

下瘀血汤干预肝硬化大鼠的蛋白质组学研究

丁赛丹¹, 陈必成¹, 刘艳⁴, 董千铜², 李中平³, 余震^{2*}

1. 温州医学院附属第一医院 外科实验室, 浙江 温州 325000

2. 温州医学院附属第一医院 普外科, 浙江 温州 325000

3. 上海中医药大学 健康营养研究室, 上海 201203

4. 上海交通大学附属瑞金医院 心内科/心血管研究所, 上海 200025

摘要: 目的 基于肝组织差异蛋白质组表达, 解析下瘀血汤对硫代乙酰胺诱导的肝硬化进展期大鼠的作用及其机制。方法 48只SD雄性大鼠中的18只作为对照组, 其余30只ip给予40 mg/mL的硫代乙酰胺水溶液200 mg/kg制备大鼠肝硬化模型, 每周2次, 连续8周; 于开始造模后第4周分别随机处死对照组和造模大鼠各6只, 进行药物干预前的动态观察。其余模型大鼠于开始造模后第5周首日随机分为模型组及下瘀血汤组, 下瘀血汤组大鼠ig给予下瘀血汤0.626 g/kg, 对照组和模型组大鼠ig生理盐水; 于第8周末处死大鼠, 双向凝胶电泳分离肝组织总蛋白, 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱分析鉴定部分差异表达蛋白; 蛋白质免疫印迹法检测层粘连蛋白受体(67LR)、DJ-1蛋白、Cu-Zn超氧化物歧化酶(Cu-Zn SOD)蛋白表达。结果 鉴定的18个蛋白中有5个氧化应激蛋白、5个与物质代谢相关的蛋白、4个细胞骨架蛋白、2个与炎症反应相关的蛋白、2个与增殖凋亡相关的蛋白; 验证的3个蛋白点(67LR、Cu-Zn SOD、DJ-1)与双向电泳分析结果基本一致。结论 过氧化损伤以及造成的物质代谢异常是硫代乙酰胺致大鼠肝硬化的重要病理环节, 提高机体内在的抗氧化能力及逐步恢复物质代谢能力是下瘀血汤逆转大鼠肝硬化的主要机制之一。

关键词: 下瘀血汤; 肝硬化; 蛋白质组学; 抗氧化; 物质代谢

中图分类号: R282.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)01-0131-08

Proteomic study of Xiayuxue Decoction on liver cirrhosis of rats

DING Sai-dan¹, CHEN Bi-cheng¹, LIU Yan⁴, DONG Qian-tong², LI Zhong-ping³, YU Zhen²

1. Laboratory of Surgery, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China

2. Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China

3. Research Center for Health and Nutrition, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

4. Institute of Cardiology/Cardiovascular Ruijin Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China

Key words: Xiayuxue Decoction; liver cirrhosis; proteomics; anti-oxidant; substance metabolism

肝纤维化是指肝脏纤维结缔组织的过度沉积, 细胞外基质合成和降解不平衡的病理变化, 是各种慢性肝病向肝硬化发展所共有的病理改变和必经途径。组织蛋白质组学分析可用于获得药物的作用模式以及治疗机制相关信息^[1-2]的研究。关于对乙酰氨基酚致肝硬化小鼠和CCl₄致肝硬化大鼠肝组织的蛋白质组学研究已见报道^[3-4]。下瘀血汤出自《金匮要略》, 由大黄、桃仁、地鳖虫组成, 具有活血逐瘀、攻坚破积之长, 故凡瘀血内行、瘀阻经络之证均可

因证施治, 适用于静止期肝硬化的肝血瘀阻症。下瘀血汤对肝硬化具有干预作用^[5-6], 但其具体机制尚不清楚。本实验拟通过对下瘀血汤干预硫代乙酰胺诱导的肝硬化大鼠的肝组织差异蛋白质组学研究, 探讨下瘀血汤抑制肝硬化的作用机制。

1 材料

1.1 动物

SD雄性大鼠, 清洁级, 体质量120~130 g, 购于中国科学院上海实验动物中心, 实验动物许可

收稿日期: 2011-07-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81070702, 81171857); 浙江省医学支撑学科项目(11-CZ24); 温州市科技计划项目(Y20110155)

作者简介: 丁赛丹(1982—), 女, 医学博士, 助理研究员, 研究方向为中医药治疗肝硬化的药理学机制。E-mail: firststdan@hotmail.com

*通讯作者 余震 E-mail: yuzhen0577@yahoo.com.cn

证号为 SCXK (沪) 2003-0002。

1.2 主要试剂与仪器

硫代乙酰胺, 分析纯, 上海凌峰化学试剂有限公司, 批号: 070301; 丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST)、 γ -谷氨酰转肽酶 (γ -GT)、血清总胆红素 (TBil)、白蛋白 (Alb)、总蛋白 (TP) 试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 二硫苏糖醇、碘乙酰胺、三羟甲基氨基甲烷、甘氨酸、十二烷基磺酸钠、24 cm 固相 pH 梯度干胶条, GE Healthcare 公司; 30% 丙烯酰胺溶液, BIO-RAD 公司; 兔抗大鼠层粘连蛋白受体 (相对分子质量 67 000, 67 LR)、DJ-1 蛋白、Cu-Zn 超氧化物歧化酶 (Cu-Zn SOD) 单克隆抗体, Abcam 公司; 小鼠抗大鼠 GAPDH 单克隆抗体, 上海建成生物工程有限公司; 荧光标记山羊抗兔、抗鼠二抗, 晶美生物技术公司; 蛋白印迹分析用蛋白标准品, Fermentus 公司。等电聚焦仪、垂直电泳槽, GE Healthcare 公司。

