文章编号:1000-5404(2008)06-0477-04

论著

当归芍药散对快速老化模型小鼠海马蛋白表达的影响

耿 森,蒋 宁,周文霞,张永祥 (军事医学科学院毒物药物研究所中药和神经免疫药理研究室,北京 100850)

摘 要:目的 研究当归芍药散(powder of Chinese Angelica and Peony, DSS)对快速老化模型小鼠(senescence-accelerated mouse, SAM)海马蛋白表达的影响。**方法** 选择12月龄SAM的快速老化亚系SAMP8和抗快速老化亚系SAMR1作为研究对象,分为SAMR1组、SAMP8组和SAMP8+DSS组(3.2 g/kg),每组10只,连续给药30 d。应用双向凝胶电泳结合质谱鉴定,观察DSS对SAMP8海马蛋白表达的影响。**结果** 与SAMR1组比较,SAMP8组海马中有9个蛋白表达下调,13个蛋白表达上调;SAMP8+DSS组与SAMP8组比较,海马中有14个蛋白表达下调,21个蛋白表达上调。经肽质量指纹谱分析及蛋白数据库检索,表达有明显变化的蛋白根据功能可分为5类:线粒体相关蛋白、能量代谢相关蛋白、突触形成相关蛋白、细胞骨架蛋白、其他蛋白。**结论** SAMP8和SAMR1海马蛋白表达存在明显差异,DSS可影响快速老化模型小鼠海马蛋白的表达,其作用是多途径多靶点的。

关键词: 当归芍药散;快速老化模型小鼠;海马;蛋白质组学
中图法分类号: R285.5;R289;R322.81 **文献标识码:** A

Effect of powder of Chinese Angelica and Peony on expressions of hippocampal proteins in senescence accelerated mice

GENG Miao, JIANG Ning, ZHOU Wen-xia, ZHANG Yong-xiang (Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: Objective To study the effect of powder of Chinese Angelica and Peony (DSS) on hippocampus proteome of senescence accelerated mice (SAM). Methods Thirty female mice aged 12 months were used in our study, including 10 SAM-resistance/1 (SAMR1) and 20 SAM-prone/8 (SAMP8). The difference of hippocampus proteome among SAMP8, SAMR1, SAMP8 treated with DSS intragastrically at dose of 3.2 g/kg once a day for 30 d (SAMP8+DSS), was analyzed by two dimensional polyacryalmide gel electrophoresis (2DE). Results Compared with SAMR1, the expressions of 13 proteins in hippocampus of SAMP8 were up-regulated and that of 9 proteins were down-regulated significantly. Compared with SAMP8, the expressions of 21 proteins in hippocampus of SAMP8+DSS were up-regulated and that of 14 proteins were down-regulated significantly. Using MALDI-TOF-MS, the proteins with significant changes in expressions were identified by peptide fingerprinting map and the results were searched in MASCOT database, and sorted into 5 function groups including mitochondria-associated proteins, energy metabolism proteins, synaptic plasticity formation proteins, cytoskeletal proteins and others proteins. Conclusion The effects of DSS on hippocampus proteome of senescence accelerated mice were probably exerted *via* multi-target and multi-pathway mechanism.

Key words: powder of Chinese Angelica and Peony; senescence accelerated mouse; hippocampus; proteomics

当归芍药散(powder of Chinese Angelica and Peony, DSS)出自《金匮要略》,常用于妇科。20世纪80年代将其应用于阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)的治疗,对改善患者痴呆的周围症状有明显疗效。近年来国内外学者已经对DSS的作用机制开展了大量的研究,但仅局限于探讨DSS对单个或几个基因、蛋白的调节,难以全面、系统地反映其多种活性物质、多种途径的综合作用机制。蛋白质组学具有整体性、系统性的特点,与中药多组分、多靶点的作用特点相契合,为中药复方作用机制的研究提供了良好的平台。本研究采用蛋白质组学研究方法,运用双向电泳结合质谱鉴定的技术手段,通过分析DSS对快速老化模型小鼠

