

## · 药理与临床 ·

## 基于同位素标记相对和绝对定量技术的联合用药抗肝纤维化作用的蛋白质组学研究

曹雯<sup>1</sup>, 廖明<sup>2</sup>, 周燕<sup>1\*</sup>

1. 广西医科大学药学院, 广西 南宁 530021

2. 广西医科大学 医学科学实验中心, 区域性高发肿瘤早期防治研究重点实验室, 广西 南宁 530021

**摘要:** 目的 以表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)、牛磺酸和染料木素 3 种具有不同抗纤维化作用的药物组成联合用药, 应用同位素标记相对和绝对定量(iTRAQ)技术研究联合用药对肝纤维化大鼠治疗作用的蛋白质基础及分子机制。方法 将 SD 大鼠分为对照组、模型组和联合用药组, 模型组和联合用药组大鼠分别 ig 50% CCl<sub>4</sub> 溶液, 对照组给予花生油, 连续 14 周。于第 9 周开始联合用药组进行 ig 给药(牛磺酸 200 mg/kg+EGCG 30 mg/kg+染料木素 20 mg/kg)治疗, 连续 6 周。采集大鼠血清和肝组织样本, 肝组织进行 HE 染色观察病理变化, 模型组和联合用药组血清样本组内等量混合后去除高丰度蛋白, iTRAQ 试剂标记后应用液相色谱分离, 经质谱鉴定, 进行相对定量及生物信息学分析, 用 ELISA 法对有代表性的血清差异蛋白 Txn1 进行验证。结果 质谱鉴定置信度在 95% 以上的蛋白质共 359 个, 其中差异表达的蛋白有 78 种, 上调的蛋白有 51 种, 下调的有 27 种。与模型组相比, 差异蛋白 Txn1 在联合用药组血清中的量明显升高 ( $P < 0.05$ )。结论 联合用药能通过对多个蛋白质、多途径的综合调节达到抗肝纤维化的效果, 其中对抗氧化防御系统和血液凝固级联活化途径的调节可能是联合用药抗肝纤维化作用的分子机制。

**关键词:** 联合用药; 同位素标记相对和绝对定量; 蛋白质组学; 肝纤维化; 表没食子儿茶素没食子酸酯; 牛磺酸; 染料木素

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)01-0073-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.01.015

## Proteomics research on antifibrotic mechanism of combination therapy based on isobaric tags for relative and absolute quantitation technique

CAO Wen<sup>1</sup>, LIAO Ming<sup>2</sup>, ZHOU Yan<sup>1</sup>

1. Department of Pharmacology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

2. Key Laboratory of High-Incidence-Tumor Prevention &amp; Treatment, Medical Scientific Research Centre, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

**Abstract: Objective** To investigate the protein basis and molecular mechanism of combination therapy with epigallocatechin gallate (EGCG), taurine, and genistein on CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in rats using isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ). **Methods** The SD rats were randomly divided into normal control, model, and combination therapy (taurine 200 mg/kg + EGCG 30 mg/kg + genistein 20 mg/kg) groups. The rats in the model and combination therapy groups were induced by ig administration of 50% CCl<sub>4</sub> for 14 weeks, and the rats in the normal control group were given peanut oil. The combination therapy was started at week 9 for 6 weeks. HE staining of liver tissue was performed to evaluate histopathologic changes. The high-abundance proteins in the serum of model and combination therapy groups were depleted by ProteoMiner Protein Enrichment Kit. Proteins differentially expressed in the serum of those two groups were identified with iTRAQ coupled with LC-ESI-MS/MS technology and analyzed with bioinformatics tools. The expression of representative differential protein (Txn1) was validated by ELISA. **Results** A total of 359 proteins with the confidence coefficient above 95% were identified, of which 78 were differential expressed proteins, including 51 up-regulated ones and 27 down-regulated ones. The serum level of Txn1 increased significantly in the combination therapy group compared with the model group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The combination therapy can alleviate the progression of liver fibrosis effectively by affecting multiple

收稿日期: 2014-07-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81160063, 81360192); 广西自然科学基金项目(2013GXNSFBA019167, 2012GXNSFCA053004); 广西区域性高发肿瘤早期防治研究重点实验室基金(GK2013-13-A-01-03)

作者简介: 曹雯(1987—), 女, 硕士, 研究方向为药理学。Tel: (0771)5358272 E-mail: mosquito1106@foxmail.com

\*通信作者 周燕, 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为药理学。Tel: (0771)5358272 E-mail: 15296542304@163.com

biological processes. The regulation of anti-oxidant defense system and coagulation cascade pathway may be the molecular mechanisms of the combination therapy against liver fibrosis.

