

蛋白质组学在中医药研究中的运用*

★ 贾钰华 周玉平 张云仙 (南方医科大学中医药学院 广州 510515)

摘要:蛋白质组学已有十余年的历史,它是以整体和全局为出发点的生物前沿学科,蛋白质组学与中医药学的整体观特征有着天然的亲和性,中医药工作者借鉴这一新技术在中医证本质、中药作用机理研究等方面做了初步的探索,取得了不少成果,本文将对蛋白质组学在中医药研究中的进展作一概述,并提出存在的问题及今后研究趋势的展望。

关键词:蛋白质组学;中医证候;中药;方剂

中图分类号:Q 51 **文献标识码:**A

“蛋白质组”的概念最早由澳大利亚 Macquarie 大学的 Wilkims 和 Williams 于 1994 年提出,蛋白质组学是继基因组学后提出的新学科,它以组织或细胞的全部蛋白质为研究对象,以蛋白质表达整体水平的研究为特点,为生命科学的研究提供了新的视角。蛋白质组学的理念和中医认识疾病的整体观有一定的趋同性,利用蛋白质组学的理论与方法探索中医学整体观念的基本内涵、证候本质及中药药效的机理都可能成为中医药理论研究的突破口。本世纪初,中医药工作者开始利用这一生物前沿技术在中医药现代化研究中做了初步的探索,取得了不少成果,本文对此概述如下:

1 蛋白质组学与中医证候研究

证候是中医辨证论治的基础和核心,对证候本质的研究是中医药现代化研究的关键问题之一。证候是在致病因素作用下,机体内外环境各系统之间相互关系发生紊乱所产生的综合反应,是反映疾病处于某一阶段病因、病性、病位、病势等病理要素的综合性诊断概念。证候既然是有规律的病理表现,就必然有相应其物质基础支配机制,而这种物质基础就有可能反映在蛋白质组学水平上,有学者提出了“证候蛋白质组”的概念^[1],并有部分学者对证候的蛋白质组基础开展了初步的实验研究。

梁恒等^[2]以 2-DE 技术分离模型小鼠和正常小鼠肾脏蛋白,运用 Bio-RodPDQuest 软件初步比较了肾阳虚小鼠模型与正常小鼠以及给予补阳中药小鼠三者肾脏蛋白质组学差异,找到了大量有代表意义的差异蛋白质点。该课题组还进一步提出了运用蛋白质组学方法研究肾阳虚同病异证的思路与方法,提出采用双向电泳(2-DE)+质谱(MS)+数据库的蛋白质组解决方案及药理学实验方法,探求肾阳虚

证的蛋白质组学本质^[3]。吴红金等^[4]应用蛋白质组技术观察了冠心病血瘀证病人与正常人血浆中的蛋白质变化,发现冠心病血瘀证病人血浆与正常人相比有 3 个蛋白质下调和 6 个蛋白质上调,经质谱鉴定,其中表达升高的蛋白质有免疫球蛋白、纤维蛋白原、粒酶,表达降低的蛋白质有 CD44SP 等,并提出纤维蛋白原、粒酶有望作为诊断冠心病血瘀证的标志物。张炯等^[5]对高血压肝阳上亢大鼠模型脾的单个核细胞的蛋白质组进行了分析,结果在高血压肝阳上亢大鼠中检测到 497 个点,其中为其独自所有的点有 387 个,认为这 387 个点可能与高血压肝阳上亢证候相关。曾星等^[6]进一步对原发性高血压肝阳上亢患者外周血单个核细胞的蛋白质组进行了双向电泳分析,研究了 10 例原发性高血压肝阳上亢患者及 10 例正常对照者外周血单个核细胞的总蛋白,结果高血压肝阳上亢病例检测到 917 个点,其中为其独自所有的点有 515 个,认为这 515 个点可能与高血压肝阳上亢证候相关。谢文光等^[7]对脂多糖致热毒血瘀证大鼠的血清进行了 2-DE 分离分析,研究发现有 13 个蛋白点出现非常明显的含量变化,与正常组比较热毒血瘀证组有 2 个蛋白的点容量值显著降低,11 个蛋白的点容量值显著增高。

2 蛋白质组学与单味中药研究

随着人类社会对重归自然的追求,在药物研究领域人们把关注的焦点放在了天然产物的开发上,因此,中药现代化的研究面临着巨大的机遇和挑战。在后基因组时代,蛋白质组技术蓬勃兴起,迅速渗透到生命医药的各个研究领域,中药研究者们借助这一研究方法开始对中药及其单体的作用机理进行了探讨。

