 2 各组大鼠饮水量变化

Table 2 Changes of volume of water the rats drank in different groups

($\bar{x} \pm s$, ml)

Group	n	Volume of water		
		0 day	3 weeks	6 weeks
Normal control	10	32.42±2.16	35.20±2.46	33.62±3.52
Untreated	10	31.92±4.24	58.58±5.56**▲▲	58.25±6.54**▲▲
PGQYF	10	33.35±3.47	56.90±5.72**▲▲	35.60±4.33△△

** $P < 0.01$, vs normal control group; △△ $P < 0.01$, vs untreated group; ▲▲ $P < 0.01$, vs 0 day in same group.

表 3 各组大鼠血压动态变化

Table 3 Dynamic state of blood pressures of the rats in different groups

($\bar{x} \pm s$, mmHg)

Group	n	SBP		
		0 day	3 weeks	6 weeks
Normal control	10	106.52±6.34	105.54±5.85	106.58±6.45
Untreated	10	181.75±10.23**	198.59±9.89**▲▲	202.00±7.25**▲▲
PGQYF	10	180.20±8.46**	198.23±8.97**▲▲	175.41±6.58**△△

** $P < 0.01$, vs normal control group; △△ $P < 0.01$, vs untreated group; ▲▲ $P < 0.01$, vs 0 day in same group.

2.4 各组大鼠肾上腺蛋白质组 2-DE 图谱 3 次重复检测胶图,采用 Image Scanner 扫描仪扫描获取图像,通过 PDQuest 7.0 软件对胶图进行点检测,发现该 3 次总蛋白质分布模式非常相似,获得正常 SD 大鼠、SHR 及 PGQYF 治疗后大鼠肾上腺组织蛋白电泳图谱平均蛋白质点数依次为 760、732 和 753。经过背景消减后,分别将各组中的 1 块胶定为参考胶进行组内 3 块胶间的蛋白质点匹配,3 组平均匹配点数为 695、648、698,其匹配率分别为 91.4%、88.5%、92.7%。由此获得了重复性较好的正常 SD 大鼠、SHR 及 PGQYF 治疗后大鼠肾上腺组织蛋白的双向凝胶电泳图谱。图谱示以等电点 (isoelectric point, PI) 4~8 和分子量 (molecular weight, Mr) 20~75 kD 范围的蛋白质斑点分布最多。见图 1。

2.5 差异表达蛋白 应用双向电泳图谱专业分析软件 PDQuest 7.0 对各组图谱进行比较分析匹配,筛选出差异常表达的蛋白质(认为表达量相差 2 倍以

上且在 3 组匹配中均有相同变化的点为差异蛋白质点)。和正常对照组比较,模型组图谱中有 5 个蛋白质斑点(2、3、5、6、7 号点)表达上升 2 倍及以上,且同一点在 PGQYF 组中表达下降 2 倍及以上,大致处于与正常对照组同一水平或低于正常对照组;有 7 个蛋白质斑点(1、4、8、9、10、11、12 号点)表达下降 2 倍及以上,且同一点在 PGQYF 组中表达上升 2 倍及以上,大致处于与正常对照组同一水平或高于正常组。差异点广泛分布于 2-DE 图谱上(见图 1-A)。部分差异表达蛋白局部显示图见图 2。

2.6 质谱结果 我们对 12 个差异显示蛋白质斑点进行胶内酶切, MALDI-TOF-MS 质谱分析仪测定肽质量指纹谱,在 www.matrixscience.com 网站上利用 MASCOT 软件检索, SWISS-PROT 蛋白质数据库进行鉴定,共鉴定出 8 个蛋白点,其中 2 个蛋白点为同一蛋白。另外 4 个蛋白斑点由于没有得到令人满意的肽质量指纹图谱或搜索数据库时不能得到可信度较高的结果而未能鉴定。见图 3。