**Key words:** combination therapy; isobaric tags for relative and absolute quantitation; proteomic; liver fibrosis; epigallocatechin gallate; taurine; genistein

中药抗肝纤维化的作用已显示出较明显的优势, 本课题组根据肝纤维化发生发展的不同机制, 基于以往的研究采用表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)、牛磺酸和染料木素(4', 5, 7-三羟基异黄酮) 3 种药物组成联合用药治疗四氯化碳( $\text{CCl}_4$ ) 诱导的大鼠肝纤维化, 发现联合用药与单一用药相比具有更高的抗纤维化能力<sup>[1-2]</sup>, 且其可能通过调节某些蛋白质的表达从而发挥抗肝纤维化作用<sup>[3-4]</sup>。前期实验研究已表明联合用药的抗肝纤维化作用机制是多方面的, 显示了其多环节、多层次、多靶点的综合药理作用, 由于肝纤维化的形成是一个多因素、多环节的动态过程, 这就需要综合整体地探讨各个靶点环节之间的相互作用、相互影响的机制。同位素标记相对和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ) 技术是美国应用生物系统公司开发的一种用于体外标记的蛋白质组学定量技术<sup>[5]</sup>, 该技术可对血清、细胞裂解物等样品中蛋白的表达丰度进行相对和绝对定量研究, 通过比较治疗药物干预后疾病状态与正常状态蛋白表达的差异, 有可能找到有效的药物作用靶点。本研究以  $\text{CCl}_4$  诱导大鼠肝纤维化模型作为研究对象, 应用 iTRAQ 结合串联质谱方法, 从整体水平上探讨肝纤维化过程中的蛋白质表达的改变, 从蛋白质组学水平揭示联合用药抗肝纤维化多途径的作用机制。

## 1 材料

### 1.1 动物

健康 SD 雄性大鼠, 体质量 ( $220 \pm 30$ ) g, 由广西医科大学实验动物中心提供, 合格证号 SCXK(桂) 2009-0004。

### 1.2 药品与试剂

牛磺酸(成都市科龙化工试剂厂, 批号 Q/C5411196-9); EGCG(四川乐山禹伽茶业公司, 批号 TP1110001P); 染料木素(上海迈瑞尔化学技术有限公司, 批号 M11111601);  $\text{CCl}_4$ (分析纯, 广东光华科技股份有限公司, 批号 20110413); Proteominer 试剂盒(美国 Bio-Rad 公司); Bradford 蛋白定量试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司);

SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司); PageRuler Prestained Protein Ladder、丙酮、乙腈、甲酸(美国 Thermo 公司); iTRAQ Reagents-8plex Kit(美国 ABI 公司); Trypsin Gold(美国 Promega 公司); Thioredoxin ELISA 试剂盒(武汉华美生物工程有限公司)。

### 1.3 仪器

DMR+Q550 病理图像分析仪(德国 Leica 公司); Spectramax plus 384 型酶联免疫检测仪(美国分子仪器公司); 5810R 型低温离心机(德国 Eppendorf 公司); Bio-Rad 电泳系统(美国 Bio-Rad 公司); LC-20AB HPLC 系统(日本岛津公司); TripleTOF 5600(美国 AB SCIEX 公司); nanoACQuity 液相系统(美国 Waters 公司); Ultremex SCX 强阳离子交换柱(美国 Phenomenex 公司)。

## 2 方法

### 2.1 动物分组与给药

24 只 SD 健康大鼠随机分为对照组、模型组、联合用药组(牛磺酸 200 mg/kg+EGCG 30 mg/kg+染料木素 20 mg/kg)<sup>[1-4]</sup>, 每组 8 只。模型组和联合用药组大鼠分别 ig 50%  $\text{CCl}_4$  溶液( $\text{CCl}_4$ -花生油 1:1, 2 mL/kg), 对照组给予等体积花生油, 每周 2 次, 连续 14 周。于第 9 周开始联合用药组进行 ig 给药治疗, 1 次/d, 连续 6 周。末次给药后处死动物, 经腹主动脉取血, 分离血清备用, 取肝组织进行病理学检查。