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(2004CB518907);国家科学自然基金(90709012,30772562)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" projects, 2004CB518907) and the National Natural Science Foundation of China (90709012, 30772562)
作者简介: 耿 森,女,山东省滨州市人,硕士,助理研究员,主要从事老年痴呆机制及药物干预方面的研究。电话:(010)66939654
通信作者: 周文霞,电话:(010)66931625,E-mail: zhouwx@nic.bmi.ac.cn
收稿日期: 2007-08-30;**修回日期:** 2007-12-28

海马蛋白表达的作用,拟从分子水平上探讨 DSS 防治 AD 或延缓脑老化的作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

IPG 缓冲液、丙烯酰铵、过硫酸胺、四甲基乙二胺、二硫苏糖醇、十二烷基硫酸钠(SDS)、甘氨酸等双向电泳试剂均购自 Amersham pharmacia Biotech 公司;考马斯亮蓝 R350 购自 Amresco 公司;其他试剂均为国产分析纯。IPGphor 等电聚焦仪、Multi Temp Ⅲ温控循环水浴、图像扫描仪及 Imagemaster2D planitum5.0 图像分析软件购自 Amersham pharmacia Biotech 公司;PROTEN II xi 垂直电泳仪购自 Bio-Rad 公司;REFLEX Ⅲ基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)购自 Bruker 公司。

1.2 实验动物及处理

SAM 快速老化亚系 SAMP8 和抗快速老化亚系 SAMR1 由日本京都大学引进,在本院动物实验室普通清洁环境下饲养繁殖,自由饮水及采食。本实验均选择 12 月龄雌性小鼠,其中 SAMR1 10 只,体质量(31.19 ± 9.93)g。SAMP8 20 只,分为 SAMP8 阴性对照组与给药组 SAMP8 + DSS 组(3.2 g/kg),每组各 10 只,体质量(25.32 ± 8.03)g。给药组每日灌胃给药 1 次,连续 30 d,其余给予等量蒸馏水。

1.3 实验方法

1.3.1 海马蛋白提取及定量 小鼠快速断头处死后迅速取出大脑,生理盐水洗去血渍,迅速剥离出海马,加入适量裂解液,采用超声破碎与液氮冻融相结合的方法提取蛋白,离心 13 000 r/min,50 min,合并上清,-70 ℃保存,Bradford 法测定蛋白浓度。

1.3.2 双向凝胶电泳 主要参考 Gorg 等[1]的方法和 IPGphorTM 等电聚焦系统操作指南进行。用 18 cm IPG 胶条等电聚焦,凝胶平衡,垂直 SDS-PAGE 电泳,0.025% 考马斯亮蓝 R-350 染色。

1.3.3 凝胶图像分析 Image Scanner 扫描仪扫描凝胶,所得图谱以 ImageMaster2D 5.0 platinum 软件包进行图像分析,比较蛋白斑点差异。

1.3.4 肽质量指纹谱测定 切割凝胶差异蛋白点,脱色,胶内酶切,检测肽质量指纹谱。

1.3.5 数据库检索鉴定蛋白质 输入拟查询的物种、肽质量指纹谱数据及其他参数,在数据库查寻与其相匹配的蛋白质。检索数据库为 Mascot,网址为 http://www.matrixscience.com。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 10.0 对蛋白点灰度值进行 t 检验,采用配对分析。

2 结果

2.1 双向电泳图谱

采用双向凝胶电泳获得了各组海马组织双向电泳图谱,各组海马组织图谱见图 1,图中从右到左为等电点增加,从下至上为相对分子质量增加。

2.2 图像分析结果

经 Imagemaster2D planitum5.0 软件分析及差异蛋白灰度值 t 检验,得到各组间海马蛋白表达有明显差异的蛋白点($P < 0.05$)。SAMP8 组与 SAMR1 组比较,海马中有 9 个蛋白表达下调,13 个蛋白表达上调;SAMP8 + DSS 组与 SAMP8 组相比,海马中有 14 个蛋白表达下调,21 个蛋白表达上调。

