

• 药理与临床 •

温热中药对寒证模型大鼠肝线粒体蛋白质组的影响

李毅, 杨贞, 许健, 唐利华, 沃兴德, 卢德赵*

浙江中医药大学生命科学学院, 浙江 杭州 310053

摘要: **目的** 应用双向电泳和质谱技术研究温热中药对寒证模型大鼠肝线粒体蛋白质组的影响, 阐述寒证与能量代谢的关系及温热中药的作用。 **方法** 提取正常大鼠、寒证模型大鼠和温热中药治疗后大鼠的肝线粒体蛋白质, 经双向电泳分离后获得蛋白质组图谱, 用 Image Master 2D 6.0 软件进行差异蛋白质分析, 筛选出差异蛋白, 进行质谱鉴定, 用 Western blotting 法验证差异蛋白的表达。 **结果** 寒证大鼠肝线粒体中 H⁺转运 ATP 合酶、电压依从性阴离子选择性通道蛋白 1 (VDAC) 表达量增加, 伴侣素 groEL、丝氨酸蛋白酶抑制剂、Tu 转运延伸因子、乙醛脱氢酶、二甲基甘氨酸脱氢酶、脂酰辅酶 A 脱氢酶、热休克蛋白 60、酰基辅酶 A 脱氢酶、丝氨酸蛋白酶、电子传递黄素蛋白、腺苷酸激酶、DJ-1 蛋白、羧酸酯水解酶、氨甲酰磷酸合成酶 1 表达量降低; 应用温热中药治疗后 F1-ATP 合酶、H⁺转运 ATP 合酶表达量降低, 丙酰辅酶 A 羧化酶、二氢硫辛酰胺支链酰基转移酶、Tu 转运延伸因子、乙酰辅酶 A 酰基转移酶、脂酰辅酶 A 脱氢酶、丝氨酸蛋白酶、丙酮酸脱氢酶、3-巯基丙酮酸硫基转移酶、40 S 核糖体蛋白、热休克蛋白 1、烯酰辅酶 A 水解酶表达量增加。 **结论** 寒证模型大鼠线粒体内脂肪酸的 β -氧化受阻, 蛋白质的合成、折叠及分泌障碍, 类固醇激素减少影响糖代谢, 导致能量不足。应用温热中药治疗后, 糖、脂代谢增强、蛋白质合成增加导致能量代谢活跃。

关键词: 寒证; 温热中药; 线粒体; 蛋白质组; 能量代谢

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2014)03-0373-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.03.014

Effects of warm and heat Chinese herbs on liver mitochondria proteome of model rats with cold syndrome

LI Yi, YANG Zhen, XU Jian, TANG Li-hua, WO Xing-de, LU De-zhao

College of Life Science, Zhejiang College of Traditional Chinese medicines, Hangzhou 310053, china

Abstract: Objective The technologies of bidirectional electrophoresis and mass spectrum were used to study the effects of warm and heat Chinese herbs (WHCH) on the liver mitochondria proteome of rats with cold syndrome. **Methods** The mitochondrial proteins from the normal rats, the rats with cold syndrome, and the rats treated with WHCH were separated with the bidirectional electrophoresis and the difference proteins were analyzed with Image Master 2D 6.0 software. MALDI-TOF MS and Western blotting were used to identify and verify the expression of difference proteins, respectively. **Results** In the rats with cold syndrome, the expression of ATP synthase and voltage-dependent anion-selective channel protein 1 increased, while the expression of chaperonin gro EL, serine protease inhibitor, translation elongation factor Tu, aldehyde dehydrogenase, dimethylglycine dehydrogenase, fatty acyl-coenzyme A (CoA) dehydrogenase, heat shock protein (HSP) 60, acyl-CoA dehydrogenase, serine protease, electron transfer flavoprotein, adenylate kinase, DJ-1 protein, carboxylic ester hydrolase, carbamoyl-phosphate synthetase 1 decreased. After the rats with cold syndrome were treated with WHCH, the expression of F1-ATPase and H⁺ transporting ATP synthase decreased, while the expression of propionyl-CoA carboxylase, dihydrolipoamide branched chain transacylase, translation elongation factor Tu, acetyl-CoA acyltransferase, fatty acyl-CoA dehydrogenase, serine protease, pyruvate dehydrogenase, 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase, 40S ribosomal protein, HSP 1, enoyl CoA hydratase increased. **Conclusion** Energy deficiency appears in the rats with cold syndrome because of the β -oxidation block of fatty acid, protein synthesis, folding and secretion disorder, and steroid hormones decreasing in mitochondria of rats. After the rats with cold syndrome are treated with WHCH, the glucometabolism, lipid metabolism, and protein synthesis could be increased so as to make the energy metabolism active.