### 2.2 肝组织病理学观察

肝右叶相同部位组织经 10% 甲醛固定, 蜡块包埋, HE 染色, 光学显微镜下应用 DMR+Q550 图像分析仪观察肝纤维化情况。

### 2.3 去除血清高丰度蛋白和血清蛋白提取

将模型组和联合用药组大鼠血清分别进行等体积混合, 取血清 180  $\mu\text{L}$ , 用 Proteominer 试剂盒进行血清高丰度蛋白去除, 具体步骤按试剂盒说明书操作。用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 对血清样本去除高丰度蛋白效果进行验证。

### 2.4 蛋白质酶解及 iTRAQ 标记

将去除高丰度蛋白后的血清样品精确取出 100

μg 蛋白, 分别加入 20 μL 溶解缓冲液、1 μL 变性剂, 按照 iTRAQ 试剂盒说明书步骤进行胰蛋白酶酶解和 iTRAQ 标记: 115 标记模型组, 116 标记联合用药组。室温孵育 2 h 后, 每管加入 100 μL Miliy-Q 水终止反应, 再将标记后的各组肽段混合, 离心冻干。

### 2.5 强阳离子交换柱分离与质谱分析

将标记后抽干的混合肽段用 4 mL SCX 缓冲液 A 复溶, 采用日本岛津公司 LC-20AB HPLC 系统, 使用 UltremexSCX 分离柱对蛋白样品进行液相分离。整个洗脱过程在 214 nm 吸光度下进行监测, 经过筛选得到 20 个组分。应用基于 TripleTOF 5600 的 nanoACQuity 液相色谱-电喷雾串联质谱 (LC-ESI-MS/MS) 系统进行多肽串联质谱分析。

### 2.6 蛋白鉴定和生物信息学分析

采用 Mascot 蛋白鉴定软件 (version 2.3.02) 对肽段的 MS/MS 数据进行蛋白质数据库搜索鉴定, 根据报告离子的峰面积积分进行相对定量分析, 以 115 (CCl<sub>4</sub> 模型组) 为对照, 按联合用药组与模型组的离子的峰面积积分比值 (116:115) 选择置信度在 95% 的结果进行报告, 表达差异大于 20%, 即 >1.2 倍或 <0.8 倍被认为该蛋白质表达存在差异。

应用 DAVID (database for annotation, visualization and integrated discovery) 功能注释软件对差异蛋白进行基因功能聚类 (gene ontology, GO) 分析, 选择 KEGG 通路数据库对蛋白所涉及的代谢通路进行分析。

### 2.7 血清蛋白 Txn1 的 ELISA 验证

用酶联免疫法对血清差异蛋白 Txn1 进行定量测定, 实验步骤按试剂盒说明书操作, 用酶标仪测量 450 nm 下的吸光度值, 并换算为相应的浓度。

### 2.8 数据处理及统计学方法

采用统计软件 SPSS 16.0 处理, 计量资料均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差 LSD 分析。

## 3 实验结果

### 3.1 联合用药对肝纤维化大鼠肝组织病理变化的影响

HE 染色后观察肝组织病理变化 (图 1), 对照组大鼠肝组织可见正常的肝组织结构, 肝小叶结构完整, 肝细胞排列整齐规则; 模型组大鼠肝细胞高或中度浊肿变性, 形成大小不等椭圆形肝细胞结缔组织构成假小叶, 结节周围纤维组织沉积增生; 联合用药组大鼠肝组织病变减轻, 肝小叶结构基本完整, 有少量肝细胞轻度浊肿, 纤维间隔变窄, 脂肪空泡的形成明显降低。

