

基于蛋白质组学的附子、干姜和花椒的性味研究

王秋红 杨 欣 李雪磊 杨炳友 王艳宏 匡海学

(教育部北药基础与应用研究重点实验室,黑龙江省中药及天然药物药效物质基础研究重点实验室,黑龙江中医药大学,哈尔滨,150040)

摘要 目的:探讨温热中药(附子、干姜、花椒)对正常大鼠能量代谢及相关蛋白表达的影响,探索温热中药在性味—功效—药理作用上的共性和差异性,为阐明温热中药性味的科学内涵提供依据。方法:选择 Sprague Dawley (SD) 雌雄大鼠,给药 21 d 后,大鼠通过腹腔内注射 1% 戊巴比妥钠麻醉(每 100 g 体重 0.15 mL),差速离心法提取蛋白,BCA 蛋白定量和 SDS-PAGE 检测蛋白完整性,应用同位素标记相对和绝对定量(iTRAQ)技术结合 2D LC-MS/MS 筛选肝脏中的差异蛋白。结果:与空白对照组相比,温热中药(附子、干姜、花椒)共筛选出 50 个共有差异蛋白,其中 11 个差异蛋白在肝脏中低表达,39 个差异蛋白在肝脏中高表达,50 个共有差异蛋白主要分布在 18 个通路中,其中绝大多数与能量代谢相关。结论:附子、干姜、花椒等热性中药在蛋白质组学方面存在共性和差异性,这种共性不仅体现在物质代谢和能量代谢上,也体现在其他药理作用上,其中,主要是通过增加体内热量生成和提高对能量的利用两个方面影响机体的能量代谢。研究结果为以“中药同时具有性(气)与味,性(气)与味是中药(包括方剂、单味中药、有效部位或组分、单体化合物)同时兼具的两种特性。药味与药物的具体功效相关。药性(气)是药物通过不同途径以主要影响机体的能量代谢、物质代谢为特征的,可影响药物疗效发挥或与副作用发生有关的一类生物学效应。”的中药性味理论新假说的客观性提供了科学依据,同时为评价中药寒热药性提供了新的方法。

关键词 附子;干姜;花椒;中药性味;寒热药性;能量代谢;药理作用;蛋白质组学

Based on proteomics to study the property and flavor of Radix Aconiti Lateralis Preparata, Rhizoma Zingiberis, Pricklyash Peel

Wang Qiuhong, Yang Xin, Li Xuelei, Yang Bingyou, Wang Yanhong, Kuang Haixue

(Heilongjiang university of Chinese medicine, Key Laboratory of Chinese Medicine, Ministry of Education, Heilongjiang

Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Pharmacodynamic Material, Harbin 150040, China)

Abstract Objective: Study on warm-heat natural herbs (Radix Aconiti Lateralis Preparata, Rhizoma Zingiberis, Pricklyash Peel) energy metabolism and expression of liver protein in normal rats, and made warm-hot drug in property and flavor-effect-pharmacological effects difference and similarities, to provide theoretical basis for the property and flavor of medicines scientific connotation of warm-heat natural herbs. **Methods:** Adopt Sprague Dawley rats, each group after continuous administration of 21 d, the rats were anesthetized via an intraperitoneal injection of 1% pentobarbital sodium (0.15 mL per 100 g body weight). Liver proteins are separated by differential centrifugation, BCA protein quantitation by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), using iTRAQ technology combined with the 2D-LC-MS/MS analysis method identification of liver proteins. **Results:** Compared with the control group, warm-heat natural herbs have identified significantly altered 50 differential proteins, with 39 proteins significantly increased and 11 decreased in response. 50 different proteins mainly distributed in 18 pathways, many pathways related to energy metabolism. **Conclusion:** Radix Aconiti Lateralis Preparata, Rhizoma Zingiberis and Pricklyash Peel such as warm-heat natural herbs have differences and similarities in proteomics. This commonality is reflected not only in the substance and energy metabolism, but also reflected in the pharmacological effects. Two aspects affect the body's energy metabolism: increasing heat generation and increase the energy utilization. The results of the study for “Chinese medicine has the property (gas) and flavor, the characteristics of characteristics of property (gas) and flavor. Flavor of a drug was related with specific efficacy. Property of a drug affects the body's energy metabolism and substance metabolism by different pass ways. Influencing therapeutic effects of drugs or lead to side-effect associated with biological effects.” Nature and flavor of medicines theory provides a scientific basis. At the same time as the evaluation of traditional Chinese medicine provides a new method for Cold and Hot natural properties.