Key words: cold syndrome; warm and heat Chinese herbs; mitochondria; proteome; energy metabolism

收稿日期: 2013-07-29

基金项目: 浙江省中医药管理局资助项目 (2007CB139)

*通信作者 卢德赵 Tel: (0571)86613626 E-mail: ludezhao@126.com

寒证是阴邪易致肌体阴气偏盛而阳气受损，或是阳气虚衰而阴寒内盛所表现的证候。临床表现为畏寒喜暖、肢冷蜷卧、口淡不渴、小便清长、大便稀溏等。其病因多由感受寒邪或过食生冷寒凉之品，内伤久病，阳气耗伤，阴邪内盛所引起，因而常用寒凉药喂饲的方法建立虚寒证动物模型。结合寒证临床及模型动物的表现，发现能量代谢低下是寒证的一个明显特征^[1]。肝脏是物质代谢的重要器官，其中线粒体是与物质代谢和能量代谢相关最重要的细胞器，它可以通过生物氧化为细胞的各项生命活动提供能量。本实验采用寒性中药喂饲大鼠造成寒证模型，并用温热中药进行实验性治疗，应用双向电泳和质谱技术对寒证模型大鼠及温热中药治疗后大鼠肝线粒体蛋白组进行分析，筛选与寒证相关的蛋白质，从线粒体蛋白质组角度阐述中医寒证能量代谢障碍的内在物质基础及温热中药的作用机制，进而指导中医的临床诊断与治疗。

1 材料

1.1 药物制备

所用中药均购自杭州方回春堂药店，由浙江中医药大学生命科学院洪行球主任药师鉴定。寒凉中药煎剂按黄芩 15 g、黄连 15 g、黄柏 15 g 混合，常规水煎 2 次，合并煎液，浓缩至生药 1 g/mL；温热中药煎剂按附子 15 g、干姜 15 g、肉桂 15 g 混合，煎法同寒凉中药，浓缩至生药 1 g/mL，冰箱内保存待用。

1.2 实验动物

Wistar 雄性大鼠 18 只，体质量 180~220 g，购自上海斯莱克实验动物有限公司，合格证号 SCXK(沪) 2007-0098，饲养于浙江大学动物中心。

1.3 主要试剂与仪器

尿素、甘氨酸、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、Tris、SDS、CHAPS、DTT、碘乙酰胺、固相 pH 干胶条 (24 cm, pH 3~10)、蛋白质定量试剂盒均为 GE healthcare 公司产品。EttanTM IPGphorTM 等电聚焦电泳仪，EttanTM DALTSix 垂直板电泳仪，Image Master 2D 6.0 凝胶分析软件，均为 GE Healthcare 公司产品。4800 Proteomics Analyzer 质谱仪为美国 AB 公司生产。

2 方法

2.1 分组及药物处理

18 只 Wistar 雄性大鼠，随机分为对照组、模型组和治疗组，对照组 ig 生理盐水，模型组和治疗组小鼠每天 ig 寒凉中药煎剂 20 g/kg^[2]，连续 21 d 后，