1.3 药物

下瘀血汤组方药材大黄、桃仁、地鳖虫均购自上海华宇药业有限公司, 由温州医学院药学院王学宝实验师鉴定。取大黄 2.0 kg、桃仁 2.0 kg、地鳖虫 1.2 kg 制成粗粉末; 加 8 倍量 20% 乙醇 (原方用黄酒, 含乙醇为 16.5%) 浸泡 1 h, 回流提取 2 次, 第 1 次加 20% 乙醇回流提取 30 min, 滤过取汁; 药渣再加 6 倍量 20% 乙醇回流提取 1 h, 滤过取汁, 合并 2 次提取液。回收乙醇, 流浸膏备用。真空干燥后冷藏保存^[7]。

2 方法

2.1 模型制备、分组和给药

48 只 SD 大鼠, 根据随机排列表完全随机选取 18 只作为对照组, 余下 30 只 ip 给予 40 mg/mL 硫代乙酰胺水溶液 200 mg/kg, 每周 2 次, 连续 8 周, 制备大鼠肝硬化模型^[8]。于造模第 4 周分别随机处死对照组、造模大鼠各 6 只, 作为药物干预前的动态观察。其余 24 只模型大鼠于开始造模后第 5 周首日随机分为模型组及下瘀血汤组, 每组 12 只, 下瘀血汤组 ig 给予下瘀血汤 (用蒸馏水 10 mL 稀释) 0.626 g/kg (相当于生药 3.2 g/kg, 为 65 kg 体质量成人临床用量的 8 倍)^[9], 给药体积 10 mL/kg, 对照组与模型组 ig 等体积生理盐水, 每日 1 次, 连续 3 周。

2.2 标本采集

对照组、造模大鼠于造模第 4 周末随机抽取 6 只、其余各组大鼠均于造模 8 周末处死: 所有大鼠

均 ip 戊巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉后打开腹腔, 观察肝脏的大体形态, 下腔静脉采血, 于肝右叶切取 1.0 cm \times 1.0 cm \times 1.0 cm 大小肝组织 2 块。血样 3 000 r/min 离心 30 min, 分离血清, -80 $^{\circ}$ C 保存; 切取的肝组织用 4% 中性福尔马林固定, 用于病理标本制备; 剩余肝组织分装, -80 $^{\circ}$ C 保存。

2.3 观测项目

2.3.1 肝功能检测 按肝功能检测试剂盒操作说明检测血清 ALT、AST、 γ -GT 活性及血清 TBil、Alb、TP 水平。

2.3.2 肝组织病理学观察 肝组织石蜡切片按常规方法行 HE 及天狼星红染色, 光学显微镜下 (\times 200) 观察肝组织的病理变化。

2.3.3 双向凝胶电泳检测大鼠肝组织总蛋白 肝组织蛋白质的提取: 将大鼠肝组织标本称质量后置研磨管, 加入组织裂解液, 室温条件下研磨、裂解 1 h, 离心, 吸取上清液即为肝组织总蛋白质。

第一向固相 pH 梯度等电聚焦参照 IPGphor 等电聚焦系统指南^[10]。将已定量的组织总蛋白质提取物与水化液 (8 mol/L 尿素、4% CHAPS、40 mmol/L Tris、40 mol/L DTT、0.5% IPG buffer pH 3~10、痕量溴酚蓝) 充分混合, 总体积 450 μ L。设置程序: 水化和聚焦均在 20 $^{\circ}$ C 下进行, 总电压时间积为 69 920 V \cdot h, 其中于 30 V 低电压水化 14 h, 然后经过 500 V、1 h, 1 000 V、1 h, 最后稳定在 8 000 V 下进行等电聚焦。平衡: 等电聚焦结束后, 迅速取出一向的 IPG 胶条先后置于 10 mL 平衡液 A (50 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8, 6 mol/L 尿素, 30% 甘油, 1% SDS, 0.2% DTT) 和 10 mL 平衡液 B (50 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8, 6 mol/L 尿素, 30% 甘油, 1% SDS, 3% 碘乙酰胺, 痕量溴酚蓝) 中, 在脱色摇床上振摇, 分别平衡 15 min。第二向垂直 SDS-PAGE 电泳: 将平衡后的胶条移至 0.75 mm 厚的 12.5% 均匀分离胶上端, 电泳至溴酚蓝离胶最底端约 1 mm 处停止电泳。胶体考马斯亮蓝染色: 按照 Candiano 等^[10]胶体考马斯亮蓝染色方法染色。

2.3.4 凝胶图像采集与分析 透射扫描凝胶获取图像后, 利用 Imagemaster 2D Platinum 6.0 软件对图像蛋白质斑点自动检测, 匹配, 筛选出在两种组织中差异水平相差 2 倍以上的 50 个蛋白质。