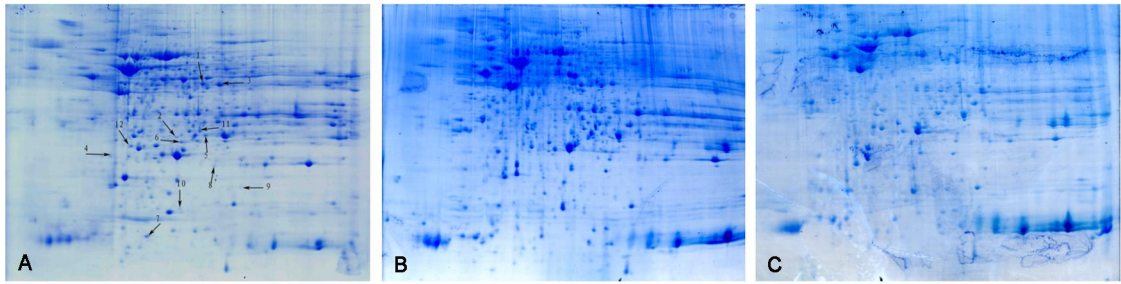


图 1 各组大鼠肾上腺蛋白质 2-DE 图谱(考马斯亮蓝染色, pH 3-10, NL, 24 cm IPG gel)

Figure 1 R-250 stained 2-DE image of adrenal proteins in rats (Coomassie brilliant blue-staining, pH 3-10, NL, 24 cm IPG gel)

A: Normal control group; B: Untreated group; C: PGQYF group.

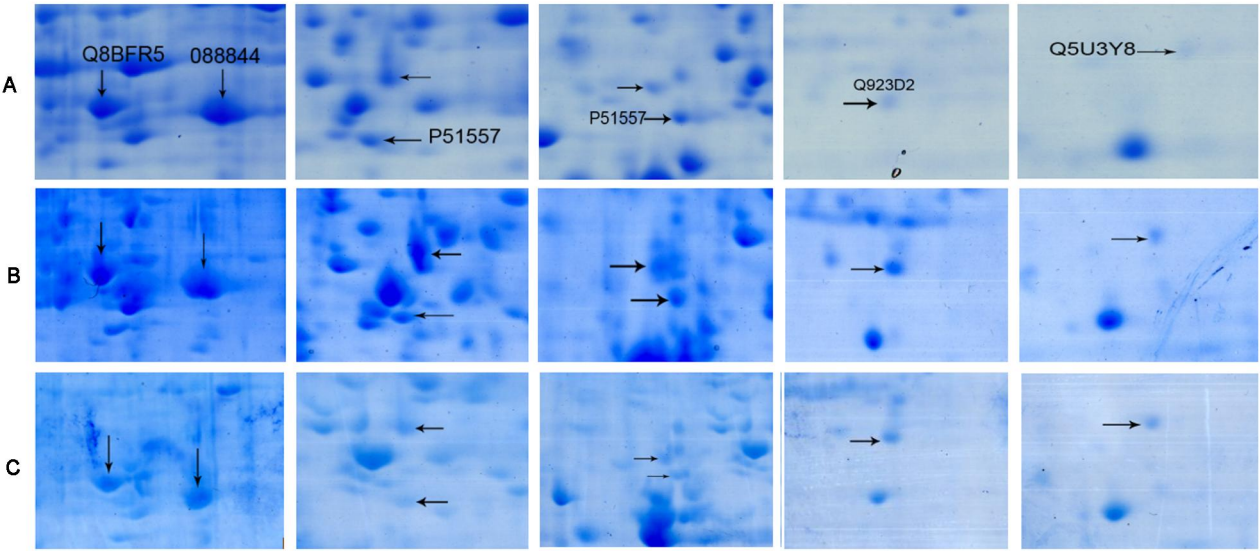


图 2 各组大鼠肾上腺差异表达蛋白局部显示图

Figure 2 Partial 2-DE images of differential expression of rat adrenal proteins in three groups

A: Normal control group; B: Untreated group; C: PGQYF group.

