

蛋白质组学是中医药现代化研究的重要工具

t 李治国 (中国协和医科大学研究生部 北京 100730)

李治国 肖 诚 李 平 (中日友好医院临床医学研究所 北京 100029)

摘 要: 蛋白质是生命功能的最终执行者,是理解生理、病理和药理作用机理的关键。蛋白质组学是分析一个基因组、一种生物或组织或细胞表达的全部蛋白质。蛋白质组学技术和策略为复杂的中医证候学说和方药体系研究带来了希望,为中医药现代化及深刻系统的理解中医药作用机理的物质基础提供了良好的契机。

关键词: 蛋白质组学 中医药 证候

21世纪,随着人类基因组计划的完成和后基因组时代的到来,生命科学发生了本质的飞跃,应运而生的系统生物学与中医药研究的思路和方法不谋而合,为复杂的中医证候学说和方药体系研究带来了希望。其中,蛋白质组学作为系统生物学研究的一个重要平台,它的发展,对于长期以直观方法作为主要认识手段,缺乏还原分析方法的古朴中医学的现代研究,提供了新的思路和方法,从而解决了许多中医学因无法采集准确的、客观的、能够反映中医药最本质特点的定性定量指标而制约其发展的瓶颈问题。

一、蛋白质组学是中医药现代化研究的重要工具

1. 蛋白质研究是中医药研究的基础

依据中心法则, DNA 转录成 mRNA, mRNA 再翻译成蛋白质,由蛋白质执行细胞生理功能。蛋白质不仅种类上远远多于基因的种类,而且含量高度动态变化,另外蛋白质之间存在众多而又复杂的相互作用。有报道 mRNA 水平和蛋白表达水平不平行^[1-2],无法通过表达水平准确推测蛋白表达水平。蛋白翻译后修饰及空间结构对蛋白活性起着决定性作用,很难在 DNA、mRNA 对蛋白的翻译后修饰及空间结构加以推测。在分析体液成分如尿液时,核酸对细胞外液没有直接的作用,只能分析蛋白质^[3-5]。因此,蛋白质研究是生命物质生理、病理、药理等研究的关键。

中医药研究与蛋白质研究息息相关。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。蛋白质是生命活动功能的直接执行者,中医证候学的

收稿日期: 2007206223

修回日期: 2007206226

科技部国家重点基础研究发展(973)计划(2005CB523503): 中医防治慢性肾功能衰竭临床方法的系统生物学研究;负责人:李平;科技部国际科技合作计划(2006DFB31480): 糖尿病肾病蛋白质组学和中医防治糖尿病肾病疗效评价研究,负责人:李平。

联系人: 李平,研究员,博士生导师,主要研究方向: 中医药对肾脏病治疗的临床和基础研究, Tel 010264227163 E-mail lp8675@yahoo.com.cn

本质势必会在蛋白水平上有所变化,因而研究中医证候的物质基础必然离不开蛋白质的研究。又现已知的药物有 2000 多种, Drews 对其 8% 所针对的 483 种药靶进行了统计^[6], 其中受体占 4%, 酶占 28%, 激素和因子占 1%, DNA 2%, 核受体占 2%, 离子通道 3%, 其它未知的占 7%。可以说蛋白质的研究是明确药物作用机理的关键。

2 蛋白质组学为明确中医证候的本质和中药复方的作用提供了可能的实验方法

中医证候学有四个特点: (1)整体性: 主张天人合一, 是对多因素的整体综合, 追求阴阳平衡与协调。(2)时空性: 随时间、状态、环境等因素发生变化, 是机体即时性功能状态的反映, 即具有动态的概念。(3)传变性: 相关证型间可以相互影响, 并按照一定规律发生传变, 表明证候复杂的相互关系。(4)个体差异性: 同病异证, 异病同证, 体现了机体先天禀赋及功能状态对各种环境、精神因素等的反应性, 是多样性的基础。而中医证候的这些特点可能牵扯到多种蛋白从含量到结构和功能的变化, 因此用以往的生化和分子生物学方法逐个寻找分析证候相关蛋白质不仅费时费力, 也使系统地理解证候本质成为空中楼阁。

又中药成分复杂, 不管是单味药还是复方, 都是一个复杂的化学体系, 药物的各个成分分别结合到自己作用靶点发挥作用, 使本来已经非常复杂药理作用机制研究难以实施。运用以往的生化和分子生物学方法逐个地分析蛋白质使明确中药作用机制变得非常缓慢, 更无法解释药物与药物之间以及药物与多系统、多靶点间的相互作用机制。