2.3.5 质谱样品制备及质谱分析 切取差异蛋白质点, 脱色、还原、烷基化、酶解、样品回收及脱盐处理, 然后在 Voyage-DE STR 4700 基质辅助激光解

吸电离飞行时间串联质谱 (MALDI-TOF/TOF-MS) 仪上分析。

2.3.6 数据库查询 选择 Mascot 数据库, 搜索条件设置肽片段质量最大误差控制在 $\pm 1 \times 10^{-4}$, 酶切断裂位点允许值为 1。

2.3.7 差异蛋白的表达 大鼠肝脏组织样品于匀浆器匀浆, 分别提取总蛋白, 100 °C 变性 5 min, 12% SDS-PAGE 电泳, 结束后半干转至 NC 膜。摇床上封闭 1 h, 杂交一抗, 4 °C 过夜, 洗膜。杂交二抗, 室温摇床上 45 min, 洗膜。用 ECL 发光剂浸膜 3 min, 取出后置曝光匣中曝光。扫描曝光片后, 应用复日 FR-200 生物电泳图像分析系统分析底片的目的条带。

2.4 统计学方法

计量资料采用统计分析软件 SPSS12.0 中的 ANOVA 程序进行单因素方差分析, *q* 检验, 并用 LSD 进行两两比较。

3 结果

3.1 对肝硬化模型大鼠肝功能的影响

与对照组比较, 模型组大鼠血清 ALT、AST、 γ -GT 活性显著增强 ($P < 0.05$), Tbil 水平显著升高 ($P < 0.05$), Alb 水平显著降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 下瘀血汤组大鼠血清 ALT、AST、 γ -GT 活性以及 Tbil 水平均显著降低 ($P < 0.05$), Alb 水平显著升高 ($P < 0.05$)。结果见表 1。

表 1 下瘀血汤对肝硬化模型大鼠血清中肝功能指标的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of Xiayuxue Decoction on liver function indices in serum of rats with liver cirrhosis ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物 / 只	ALT / (U·L ⁻¹)	AST / (U·L ⁻¹)	γ -GT / (U·L ⁻¹)	Tbil / (μ mol·L ⁻¹)	Alb / (g·L ⁻¹)	TP / (g·L ⁻¹)
对照	18	21.32 ± 3.20	30.88 ± 4.50	21.70 ± 2.40	12.55 ± 1.22	33.02 ± 3.20	61.75 ± 2.42*
模型 4 周	6	43.60 ± 5.50*	49.50 ± 7.60*	31.99 ± 4.60*	21.67 ± 2.50*	28.50 ± 2.70*	52.14 ± 3.35 [△]
8 周	12	70.30 ± 6.70* [△]	89.70 ± 14.56* [△]	55.90 ± 6.80* [△]	26.89 ± 1.60* [△]	23.99 ± 3.50* [△]	46.17 ± 4.24
下瘀血汤(0.626 g·kg ⁻¹)	12	40.02 ± 4.60 [▲]	46.90 ± 6.80 [▲]	28.44 ± 4.50 [▲]	18.89 ± 3.50 [▲]	31.08 ± 4.20 [▲]	54.09 ± 4.40 ^{▲▲}

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组造模 4 周比较: [△] $P < 0.05$; 与模型组造模 8 周比较: [▲] $P < 0.05$

^{▲▲} $P < 0.05$ vs control group; [△] $P < 0.05$ vs model group after four weeks modeling; [▲] $P < 0.05$ vs model group after eight weeks modeling

3.2 对肝硬化模型大鼠肝组织病理学的影响

大鼠正常肝组织仅在汇管区和中央静脉壁见少量胶原纤维。模型组大鼠造模 4 周, 胶原纤维广泛增生并自汇管区向小叶内伸展, 形成部分菲薄的不完全间隔; 造模 8 周时增生的胶原纤维分割肝小叶形成较粗大、致密的完全间隔, 正常肝小叶结构消失, 个别形成不完整假小叶。下瘀血汤给药组大鼠纤维组织增生明显减轻, 纤维间隔变窄、疏松, 多为不完全间隔。结果见图 1、2。

3.3 大鼠肝组织蛋白凝胶图谱分析

从每组胶中筛选出分辨率、重复性均较高的肝组织 2-DE 图谱 3 张, 进行图像分析。以对照组拟

合胶为参考胶。结果显示, 对照组胶蛋白点为 1 008 个; 造模 4、8 周后检测到模型组蛋白点数分别为 1 019、1 111 个; 下瘀血汤组检测到 1 123 个。造模 4 和 8 周后的模型组、下瘀血汤组 2-DE 胶与参考胶匹配率分别为 89.34%、84.55%、87.67%。各组大鼠从肝组织分离的蛋白质点双向凝胶图谱见图 3。

3.4 大鼠肝组织蛋白质谱鉴定

根据 2D 凝胶图谱分析软件 Image Master 2D Platinum 6.0 检测、分析得出的匹配蛋白质点平均表达量的比值分析差异度, 选取模型组大鼠造模 8 周时有差异蛋白表达 (与对照组相比, 差异度在 1.2 倍以上), 且下瘀血汤组有差异表达的 18 个蛋白点