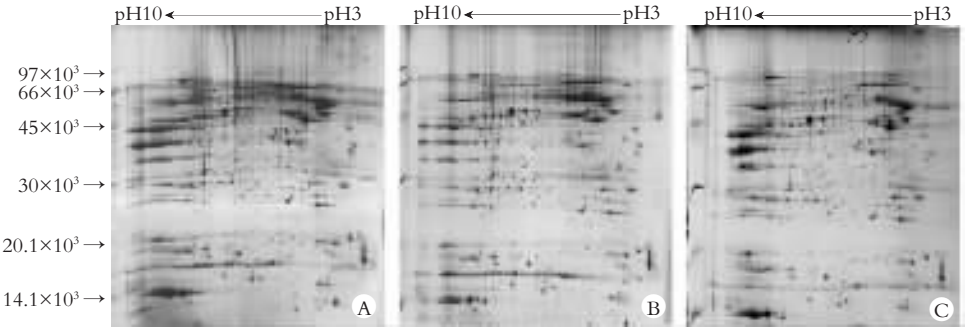
2.3 差异蛋白鉴定结果

经 MALDI-TOF 获得差异蛋白肽指纹图谱,Mascot 数据库检索对差异蛋白点进行鉴定,最终获得 17 个差异蛋白的相关信息。见表 1。

表 1 DSS 作用的差异蛋白点

蛋白序号	鉴定结果	数据库序列号	理论等电点	理论相对分子质量	SAMP8 与 SAMR1 相比	SAMP8 + DSS 与 SAMP8 相比
1	磷脂酰肌醇转移蛋白-α	gi|6 679 337	5.97	31 873	↓	↑
2	异柠檬酸脱氢-3	gi|1 8250 284	6.27	39 613	↓	↑
3	谷氨酸脱氢酶	gi|6680 gi|6 680 027	8.05	61 298	↓	↑
4	醛脱氢酶-2	gi|6 753 036	7.53	56 502	—	↑
4	septin 11	gi|38 328 220	6.36	48 934	—	↑
6	泛素羧端水解酶-L1	gi|25 058 057	5.14	24 822	—	↑
7	腺苷酸激酶	gi|5 725 310	5.67	21 526	—	↑
8	肌动蛋白结合蛋白 1A	gi|12 805 335	6.05	50 943	—	↑
9	Fscn 1 protein	gi|30 023 548	6.57	51 373	—	↑
10	乙醛还原酶	gi|10 946 870	6.90	36 564	—	↑
11	丙酮酸脱氢酶-β	gi|18 152 793	6.41	38 912	—	↑
12	N-已基顺丁烯二酰亚胺敏感因子附着蛋白 β	gi|27 754 065	5.37	32 646	—	↑
13	Krt2-7 protein	gi|16 507 855	9.98	19 381	—	↑
14	谷胱甘肽 S 转移酶	gi|6 754 084	7.71	25 953	—	↑
15	磷酸丙糖异构酶	gi|1 864 018	5.62	22 492	↑	↓
16	醛缩酶-3	gi|60 687 506	6.67	39 370	↑	↓
17	电压依从性阴离子通道-2	gi|6 755 965	7.44	31 713	—	↓

↓:表达下调;↑:表达上调;—:表达未见改变



A:SAMR1 组;B: SAMP8 组;C:SAMP8 + DSS 组

图 1 各组海马蛋白双向电泳图谱

3　讨论

当归芍药散由当归、芍药、川芎、茯苓、白术和泽泻六味中药组成,该方原为治疗血瘀虚证的活血化瘀方药,主要用于治疗“妇人腹中诸疾痛”。日本学者首先用当归芍药散防治老年期痴呆,发现其可通过改善脑的微循环,降低血液黏稠度,提高脑内的超氧化物歧化酶的活性,降低丙二醛的含量增强抗氧化能力,调节酶的活性改善脑内的自由基代谢等多种生物学效应有效改善疗老年痴呆认知功能[2]。本研究采用蛋白质组学技术观察了 DSS 对快速老化模型小鼠海马蛋白,从分子水平上进一步探讨其生物学效应。结果表明 DSS 对 SAMP8 的海马蛋白表达具有明显影响,经酶切鉴定共获得 17 个具有明确功能提示的蛋白生物信息学,根据功能可将它们分为 5 类。