蛋白质组学是指由一个基因组、一种生物或组织或细胞表达的全部蛋白质^[7], 是系统的对某一研究对象的所有蛋白质进行鉴定、定量及功能研究的科学^[8]。蛋白质组学主要包括三个部分: 表达蛋白质组学, 结构蛋白质组学, 和功能蛋白质组学^[9-11]。表达蛋白质组学是指特定的细胞、组织或生物所产生全部蛋白质的鉴定。结构蛋白质组学是指对上述全部蛋白质精确三维结构的测定。功能蛋白质组学的任务是阐明上述全部蛋白质所形成的类似于电路的功能网络。

蛋白质组学最大特点是同时系统地分析大量的蛋白质, 这恰恰是中医药研究最急需解决的问题, 利用功能蛋白质组技术和策略, 分析中医证候及经单味药或复方药处理过的组织、细胞或体液表达的蛋白质组, 并比较治疗前后蛋白质组的表达差异、蛋白质功能结构及相互作用的变化, 系统地对证候本质和中药的多环节、多靶点调整作用机理进行研究, 最终揭示证候的物质基础和中药单方、复方的相互作用和配伍规律。

二、蛋白质组学常用的技术方法

蛋白质组学是技术发展的产物, 它的发展受到技术发展驱动的同时也受到技术发展的制约^[12]。蛋白质组学的研究技术具有三个鲜明的特点: 没有任何一种单一的技术平台能够满足蛋白质组学研究的全部需要; 越接近蛋白质功能测定, 研究技术越不成熟; 虽然迄今为止尚没有成熟的真正的蛋白质组学研究技术^[13], 但是以质谱 (MS) 为基础的双向电泳 (2-DE) 和双向高压液相色谱技术 (2DHP LC) 是目前较成熟的研究表达蛋白质组学的技术平台, 大规模酵母双杂交是较常用的研究蛋白质相互作用的技术方法。

1 2-DE-MS

2-DE 是目前唯一能将数千种蛋白质同时分离与展示的分选技术, 是目前蛋白质组学研究分析最常采用的方法:

第一步, 运用 2-DE 技术分离样品中的蛋白质。在 2-DE 中, 蛋白质首先根据等电点的不同在第一向等电聚焦电泳 (IEF) 中分离, 平衡后转移到第二向 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 中根据蛋白质的相对分子量大小不同被分离, 使复杂蛋白质混合物中的蛋白质依据各自的等电点和分子量在二维平面上分开, 然后采用计算机作基础的图像采集、数据处理, 对电泳图谱进行斑点检测、背景消减和数据构建等分析。

第二步, 切下蛋白斑点, 酶切后应用质谱技术鉴定蛋白质。质谱技术是将样品分子离子化后根据离子间的质核比和基质的差异来分析并确定分子量的方法。

第三步, 应用生物信息学技术存储、处理和比较获

得的数据。在目前情况下,双向凝胶电泳的可分离出 3000~4000个,甚至 10000个可检测的蛋白斑点。

近年来,对 2-DE 技术做了很多改进使其对难溶性和碱性蛋白的显示及 2-DE 的重现性和分辨率有了较大幅度的提高。如 SB3-10 等新型去污剂的运用使难溶蛋白有了更好的显示;采用固定化 pH 梯度胶,极大提高了 2-DE 对极酸极碱性蛋白的显示并且大幅提高了 2-DE 重现性;采用对样品进行预分离、宽范围 pH 胶条、多根窄范围 pH 胶条等策略极大的提高了 2-DE 的分辨率,尤其值得一提的是自由流电泳可以把样品依照等电点分成 96 个组分之多,可以极大地提高 2-DE 的分辨率。

传统的 2-DE 及染色方法进行表达蛋白质组的比较研究经常被凝胶、样品和染色时操作的差异所困扰。近年来出现的荧光差异双向凝胶电泳 (DIGE) 用一块胶来分离不同荧光染料标记的两个或多个蛋白样品,显著地减少了这些困扰,提高了重复性^[14-15]。最近 DIGE 技术的革新,特别是内标的引入,进一步提高了这一技术的定量的准确性和统计的可靠性^[16]。

2 2DHPLC - MS

2DHPLC-MS 是目前较成熟的研究表达蛋白质组学的技术平台。第一步 2DHPLC 技术分离多肽。将提取的蛋白样品酶解成肽段。2DHPLC 分离,第一相根据分子大小分离多肽,第二相采用反向层析技术分离多肽。第二步,质谱鉴定肽段并解析成蛋白质。第三步,应用生物信息学技术存储、处理和比较获得的数据。这种技术在蛋白提取后或在细胞培养早期可以同位素标记以达到定量的目的。可以给蛋白肽段进行同位素或其它标记以利于定量。

3 大规模酵母双杂交法

酵母双杂交是研究蛋白质相互作用的常用方法。传统的酵母双杂交法可分为矩阵筛选法,和文库筛选法。矩阵筛选法是将表达不同/猎物 0 蛋白的酵母单克隆分别与带有不同/诱饵 0 蛋白的酵母株接合形成二倍体细胞,通过报道基因的表达式来鉴定它们的相互作用。文库筛选法是将表达/猎物 0 蛋白的酵母细胞构成的文库分别与表达不同/诱饵 0 蛋白的酵母细