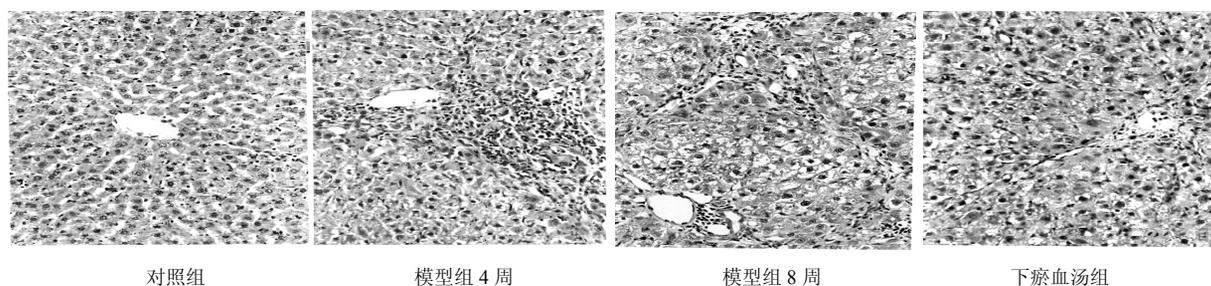


图 1 大鼠肝组织病理学观察 (HE 染色)

Fig. 1 Pathological observation in liver tissues of rats (HE staining)

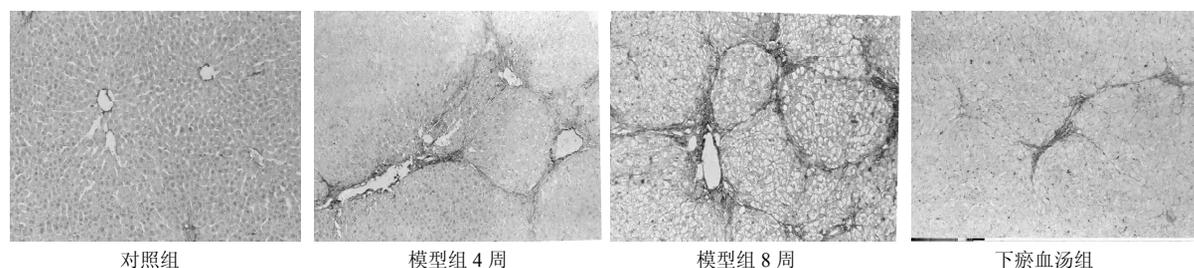


图 2 大鼠肝组织病理学观察 (天狼星红染色)

Fig. 2 Pathological observation in liver tissues of rats (Sirius red staining)

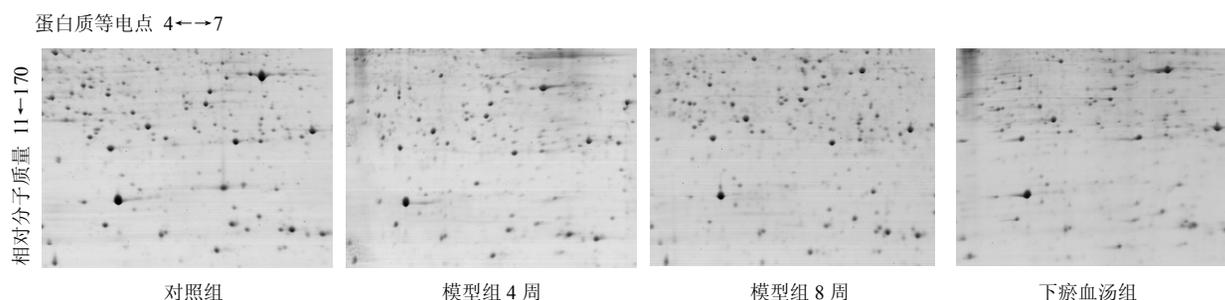


图 3 大鼠肝组织蛋白表达双向凝胶图谱

Fig. 3 2-DE maps of protein expressions in liver tissues of rats

(与模型组大鼠造模 8 周相比, 差异度在 1.2 倍以上), 进行质谱鉴定。通过生物信息学检索相关蛋白质功能, 鉴定其中 5 个为氧化应激蛋白、4 个细胞骨架蛋白、5 个与物质代谢相关的蛋白、2 个与炎症反应相关的蛋白、2 个与增殖凋亡相关的蛋白。结果见表 2 和图 4。与对照组相比, 模型组大鼠亮氨酸氨基肽酶、谷胱甘肽合成酶、Cu-Zn SOD、DJ-1 蛋白表达下降, 下瘀血汤组 DJ-1 蛋白表达有所上升; 与对照组相比, 模型组大鼠 γ -actin、67 LR、角蛋白 18、果糖-1, 6-二磷酸酶 1、半乳糖激酶 1 大鼠表达上升, 而这些蛋白在下瘀血汤组大鼠中表达有所下降。

3.5 对肝硬化相关蛋白表达量的影响

3.5.1 对 67 LR 蛋白表达的影响 与对照组大鼠相比, 模型组大鼠在造模 4 周和 8 周时 67LR 蛋白表达显著上调 ($P < 0.01$); 与模型组造模 8 周时相比, 下瘀血汤组 67 LR 蛋白表达显著下调 ($P < 0.01$)。结果见图 5 和 6。

3.5.2 对 DJ-1 蛋白表达的影响 与对照组大鼠相比, 模型组大鼠在造模 4 周和 8 周时 DJ-1 蛋白表达显著下调 ($P < 0.01$); 与模型组造模 8 周时相比, 下瘀血汤组 DJ-1 蛋白表达显著上调 ($P < 0.05$)。结果见图 5 和 6。