模型组不进行治疗，治疗组小鼠每天 ig 温热中药煎剂 20 g/kg，治疗 14 d 后与对照组及模型组大鼠同时处死取材。

2.2 代谢指标检测

处死前 1 d 将大鼠装入代谢笼 (每笼 1 只)，24 h 后分别测定 24 h 尿量、饮水量、饮食量、肛温及体质量。

2.3 动物血清激素指标的测定

动物处死前，采用眼眶后静脉丛取血法采血，每只 3~4 mL，分离血清，用双抗体夹心化学发光两步法测定三碘甲状腺原氨酸 (T3)、四碘甲状腺原氨酸 (T4)；用固相竞争化学发光酶免疫分析法测定睾酮。

2.4 大鼠肝线粒体蛋白制备

处死大鼠，用 0.25 mol/L 蔗糖冲洗肝脏 2 次，在 MSHE 缓冲液 (pH 7.4) 中匀浆后于 600×g 离心 5 min，上清再经 10 300×g 离心 10 min，取沉淀重悬于 5 mL 缓冲液中，加入 20 mL 含 30% Percoll 的纯化液中，于 95 000×g 离心 30 min，收集 1.052~1.075 g/mL 的悬液，去除 Percoll 后，用 150 mmol/L KCl 和 MSHE 缓冲液分别洗涤 2 次，沉淀加入适量裂解液冰上超声裂解，经 12 000×g 离心 30 min，取上清，蛋白质定量后-80 °C 保存备用。

2.5 双向凝胶电泳分析

将各组蛋白质样品和水化液混合后共 450 μL，制成第 1 向等电聚焦体系，上样于 pH 3~10 的预制胶条中。等电聚焦的参数：30 V，12 h；500 V，500 V·h；1 000 V，1 000 V·h；8 000 V，64 000 V·h。等电聚集后，胶条于含 1% DTT 和 4% 碘乙酰胺的平衡液中各平衡 15 min，转移到第 2 向已制好的 12.5% SDS-PAGE 凝胶上，用 0.5% 琼脂糖封顶，进行 SDS-PAGE 电泳，电泳的参数设定为 30 W，45 min；90 W，6 h。直到溴酚蓝染料迁移至胶的底部边缘，结束电泳^[2]。电泳结束后，SDS-PAGE 凝胶转移到染色盒里进行硝酸银染色。经 UMAX Image Scanner 凝胶扫描仪扫描获得的蛋白质组图谱，再用 Image Master 2D 6.0 图像分析软件进行差异蛋白质分析。

2.6 胶内酶解及质谱分析

制备胶硝酸银染色后切下差异蛋白质点，置于离心管中，经脱色处理用 100 μL 25 mmol/L NH₄HCO₃ 冲洗，剧烈振荡 8 min，弃去溶液后用乙腈脱水干燥，加入含 10 nmol/L DTT 的 25 mmol/L NH₄HCO₃ 100 μL，于 57 °C 还原 1 h，室温冷却，去

掉过量液体, 迅速加入 100 μL 25 mmol/L NH_4HCO_3 (含 55 mmol/L 碘乙酰胺), 室温放置 1 h, 使蛋白质烷基化, 反应后去除悬液, 加少量 100 mmol/L NH_4HCO_3 清洗 2 次, 100 μL 纯乙腈脱水后加入等体积的 100 mmol/L NH_4HCO_3 , 冻干。估计干胶体积, 加入 3 倍体积的 12.5 ng/ μL 胰蛋白酶, 35 $^\circ\text{C}$ 酶解过夜, 酶解后用 50 μL 45% H_2O -5% TFA-50% 乙腈萃取 2 次, 合并萃取液, 真空干燥后进行 MALDI-TOF-MS 检测, 得到肽质量指纹图谱, 通过 Mascot 数据搜索鉴定蛋白质^[3-4]。