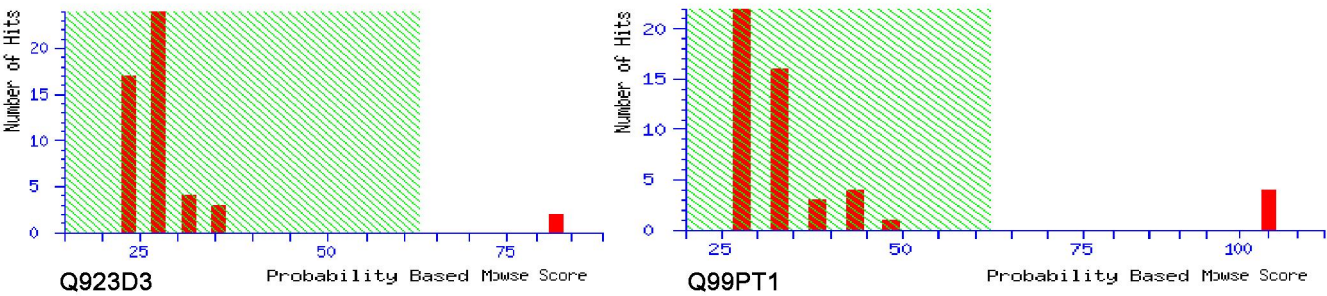


图 3 肾上腺 2-DE 图谱中差异蛋白点 Q923D2、Q99PT1 Mascot 搜索结果

Figure 3 Mascot search results of differentially expressed adrenal proteins (Q923D2, Q99PT1)

鉴定蛋白亚细胞定位包括线粒体、细胞质和细胞核等,涉及多种蛋白种类,如代谢酶类、信号蛋白、抗氧化蛋白和细胞骨架相关蛋白等。其中异柠檬酸脱氢酶(isocitric dehydrogenase, ICDH)、类固醇合成急性调节蛋白(steroidogenic acute regulatory protein, StAR)在模型组表达较正常对照组上调,在 PGQYF 组重新下调至前水平;铁蛋白轻链(ferritin

light chain, FLC)、鸟苷酸解离抑制因子 1(Rho guanine nucleotide dissociation inhibitor 1, Rho GDI1)、黄素还原酶(flavin reductase, FR)、Basic 转录因子 3(Basic transcription factor 3, BTF3)、Tu 翻译延长因子(elongation factor Tu, EF-Tu)在模型组表达较正常组下调,在治疗组重新上调至前水平。见表 4。

表 4 PGQYF 治疗后差异表达蛋白

Table 4 Differentially expressed proteins after PGQYF treatment

Access number	Abbr. name	Gene name	Protein name	Mr	PI	MALDI-TOF-MS		Peptide
						Matching	Total	Sequence coverage
Q8BFR5	Q497E7_MOUSE	Tufm	EF-Tu, mitochondrial	49 876	7.23	13	20	40
088844	AAD02919	Idh1	ICDH [NADP], cytoplasmic	47 030	6.48	15	59	41
Q99PT1	Q8BPIO_MOUSE	Arhgdia	Rho GDI1	22 991	5.20	9	16	56
P51557	A55455	StAR	StAR, mitochondrial	31 891	8.56	13	35	40
Q923D2	BLVRB_MOUSE	Blvrb	FR	22 166	6.47	4	4	31
Q5U3Y8	Q5U3Y8_RAT	Btf3	BTF3	17 688	6.85	9	24	50
P49945	FRIL2_MOUSE	Ftl2	FLC2	20 756	6.37	5	7	50

3 讨 论

高血压病作为引起心血管事件的重要危险因素之一,给社会和家庭带来了沉重的经济负担,开展高血压病防治研究已成为医学界和社会普遍关注的课题。目前没有一种特效抗高血压的西药可以治愈高血压或完全逆转和预防与高血压相关靶器官的病理改变^[11]。中医药在降压方面可能不如西药直接,但治疗高血压病时强调整体调节,不仅注重降低血压,更注重兼顾高血压病的其他病理环节,尤其在改善症状及保护靶器官方面有其独特的优势,能有效地弥补西药在治疗方面的不足。

肝阳上亢证是高血压病中最多见的证型。中医学认为,肝阳上亢证主要病机是由于肝肾阴虚、阴不制阳而致肝阳偏亢,因而传统治疗着眼于平肝潜阳。平肝潜阳方由天麻钩藤饮化裁而来,由天麻、钩藤、石决明、牡蛎和牛膝等药组成,通过平肝潜阳治疗高血压肝阳上亢证。天麻、石决明为治肝阳上亢眩晕之要药,平肝潜阳,为君药;钩藤为臣,清肝热、平肝熄风,使肝经之热不致偏亢,加强君药之功效;牡蛎咸寒质重,重镇安神;川牛膝引头部血液下行,减轻脑充血。

实验中发现,模型组和 PGQYF 组大鼠在附子汤灌胃后,提尾时尖叫、惊跳,甚至咬人或同笼大鼠频繁打斗,大部分结合膜充血。PGQYF 治疗后,其易激惹程度及结合膜充血均较前好转,收缩压下降,与模型组比较,差异有统计学意义。从实验结果可以看出,成功复制了高血压病肝阳上亢证大鼠模型,平肝潜阳方有效降低了大鼠收缩压,改善了症状,再次在动物实验方面证实了平肝潜阳法治疗高血压病肝阳上亢证的可行性。