3.5.3 对 Cu-Zn SOD 蛋白表达的影响 与对照组

大鼠相比, 模型组大鼠在造模 4 周和 8 周时 Cu-Zn SOD 蛋白表达显著下调 ($P < 0.01$); 与模型组造模 8 周时相比, 下瘀血汤组 Cu-Zn SOD 蛋白表达显著上调 ($P < 0.01$)。结果见图 5 和 6。

4 讨论

本实验结果显示, 与对照组相比, 肝硬化模型组大鼠肝组织中鉴定出 18 个差异蛋白质点, 其中 10 个蛋白点表达上升, 8 个蛋白点表达下降。经鉴定有 5 个氧化应激蛋白、5 个与物质代谢相关的蛋白、4 个细胞骨架蛋白、2 个与炎症反应相关的蛋白、2 个与细胞增殖、凋亡相关的蛋白。氧化应激蛋白有: 血红素加氧酶 1、过氧化还原蛋白 6、DJ-1 蛋白、Cu-Zn SOD、谷胱甘肽合成酶; 与物质代谢相关的蛋白有: 果糖-1, 6-二磷酸酶 1、半乳糖激酶 1、亮氨酸氨基肽酶 3、过氯酸可溶性蛋白; 细胞骨架蛋白有: 67 LR、 γ -actin、角蛋白 18、波形蛋白; 炎症相关蛋白有: 触珠蛋白、高迁移组蛋白; 细胞增殖与凋亡相关蛋白有: 磷脂酰乙醇胺结合蛋白、Caspases-12。提示肝纤维化的发生、发展与氧化应激及物质代谢密切相关^[11]。DJ-1 蛋白与肿瘤的生成有关, 参与细胞应激反应, 是一个强有力的抗氧化剂^[12]。内源性 DJ-1 蛋白的下调可加强氧化应激对神经元的损伤^[13]。DJ-1 保护细胞对抗缺氧诱导的细胞死亡, 对癌细胞的存活起重要作用。SOD 广

表 2 蛋白质质谱鉴定结果
Table 2 MS identification of proteins

登录号	蛋白质	相对分子质量 / 等电点	细胞定位	功能	表达
P06762	血红素加氧酶-1	33 006/6.09	微粒体、内质网	血红素降解成胆红素的限速酶	-
O35244	过氧化物还原酶 6	24 819/5.64	细胞质、溶酶体	分解过氧化氢及有机过氧化物	-
O88767	DJ-1 蛋白	20 190/6.32	细胞质、细胞核	在受精过程中发挥作用	-
P07632	Cu-Zn SOD	16 177/5.74	细胞质	催化过氧化物生成过氧化氢和分子氧, 参与氧化应激	-
P46413	谷胱甘肽合成酶	52 597/5.48		催化谷氨酰基半胱氨酸与甘氨酸合成谷胱甘肽	-
P38983	67 LR	32 917/4.8	细胞膜、细胞质、细胞核	参与肠上皮细胞发育和分化	+
P63259	γ-actin	42 108/5.31	细胞骨架	参与细胞迁移, 广泛表达在真核细胞中	+
Q5BJY9	细胞角蛋白 8	52 677.6/5.49	核基质、细胞质	参与白介素-6 介导的屏障保护	+
P31000	波形蛋白	53733/5.06	核基质	III 型中间丝, 在间叶细胞等非上皮细胞中表达	+
Q68FS4	亮氨酸氨基肽酶 3	56 514/6.77	细胞质	切下多肽 N 端氨基酸	-
P19112	果糖-1, 6-二磷酸脂酶 1	40 040/5.54		在糖原异生中催化果糖-1, 6 二磷酸水解	+
Q5RKH2	半乳糖激酶 1	42 806/5.24		在半乳糖代谢中催化 ATP 和 D-半乳糖生成 ADP 和 D-半乳糖-1-磷酸	+
Q5U2N3	磷脂酰肌醇转移蛋白 1	13 4984/5.64	细胞质、高尔基体	参与细胞骨架重塑, 完成胞质分裂, 维持高尔基体的甘油二酯水平	-
P52759	高氯酸可溶性蛋白	14 303/7.8	线粒体	内切核糖核酸酶, 通过切断 mRNA 抑制翻译	+
P06866	触珠蛋白	38 563/6.1	分泌蛋白	与血红素结合, 防止铁经肾脏代谢而丢失	+
P63159	高迁移组蛋白 1	24 894/5.62	细胞质、染色体	肝素结合蛋白, 促进神经突分支并生长	+
P31044	磷脂酰乙醇胺结合蛋白 1	14 857/5.14	细胞质、细胞膜	丝氨酸蛋白酶抑制剂, 抑制凝血酶、糜蛋白酶、前溶酶原激活物、弹性蛋白酶活性	+
Q920D5	Caspases-12	47 837/5.55		参与 Caspases 活化级联反应, 负责执行细胞凋亡过程	-

登录号: 相应蛋白在 EXPASY 数据库中对应的编号; +: 模型组造模 8 周蛋白表达量上调, 与对照组的比例 > 1.2; -: 模型组造模 8 周蛋白表达量下调, 与对照组的比例 > 1.2