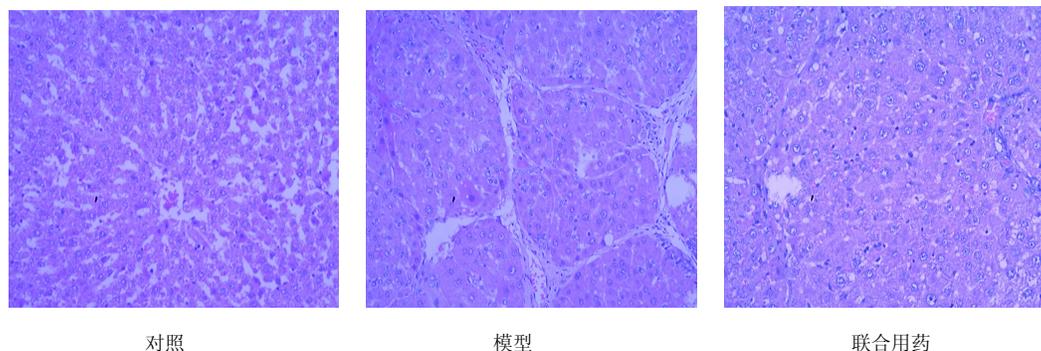


图 1 肝纤维化组织 HE 染色结果

Fig. 1 HE staining of liver fibrosis tissue

### 3.2 去除血清高丰度蛋白结果

应用 SDS-PAGE 验证去除血清高丰度蛋白效果 (图 2), 对比原血清和去除高丰度蛋白样品电泳条带发现, 在未经去除高丰度蛋白的血清凝胶图上蛋白质条带较少, 白蛋白 (相对分子质量 66 000) 条带染色浓重, 而在经过去除高丰度蛋白后的血清条带上, 高丰度蛋白基本被去除, 蛋白质条带明显增多, 更多低丰度蛋白条带显现出来。

### 3.3 质谱鉴定结果

质谱数据经 Mascot 软件对 IPI 数据库进行检索

鉴定蛋白, 报告置信度在 95% 以上的蛋白质共 359 个, 其中差异表达的蛋白有 78 种, 上调的蛋白有 51 种, 下调的有 27 种, 见表 1。

### 3.4 生物信息学分析

运用 DAVID 富集分析平台对本实验获得的 78 种差异性蛋白进行 GO 分析和 KEGG 分析。这 78 种差异性蛋白主要参与的生物学过程有 109 个 ( $P < 0.05$ ), 其中占比例较高的前 5 个分别是蛋白代谢进程 (27.8%)、应激反应 (26.4%)、外界刺激反应 (20.8%)、免疫反应 (19.4%)、创伤反应 (16.7%);

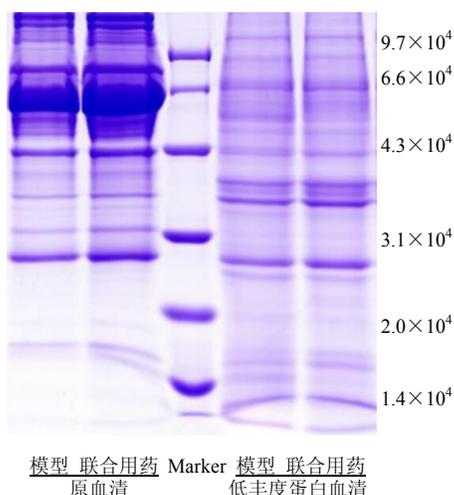


图 2 血清去除高丰度蛋白 SDS-PAGE 效果图

Fig. 2 SDS-PAGE of serum with depletion of high-abundance proteins

细胞成分 31 个 ( $P < 0.05$ ), 所占比例较高的前 5 个分别是细胞质 (59.7%)、细胞器 (58.3%)、细胞内区域 (65.3%)、细胞膜结合细胞器 (52.8%)、高分子配合物 (29.2%); 分子功能 18 个 ( $P < 0.05$ ), 所占比例较高的前 5 个分别是蛋白结合 (70.8%)、催化活性 (44.4%)、水解酶活性 (22.2%)、核酸结合 (20.8%)、钙离子结合功能 (13.9%)。Pathway 分析显示这些差异蛋白参与的信号转导通路主要有血液凝固级联活化途径、补体调节通路、精氨酸和脯氨酸代谢通路。

### 3.5 血清差异蛋白 Txn1 的 ELISA 验证结果

差异蛋白 Txn1 在联合用药组大鼠血清中的量为  $(20.35 \pm 6.33)$  ng/mL, 与模型组 [ $(15.63 \pm 2.90)$  ng/mL] 相比明显增加 ( $P < 0.05$ ), 血清表达水平与 iTRAQ 检测结果一致。

