

双向凝胶电泳技术在中医证候研究中的应用

陈 冰

(中国中医科学院中医基础理论研究所,北京市东直门内南小街 16 号,100700)

关键词 证候;蛋白质组学

双向凝胶电泳技术自从问世以来便广泛应用于各种领域,现已成为蛋白质组学的核心技术,由于其整体性、实时性等特点,近年来大量应用于中医证候研究方面。本文拟对双向电泳技术在证候研究中的应用做一综述。

1 双向电泳技术原理及应用

双向电泳(two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE)是根据蛋白质等电点和分子量的不同,通过两次方向互相垂直的高分辨率等电聚焦电泳和十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE),将带不同净电荷和不同分子量的蛋白质二维平面上呈点状分开的技术。双向电泳技术 1975 年由意大利生化学家 O'Farrell 发明^[1],可以在一个平面上分离出数以千计的蛋白质,适用于整体水平生命活动规律的研究^[2]。它以高分辨率、简单、快速等优点被广泛应用于蛋白质组学研究,是目前分离复杂蛋白质组分最常用的工具。通过双向电泳得到差异蛋白后,可结合其他蛋白质组学研究方法进一步分析,如结合质谱技术进行差异蛋白质的鉴定、相关数据库检索,将所获结果进行生物信息学分析等。因此说,双向电泳是蛋白质组学的核心技术。

双向电泳技术包括蛋白样品制备、等电聚焦、SDS-PAGE、染色等步骤。样品制备非常关键,合理的样品制备可保证 2-DE 的重复性。尽量减少蛋白提取过程中的降解和丢失,以提高分辨率。等点聚焦是在存在 pH 梯度和电场的条件下,蛋白质分子向其净电荷为零的 pH 处移动,当样本中的每一个蛋白质均达到其电荷为零的 pH 位置时,样品蛋白质就根据其等电点得到分离。SDS-PAGE 有垂直和水平 2 种方式。垂直方式是日前常用的电泳方式,阴离子去垢剂十二烷基磺酸钠同蛋白质结合后形成项链样结构,并以 114: 1 的比例结合,从而使蛋白质带有净负电荷,使蛋白电泳

时移动距离与其分子量呈正比。

双向电泳常用的染色方法有考染色、银染、荧光染色等方法。荧光差异双向凝胶电泳(DIGE)是日前蛋白质组学研究的热门技术^[3-4]。它是通过荧光染料与蛋白质中的赖氨酸残基进行结合,把不同荧光素标记的样品在同一块凝胶上进行分离,用不同波长的激光激发后可以显示不同的颜色。DIGE 技术的优点是采用几种不同的荧光染料(Cy3、Cy5、Cy2)分别标记不同的蛋白质样品,并设立内标,可以在同一块胶上同时分离 2 种以上蛋白质样品,比较同一蛋白在不同样品中的丰度^[5-6]。由于每块凝胶中加入了内标,降低了普通双向凝胶电泳中不同凝胶间的误差,减少了实验重复次数;且灵敏度高,可以对相对微量的蛋白质进行定量研究。DIGE 实验中一般用 Cy2 标记内标,用 Cy3、Cy5 分别交叉标记不同胶间的样品,这就避免了不同染料对实验结果的影响。其分析软件能自动进行蛋白质点的识别和匹配,可消除人为因素,增加实验的准确性和重复性^[7-8]。因此, DIGE 技术具有较高的敏感性、特异性及较宽的动态范围等优点,非常适用于样本数较少,蛋白丰度范围大的实验研究。目前已有学者将该项技术应用于证候特征的研究方面,唐利华等发现了 17 个差异蛋白质可能与肾虚虚疾病有关^[9]。双向电泳技术还可以根据研究者的需要结合其他蛋白质组学相关技术,如蛋白质芯片、S 质谱等,目前双向电泳加质谱已经成为蛋白质组学研究的基本方法。

2 双向电泳技术是研究中医证候的重要方法

中医证候是指在致病因素作用下,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、病势等病理因素的综合性诊断概念,是致病因素与机体反应两方面情况的综合。证,是指对疾病所处的一定阶段的病机概括,或非疾病机体的一定阶段的机体状态的概括;候,是指这种病机或状态的可被观察到的外在表现^[10]。