姜楠等^[8]研究了桂枝单体桂皮醛对酵母致发

* 基金资助:国家自然科学基金(NO:30572435)

热大鼠下丘脑蛋白质组的影响,给予发热大鼠桂皮醛口服后有解热作用,双向电泳图像分析显示,有 15 个蛋白质点在发热状态比正常下调大于 30%,给予桂皮醛后,有 4 个蛋白质点的相对含量上调趋于正常,另外,有 15 个蛋白质点在发热状态比正常上调大于 30%,在给桂皮醛后,有 2 个蛋白质点的相对含量下调趋于正常,由此认为,桂皮醛对酵母致热大鼠的解热作用与这些差异表达的蛋白质点有关。

谢文光等^[9]研究了玄参治疗大鼠内毒素血症的血清蛋白质组变化,采用脂多糖静脉注射制备动物模型,用双向电泳分析显示,LPS 致内毒素血症大鼠的血清在 2-DE 胶上 16 个蛋白出现非常明显的含量变化,其中有 2 个蛋白点的点容量值显著降低,14 个蛋白点的点容量值显著增高,玄参干预后,脂多糖引起增高的 14 个蛋白点中有 10 个点容量值显著降低,并有 6 个蛋白点已被明显调节到正常状态,这预示通过调节这 10 个蛋白点,可能是玄参治疗内毒素血症的疗效的分子基础。该课题组用同样的方法观察了赤芍治疗大鼠热毒血瘀证的血清蛋白质组变化的影响,发现赤芍治疗热毒血瘀证的分子基础可能与调节 6 个蛋白点的表达有关^[7]。

马兵等^[10]从蛋白质组学的角度研究了泽泻对 Lewis 肺癌自发性转移的影响及其可能机制,2-DE 电泳分析给药后小鼠血清蛋白质组变化,结果泽泻 10、20 g/(kg·d)连续给药 20 天均可使肺中的转移灶数明显减少,泽泻可使荷瘤小鼠的血清蛋白成分发生显著变化,模型组检测到(269±12)个蛋白点,治疗组检测到(295±8)个蛋白点,选取治疗组胶作为参考胶进行匹配,匹配(109±11)个蛋白点,提示药物治疗前后血清蛋白质组发生了显著变化,这可能是泽泻显著抑制 Lewis 肺癌的自发性转移的机制之一。

梁恒等^[11]通过双向电泳,研究了山茱萸醇提物(FCE)作用 IgA 肾病鼠的肾组织的差异蛋白质表达谱,发现表达量差异在 2 倍以上的有 263 个,另有 3 种蛋白在 IgA 肾病肾组织中未被表达和 1 种蛋白特异表达,比较 FCE 服用前后鼠 IgA 肾病肾组织的 2-DE 图谱发现,在原先差异表达的 263 个蛋白质中,用药后有 147 个显著地恢复正常表达,在 IgA 肾病 3 种未表达和 1 种特异表达的蛋白都恢复了正常表达,提示这些差异和特异表达的蛋白质可能是 IgA 肾病和 FCE 药物作用的靶蛋白,FCE 能有效地纠正小鼠 IgA 肾病可能是通过影响这些靶蛋白而起作用的。

3 蛋白质组学与中药复方研究

中药复方是在辨证审因决定治法以后,选择合适的药物酌定用量,按照组成原则妥善配伍而成的一组药物,其所含化学成分复杂,药理作用具有多靶点、多层次的特点,而且干扰因素众多,因此中药复方药理的研究难度颇大,近年来中药复方药理研究在方法学研究方面取得了一定成绩^[12],其中,蛋白质组学的技术的兴起为中药复方现代化研究带来了极好的契机,蛋白质组学将成为中药方剂复杂物质基础及作用机理研究的最佳平台及切入点,有许多学者对此展开了初步的研究。