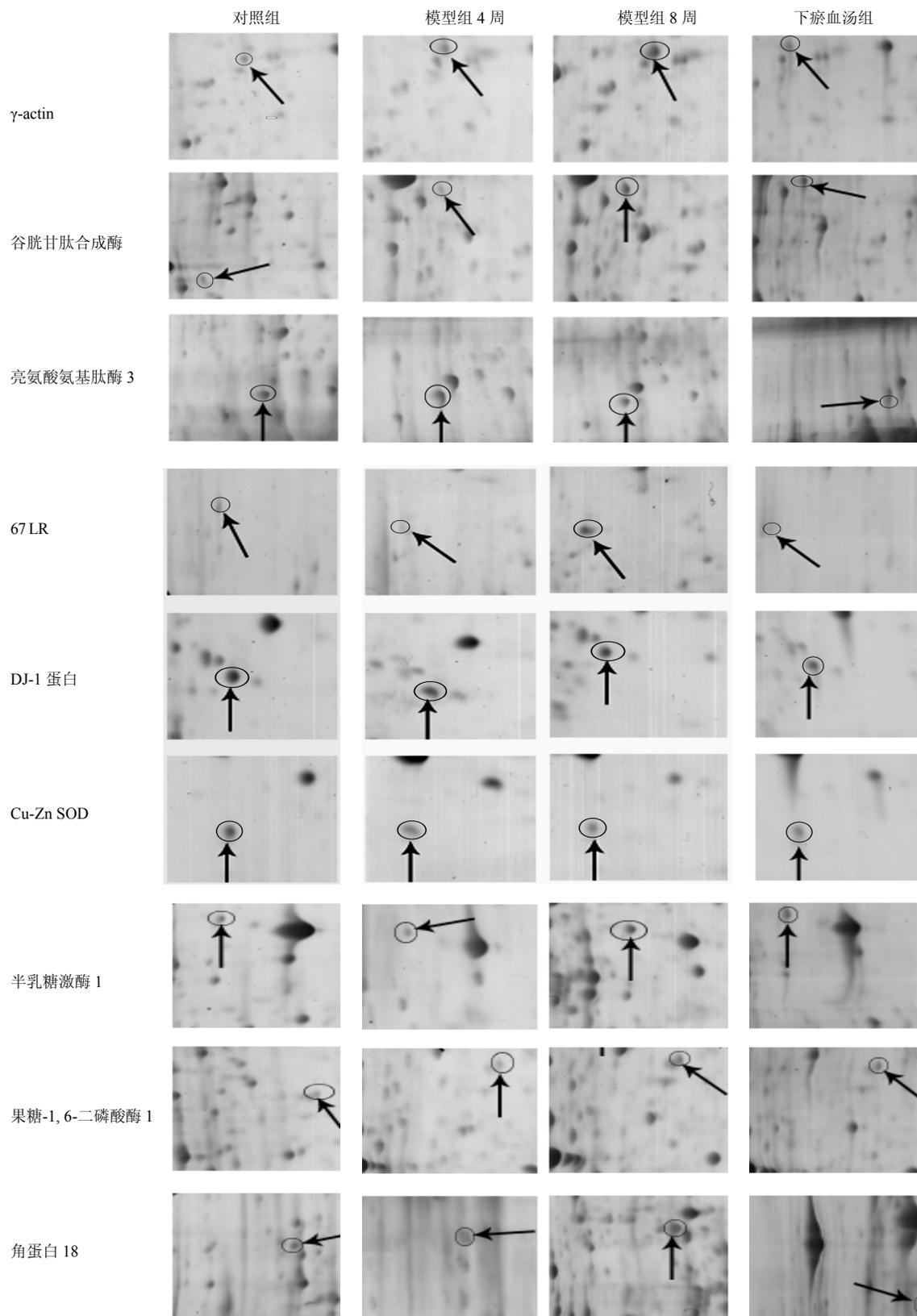
Registration number: corresponding number in EXPASY database; +: up-regulation of model group after eight weeks modeling, ration > 1.2 vs control group; -: down-regulation of model group after eight weeks modeling, ratio > 1.2 vs control group

泛存在于生物体有氧代谢的细胞内, 能将具有高度反应活性的超氧阴离子歧化为分子氧和 H₂O₂^[14]。Cu-Zn SOD 是 SOD 中量最多 (90%) 的一种, 该酶在肝细胞活性最强, 在肾上腺及红细胞的量次之。迄今为止发现的 SOD 按金属辅基不同分为 3 种类型, 即 Cu-Zn SOD、Mn SOD、Fe SOD。

本研究发现, 与对照组相比, 在造模 8 周时模型组大鼠肝组织与氧化应激相关的蛋白血红素加氧酶 1、过氧化物还原酶 6、DJ-1 蛋白、Cu-Zn SOD、谷胱甘肽合成酶表达均上调。这些蛋白生成的减少可能导致活性氧 (ROS) 被清除的速率减慢, 而生成增多, 造成活性氧的蓄积, ROS 直接或间接作用