表 1 联合用药组与模型组比较血清差异蛋白结果

Table 1 Comparison on differentially expressed proteins in combination treatment and model groups

| IPI 编号      | 基因名称      | 蛋白质名称  | 联合用药组/模型组 |
|-------------|-----------|--|-----------|
| IPI00559178 | Mst4      | serine/threonine-protein kinase MST4                           | 0.287     |
| IPI00231099 | Spp2      | secreted phosphoprotein 24                                     | 0.339     |
| IPI00363901 | Igj       | immunoglobulin J chain   | 0.484     |
| IPI00362416 | Sdpr      | serum deprivation-response protein                             | 0.491     |
| IPI00204206 | Tpm1      | tropomyosin alpha-1 chain isoform d                            | 0.535     |
| IPI00858359 | Myl9      | myosin regulatory light polypeptide 9                          | 0.578     |
| IPI00565966 | Cd5l      | CD5 antigen-like   | 0.591     |
| IPI00324618 | Uso1      | general vesicular transport factor p115                        | 0.596     |
| IPI00555303 | Pcmt1     | protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase       | 0.617     |
| IPI00199497 | Lifr      | leukemia inhibitory factor receptor                            | 0.621     |
| IPI00202109 | Bid       | BH3-interacting domain death agonist                           | 0.642     |
| IPI00215299 | C1qc      | complement C1q subcomponent subunit C                          | 0.663     |
| IPI00213299 | Mapre1    | microtubule-associated protein RP/EB family member 1           | 0.670     |
| IPI00188478 | Mcpt1     | mast cell protease 1   | 0.673     |
| IPI00327185 | Nap1l1    | nucleosome assembly protein 1-like 1                           | 0.697     |
| IPI00206786 | F10       | coagulation factor X   | 0.700     |
| IPI00201699 | Rhoa      | transforming protein RhoA                                      | 0.701     |
| IPI00324561 | Ptpn11    | isoform 2 of tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11 | 0.716     |
| IPI00776882 | Calu      | calumenin isoform a  | 0.719     |
| IPI00370844 | Pls1      | plastin-1  | 0.722     |
| IPI00782787 | LOC362795 | ig gamma-2C chain C region                                     | 0.724     |
| IPI00190559 | Ube2n     | ubiquitin-conjugating enzyme E2 N                              | 0.727     |
| IPI00212220 | Pdia4     | protein disulfide-isomerase A4                                 | 0.727     |
| IPI00215297 | C1qb      | complement C1q subcomponent subunit B                          | 0.735     |
| IPI00554034 | Rab6a     | ras-related protein Rab-6A                                     | 0.744     |
| IPI00215296 | C1qa      | complement C1q subcomponent subunit A                          | 0.783     |
| IPI00187799 | Kng1      | isoform HMW of Kininogen-1                                     | 0.792     |
| IPI00203690 | Aldh9a1   | 4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase                    | 1.226     |
| IPI00201333 | Ganab     | neutral alpha-glucosidase AB                                   | 1.234     |
| IPI00203214 | Eef2      | elongation factor 2  | 1.239     |