线粒体功能相关蛋白:如醛脱氢酶-2,乙醛还原酶,谷胱甘肽 S 转移酶,丙酮酸脱氢酶-β 和电压依赖型阴离子通道。醛脱氢酶-2、谷胱甘肽 S 转移酶与乙醛还原酶在羰基解毒以及维持蛋白正常生理功能中发挥着重要的作用[3]。丙酮酸脱氢酶能催化丙酮酸氧化脱羧为乙酰胆碱的合成材料乙酰辅酶 A[4]。DSS 对这几个蛋白的上调作用,提示 DSS 可减轻 SAMP8 脑中的自由基损伤,维持胆碱能神经元的正常功能。电压依赖型阴离子通道是线粒体中控制凋亡关键部位线粒体通透性转运孔(permeability transition pore, PTP)的重要组成部分[5],而 SAMP8 脑中的神经元程序性死亡是导致其记忆丧失的直接原因。DSS 对该蛋白的表达的下调,提示 DSS 可能减轻了 SAMP8 神经元凋亡的发生,从而改善了其学习记忆功能。

物质、能量代谢相关蛋白:如磷脂酰肌醇转运蛋白-α、异柠檬酸脱氢酶-3,谷氨酸脱氢酶-1、腺苷酸激酶、醛缩酶 3、磷酸丙糖异构酶。磷脂酰肌醇转运蛋白可促进神经传递效应物质三磷酸肌醇的合成和分泌,参与神经递质的传递过程,它的缺陷或代谢障碍可引发老年痴呆[6]。异柠檬酸脱氢酶是三羧酸循环中的关键调节酶,其活性下调可使 ATP 生成减少,从而引起能量代谢障碍,该酶在对抗细胞氧化损伤也发挥着关键作用[7]。谷氨酸脱氢酶-1 是谷氨酸代谢的关键酶,在神经递质谷氨酸代谢过程中起着举足轻重的作用,活性的降低可导致谷氨酸代谢受阻,引起脑组织氧化损伤。腺苷酸激酶的释放可影响 ADP、ATP 或 dATP 的水平,进而介导神经元凋亡[8]。醛缩酶在 AD 患者血清中特异性的高表达,可能是 AD 患者脑中的慢性炎症反应而引起的过度表达[9]。磷酸丙糖异构酶在 SAMP8 脑中表达显著上调,推测是氧化应激引起该酶的活性下降,而蛋白表达代偿升高[10]。DSS 对磷脂酰肌醇转运蛋白-α、异柠檬酸脱氢酶-3,谷氨酸脱氢酶-1、腺苷酸激酶的表达的上调,提示 DSS 可改善 SAMP8 脑中的能量与物质代谢障碍;而对醛缩酶和磷酸丙糖异构酶的蛋白表达的下调,提示 DSS 可减轻 SAMP8 的炎症及氧化应激反应,延缓老化进程。

突触形成相关蛋白:如 Coronin 1A 及 N-已基顺丁烯二酰亚胺敏感因子附着蛋白 β。Coronin 1A 于肌动蛋白结合蛋白家族,具有加快肌动蛋白的聚和作用,同时在细胞的迁移及神经突触向外伸展中同样扮演着重要的角色。研究表明,SAMP8 记忆缺陷的原因可能是 Coronin 1A 被氧化而导致神经细胞固缩[11],DSS 对该蛋白的上调作用表明,DSS 对维持神经细胞突触的正常形态有促进作用。N-已基顺丁烯二酰亚胺敏感因子附着蛋白 β,在成人的脑组织中特异性高表达,在突触形成、神经递质的释放以及囊泡的转运中发挥重要作用[12],DSS 可上调该蛋白的表达。