胞接合,再筛选它们发生相互作用所形成的阳性克隆。

随着,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医证候的物质基础和中药及其单体的作用机理进行了探讨。

三、蛋白质组学在中医药研究中的应用

1 蛋白质组学在中医证候研究中的应用

近年来少数医务工作者利用蛋白质组学的相关技术进行了中医证候学的研究,取得了初步的成果。吴红金^[17]等应用蛋白质组学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 个蛋白点下调和 6 个蛋白点上调,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。谢文光^[18]等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 个蛋白点差异表达,与正常组比较热毒血瘀证组有 2 个蛋白点低表达,11 个蛋白点高表达。

2 蛋白质组学中中药单体研究中的应用

为了简化中药作用机理的研究和结果的理解,一些研究者采取选择已知有效的药物单体来进行研究。姜楠等研究了桂枝单体桂皮醛对酵母致发热大鼠下丘脑蛋白质组的影响,该研究在发现发热状态比正常有分别有 15 个蛋白质点下调和上调大于 30%。给予发热大鼠桂皮醛口服后有解热作用,有 4 个下调和 2 两个上调蛋白点的相对含量趋于恢复正常,推测桂皮醛对酵母致热大鼠的解热作用与 6 个差异表达的蛋白质有关。Zeng- Chun MA 等人^[20]用蛋白质组学的方法研究了川芎嗪毛冬青对照射后的 QXMSC1 细胞的影响。放射线照射组与未照射组 18 个蛋白差异表达,其中 15 个能被鉴定。给予川芎嗪毛冬青照射组能逆转或恢复这些蛋白的表达,并用 RT-PCR 进行了验证。

3 蛋白质组学技术在单味和复方药研究中的应用

单味和复方中药所含化学成分复杂,药理作用具有多靶点、多层次的特点,而且干扰因素众多,因此研究难度颇大。蛋白质组学的技术的兴起为单味和复方

中药研究带来了极好的契机,蛋白质组学将成为单味和复方中药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。

谢文光等^[21]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 2-DE 分析显示 16 个蛋白点差异表达,其中有 2 个蛋白点的表达降低,14 个蛋白点的表达增高,玄参干预后,脂多糖引起增高的 14 个蛋白点中有 10 个点表达显著降低,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 种蛋白可能是玄参治疗内毒素血症的疗效的分子基础。

吴伟康等探讨^[22]了四逆汤保护缺血心肌的相关蛋白谱变化,利用 2-DE 的方法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化自由基损伤等有关。马增春^[23]等用 2-DE 考察四物汤对放射线照射小鼠血清蛋白的影响,结果发现四物汤可使小鼠血清中由于放射线照射引起的 12 个下调和 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小鼠骨髓蛋白质表达的影响,四物汤可以逆转放射线照射小鼠骨髓 10 个上调和 5 个下调的蛋白点^[24]。

四、展 望

目前,虽然不少科研工作者用蛋白质组技术在中医药领域进行了探索研究并取得了一些成绩,然而目前仍停留在表达蛋白质组的研究层面,而对靶蛋白的结构和生物学意义及靶蛋白与其相互作用的蛋白研究较少。另外,目前中医药蛋白质组学研究采取的增加分辨率的策略较少,使有重要生物功能的低丰度蛋白(如细胞信号转导蛋白)显示不理想。要想进一步深入研究和明确中医机理及中药作用机制从而加深人们对疾病的认识并使中药迈出国门为世界所接受还有很艰辛的路要走。总之,前途是光明的、道路是曲折的。