续表 1

| IPI 编号      | 基因名称      | 蛋白质名称  | 联合用药组/模型组 |
|-------------|-----------|--|-----------|
| IPI00476295 | Ahcy      | adenosylhomocysteinase   | 1.239     |
| IPI00203391 | Paics     | multifunctional protein ADE2   | 1.249     |
| IPI00371512 | Dpt       | dermatopontin  | 1.258     |
| IPI00193349 | Cops4     | COP9 signalosome complex subunit 4   | 1.282     |
| IPI00206403 | Lum       | lumican  | 1.291     |
| IPI00190501 | Cpb2      | carboxypeptidase B2  | 1.292     |
| IPI00372498 | Dak       | bifunctional ATP-dependent dihydroxyacetone kinase/FAD-AMP lyase (cyclizing) | 1.310     |
| IPI00209744 | Agt       | angiotensinogen  | 1.313     |
| IPI00831740 | Masp2     | mannan-binding lectin serine protease 2                                      | 1.316     |
| IPI00230979 | Nampt     | nicotinamide phosphoribosyltransferase                                       | 1.322     |
| IPI00195372 | Eef1a1    | elongation factor 1-alpha 1  | 1.340     |
| IPI00191749 | Psmb1     | proteasome subunit beta type-1   | 1.342     |
| IPI00326179 | Fbln5     | fibulin-5  | 1.361     |
| IPI00958044 | Hist1h2ai | histone cluster 1, H2ae-like   | 1.384     |
| IPI00202610 | F7        | coagulation factor VII   | 1.391     |
| IPI00325599 | Asl       | argininosuccinate lyase  | 1.417     |
| IPI00200147 | Rplp0     | 60 S acidic ribosomal protein P0   | 1.441     |
| IPI00208205 | Hspa8     | heat shock cognate 71 kDa protein  | 1.456     |
| IPI00188622 | Tgfb1     | transforming growth factor, beta induced                                     | 1.457     |
| IPI00203721 | Fgl1      | fibrinogen-like protein 1  | 1.465     |
| IPI00393058 | Mmrn1     | multimerin-1   | 1.480     |
| IPI00205274 | Mybbp1a   | myb-binding protein 1A   | 1.490     |
| IPI00213693 | Pros1     | vitamin K-dependent protein S  | 1.502     |
| IPI00555252 | Gapdh     | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase                                     | 1.532     |
| IPI00190759 | Fgg       | isoform Gamma-B of fibrinogen gamma chain                                    | 1.532     |
| IPI00211127 | Ass1      | argininosuccinate synthase   | 1.541     |
| IPI00193983 | Cltc      | clathrin heavy chain 1   | 1.562     |
| IPI00198884 | Ncl       | nucleolin-like protein   | 1.586     |
| IPI00205389 | Fgb       | isoform 1 of fibrinogen beta chain   | 1.587     |
| IPI00373762 | Pla2g7    | platelet-activating factor acetylhydrolase                                   | 1.610     |
| IPI00886470 | Hsd17b10  | 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2                                       | 1.611     |
| IPI00231046 | Psm4      | proteasome subunit alpha type-4  | 1.621     |
| IPI00204703 | Serpinh1  | serpin H1  | 1.669     |
| IPI00194087 | Actc1     | alpha cardiac muscle 1   | 1.672     |
| IPI00339148 | Hspd1     | 60 000 heat shock protein, mitochondrial                                     | 1.674     |
| IPI00207123 | Tnc       | tenascin C   | 1.695     |
| IPI00194292 | Masp1     | isoform 2 of mannan-binding lectin serine protease 1                         | 1.748     |
| IPI00231229 | Gstp1     | glutathione S-transferase P  | 1.893     |
| IPI00190303 | Ptx3      | pentraxin-related protein  | 1.897     |
| IPI00325146 | Anxa2     | isoform short of annexin A2  | 1.913     |
| IPI00190208 | Sema3f    | semaphorin-3F  | 1.937     |
| IPI00197568 | Gdi2      | rab GDP dissociation inhibitor beta  | 1.952     |
| IPI00231767 | Tpi1      | triosephosphate isomerase  | 2.078     |
| IPI00370411 | Fbln1     | fibulin-1  | 2.091     |
| IPI00371498 | Prg4      | proteoglycan 4   | 2.619     |
| IPI00188920 | LOC675759 | ig heavy chain V region IR2  | 2.629     |
| IPI00205255 | Pigr      | polymeric immunoglobulin receptor  | 2.645     |
| IPI00231368 | Txn1      | thioredoxin  | 3.886     |

#### 4 讨论

肝纤维化是继发于肝脏炎症或慢性肝损伤后组织修复过程中的代偿反应,是各种致病因子引起的慢性肝病的共同病理过程。慢性肝病的病程中常常伴随着肝纤维化的发生,而进展性的肝纤维化如果得不到有效控制和治疗,最终将会发展为肝硬化甚至肝癌<sup>[6]</sup>。实验性肝纤维化的研究目的在于探索肝纤维化的形成和发展的规律,进一步研究其防治问题。本研究采用 CCl<sub>4</sub> 诱导大鼠肝纤维化模型,应用 iTRAQ 联合 LC-ESI-MS/MS 技术探讨联合用药的抗肝纤维化作用机制。EGCG 是绿茶提取物茶多酚中最有效的活性成分,具有抗氧化、抗动脉硬化、抗炎以及抗肿瘤等多种药理作用;牛磺酸最早由牛黄中分离出来,是一种动物来源的传统中药,是身体所需营养成分之一,对心脏、肝脏、胃肠及眼部有良好的保护作用;染料木素为豆科植物金雀花中天然存在的异黄酮类物质,近年来有研究显示其具有抗肿瘤作用。实验病理切片的 HE 染色结果显示,联合用药组肝组织病变程度较模型组有明显的减轻,证实了联合用药的抗肝纤维化效果,也与笔者的前期研究结果相符<sup>[1-4]</sup>。