细胞骨架蛋白:Septin 11。Septin 11 属于 septin 基因家族。研究表明,Septin 蛋白间相互作用形成的单聚体或多聚复合体可作为细胞骨架元件,同时 septin 还具有蛋白定位器的作用,可将细胞内的其他蛋白固定到某个区域,Septin 对维持神经细胞的正常功能有重要的作用,其表达异常可能导致神经退行性病变的发生[13]。本研究表明,DSS 可上调该蛋白的表达,提示 DSS 可能通过调节 Septin 的表达,使 SAMP8 海马细胞骨架的异常得以改善,从而维持了 SAMP8 神经细胞的生理功能。

其他蛋白:如泛素羧端水解酶-L1、Fscn1、Krt2-7。泛素羧端水解酶在蛋白质选择性降解途径中起重要作用,并参与神经系统的分化和发育过程,该蛋白在 AD 与帕金森病脑组织中表达明显降低[14]。Fscn1 则主要参与了获得性免疫系统的中心环节抗原提呈过程。本研究表明,DSS 可上调这两个蛋白的表达,提示 DSS 可能通过对这两个蛋白表达的调节而影响了 SAMP8 的免疫功能和神经系统的分化和发育,从而对其学习记忆功能有所改善。

本研究结果为 DSS 作用机制的研究提供了新的线索,DSS 防治脑老化是通过改善物质能量代谢、恢复线粒体功能,促进突触形成等多环节、多层次,多途径的综合作用。研究中获得的 SAMP8 与 SAMR1 海马组织中的多个差异蛋白点,也为从药理学的角度研究中枢认知功能的生物学过程提供了实验依据。

参考文献:

[1] Gorg A. Obermater C, Boguth G, *et al*. The Current state of two-di-

men sional dectrophorests with immobilized PH gradcents[J]. Electrophoreses, 2000, 21(6): 1037 - 1053.
[2] 水岛宜昭. 当归芍药散治疗老年痴呆有效[J]. 和汉医学会志(日). 1989, 6(3): 456 - 460.
[3] Ruan H, Tang X D, Chen M L, *et al*. High quality life extension by the enzyme peptide methionine sulfoxide reductase[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(5): 2478 - 2453.
[4] Picklo M J, Montine T J, Amarnath V, *et al*. Carbonyl toxicology and Alzheimer's disease[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2002, 184(3): 187 - 197.
[5] Kim H C, Yamada K, Nitta A , *et al*. Immunocytochemical evidence that amyloid beta (1-42) impairs endogenous antioxidant systems *in vivo*[J]. Neuroscience, 2003, 119(2): 399 - 419.
[6] Bankaitis V A, Cortese J, Phillips S E, *et al*. Phosphatidylinositol transfer protein function in the mouse [J]. Adv Enzyme Regul, 2004, 44: 201 - 218.
[7] Kil I S, Lee J H, Shin A H, *et al*. Glycation-induced inactivation of NADP + -dependent isocitrate dehydrogenase: implications for diabetes and aging[J]. Free Radic Biol Med, 2004, 37(11): 1765 - 1778.
[8] Kohler C, Gahm A, Noma T, *et al*. Release of adenylate kinase 2 from the mitochondrial intermembrane space during apoptosis[J]. FEBS Lett, 1999, 447(1): 10 - 12.
[9] Mor F, Izak M, Cohen I R. Identification of aldolase as a target antigen in Alzheimer's disease[J]. J Immunol, 2005, 175(5): 3439 - 3445.
[10] Poon H F, Castegna A, Farr S A, *et al*. Quantitative proteomics analysis of specific protein expression and oxidative modification in aged senescence-accelerated-prone 8 mice brain[J]. Neuroscience, 2004, 126(4): 915 - 926.
[11] Poon H F, Farr S A, Banks W A, *et al*. Proteomic identification of less oxidized brain proteins in aged senescence-accelerated mice following administration of antisense oligonucleotide directed at the Abeta region of amyloid precursor protein[J]. Brain Res Mol Brain Res, 2005, 138(1): 8 - 16.
[12] Nishiki T, Nihonmatsu I, Tsuhara Y, *et al*. Distribution of soluble N-ethylmaleimide fusion protein attachment proteins (SNAPS) in the rat nervous system[J]. Neuroscience, 2001, 107 (3): 363 - 371.
[13] Kinoshita M. Diversity of septin scaffolds[J]. Curr Opin Cell Biol, 2006, 18(1): 54 - 60.
[14] Choi J, Levey A I, Weintraub S T, *et al*. Oxidative modifications and down-regulation of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 associated with idiopathic Parkinson's and Alzheimer's diseases[J]. J Biol Chem, 2004, 279(13): 13256 - 13264.