周军等^[13]为进一步探讨桂枝汤的解热分子机制,应用蛋白质组技术,观察了桂枝汤对酵母致热大鼠下丘脑组织中蛋白质的表达的影响,发现模型和治疗大鼠下丘脑蛋白表达有明显差异,其中在给予桂枝汤后有 8 种蛋白表达增强,6 种蛋白表达降低,1 种蛋白等电点发生了改变,差异蛋白数量约占可分辨蛋白点的 2.3%。随后,该课题组进一步观察了桂枝汤有效部位 A 对酵母致热大鼠下丘脑组织蛋白质组影响,2-DE 图像分析示桂枝汤有效部位 A 组与模型组匹配率为 85%,多个蛋白质点表达量有不同程度的改变,这些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^[14]。吴伟康等^[15]探讨了四逆汤保护缺血心肌的相关蛋白改变谱,利用二维凝胶电泳分离左心室肌总蛋白,发现四逆汤可以影响大鼠缺血心肌的多个蛋白质点的表达,经质谱鉴定,这些差异表达的蛋白与心肌的能量代谢、信号转导、机能、心肌细胞修复和抗氧自由基损伤等有关。马增春等^[16]用蛋白质组技术考察四物汤对血虚证小鼠血清蛋白的影响,采用 ⁶⁰Co γ 射线全身照射小鼠造成血虚证模型,结果发现四物汤可使血虚证小鼠血清中 12 个下调的蛋白点和 4 个上调的蛋白点有所恢复,进一步质谱鉴定提示,其中 4 个上调的蛋白质可能是 DNA 依赖蛋白激酶、肌细胞增强蛋白、马达蛋白、肌动蛋白结合蛋白。该课题组还用类似的方法观察了四物汤对血虚证小鼠骨髓蛋白质表达的影响,四物汤可以逆转放射线致血虚证小鼠骨髓 10 个上调和 5 个下调的蛋白质^[17]。王东生等^[18]从蛋白质组学角度探讨了茵陈五苓散对动脉粥样硬化(AS)大鼠作用的分子机制,双向电泳图像分析显示,茵陈五苓散组的平均蛋白质数为 $1\,077 \pm 68$,模型组的平均蛋白质数为 $1\,106 \pm 84$,差异蛋白质有 556 个,其中有 196 个表达增强,有 360 个蛋白质表达下降,从而认为茵陈五苓散的抗 AS 作用与这些差异表达蛋白质有关。

唐发清等^[19]利用蛋白质组技术研究了益气解

毒颗粒(组成为黄连、天花粉、臭牡丹等)对鼻咽癌细胞杀伤作用的分子机制,发现益气解毒颗粒药物处理组图像的平均蛋白质数为 $1\,120 \pm 89$,而未处理组的平均蛋白质数为 $1\,281 \pm 102$,差异蛋白质有 673 个,其中有 218 个表达增强,有 455 个蛋白质表达下降,认为益气解毒颗粒对鼻咽癌细胞的杀伤作用与这些差异表达的蛋白质有关。蒋红梅等^[20]用双向电泳技术探讨了益生注射液(有效成分提取自夏至草、红陈艾等中药)抗移植植物缺血再灌注损伤的分子机制,利用血管内皮细胞缺氧损伤模型模拟移植器官的缺血再灌注损伤过程,结果发现缺血再灌注损伤可以导致内皮细胞大量蛋白质含量发生变化,但只有 8 种蛋白质用药前后含量发生明显改变(其中 6 种蛋白质在细胞受损后含量下降,益生药物干预后上调,另 2 种受损后含量增高,药物作用后下调),益生注射液可能将血管内皮细胞的这 8 种蛋白质作为靶标发挥抗缺血再灌注损伤作用。刘莺等^[21]利用蛋白质组技术寻找与扶正化疗方治疗 CCl₄ 致肝纤维化模型相关的蛋白质分子,采用蛋白质分步抽提方法,提取肝组织蛋白质,分别进行 2-D 分离,分析各组银染凝胶图谱发现,可辨识的蛋白质斑点达 1 000~1 400 个左右,特异表达蛋白质分子为 100 至 300 多个。

4 存在的问题及展望

从以上我们可以看到,不少中医药工作者在蛋白质组领域进行了探索,但目前还处于刚刚起步的阶段,要取得突破性的进展还有很长的路要走。笔者认为目前还存在着如下问题:一是主要停留在蛋白质组表达模式的研究上,而对靶蛋白具有的生物学意义及靶蛋白相互间的联系和作用研究较少。二是目前的研究偏重在中药作用机制的研究,而中医基础理论的几个关键问题如证本质的研究、脏象理论等研究较少。三是虽然证本质的研究有所涉及,但缺少异病同证和同病异证的研究,而这两方面又恰恰更能揭示中医证候的本质。四是蛋白质组技术本身尚存在其明显的不足,主要表现在对整体蛋白质的辨别分离能力有待提高,对疏水性强、相对分子质量较小和较大,酸碱性强度的蛋白质及其他具有重要生物学意义的痕量蛋白分离较困难。虽然如此,我们应该看到,蛋白质组学迅速发展,已成为后基因组时代最主要、最重要的研究体系之一,由于其本身的特点和优势决定了蛋白质组在中医药领域具有非常光明的前景,它必将是未来研究的重点和热点,我们中医药工作者要抓住这一机遇,在中医药现