于肝细胞, 改变其细胞膜和亚细胞器的结构使其变性、坏死进而造成肝细胞损伤、坏死、凋亡及肝组织炎症反应, 产生大量的炎症介质及细胞因子, 导致肝纤维化乃至肝硬化。

与对照组相比, 在造模 8 周时, 模型组大鼠肝组织与糖类代谢相关的蛋白果糖-1, 6-二磷酸酶 1、半乳糖激酶 1 表达上调, 而与脂质转运相关的蛋白磷脂酰肌醇转移蛋白 1 表达下调, 提示葡萄糖高度合成, 表明肝纤维化期肝细胞被激活以供能, 代偿性减缓大量肝细胞损伤所致的肝脏功能减弱。提示肝脏血液中脂质转运受阻, 脂肪在肝脏内蓄积, 一同参与肝硬化的形成。



箭头所指的蛋白点表示不同组别中的某一蛋白的差异表达
Arrows show protein differential expression in different groups

图 4 下瘀血汤对肝硬化模型大鼠肝组织中相关蛋白表达的影响

Fig. 4 Effects of Xiyuxue Decoction on related proteins expression in rats with liver cirrhosis

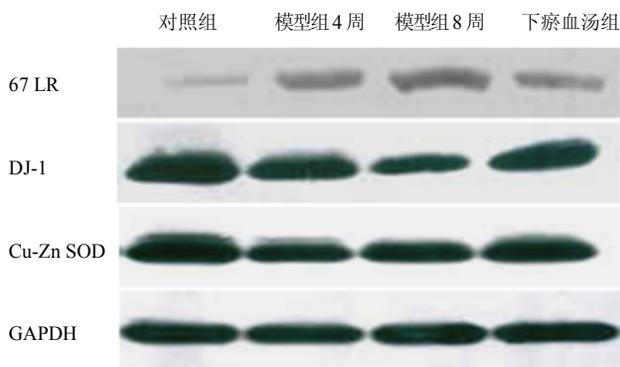
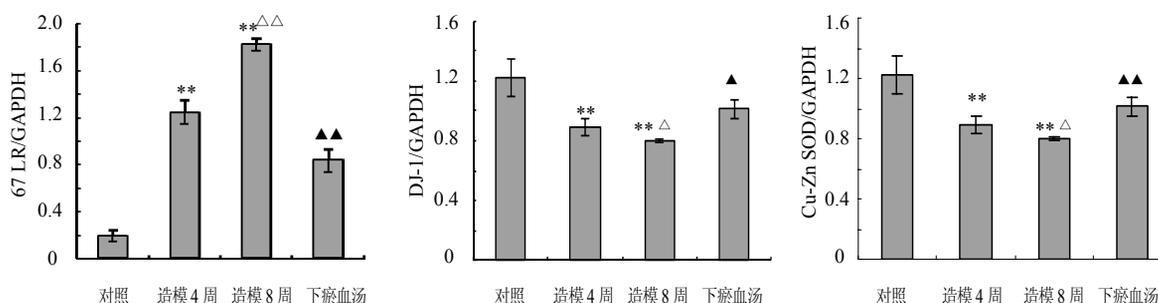


图 5 大鼠肝组织部分差异蛋白的局部 2D 放大图

Fig. 5 Partial 2D images of liver differential proteins in rats



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组造模 4 周比较: $\triangle P < 0.05$ $\triangle\triangle P < 0.01$; 与模型组造模 8 周比较: $\blacktriangle P < 0.05$ $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$
 ** $P < 0.01$ vs control group; $\triangle P < 0.05$ $\triangle\triangle P < 0.01$ vs model group after four weeks modeling;
 $\blacktriangle P < 0.05$ $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ vs model group after eight weeks modeling

图 6 下瘀血汤对肝硬化模型大鼠肝组织中 67 LR、DJ-1、Cu-Zn SOD 蛋白表达的影响

Fig. 6 Effects of Xiyuxue Decoction on 67 LR, DJ-1, and Cu-Zn SOD protein expression in rats with liver cirrhosis

综上所述, 过氧化损伤继而物质代谢紊乱是硫代乙酰胺致大鼠肝硬化发生、发展的重要病理环节, 提高肝组织抗氧化应激相关蛋白的表达, 继而恢复物质代谢相关蛋白的表达可能是下瘀血汤有效治疗硫代乙酰胺所致大鼠肝硬化的主要作用机制。

参考文献

[1] Anderson N L, Esquer-Blasco R, Richardson F, et al. The effects of peroxisome proliferators on protein abundances in mouse liver [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1996, 137(1): 75-89.
 [2] Arce A, Aicher L, Wahl D, et al. Changes in the liver protein pattern of female Wistar rats treated with the hypoglycemic agent SDZ PGU 693 [J]. *Life Sci*, 1998, 63: 2243-2250.
 [3] Fountoulakis M, Berndt P, Boelsterli U A, et al. Two-dimensional database of mouse liver proteins:

与对照组相比, 模型组大鼠肝组织催化多肽水解的亮氨酸氨基肽酶 3 表达下调, 提示肝脏功能在下降; 抑制蛋白质合成的过氯酸可溶性蛋白表达上调, 表明蛋白质合成被抑制、异常蛋白质在细胞内蓄积、蛋白功能消失, 最终细胞功能逐渐丧失, 坏死, 促进纤维化进程。与模型组大鼠造模 8 周相比, 下瘀血汤组 5 个氧化应激蛋白表达上调, 2 个糖类代谢相关的蛋白表达下调, 与脂质转运相关的蛋白磷脂酰肌醇转移蛋白 1 表达上调, 催化多肽水解的亮氨酸氨基肽酶 3 表达上调, 抑制蛋白质合成的过氯酸可溶性蛋白表达下调, 充分显现出下瘀血汤在提高抗氧化应激、继而恢复物质代谢异常方面的优势。

changes in hepatic protein levels following treatment with acetaminophen or its nontoxic regioisomer 3-acetamidophenol [J]. *Electrophoresis*, 2000, 21: 2148-2161.