2.7 Western blotting 法验证蛋白质表达

20 μg 蛋白样品与上样缓冲液按比例混合后煮沸 5 min, SDS-PAGE 电泳 80 V 恒压 3 h, WB 湿转 (0.45 μm 的 PVDF 膜) 200 mA 恒流 2 h, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, TBST 漂洗 3 次后分别加入相应一抗, 4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜, TBST 漂洗 3 次, 于 37 $^\circ\text{C}$ 和二抗反应 2 h, TBST 漂洗 3 次后进行 ECL 显色。用化学发光仪扫描成像, 以内参为对照, 计算各处理组目的蛋白的表达量。

2.8 数据统计

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 10.0 统计软件分

析数据, 两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 大鼠体征观察

与对照组比较, 寒凉中药喂饲大鼠 21 d 后, 大鼠出现毛脏毛枯、少动安静、怠倦乏力、精神萎靡、目光无神、身体消瘦等现象。用温热中药治疗 14 d 后治疗组大鼠各种症状均有明显改善。

3.2 大鼠代谢指标的变化

与对照组比较, 模型组大鼠尿量明显增多 ($P < 0.05$), 但肛温显著下降 ($P < 0.01$), 体质量增长缓慢 ($P < 0.01$), 饮食量和饮水量稍减但无显著差异 ($P > 0.05$); 寒证大鼠经温热中药治疗后, 大鼠尿量明显减少 ($P < 0.05$), 肛温明显升高 ($P < 0.05$), 体质量增长显著加快 ($P < 0.01$), 见表 1。

3.3 大鼠血清激素水平的变化

与对照组比较, 模型组大鼠血清 T3、T4 水平明显降低 ($P < 0.05$), 睾酮亦显著降低 ($P < 0.001$); 经温热中药治疗后, 大鼠血清 T3、T4 及睾酮水平有所回升, 但与模型组比较无显著差异 ($P > 0.05$), 见表 2。

表 1 各组大鼠代谢指标变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Changes of metabolic indexes of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	体质量增长值 / g	尿量 / mL	饮食量 / g	饮水量 / mL	肛温 / $^\circ\text{C}$
对照	35.33 \pm 3.14	9.50 \pm 1.52	14.58 \pm 2.17	20.08 \pm 2.33	38.13 \pm 0.24
模型	19.50 \pm 2.07**	13.58 \pm 2.78*	11.33 \pm 3.03	18.50 \pm 2.68	37.17 \pm 0.40**
治疗	27.67 \pm 3.01**	9.58 \pm 2.01*	13.83 \pm 2.40	19.50 \pm 1.79	37.88 \pm 0.34*

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

表 2 大鼠血清激素水平变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Changes of serum hormone levels of rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	T3 / (nmol·L ⁻¹)	T4 / (nmol·L ⁻¹)	睾酮 / (nmol·L ⁻¹)
对照	0.87 \pm 0.16	32.62 \pm 2.00	15.83 \pm 4.37
模型	0.70 \pm 0.11*	28.10 \pm 3.59*	10.16 \pm 2.36***
治疗	0.83 \pm 0.11	31.03 \pm 3.15	13.62 \pm 2.11

与对照组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs control group

3.4 双向电泳银染图谱

双向电泳结束后, 取出凝胶进行硝酸银染色, 经 UMAX ImageScanner 凝胶扫描仪扫描后获得不同组大鼠肝线粒体蛋白质组图谱, 图谱中蛋白质点分布均匀, 点与点之间分隔清楚, 可以用于差异蛋

白质组分析, 见图 1。

3.5 模型组与对照组大鼠的差异蛋白质组分析

用 Image Master 2D 6.0 图像分析软件对模型组和对照组大鼠肝线粒体蛋白质组进行比较分析, 结果显示, 对照组大鼠肝线粒体蛋白质组图谱中平均蛋白质点数为 970 个 ($n = 3$), 而模型组的平均蛋白质点数为 822 个 ($n = 3$)。两组比较, 如果蛋白质表达的量差异超过 2 倍 (增加或者降低), 并且 3 块胶中蛋白质表达量变化的趋势相一致, 则被认为该蛋白质表达差异是由疾病所引起, 而不是样品材料和操作过程所带来的误差。根据这个原则, 共找到 16 个差异蛋白。经基质辅助激光电离质谱进行检测, 其相关信息见表 3。