代化研究中有所作为。

参考文献

- [1] 金光亮. 证候基因组学和证候蛋白质组学浅论[J]. 中国医药学报, 2003, 18(6): 332~335
- [2] 梁恒, 邢建宇, 刘希成, 等. 小鼠肾脏组织的双向电泳[J]. 西安交通大学学报, 2004, 38(2): 212
- [3] 黄黎明, 梁恒. 运用蛋白质组学方法研究肾阳虚病同证异的思路与方法[J]. 上海中医药杂志, 2005, 39(5): 44~46
- [4] 吴红金, 马增春, 高月, 等. 蛋白质组学技术对冠心病血瘀证相关蛋白的研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2005, 3(3): 189~191
- [5] 张娴, 李伟, 曾星, 等. 高血压肝阳上亢大鼠模型单个核细胞蛋白质组的二维电泳分析[J]. 中华中西医杂志, 2003, 4(13): 1 929~1 931
- [6] 曾星, 张娴, 黄羽, 等. 原发性高血压肝阳上亢患者外周血单个核细胞蛋白质组的双向电泳分析[J]. 中华实用中西医杂志, 2004, 17(6): 783~784
- [7] 谢文光, 马晓昌, 邵宁生, 等. 赤芍治疗热毒血瘀证的血清蛋白质组变化的初步研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(6): 520~524
- [8] 姜楠, 霍海如, 李兰芳, 等. 桂皮醛对发热大鼠下丘脑蛋白质组双向凝胶电泳分析[J]. 中药药理与临床, 2003, 19(6): 11~13
- [9] 谢文光, 邵宁生, 马晓昌, 等. 玄参治疗大鼠内毒素血症的血清蛋白质组变化的初步研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(9): 877~882
- [10] 马兵, 项阳, 李涛, 等. 泽泻对 Lewis 肺癌自发性转移的抑制作用及其机制研究[J]. 中草药, 2003, 34(8): 743~746
- [11] 梁恒, 邢建宇, 刘希成, 等. 山茱萸作用鼠 IgA 肾病的肾组织差异蛋白质谱[J]. 西安交通大学学报, 2005, 39(6): 650~655
- [12] 路晓钦, 高月. 中药复方现代化药理研究方法进展[J]. 中药新药与临床药理, 2002, 13(1): 59~61
- [13] 周军, 李沧海, 霍海如, 等. 桂枝汤对发热大鼠下丘脑蛋白质组影响初探[J]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9(1): 31~34
- [14] 姜楠, 霍海如, 李兰芳, 等. 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[J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10(3): 14~17
- [15] 吴伟康, 李劲平, 罗汉川, 等. 四逆汤抗心肌缺血作用的相关蛋白谱研究[J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(3): 506~510
- [16] 马增春, 高月, 谭洪玲, 等. 四物汤对辐射致血虚证小鼠血清蛋白质表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(11): 1 050~1 053
- [17] 郭平, 马增春, 李鹰飞, 等. 四物汤对放射线致血虚证小鼠骨髓蛋白质表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(9): 893~896
- [18] 王东生, 陈方平, 袁肇凯, 等. 茵陈五苓散对动脉粥样硬化大鼠蛋白质组学的影响[J]. 浙江中医学院学报, 2005, 29(1): 41~44
- [19] 唐发清, 田道法, 龚志军, 等. 益气解毒颗粒干预鼻咽癌细胞 HNE1 蛋白质表达的研究[J]. 中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志, 2004, 12(3): 120~123
- [20] 蒋红梅, 卢晓风, 李幼平, 等. 用双向电泳技术探讨益生注射液抗缺血再灌注损伤的分子机制[J]. 中国医药学报, 2003, 09: 15; 18(9): 524~526
- [21] 刘莺, 刘平, 徐列明. CCl₄ 大鼠肝纤维化形成与消减过程中肝组织蛋白质组[J]. 中西医结合肝病杂志, 2005, 15(3): 146~148

(收稿日期: 2006-05-15)