临床研究发现高血压肝阳上亢证的病理生理学基础为外周交感-肾上腺髓质功能亢进,主要病理环节为外周血血浆去甲肾上腺素和肾上腺素含量的增高^[12],已有研究证实肾上腺素能受体与高血压病的发生关系非常紧密^[13]。虽然近年来一些学者已从

整体器官、细胞分子等层次揭示了高血压肝阳上亢证的发生机制及中医药治疗的疗效机制^[14, 15],但研究主要集中在平肝潜阳药物对临床疾病的疗效观察和生化水平检测,研究深度还不够。从蛋白质水平探讨中医经典治法治疗高血压肝阳上亢证的研究很少有报道。

蛋白质是生物细胞赖以生存的各种代谢和调控途径的主要执行者,它不仅是多种致病因子对机体作用最重要的靶分子,而且也成为大多数疾病干预措施的靶目标^[16]。人体生命活动最终体现为蛋白质的活动,人类蛋白质学可以直接揭示生命活动的本质和规律,发现人类重大疾病与病原体致病的物质基础及其发展的病理机制。证是个体对于外界因素的一种反应性的宏观表现,是机体的一种特定的功能状态,有其自身的物质基础,证本质研究是中医学理论研究的基石和核心。证的特征与动态变化着的蛋白质组有惊人的相似之处,且证候的形成及不同治疗方的治疗效果必然有其物质基础,而这种物质基础就有可能反映在蛋白质水平。并且蛋白质组学研究方法的整体性和系统性与中医基础理论的整体性和系统性相似,因而具有高效解码证候生物学基础的潜力,将是揭示证实质的最有效手段。比较大鼠灌服复方中药前后蛋白质组学的变化有助于揭示肝阳上亢证发生和发展的分子调控规律,进而阐明复方药的作用靶点、作用环节和作用过程。

实验中应用差异蛋白质组技术,观察 PGQYF 治疗高血压肝阳上亢证大鼠后,其肾上腺蛋白质表达谱的变化,在 www.matrixscience.com 网站上利用 MASCOT 软件检索 Swissprot 蛋白质数据库进行鉴定,共鉴定出 8 个蛋白点,鉴定蛋白的序列覆盖率为 31%~56%,和文献报道的基本一致^[17]。

EF-Tu 是真核细胞中一种含量丰富的蛋白质,是与转录和翻译相关的蛋白,往往以四聚体的形式存在,通过与核糖体的相互作用,参与蛋白质合成的 mRNA 翻译过程中氨基-酰基-tRNA 复合体与小亚基核糖体上接受位点的结合及细胞骨架的重排、蛋

白的降解等^[18]。在线粒体蛋白质翻译过程中,EF-Tu 协助完成氨基酸的识别与肽链延伸^[19]。另外,Slobin^[20]的研究显示,EF 各种功能的发挥可能与其在不同状态下蛋白表达量的变化有关(其基因具有显著的多拷贝特性)。实验中发现,模型组 EF-Tu 较正常组下调,治疗后重新回到与正常组同水平。由此推测,高血压肝阳上亢证大鼠在平肝潜阳法治疗后,通过差异蛋白表达量的显著加大,增强和促进了某些其他相关蛋白的翻译,从而启动或参与了其治疗高血压肝阳上亢证的作用。还有研究证实 EF-Tu 的表达调控与能量代谢水平有着密切的联系^[21]。在本研究中,推测其表达的差异反映了各组间能量代谢的不同。

ICDH 存在于线粒体上,其功能是催化异柠檬酸氧化为 α -酮戊二酸而参与三羧酸循环,是调节三羧酸循环最主要的酶。高血压肝阳上亢时患者机体能量代谢障碍,三羧酸循环减弱,ICDH 上调则可促进三羧酸循环。在本研究中其含量在模型组增加,可能是代偿反应;平肝潜阳法治疗后,ICDH 重新降至正常水平。