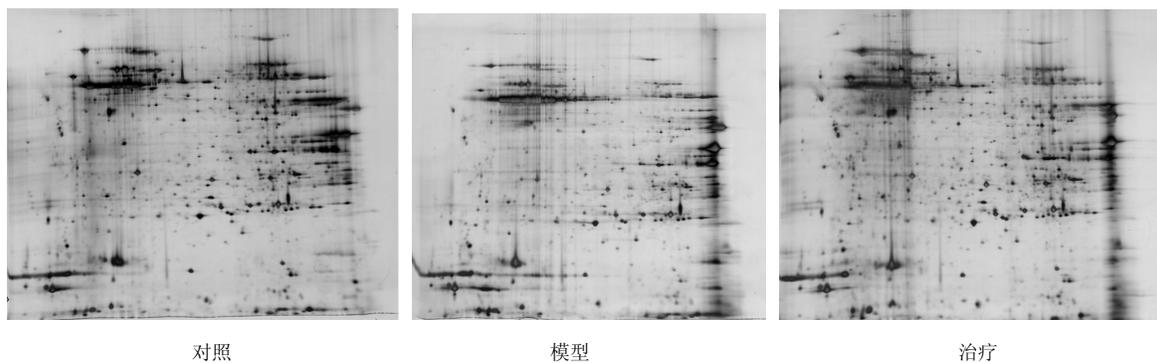


图 1 肝线粒体蛋白质组图谱 (pH 3~10、24 cm、NL)
Fig. 1 Proteomic maps of liver mitochondria (pH 3-10, 24 cm, NL)

表 3 模型组与对照组大鼠差异表达蛋白质的质谱鉴定信息

Table 3 MS information of differentially expressed protein between model and control groups

编号	蛋白质名称	相对分子质量	等电点	表达量变化 (模型组/对照组)
1	伴侣素 groEL 前体	60 903.4	5.91	-2.4↓
2	丝氨酸蛋白酶抑制剂	36 760.1	5.15	-2.0↓
3	Tu 转运延伸因子	49 477.0	7.23	-2.1↓
4	乙醛脱氢酶	7 924.5	8.25	-3.0↓
5	二甲基甘氨酸脱氢酶	95 917.4	6.77	-2.1↓
6	脂酰辅酶 A 脱氢酶	46 351.9	7.28	-2.3↓
7	热休克蛋白 60	60 940.4	6.35	-2.1↓
8	酰基辅酶 A 脱氢酶	44 737.0	8.47	-2.1↓
9	丝氨酸蛋白酶	49 064.0	9.51	-2.2↓
10	电子传递黄素蛋白	35 017.5	8.62	-2.4↓
11	腺苷酸激酶	25 187.3	7.79	-2.2↓
12	H ⁺ 转运 ATP 合酶	25 639.4	7.03	+2.2↑
13	电压依从性阴离子选择性通道蛋白 1	30 736.6	8.62	+2.4↑
14	DJ-1 蛋白	19 902.4	6.33	-2.0
15	羧酸酯水解酶	62 104.9	6.34	-2.5↓
16	氨甲酰磷酸合成酶 1	164 475.5	6.33	-3.0↓

↓表示模型组与对照组比较显著下调, ↑表示模型组与对照组比较显著上调

↓ indicates significant down-regulation in model group compared with control group, ↑ indicates significant up-regulation in model group compared with control group

3.6 模型组与治疗组大鼠的差异蛋白质组分析

用 Image Master 2D 6.0 图像分析软件对治疗组与模型组大鼠肝线粒体蛋白质组进行比较分析, 模型组的平均蛋白质点数为 822 (n=3), 治疗组的平均蛋白质点数为 1 099 (n=3), 按“3.5”项的原则共筛选出 13 个差异蛋白质, 其质谱鉴定的相关信息见表 4。