蛋白质是机体内各种代谢和调控途径的主要执行者,是多种致病因子对机体作用最重要的靶分子,也是大多数药物的作用靶点。蛋白质组学是近年来发展起来的强有力的发现药物靶点的技术平台,运用蛋白质组学技术研究肝纤维化发生的分子机制、寻找早期诊断血清标志物以及干预治疗的药物靶点已成为目前国内外研究肝纤维化的焦点<sup>[7]</sup>。血清是蛋白质组学研究中较易获得的样本,大多数血清蛋白由细胞或者组织在不同的生理和病理环境下分泌或者脱落下来,能较全面地反映机体的疾病状态,特别适用于对疾病的监测以及药物作用靶蛋白的研究;但由于血清蛋白种类的复杂性及大量的高丰度蛋白质的存在,很多有意义的低丰度蛋白信息常常被掩盖<sup>[8]</sup>。本实验应用 Proteominer 试剂盒进行对大鼠血清中的高丰度蛋白进行有效去除,从而使更多低丰度蛋白的信息能够显现,后续实验能够获得更充分的信息。iTRAQ 技术是近年来新开发的定量蛋白质组学技术,具有选择性高、灵敏度高、重复性好的特点,尤其适用于对低丰度蛋白的研究,并且能够通过同位素标记准确把握差异表达蛋白的动态变化<sup>[9]</sup>。

本研究通过对差异蛋白进行 GO 功能分类及

KEGG 的通路数据库的分析,发现联合用药作用后的差异蛋白主要参与抗氧化防御系统、血液凝固级联活化途径、能量代谢等多种生物调节进程,如 Txn1 主要参与抗氧化防御系统, Fgb、Fgg 主要参与血液凝固级联活化途径, Tpi1、Gapdh 主要参与细胞生长及能量代谢,提示联合用药的抗纤维化作用可能是通过影响多个生物学进程而实现的。本实验用 ELISA 方法对上调趋势最高的血清 Txn1 蛋白进行了验证,验证结果与 iTRAQ 检测结果一致。Txn1 是一种在各种组织细胞中广泛存在并控制细胞氧化还原状态的蛋白质,是抗氧化防御系统的重要组成部分,在细胞生存和生长中具有极其重要的作用,具有直接清除活性氧(ROS)、维持细胞氧化还原平衡、抗炎和抗凋亡等多种功能<sup>[10]</sup>,还与肿瘤的发生密切相关,在调节蛋白质-蛋白质、蛋白质-核酸相互作用等方面起重要作用。炎症和慢性肝病的发生与 ROS 的过度产生息息相关,当肝细胞内 ROS 的产生超过抗氧化系统的清除能力或细胞中保护体系的功能降低时,就会造成大分子损伤和包括凋亡在内的病理变化<sup>[11-12]</sup>,此时机体需要调动出自身的抗氧化防御机制,以清除过多的 ROS。Txn1 的高表达可调控机体的抗氧化防御系统,在抗肝纤维化过程中发挥重要作用。目前已有研究显示 Txn1 可对抗肝纤维化和肝硬化, Okuyama 等<sup>[13]</sup>有关重组人 Txn1 或转基因小鼠的实验研究表明, Txn1 可通过抑制氧化应激以及肝星状细胞的增殖而减轻肝纤维化,证明了 Txn1 对肝脏的保护作用。

CCl<sub>4</sub> 诱导的肝纤维化会引起肝细胞坏死,并激活炎症伤口愈合反应,可导致在肝组织中细胞外基质(ECM)过度沉积<sup>[14]</sup>,凝血途径是肝组织损伤后所激活的第一个炎症伤口愈合机制,并且被认为是在肝纤维化的发病机制中的主要驱动力,长时间的凝血系统紊乱会加重肝纤维化的发展过程<sup>[15]</sup>。Fgb、Fgg 是由肝脏合成的具有凝血功能的蛋白质,可聚合成纤维蛋白,是血小板聚集的辅助因子,在炎症、伤口愈合和凝血途径中起着重要的作用<sup>[16]</sup>。当肝脏受到严重损伤时,肝脏合成纤维蛋白原的功能发生障碍,血清中纤维蛋白原浓度降低。实验研究结果显示,与 CCl<sub>4</sub> 模型组比较, Fgb、Fgg 蛋白的表达在联合用药的干预作用下均上调,提示联合用药可能通过上调控制细胞氧化还原状态的 Txn1 蛋白,启动机体的抗氧化防御系统,抑制 ROS 产生从而保护肝细胞,发挥抗肝纤维化作用。在联合用药作