Rho 为小 G 蛋白家族的一员,以活性型和非活性型 2 种形式存在。活性型 Rho-GTP 与效应蛋白结合调节一系列的生物学过程^[22],参与细胞的生长、分化、癌变、浸润和转移每一个步骤。GDI 为其调节因子之一,与 Rho-GDP 结合,存在于胞浆中,抑制 Rho-GDP 转换成 Rho-GTP^[23]。在本研究中,模型组 GDI 表达下调,对 Rho 的抑制减弱,Rho 的激活抑制了神经元的生长,与以往研究高血压肝阳上亢证患者神经传导减弱,功能障碍相符^[24]。一系列的证据表明 Rho 的调节基因,如 GDI 对于细胞的生物学行为发挥更大的作用。

铁蛋白是由重链和轻链组成。重链具有铁氧化酶活性,而轻链在与铁结合及稳定蛋白方面起重要作用^[25]。铁蛋白在体内与游离铁结合,具有储存铁和减少铁离子细胞毒性的作用,并且具有参与抗氧化反应和保护细胞的生物学作用^[26, 27]。有研究发现肝脏中铁蛋白表达水平的升高是机体抵抗氧化应激损伤的机制之一^[28]。Ishizaka 等^[29]报导血管紧张素 II 增多导致铁蛋白增多及铁沉积于大动脉,铁介导活性氧族的增殖。同时研究显示血管紧张素 II 增多导致机体肝内铁内环境的紊乱^[30]。已知氧化应激及血管紧张素 II 与高血压病的发生密切相关。实验发现模型组大鼠肾上腺铁蛋白轻链较正常组明显下调,经治疗后又重新上调至高水平,推测平肝潜阳法可以作用于铁蛋白轻链,使其水平提高,从而发挥其抗氧化应激损伤的作用。

StAR 主要存在于类固醇合成细胞中,对类固醇激素的合成起重要作用。目前认为 StAR 在胆固醇转移中起限速作用,可作用于线粒体外膜,介导并促进类固醇的底物胆固醇经线粒体外膜转运至内膜,转运至内膜的胆固醇继续在 P450 scc 作用下发生羟化和侧链裂解生成孕烯醇酮^[31],然后在有关的类固醇激素合成酶作用下逐渐转变为睾酮及其他类固醇激素。Krug 等^[32]发现可能由于细胞外信号调节激酶依赖性 StAR 的增量调节,肥胖导致人类肾上腺皮质细胞醛固酮的过度分泌及对血管紧张素 II 的敏感性增强。而已知肥胖与高血压病关系密切,由此推测 StAR 在肾上腺的表达差异可能与高血压的发生密切相关。

FR 属于自由基/抗氧化剂类蛋白,Dusting 等^[33]在发生血管重塑的高血压病病人的血管细胞中发现了一种重要的含黄素催化亚单位,氮氧化物 1(nitrogen oxides 1, Nox1)和 Nox4。其在治疗组有明显提高,有可能与其发挥抗氧化功能相关。

总之,我们在蛋白质水平上进行动物实验研究,严格造模,提取蛋白,进行双向电泳和质谱分析,所获得的结果具有一定的科学性及可信度。但是由于在一个电泳条带中含有不止一种蛋白质,因此所鉴定出来的蛋白质虽然在强度发生了改变的条带中,但并不能肯定这些蛋白的强度也发生了相应的改变,因此真正肯定的结果还需要后续的免疫学及 mRNA 水平的验证。另外,本实验只是从动物实验方面找到了可能与高血压肝阳上亢证相关的蛋白,要确认这些蛋白质是否为与其相关的蛋白质,还需要深入研究其结构、功能及在人体高血压肝阳上亢证及平肝潜阳法治疗前后过程中所起的作用。进一步优化反应条件,深入研究分析这些蛋白质,对差异结果进行再验证和下游功能分析,从临床方面着手研究等深入探讨至关重要,将有助于进一步了解发生机制,寻找更好的预测指标和干预靶点。

REFERENCES

- 1 Liu ZR. Recent developments of epidemiologic survey about hypertension in China. *Yi Xue Zong Shu*. 2004; 10(2): 88-89. Chinese.
刘忠仁. 我国各地高血压流行病学调查近况. *医学综述*. 2004; 10(2): 88-89.
- 2 Wang W, Zhao D. Epidemiology of hypertension in aged people in China. *Zhonghua Lao Nian Yi Xue Za Zhi*. 2005; 24(4): 246-247. Chinese.
王薇, 赵冬. 中国老年人高血压的流行病学. *中华老年医学杂志*. 2005; 24(4): 246-247.
- 3 Chen MJ. Study progress on the treatment of