Key Words Radix Aconiti Lateralis Preparata; Rhizoma Zingiberis; Pricklyash Peel; Nature and flavor of medicines; Cold and

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)资助项目(编号:2013CB531801);黑龙江中医药大学研究生创新科研项目(编号:2015009)

作者简介:王秋红(1969—),女,教授,博士研究生导师,主要从事中药炮制学及中药药性理论研究;Tel: (0451) 87266856, E-mail: qhwang668@sina.com

通信作者:匡海学(1955—),男,教授,博士研究生导师,主要从事中药药性理论及中药及复方药效物质基础研究;Tel: (0451) 82193001, E-mail: hxkuang56@163.com

Hot natural properties; Energy metabolism; Pharmacological effect; Proteomics

中图分类号:R28 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2015.12.003

中药药性理论研究,特别是中药四性科学内涵的解析是目前中医药研究难点和重点领域。中药具有的四性(气),即寒、热、温、凉是中药的基本特性。中药四性中的温和热,寒和凉在本质上并没有差别,只是程度上有所不同。中医认为的寒热药性是根据临床经验和反复验证归纳总结所得,是对药物疗效作用的高度概括,临床上运用药物四气治疗疾病,主要是根据药物的寒、热、温、凉之偏性,治疗疾病的寒和热,从而使人体达到相对平衡状态^[14]。西药虽然具有物质结构明确、作用机理清晰的优势,却由于没有标示其寒热药性,因此不能向中药一样在临床上辨证用药,因此,中药的四性也是中药有别于西药的最本质的特征。迄今,诸多不同学科的研究者应用各种不同的研究方法,从机体功能的多个方面如神经系统、内分泌系统、能量代谢等,对中药四性开展了大量的探索性研究,尽管证实一些温热药可以提高机体的基础代谢率,或对内分泌系统、中枢和植物神经系统有兴奋作用^[5-7],但是仍还没有建立完整的体系诠释全部中药的寒热药性的科学内涵。在中药四性的研究方法方面,国内研究者虽然采用了诸多现代科学技术前沿的研究方法,但还没有建立起适于中药复杂体系与特点的、能对药性、药味的科学内涵进行科学解析的有效途径及方法^[8-10]。

本课题组匡海学教授提出了中药性(气)味科学内涵的新假说,即“中药同时具有性(气)与味,性(气)与味是中药(包括方剂、单味中药、有效部位或组分、单体化合物)同时兼具的两种特性。药味与药物的具体功效相关。药性(气)是药物通过不同途径以主要影响机体的能量代谢、物质代谢为特征的,可影响药物疗效发挥或与副作用发生有关的一类生物学效应。促进机体能量代谢、物质代谢的中药具有热(或温)性,抑制机体能量代谢、物质代谢的中药具有寒(或凉)性。药性(气)可以通过动物实验以及系统生物学等方法予以评价归属。中药一味一性,一药内部 X 味 Y 性($Y \leq X$)”。本文依据匡海学教授的这个科学假说,并采用蛋白质组学的研究方法,选择代表性的温热中药附子、干姜和花椒,在蛋白质水平上开展药性、药味的实验研究,探讨温热中药在药性和药味中存在共性和差异性,为进一步验证匡海学教授提出的中药药性科学内涵新假说的客观性提供依据,也为完善中药寒热药性的评价方法