[4] Fountoulakis M, de Vera M C, Crameri F, et al. Modulation of gene and protein expression by carbon tetrachloride in the rat liver [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2002, 183: 71-80.
 [5] 常 城, 朱尤庆, 吴 菁. 下瘀血汤抗大鼠肝纤维化的作用及其机制 [J]. *医学新知杂志*, 2007, 17(4): 210-212.
 [6] 钦丹萍, 蒋挺英, 任永葆. 下瘀血汤对实验性肝硬化及其脂质过氧化反应干预研究 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2003, 10(3): 25-27.
 [7] 都广礼, 刘 平, 王 磊, 等. 下瘀血汤抗猪血清免疫性肝纤维化方证相关的药效学研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2007, 13(6): 30-33.
 [8] Fitzhugh O G, Nilsson A. Liver tumours in rats fed thiourea or thioacetamide [J]. *Science*, 1948, 108(5):

- 626-628.
- [9] 慕永平, 刘平, 刘莺, 等. 下瘀血汤对进展期大鼠肝纤维化的抑制作用及其方证探讨 [J]. 中医杂志, 2006, 47(3): 215-218.
- [10] Candiano G, Bruschi M, Musante L, *et al.* Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis [J]. *Electrophoresis*, 2004, 25(9): 1327-1333.
- [11] Schwabe R F, Brenner D A. Mechanisms of liver injury. I. TNF-alpha-induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006, 290(4): G583-G589.
- [12] Bandopadhyay R, Kingsbury A E, Cokson M R, *et al.* The expression of DJ-1 (PARK7) in normal human CNS and idiopathic Parkinson's disease [J]. *Brain*, 2004, 127: 420-430.
- [13] Andres-Mateos E, Perier C, Zhang L, *et al.* DJ-1 gene deletion reveals that DJ-1 is an atypical peroxiredoxin-like peroxidase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(37): 14807-14812.
- [14] Bostwick D G, Alexander E E, Singh R, *et al.* Antioxidant enzyme expression and reactive oxygen species damage in prostatic intraepithelial neoplasia and cancer [J]. *Cancer*, 2000, 89(1): 123-124.

欢迎订阅《中草药》杂志 1996—2009 年增刊

为了扩大学术交流, 提高新药研究水平, 经国家新闻出版主管部门批准, 我部从1996年起, 每年出版增刊一册。

1996年增刊: 特邀了国内知名专家就中药新药研究的方向、法规及如何与国际接轨等热点问题撰文阐述。

1997年增刊: 包括紫杉醇的化学成分、提取工艺及组织培养等方面的科研论文, 并特邀国内从事紫杉醇研究的知名专家撰写综述文章, 充分反映了紫杉醇研究方面的新成果、新进展和新动态。

1998年增刊: 以当今国际研究的热点银杏叶为专论重点, 包括银杏叶的化学成分、提取工艺、质量控制、药理作用及临床应用等方面, 充分反映了国内银杏叶开发研究方面的新成果、新进展和新动态。

1999年增刊: 为“庆祝《中草药》杂志创刊30周年”会议论文集, 特邀中国工程院院士、国家药品监督管理局药品评审中心及知名专家就中药新药研究热点问题撰写了综述文章。

2000年增刊: 以“中药新理论、新剂型、新工艺和新技术”为主要内容。

2001年增刊: 特邀了中国工程院院士、专家就加快中药现代化的进程, 我国入世后中药产业的发展新对策及西部药用植物资源的保护、开发和利用等撰写综述文章。

2002年增刊: 以“中药现代化”和“中药指纹图谱”为主要内容。

2003—2008年增刊: 包括中药创新药物开发的思路和方法、中药现代化研究、中药知识产权保护、中药专利的申请及中药走向国际等热点内容。

2009年增刊: 为庆祝“《中草药》杂志创刊40周年”和“《中草药》英文版 (*Chinese Herbal Medicines*, CHM) 创刊”, 以中药创新药物开发的思路和方法、活性天然产物的发现及其作用机制研究、中药代谢组学研究、生药学研究、中药的安全性评价和不良反应监控、中药新药审评法规的最新进展、中药知识产权保护和专利的申请、民族药研究为主要内容; 学术水平高, 内容丰富, 信息量大。

以上各卷增刊选题广泛、内容新颖、学术水平高、科学性强, 欢迎广大读者订阅。以上增刊为我部自办发行, 邮局订阅《中草药》不含增刊, 但能提供订阅凭证者, 购买增刊7折优惠, 款到寄刊。

地址: 天津市南开区鞍山西道308号

邮编: 300193

网址: www.tiprpress.com; www.中草药杂志社.中国

电话: (022)27474913 23006821

传真: (022)23006821

E-mail: zcy@tiprpress.com

《中草药》杂志编辑部