- hypertensive disease with type of excessive rising of liver-YANG by TCM. *Zhong Yi Yao Dao Bao*. 2006; 12 (1): 80-82. Chinese with abstract in English.
- 陈明嘉. 高血压病(肝阳上亢型)的中医治疗及研究近况. *中医药导报*. 2006; 12(1): 80-82.
- 4 Yan DH, Jin YQ, Xiao C, *et al*. Duplicate model of excessive rising of liver-YANG syndrome in spontaneous hypertensive rat. *Hunan Zhong Yi Xue Yuan Xue Bao*. 1999; 19 (4): 35-38. Chinese.
鄢东红, 金益强, 肖纯, 等. 自发性高血压大鼠肝阳上亢证模型的复制. *湖南中医学院学报*. 1999; 19(4): 35-38.
 - 5 Yang LH, Zou SZ, Li YX. New equipments and methods in measuring systolic blood pressure and diastolic blood pressure of rats without wounds. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*. 1991; 7 (1): 62-64. Chinese.
杨绿化, 邹沙舟, 李云霞. 无创测量大鼠收缩压和舒张压的新仪器和新方法. *中国应用生理学杂志*. 1991; 7 (1): 62-64.
 - 6 Görg A, Boguth G, Obermaier C, *et al*. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-Dalt): the state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems. *Electrophoresis*. 1995; 16(7): 1079-1086.
 - 7 Guo YJ. Experiment technique in protein electrophoresis. Beijing: Science Press. 1999: 140-141. Chinese.
郭尧君. 蛋白质电泳实验技术. 北京: 科学出版社. 1999: 140-141.
 - 8 Krapfenbauer K, Fountoulakis M, Lubec G. A rat brain protein expression map including cytosolic and enriched mitochondrial and microsomal fractions. *Electrophoresis*. 2003; 24(11): 1847-1870.
 - 9 Paulson L, Martin P, Persson A, *et al*. Comparative genome- and proteome analysis of cerebral cortex from MK-801-treated rats. *J Neurosci Res*. 2003; 71 (4): 526-533.
 - 10 Fernandez J, Gharahdaghi F, Mische SM. Routine identification of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gels or polyvinyl difluoride membranes using matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). *Electrophoresis*. 1998; 19(6): 1036-1045.
 - 11 Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, *et al*. The seventh report of the Joint National Committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure: the JNC 7 report. *JAMA*. 2003; 289 (19): 2560-2572.
 - 12 Yang XC. Objective research on type of hyperactivity of liver-yang syndrome in hypertension. *Beijing Zhong Yi*. 2005; 24(1): 58-60. Chinese.
杨兴才. 高血压病肝阳上亢证型的客观化研究. *北京中医*. 2005; 24(1): 58-60.
 - 13 Wang HM, Li NF. Advance in the relationship between $\beta 3$ adrenergic receptor gene polymorphism and insulin resistance and essential hypertension. *Guo Ji Yi Chuan Xue Za Zhi*. 2007; 30(2): 136, 140-142. Chinese with abstract in English.
王红梅, 李南方. $\beta 3$ 肾上腺素能受体基因多态性与胰岛素抵抗、高血压病关系的研究进展. *国际遗传学杂志*. 2007; 30(2): 136, 140-142.
 - 14 Chen HD, Fang Z, Wang CM. Research progress on hyperactivity of the liver-yang syndrome in hypertensive disease. *Zhongguo Zhong Yi Yao Xin Xi Za Zhi*. 2004; 11 (2): 178-180. Chinese.
陈华德, 方针, 王翀敏. 高血压病肝阳上亢证的研究进展. *中国中医药信息杂志*. 2004; 11 (2): 178-180.
 - 15 Hu XQ, Chen LG. Progress of mechanism of action of traditional Chinese medicine for treating hypertension. *Zhonghua Zhong Yi Yao Za Zhi*. 2006; 21(10): 612-613. Chinese.
胡小勤, 陈利国. 中医药治疗高血压病作用机制的研究进展. *中华中医药杂志*. 2006; 21(10): 612-613.
 - 16 Corbett JM, Dunn MJ, Posch A, *et al*. Positional reproducibility of protein spots in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis using immobilised pH gradient isoelectric focusing in the first dimension: an interlaboratory comparison. *Electrophoresis*. 1994; 15(8-9): 1205-1211.
 - 17 Bienvenut WV, Déon C, Pasquarello C, *et al*. Matrix-assisted laser desorption/ionization-tandem mass spectrometry with high resolution and sensitivity for identification and characterization of proteins. *Proteomics*. 2002; 2(7): 868-876.
 - 18 Vinkenoog R, Speranca MA, van Breemen O, *et al*. Malaria parasites contain two identical copies of an elongation factor 1 alpha gene. *Mol Biochem Parasitol*. 1998; 94(1): 1-12.
 - 19 Worlax VL, Bullard JM, Ma L, *et al*. Mechanistic studies of the translational elongation cycle in mammalian mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 1997; 1352(1): 91-101.
 - 20 Slobin LI. The role of eucaryotic factor Tu in protein synthesis. The measurement of the elongation factor Tu content of rabbit reticulocytes and other mammalian cells by a sensitive radioimmunoassay. *Eur J Biochem*. 1980; 110(2): 555-563.