(编辑 陈聪连)

(上接476页)

1.3 评价指标

采取护理干预前和干预后6个月,观察患者:①气短症状分级[2]。②日常生活能力(ADL)评分。③血气分析及呼吸脉搏情况。

1.4 统计学方法

采用SPSS 12.0统计软件进行,自身前后对照,计量资料采用 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验,等级资料采用秩和检验。

2 结果

2.1 护理干预前后气短状况比较

本组护理干预前患者气短症状Ⅱ级5例,Ⅲ级11例,Ⅳ级12例,Ⅴ级24例;护理干预后患者气短症状Ⅰ级14例,Ⅱ级17例,Ⅲ级10例,Ⅳ级8例,Ⅴ级3例。患者气短症状明显得到改善($\chi^2 = 11.25$, $P < 0.05$)。

2.2 护理干预前后ADL评分比较

本组护理干预前患者ADL评分:40~60分46例,<40分6例;护理干预后患者ADL评分:>60分19例,40~60分33例。患者日常生活能力明显提高($u = 9.25$, $P < 0.05$)。

2.3 护理干预前后血气分析及呼吸、脉搏情况比较

本组52例患者经护理干预后,主要血气分析指标及呼吸、脉搏明显改善,见表1。

表1 护理干预前后血气分析及呼吸脉搏情况比较

	$p(O_2)$ (kPa)	$p(CO_2)$ (kPa)	SaO_2(%)	呼吸(次/min)	脉搏(次/min)
干预前	6.75±1.96	6.23±0.44	82.08±11.12	24.5±1.5	96.24±11.01
干预后	8.12±1.25	5.32±0.32	91.54±7.31	17.5±2.5	70.21±5.33
t 值	6.54	5.43	3.77	8.76	14.53
P 值	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

3 讨论

COPD患者病程长,反复发作,易患感冒,诱发肺部感染,肺功能不易改善,且短期干预措施对气急、气喘缓解不明显,患者易失去信心,放松训练,因此,要根据患者不同时期的心理状况,做好长期心理指导工作。

COPD患者气道阻塞,肺和胸廓的顺应性下降,活动度变小,收缩力下降,且呼气时气道塌陷闭塞,肺泡内气体不能有效排出。采用腹式呼吸、缩唇呼吸、呼吸操等能增加支气管内压,扩大支气管内径,防止支气管过早闭塞,改善通气功能,提高呼吸肌肌力,改善肺功能,可作为改善COPD患者肺功能的有效手段。本组患者通过呼吸训练后,气短状况改善,血气分析结果显示 $p(O_2)$ 升高,$p(CO_2)$ 降低,呼吸、脉搏次数均减少。

虽然COPD从病理及功能上大多不可逆转,但通过现代医疗和有效的护理干预措施,使患者肺功能有所恢复,机体抵抗力得到增强,防止了疾病的复发与恶化是COPD患者的康复目标。本组患者经护理干预后,ADL评分均增加,生活质量得到改善,机体对运动的耐受性增强,机体抵抗力增加,稳定期延长,从而延缓了病程进展,提高患者的生命质量。

关键词:护理干预;COPD;生命质量
中图法分类号:R473.5 **文献标识码**:B

参考文献:

[1] 中华医学会呼吸系病学会. 慢性阻塞性肺疾病(COPD)诊治规范(草案)[J]. 中华结核和呼吸杂志,1997, 20(4): 199 - 203.
[2] 周士枋. 慢性阻塞性肺病患者的康复[J]. 实用老年医学, 1993, 7(1): 11 - 13.

(编辑 王小寒)