用下肝细胞受损减少, 肝脏合成纤维蛋白原的功能得到改善, 使纤维蛋白原合成增多, 表现为血清 Fgb、Fgg 浓度的升高。因此, 通过多个蛋白对抗氧化防御系统和血液凝固级联活化途径进行调节可能是联合用药抗肝纤维化作用的分子机制, 而联合用药抗肝纤维化的其他作用机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] 廖明, 李彦, 舒伟, 等. 鸡尾酒疗法对大鼠肝星状细胞的增值及 I 型胶原、TIMP-1\_mRNA 表达的影响 [J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(9): 932-936.
- [2] 廖明, 林兴, 陈兆霓, 等. 鸡尾酒疗法对肝纤维化大鼠肝组织中 TGF- $\beta$ 1、COL I 及 COL III 表达的影响 [J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(18): 1867-1872.
- [3] 廖明, 莫财锋, 周怡, 等. 质谱技术分析联合用药抗大鼠肝纤维化的作用 [J]. 中国新药杂志, 2012, 21(14): 1668-1671.
- [4] Li Y, Luo Y, Zhang X R, *et al.* Combined taurine, epigallocatechin gallate and genistein therapy reduces HSC-T6 cell proliferation and modulates the expression of fibrogenic factors [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(10): 20543-20554.
- [5] Song X M, Bandow J L, Sherman J, *et al.* iTRAQ experimental design for plasma biomarker discovery [J]. *J Proteome Res*, 2008, 7(7): 2952-2958.
- [6] 庞市宾, 吴发宝, 刘晓燕, 等. 毛菊苣提取物对四氯化碳诱导大鼠肝纤维化的防治作用 [J]. 药物评价研究, 2013, 36(6): 418-421.
- [7] Roumeliotis T I, Halabalaki M, Alexi X, *et al.* Pharmacoproteomic study of the natural product ebenfuran III in DU-145 prostate cancer cells: the quantitative and temporal interrogation of chemically induced cell death at the protein level [J]. *J Proteome Res*, 2013, 12(4): 1591-1603.
- [8] 白晓苏, 任伟, 张素华. 血清蛋白组学的最新研究以及应用现状 [J]. 中国临床康复, 2005, 27(9): 150-152.
- [9] Mallick P, Kuster B. Proteomics: a pragmatic perspective [J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(7): 695-709.
- [10] Duan X Y, Zhao H P, Fan J G. Dynamic expression of hepatic thioredoxin mRNA in rats with non-alcoholic fatty liver disease [J]. *J Dig Dis*, 2010, 11(2): 94-100.
- [11] Shearn C T, Smathers R L, Backos D S, *et al.* Increased carbonylation of the lipid phosphatase TEN contributes to Akt2 activation in a murine model of early alcohol-induced steatosis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 65: 680-692.
- [12] 周程艳, 艾凌艳, 王美, 等. 杜仲多糖抗肝纤维化作用的实验研究 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 324-329.
- [13] Okuyama H, Nakamura H, Shimahara Y, *et al.* Overexpression of thioredoxin prevents thioacetamide-induced hepatic fibrosis in mice [J]. *J Hepatol*, 2005, 42(1): 117-123.
- [14] Fujii T, Fuchs B C, Yamada S, *et al.* Mouse model of carbon tetrachloride-induced liver fibrosis: histopathological changes and expression of CD133 and epidermal growth factor [J]. *BMC Gastroenterol*, 2010, 10: 79-80.
- [15] Anstee Q M, Goldin R D, Wright M, *et al.* Coagulation status modulates murine hepatic fibrogenesis: implications for the development of novel therapies [J]. *J Thromb Haemost*, 2008, 6(8): 1336-1343.
- [16] Grattagliano I, Palmieri V O, Portincasa P, *et al.* Long-term ursodeoxycholate improves circulating redox changes in primary biliary cirrhotic atients [J]. *Clin Biochem*, 2011, 44(17/18): 1400-1404.