蛋白质组的概念最早由澳大利亚学者 Wilkins 和 Williams 提出^[11],指由一个基因组、细胞、组织或生物所表达的全部蛋白质。蛋白质组学是以细胞或组织不

同时间、环境的所有蛋白质为研究对象,从整体上研究蛋白质的种类、相互作用以及功能结构的一门科学。而证候的整体性、时相性等特点与蛋白质组学时空性与整体性的特点十分贴近。因此,应用蛋白质组学方法对证候本质进行研究已经成为一种公认的方法,而作为蛋白质组学中最重要技术——双向电泳,更是被广泛使用。将蛋白质组学引入证实质研究,更有利于动态地揭示同一个研究对象不同时期的变动性,更符合证研究自身的特点。对不同中医证候产生前后蛋白质组学研究,探究中医证候产生的物质基础支配机制,可以揭示中医证候的科学内涵,能够为中医诊断的客观化提供依据和方法。寻找与证候相关的差异标志蛋白群,制定标准参照物,使得疾病的辨证分型及用药具有客观性、准确性及重复性^[12]。

3 双向电泳技术在中医证候研究中的应用

以双向电泳技术为代表的蛋白质组学方法近些年来已经大量应用于中医证候的研究中。刘萍^[13]等通过双向电泳技术,成功建立了脾肾虚型重症肌无力患者血清 2-DE 图谱。其中在正常对照组双向电泳图谱上观察到了 1463 ± 179 个蛋白点,而重症肌无力组共观察到 1508 ± 89 个蛋白点。选取具有明显差异的 21 个蛋白点进行质谱鉴定,共鉴定出 8 种差异蛋白。赵慧辉^[14]等采用双向凝胶电泳结合基质辅助激光解析/电离-飞行时间质谱对 8 例心绞痛血瘀证患者血瘀证程度变化前后的血浆进行比较蛋白质组学研究,寻找心绞痛血瘀证相关蛋白。结果初步发现了 Clusterin、ApoA-I 在血瘀证程度变轻后表达增加,而 Fibrinogen β chain、Vitamin D-Binding Protein、Haptoglobin β chain、Albumin isoform 在血瘀证程度变轻后表达降低。谭秦湘等^[15]以不同疾病组肝郁证患者和正常人的血清为样本,采用双向凝胶电泳分离蛋白质组分,通过分析比较正常组与肝郁证组血清蛋白质图谱,探询其物质基础,经分析后发现肝郁证差异蛋白质群。张娴^[16]等在对自发性高血压大鼠组和高血压肝阳上亢模型组大鼠肝脏蛋白质组的双向电泳分析中发现,大部分蛋白集中分布在 PI 5~8 的区域。研究人员认为应用蛋白质组分析技术能较全面地了解模型的蛋白表达情况,有利于筛选证候相关蛋白,是研究中医证候的可行途径之一。战丽彬^[17]等应用双向电泳技术,通过 2-DE 图像分析软件 ImageMaster 5.0 对大鼠脾阴虚组和空白对照组海马蛋白质组进行分析,可分辨 2 组蛋白斑点数目分别为 (2027 ± 61) 个和 (1917 ± 207) 个。将图谱部分区域放大后显示出明显差异,初步筛选出脾阴虚大鼠海马蛋白质组的差异表达,研究人员

推测与学习记忆相关。刘希成^[18]利用双向电泳优化分离了除去高丰度蛋白(白蛋白和 IgG)的老年体虚肾阳虚患者(以健康组为参照)的血清样本,对比分析 pH4~7 范围的 2-DE 图谱,发现肾阳虚患者和参照组的平均蛋白点分别为 (393 ± 32) 和 (455 ± 19) 个。其中肾阳虚证候表达量上调 2 倍($P < 0.05$)以上的蛋白点有 26 个,下调 2 倍以上的有 33 个。结合质谱获得上述差异蛋白的肽质量指纹图谱,并经数据库检索共鉴定出了 49 种差异蛋白质,其中有 10 种在肾阳虚血清中特异表达,有 6 种在健康组血清中特异表达。蛋白功能分析发现,其中 33 种蛋白质的差异表达与肾阳虚证密切相关。蛋白质 TCR β 及 transthyretin 的蛋白印迹实验验证了 2-DE 的结果。研究人员认为该研究结果为阐明中医肾阳虚证的机理提供了一条新途径。除此之外,还有学者利用双向电泳技术对血虚证^[19]、慢性胃炎湿证^[20]等证候类型进行了研究。