蛋白质组学研究方法为中医药现代化研究带来新的曙光。

参考文献

- 1 Gygi SP, Rochon Y, Fianza BR, et al. Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol*. 1999 Mar; 19(3):1720~1730.
- 2 Ji P, uan W, Onita T, et al. Correlation study showing no concordance between EPAS-1/HIF-2α mRNA and protein expression in transitional cell cancer of the bladder. *Urology*. 2003 Apr; 61(4):B851~857.
- 3 Spahr CS, Davis MT, McGinley MD, et al. Towards defining the urinary proteome using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. I. Pro-1406. *Journal of the American Society of Nephrology J Am Soc Nephrol*. 2002; 13:B1398~1408.
- 4 Davis MT, Spahr CS, McGinley MD, et al. Towards defining the urinary proteome using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. II. Limitations of complex mixture analyses. *Proteomics*. 2001 Jan; 1(1):B108~117.
- 5 Hampel DJ, Sansome C, Sha M, et al. Toward proteomics in uroscopy. Urinary protein profiles after radiocontrast medium administration. *Arthritis Rheum*. 2007 Mar; 56(3):B949~959.
- 6 Drows J. Drug discovery: a historical perspective. *Science*. 2000 Mar 17; 287(5460):B1960~1964.
- 7 Humphrey S, Smith J, Cordwell S, Blachstock W, et al. Proteome re2 search: complementarity and limitations with respect to the RNA and DNA worlds. *Electrophoresis*. 1997 Aug; 18(8):B1217~1242.
- 8 Peng J, Gygi SP. Proteomics: The move to mixtures. *J Mass Spectrom*. 2001 Oct; 36(10):B1083~1091.
- 9 Aggarwal K, Lee KH. Functional genomics and proteomics as a foundation for systems biology. *Brief Funct Genomic Proteomic*. 2003 Oct; 2(3):B175~184.
- 10 Schmid MB. Structural proteomics: the potential of high-throughput structure determination. *Trends Microbiol*. 2002; 10(10 Suppl):BS27~31.
- 11 Patterson SD, Aebersold RH. Proteomics: the first decade and beyond. *Nat Genet*. 2003 Mar; 33 Suppl:B311~323.
- 12 Lee KH. Proteomics: a technology-driven and technology-limited discovery science. *Trends Biotechnol*. 2001 Jun; 19(6):B217~222.
- 13 Patterson SD, Aebersold RH. Proteomics: the first decade and beyond. *Nat Genet*. 2003 Mar; 33 Suppl:B311~323.
- 14 Yan JX, Devenish AT, Wait R, et al. Fluorescence two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry based proteomic al

- analysis of *Escherichia coli* Proteomics. 2002 Dec; 2(12):B1682~1698
- 15 Unlu M, Morgan ME, Minden JS. Difference gel electrophoresis a single gel method for detecting changes in protein extracts. Electrophoresis. 1997 Oct; 18(11):B2071~2077.
 - 16 Alban A, David SQ, Björkstén L, et al. Currie I A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. Proteomics. 2003; 3(1):B36~44.
 - 17 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. 中西医结合心脑血管病杂志, 2005, 3(3):B189~191.
 - 18 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. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(6):B520~524.
 - 19 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. 中药药理与临床, 2003, 19(6):B11~13.
 - 20 Ma ZC, Tan HL, Xiao CR, et al. Proteomic analysis of the effects of tetramethylpyrazine on irradiated QXMSC1 cells. Biol Pharm Bull. 2007 Feb; 30(2):B397~402.
 - 21 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. 中国中药杂志, 2004, 29(9):B877~882.
 - 22 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. 中国病理生理杂志, 2005, 21(3):B506~510.
 - 23 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. 中国中药杂志, 2003, 28(11):B1050~1053.
 - 24 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. 中国中药杂志, 2004, 29(9):B893~896.

Proteomics Is a Most Important Tools for modernization of Traditional Chinese Medicines

Li Zhiguang, Xiao Cheng, Li Ping*

(Institute of Clinical Medical Science, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029)

Protein is not only the final executant of life functions but also the key to understand physiological, pathological and pharmacological functions. The main aim of proteomics is to analyze the whole protein expressed by a genome of a life being or a kind of tissue or cell. Its strategy and technology shed lights on traditional Chinese medicine research and provides a new orientation for modernization and mechanism exploration of traditional Chinese medicine.

Keywords: Proteomics, Traditional Chinese Medicine, syndrome

(责任编辑: 张志华, 郭 屹)

面向基层 服务农村 惠及百姓 我国将举办/中医中药中国行 0大型科普宣传活动 17部委联合主办, 7月启动, 历时 3年

6月14日, 卫生部副部长、国家中医药管理局局长王国强在北京举行的新闻发布会上宣布, 为广泛宣传党中央、国务院坚定不移地发展中医药事业的方针政策, 认真贯彻吴仪副总理在今年全国中医药工作会议上的重要讲话精神, 进一步加强中医药科普宣传, 面向基层, 服务农村, 惠及百姓, 为中医药发展营造良好的社会氛围, 由国家中医药管理局联合 16个部委局共同主办的/中医中药中国行 0大型科普宣传活动即将于下月正式启动。

这项活动的主题为/传承中医国粹, 传播优秀文化, 共享

健康和谐0, 通过在全国范围内举办大规模的中医药科普宣传活动, 集中展示中医药悠久的历史、科学的理论、独特的方法、良好的疗效, 让社会了解中医药为中华民族繁衍生息所做出的巨大贡献, 了解中医药在维护人民健康, 促进经济社会发展, 弘扬我国优秀传统文化等方面的重要地位和作用, 使广大人民群众了解中医、认识中医、感受中医, 让中医药惠及千家万户, 为大众健康服务。

(文 摘)