3.7 Western blotting 法验证

应用 Western blotting 技术检测 β-actin 和 ATP 合酶蛋白质的表达, 结果显示模型组大鼠 ATP 合酶表达量升高, 而用温热中药治疗后 ATP 合酶表达量降低, 此结果与双向电泳分析的结果一致。见图 2。

4 讨论

寒证是机体感受寒邪或阳气不足所表现的证

表 4 治疗组与模型组大鼠差异表达蛋白质的质谱鉴定信息

Table 4 MS information of differentially expressed protein between treatment and model groups

编号	蛋白质名称	相对分子质量	等电点	表达量变化 (治疗组/模型组)
1	丙酰辅酶 A 羧化酶	79 871.1	6.83	+2.9↑
2	二氢硫辛酰胺支链酰基转移酶	53 425.1	8.71	+3.7↑
3	Tu 转运延伸因子	47 192.6	7.65	+4.9↑
4	乙酰辅酶 A 酰基转移酶	41 844.4	8.09	+3.9↑
5	脂酰辅酶 A 脱氢酶	44 939.0	8.47	+4.1↑
6	丝氨酸蛋白酶 OMI	49 064.0	9.51	+3.9↑
7	丙酮酸脱氢酶	38 957.0	6.20	+4.7↑
8	3-巯基丙酮酸硫基转移酶	32 919.4	5.88	+2.2↑
9	40S 核糖体蛋白	28 840.7	5.24	+3.2↑
10	热休克蛋白 1	60 918.3	5.67	+2.0↑
11	F1-ATP 合酶 β -亚单位	38 747.1	5.07	-2.1↓
12	烯酰辅酶 A 水解酶	31 496.2	8.39	+3.7↑
13	H ⁺ 转运 ATP 合酶	25 639.4	7.03	-2.0↓

↓表示治疗组与模型组比较显著下调, ↑表示治疗组与模型组比较显著上调

↓ indicates significant down-regulation in treatment group compared with model group, ↑ indicates significant up-regulation in treatment group compared with model group

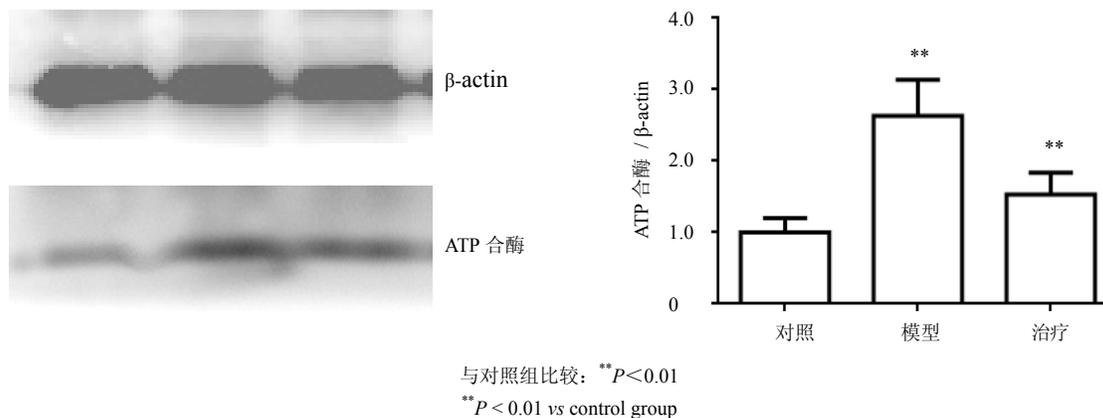


图 2 Western blotting 法验证 ATP 合酶的表达

Fig. 2 Expression of ATP synthase with Western blotting

候,所谓“阴盛则寒,阳虚则寒”,主证要点是畏寒、形寒肢冷。就中医理论而言,寒凉药易伤阳气,阳虚则寒,故此用公认的寒凉药制备寒症动物模型^[1],本实验用大苦大寒的清热中药黄芩、黄连、黄柏喂饲大鼠 21 d 后,大鼠出现毛脏、毛枯、精神萎靡、蜷缩、倦怠乏力、大便稀、小便清、体质量增长减慢,体温较低,食量减少等表现,血清 T3、T4 及睾酮水平均有不同程度降低;其症状及体征符合寒证的辩证诊断标准。采用辛热的温里中药附子、干姜、肉桂进行实验性治疗,14 d 后发现寒证大鼠的各种症状、体证明显得到改善,尿量减少,肛温升