- 21 Xu Q, Liu XL, Zhao J, *et al.* Differential and tissue specific expression of mitochondrial elongation factor Tu and Ts during development. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao.* 1999; 31(1): 37-40. Chinese with abstract in English.
许青, 刘旭磊, 赵靖, 等. EF-Tu_{mt} 和 EF-Ts_{mt} 在不同发育阶段小鼠各组织中的表达分析. *生物化学与生物物理学报.* 1999; 31(1): 37-40.
- 22 Sahai E, Marshall CJ. RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2(2): 133-142.
- 23 Gorvel JP, Chang TC, Boretto J, *et al.* Differential properties of D4/LyGDI versus RhoGDI: phosphorylation and rho GTPase selectivity. *FEBS Lett.* 1998; 422(2): 269-273.
- 24 Bi HM, Li D, Dan HQ. Effects of hypertension on complications of capillary vessels and nerves in patients with type 2 diabetes mellitus. *Zhongguo Zong He Lin Chuang.* 2000; 16(12): 899-900. Chinese.
毕会民, 李栋, 但汉卿. 高血压对 II 型糖尿病微血管和神经并发症的影响. *中国综合临床.* 2000; 16(12): 899-900.
- 25 Andersen O, Pantopoulos K, Kao HT, *et al.* Regulation of iron metabolism in the sanguivore lamprey *Lampetra fluviatilis*--molecular cloning of two ferritin subunits and two iron-regulatory proteins (IRP) reveals evolutionary conservation of the iron-regulatory element (IRE)/IRP regulatory system. *Eur J Biochem.* 1998; 254(2): 223-229.
- 26 Cozzi A, Santambrogio P, Levi S, *et al.* Iron detoxifying activity of ferritin. Effects of H and L human apoferritins on lipid peroxidation *in vitro*. *FEBS Lett.* 1990; 277(1-2): 119-122.
- 27 Balla G, Jacob HS, Balla J, *et al.* Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem.* 1992; 267(25): 18148-18153.
- 28 Erario MA, Gonzales S, Noriega GO, *et al.* Bilirubin and ferritin as protectors against hemin-induced oxidative stress in rat liver. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2002; 48(8): 877-884.
- 29 Ishizaka N, Saito K, Mori I, *et al.* Iron chelation suppresses ferritin upregulation and attenuates vascular dysfunction in the aorta of angiotensin II-infused rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25(11): 2282-2288.
- 30 Ishizaka N, Saito K, Noiri E, *et al.* Administration of ANG II induces iron deposition and upregulation of TGF-beta1 mRNA in the rat liver. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005; 288(4): R1063-R1070.
- 31 Artemenko IP, Zhao D, Hales DB, *et al.* Mitochondrial processing of newly synthesized steroidogenic acute regulatory protein (StAR), but not total StAR, mediates cholesterol transfer to cytochrome P450 side chain cleavage enzyme in adrenal cells. *J Biol Chem.* 2001; 276(49): 46583-46596.
- 32 Krug AW, Vleugels K, Schinner S, *et al.* Human adipocytes induce an ERK1/2 MAP kinases-mediated upregulation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and an angiotensin II-sensitization in human adrenocortical cells. *Int J Obes (Lond).* 2007; 31(10): 1605-1616.
- 33 Dusting GJ, Selemidis S, Jiang F. Mechanisms for suppressing NADPH oxidase in the vascular wall. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005; 100(Suppl 1): 97-103.