4 存在问题与展望

双向电泳的分辨率较高,近年来被广泛应用于农业、医学等研究领域。但仍存在诸多问题:1)重复性差,自动化程度低;2)低丰度蛋白质、极酸及极碱性蛋白质、分子量过大或过小的蛋白质及膜蛋白等分离困难。针对上述问题,可采用如二维色谱、二维毛细管电泳、液相色谱-毛细管电泳等新型分离技术作为双向电泳的补充。而且随着高通量和高精度蛋白质新型检测技术的出现,双向电泳技术可以得到进一步完善。双向电泳技术结合蛋白质的生物质谱鉴定及其与生物信息学的结合一系列方法的建立,必将为中医证候的研究提供更完备的支持。

参考文献

- [1] O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins [M]. J Biol Chem, 1975, 250:4007-4021.
- [2] Dutt MJ, Lee KH. Proteomics analysis. Curr Opin Biotechnol, 2000, 11 (2):176-179.
- [3] Zhou G, Li H, DeCamps D, et al. 2D differential in2gel electrophoresis for the identification of esophageal scans cell cancer specific protein markers. Mol Cell Proteomics, 2002, 1 (2):117-124.
- [4] Gharbi S, Gaffney P, Yang A, et al. Evaluation of two2dimensional differential gel electrophoresis for proteomic expression analysis of a model breast cancer cell system. Mol Cell Proteomics, 2002, 1 (2):91-98.
- [5] Unlu M, Morgan ME, Minden JS. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. Electrophoresis, 1997, 18 (11):2071-2077.
- [6] Tonge R, Shaw J, Middleton B, et al. Validation and development of fluorescence two2dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. Proteomics, 2001, 1 (3):377-396.
- [7] Karp NA, Kreil DP, Lilley KS. Determining a significant change in protein expression with DeCyderTM during a pair-wise comparison using two-dimensional difference gel electrophoresis. Proteomics, 2004, 4 (4):1421-1432.

- [8] Alban A, David SO, Bjordesten L. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: Two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics*, 2003, 68(3): 36-44.
- [9] 唐利华, 卢德赵, 沃兴德. 肾上腺切除的肾虚大鼠肝组织蛋白质双向电泳图谱的建立与分析. *浙江中医学院学报*, 2005, 29(5): 51-54.
- [10] 郭蕾, 王永炎, 张志斌. 关于证候概念的诠释. *北京中医药大学学报*, 2003, 26(02): 5-8.
- [11] Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa -Poljak A, et al. Progress with gene-product of mapping of the moliautos *Mycoplasmit genitalium*. *Electrophoresis*, 1995, 16(7): 1090-1094.
- [12] 施孟如, 沃兴德, 卢德赵. 蛋白质组学和中医药研究. *浙江中医学院学报*, 2004, 28(6): 82-85.
- [13] 刘萍, 章怡祎, 乔健. 脾肾虚型重症肌无力患者血清双向电泳图谱的建立及分析. *中西医结合学报*, 2007, 5(2): 150-154.
- [14] 赵慧辉, 王伟, 李宏. 双向电泳-质谱技术筛选心绞痛血瘀证相关蛋白的研究. *北京中医药大学学报*, 2008, 27(2): 96-99.
- [15] 谭秦湘, 吕志平, 钟小兰, 等. 肝郁证辨证与相关蛋白关系初步研究. *辽宁中医杂志*, 2006, 33(2): 157-158.
- [16] 张炯, 曾星, 段小军, 等. 高血压肝阳上亢证大鼠模型建立和蛋白质表达分析. *四川中医*, 2008, 26(3): 9-11.
- [17] 战丽彬, 刘莉, 路小光, 等. 脾阴虚证大鼠海马蛋白质组双向凝胶电泳的研究. *中华中医药杂志*, 2009, 24(2): 149-152.
- [18] 刘希成, 梁恒, 田真, 等. 肾阳虚证候的人血清比较蛋白质组学分析. *中国生物化学与分子生物学报*, 2007, 23(7): 592-599.
- [19] 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): 1050-1053.
- [20] 王亿勤, 李福凤, 王文静, 等. 慢性胃炎中医证血清蛋白质组学研究. *中西医结合学报*, 2007, 5(5): 514-516.