高,饮水量和饮食量稍增加,体质量增长明显,血清 T3、T4 及睾酮均有不同程度的升高,说明温里药能够改善寒凉药引起的不良症状,能够治疗药物性引起的寒证。

为了进一步阐明中医寒证能量代谢障碍的内在物质基础及温热药的作用机制,利用双向电泳及质谱技术进一步分析了不同组大鼠肝线粒体蛋白质组的变化,共筛选并鉴定了 29 个差异蛋白质。寒证动物造模后,动物机体各方面功能大部分均出现衰减的趋势。首先,脂肪代谢出现障碍,表现为脂酰辅酶 A 脱氢酶、酰基辅酶 A 脱氢酶及羧

酯水解酶表达量的降低。脂酰辅酶 A 脱氢酶是脂肪酸 β 氧化过程中的关键酶^[5], 它们的降低引起脂类代谢障碍, 由此引起相应的能量供应障碍。其次, 蛋白质代谢受到影响, 其表现为参与核糖体循环的 Tu 转运延伸因子, 参与蛋白质折叠的伴侣素 groEL 前体、HSP60、DJ-1 蛋白表达量下降, 影响了蛋白质的合成、正确折叠和修复^[6-7], 导致相关蛋白质功能受到影响, 从而表现机体代谢全面降低的状态。再次, 寒证造模后, 氧化磷酸化水平也受到影响, 电子传递中黄素蛋白及腺苷酸激酶呈现下降。电子传递黄素蛋白是呼吸链的组成成分, 它的下降可直接使能量生成受到抑制, 而腺苷酸激酶的表达下降则使得 AMP 不能生成 ADP, 则导致 ATP 生成减少, 这可能是寒证动物较安静、少动、精神萎靡、蜷缩、倦怠乏力的内在物质基础。

寒证动物造模后由于脂类代谢及蛋白质代谢障碍导致能量不足, 需要通过其他一些代谢得以补偿以维持机体的一些基本功能需要, 表现为 H^+ 转运 ATP 合酶与电压依从性阴离子选择性通道蛋白 1 (VDAC) 表达的升高。ATP 合酶是催化细胞内线粒体 ATP 生成的关键酶。VDAC 主要通过影响线粒体与细胞质间的有效交换而参与能量代谢过程^[8]。寒证时机体各方面机能都处于低势的状态, H^+ 转运 ATP 合酶及 VDAC 表达量的升高, 可能是作为一种代偿机制, 以维持机体最基础代谢所必需的能量。

此外, 寒证造模后乙醛脱氢酶降低, 乙醛脱氢酶在人体内的主要生理作用是将醛通过脱氢氧化生成羧酸, ALDH 介导的产物包括视黄酸、 γ -氨基丁酸和三氯乙酸, 其中视黄酸参与类固醇激素的合成^[9], 寒证动物醛脱氢酶下降的间接导致类固醇激素的合成减少, 由于类固醇激素参与糖及其他代谢, 故此蛋白的减少可能是寒证动物的神经症状, 如精神萎靡、蜷缩、倦怠乏力等形成的物质基础之一。

应用温热中药治疗后脂代谢增强, 表现为与脂肪代谢有关的蛋白脂酰辅酶 A 脱氢酶、烯酰辅酶 A 水解酶、乙酰辅酶 A 酰基转移酶、丙酰辅酶 A 羧化酶都出现表达量的增高, 使脂类物质代谢加快, 并增加了能量的生成, 改善了寒证时能量代谢低下的状况, 这为热药疗寒提供了理论依据, 也解释了治疗组大鼠各种症状、体征明显改善的内在原因。

此外, 温热中药治疗后二氢硫辛酰胺支链酰基

转移酶和丙酮酸脱氢酶表达量增加, 二氢硫辛酰胺支链酰基转移酶是丙酮酸脱氢酶系和 α -酮戊二酸脱氢酶系中的一个关键酶, 丙酮酸在丙酮酸脱氢酶作用下脱去羧基后与辅酶 A 作用生成乙酰辅酶 A, 然后进入三羧酸循环, 丙酮酸氧化脱羧决定了丙酮酸走向氨基酸合成还是走向三羧酸循环。 α -酮戊二酸脱氢酶是三羧酸循环中的关键酶之一, 因此温热中药治疗后二氢硫辛酰胺支链酰基转移酶表达量增加将加快糖的有氧氧化。为机体提供能量, 以缓解寒证造成的物质能量代谢低下的状况。

综上所述, 寒证时三大物质代谢较弱, 能量代谢低下, 表现为线粒体内脂肪酸的 β -氧化受阻, 蛋白质的合成、折叠及分泌障碍, 氨基酸代谢低下, 类固醇激素减少影响糖代谢, 三大物质代谢水平的降低及部分能量生成酶的表达下降导致能量的不足, 所以机体通过提高另一部分能量生成酶以达到机体最基本的代谢需要。应用温热中药治疗后, 出现与寒证造模后整体状态逆向的态势, 糖、脂代谢增强、蛋白质合成增加导致能量代谢活跃, 显示温热中药治疗后可通过提高三大物质代谢给与机体更多的能量使寒证症状得到改善, 但能量生成酶表达量的下降也提示温热药可通过调节机体能量生成, 使机体不至于矫枉过正。

参考文献

- [1] 黄俊山, 白介辰, 黄国良, 等. 从检测血中 FT 3、FT4、T、E2 及皮质醇等指标探讨寒证热证的本质 [J]. 中国中西医结合杂志, 2002, 22(2): 113-115.
- [2] 卢德赵, 沃立科, 赵虹, 等. 不同中医证型乳腺增生组织蛋白质组的研究 [J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(3): 565-569.
- [3] Karp N A, Kreil D P, Lilley K S. Determining a significant change in protein expression with DeCyder during pair-wise comparison using two-dimensional difference gel electrophoresis [J]. *Proteomics*, 2004, 4: 1421-1432.
- [4] Friedman D B, Hill S, Keller J W, et al. Proteome analysis of human colon cancer by two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry [J]. *Proteomics*, 2004, 4: 793-811.
- [5] Prasad C, Speechley K N, Dyack S, et al. Incidence of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in Canada using the Canadian Paediatric Surveillance Program: Role of newborn screening [J]. *Paediatr Child Health*, 2012, 17(4): 185-189.

- [6] Takei Y, Iizuka R, Ueno T, *et al.* Single-molecule observation of protein folding in symmetric GroEL-(GroES) 2 complexes [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(49): 41118-41125.
- [7] Martinat C, Shendelman S, Jonason A, *et al.* Sensitivity to oxidative stress in DJ-1-deficient dopamine neurons: an ES-derived cell model of primary Parkinsonism [J]. *PLoS Biol*, 2004, 2(11): 1755-1763.
- [8] Godbole A, Mitra R, Dubey A K, *et al.* Bacterial expression, purification and characterization of a rice voltage-dependent, anion-selective channel isoform, OsVDAC4 [J]. *J Membr Biol*, 2011, 244(2): 67-80.
- [9] Solito R, Corti F, Chen C H, *et al.* Mitochondrial aldehyde dehydrogenase-2 activation prevents β -amyloid-induced endothelial cell dysfunction and restores angiogenesis [J]. *J Cell Sci*, 2013, 126(9): 1952-1961.