(2010-06-23 收稿)◎

腰痛宁治疗肾虚腰痛 90 例

余晓兵¹ 何东初²

(1 中国人民解放军空军总医院, 100142; 2 广州军区武汉总医院)

关键词 腰痛/中医药疗法; @ 腰痛宁

腰痛宁口服液由我院制剂室提供, 主要由续断、杜仲、牛膝、熟地黄、补骨脂、菟丝子等 6 味药物组成, 每毫升含生药 0.5g, 具有止腰痛、补肝肾、养元气等功效, 临床用于腰部酸软或绵绵作痛、喜按、遇劳则甚或腰膝酸软无力、手足不温或五心烦热等肾虚为主症的疾病。我们于 1998 年 3 月-2002 年 3 月对该药的临床功效进行观察, 现将有关资料总结如下。

1 临床资料

中医诊断标准: 典型的一侧或两侧腰部疼痛症状; 并有反复发作病史; 排除肿瘤及妊娠等兼有腰痛症状者。中医辨证: 主要有肾虚证及偏肾阳虚或肾阴虚的证型。

西医诊断标准: 主要指下述疾病: 慢性腰肌劳损; 腰椎退行性病变(骨质增生); 内科肾虚腰痛。

排除病例标准: 1) 确诊为肿瘤等所引起的腰痛症状者; 2) 合并心、肝、肾、造血等系统严重疾病者; 3) 年龄在 18 岁以下或 65 岁以上, 孕妇及哺乳期妇女及对本药过敏者; 4) 不符合纳入标准, 未按规定用药或资料不全等影响疗效或安全性判定者。

一般资料: 本次共观察 120 例; 年龄 18~35 岁, 平均 50 岁; 病程 0.5~20 年, 中医辨证属肾阴虚 56 例, 肾阳虚 64 例。主要临床表现为腰部冷痛(或急痛)、胫软膝酸、性功能异常、畏寒肢冷、精神疲乏或兼五心烦热等症。西医诊断为慢性腰肌劳损 41 例, 腰椎退行性变(如骨质增生) 43 例, 内科腰痛 36 例。120 例肾虚腰

痛和患者随机分为治疗组 90 例和对照组 30 例, 年龄、性别、证型、主要症状轻重程度等方面均较接近, 统计学处理无显著性差异, 具有可比性($P > 0.05$)。

2 治疗方法

治疗组口服腰痛宁口服液, 每次 20mL, 每日 2 次, 连服 30 天。对照组口服壮腰健肾口服液, 每次 20mL, 每日 2 次, 连服 1 个月。治疗期间, 停用其他补肾、止痛的中西药物, 并停止针刺和按摩治疗。

3 结果

疗效标准: 临床治愈: 腰痛及相关症状消失, 不影响活动与工作。显效: 腰痛及相关症状基本消失, 积分下降达 2/3 以上者。有效: 腰痛及有关症状有所减轻缓解, 积分下降达 1/3~2/3 者。无效: 临床症状及体征无变化, 甚或加重者。

治疗结果: 治疗组与对照组总有效率比较: 治疗组 90 例中, 治愈 25 例, 显效 36 例, 有效 20 例, 无效 9 例, 总有效率 90%; 对照组 30 例中, 治愈 5 例, 显效 6 例, 有效 8 例, 无效 11 例, 总有效率 63.3%。治疗组的治愈率及总有效率均高于对照组($P > 0.05$)。

4 讨论

腰痛宁口服液由补肾中药续断、杜仲、牛膝、菟丝子等药物组成, 其功效为止腰痛、补肝肾、壮腰膝、养元气、舒经络、益肾精等, 属阴阳气血双补之剂, 用于临床以肾虚为主的腰痛等一系列症状, 确有良好的疗效, 值得进一步推广。

(2009-09-07 收稿)