进行有益的探索。

1 材料与动物处理

1.1 实验药品 所选用的附子、干姜、花椒购买于哈尔滨世一堂药店,经黑龙江中医药大学中药鉴定学教研室都晓伟教授鉴定符合 2010 版《中华人民共和国药典》相关规定。

1.2 实验试剂 iTRAQ® Reagents Multiplex Kit (Applied Biosystem); iTRAQ® Reagents Application Kit-Plasma (Applied Biosystem); 乙腈 (Fisher Scientific); 甲醇 (Fisher Scientific); BCA Protein Assay Kit (康为世纪); 组织蛋白提取试剂盒 (康为世纪); SDS 凝胶试剂盒 (康为世纪); 考马斯亮蓝染料 G250 (Amesco); 双蒸水为本实验室用 MilliQ 纯水仪制备; 乙醇 (Fisher Scientific); 甲酸 (Fisher Scientific); 胰蛋白酶 (Promega); Durashell-C18 (Agela); 10K 超滤管 (100 个/Pack, Sartorius); strata-X C18 除盐柱 (phenomenex); 进样瓶 (Agilent, 5183-2072); 瓶盖 (Agilent, 5185-5829); 内称管 (Agilent, 5182-0549); 喷针 (New Objective, PN:FS360-20-10-N-20-C12)。

1.3 中药水煎液的制备 按临床常用方法对药物进行处理。称取定量的上述药材,加入 10 倍量水,浸泡 60 min,快速加热至沸腾,煎煮 60 min,倾出药液,残渣再加入 8 倍水,煎煮提取 60 min。合并 2 次药液,滤过,附子、干姜、花椒分别浓缩至含生药量为 0.53 g/mL、0.42 g/mL、0.20 g/mL 的中药水提液,4℃ 储存备用。

1.4 实验动物分组及给药 雌性 SD 大鼠 40 只,体重 (180 ± 20) g,购自黑龙江中医药大学医学实验动物中心,合格证号:SCXK 黑 2014007,置动物笼饲养,保持室内温度 18~22℃,室内昼夜自然明暗交替照明,饲养标准大鼠饲料。将大鼠随机分为 4 组,空白对照组、附子组、干姜组和花椒组,每组各 10 只。大鼠在动物饲养室适应 7 d 后,各给药组剂量均为临床人用高限剂量的 42 倍,每天分别按给药容积为 20 mL/kg 体重连续灌胃生理盐水和附子 (10.5 g/kg)、干姜 (8.4 g/kg)、花椒 (4.0 g/kg) 水煎液 21 d,各组饲养过程中保持温度、光照、湿度等环境条件均衡,自由进食饮水。

2 实验方法

2.1 样品处理 给药 21 d 后,大鼠通过腹腔内注射 1% 戊巴比妥钠麻醉 (每 100 g 体重 0.15 mL),迅

速打开腹腔,从门静脉注射冰冷的生理盐水,清除残留血液,取出肝脏,用冰冷缓冲液洗净,去除肝脏表面的血液,用滤纸吸干表面液体,称重。蛋白提取采用组织蛋白抽提试剂盒(康为世纪: CW0891),取 0.1 g 大鼠肝脏组织,用液氮研磨能细末,转入离心管中;取 990 L 的蛋白抽提试剂,加入 10 L 的蛋白酶抑制剂,蛋白酶抑制混合物在进行蛋白抽提前 2 min 内加入;冰上孵育 20 min;10 000 × g 离心 20 min;收集上清,在 -80 °C 保存备用。提取的蛋白采用 BCA (Bicin-choninic Acid) 蛋白定量试剂盒(康为世纪: CW0014)进行蛋白定量,在分光光度计在 562 nm 处测定每个样品及 BSA 标准品的吸光值,绘制标准曲线时 X 轴(纵坐标)为蛋白的质量浓度 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,Y 轴(纵坐标)为吸光值。用 excel 制作标准曲线,计算样品中的蛋白含量。蛋白完整性采用 SDS-PAGE 凝胶试剂盒(Beyotime biotechnology, China),分离胶浓度 10%,浓缩胶浓度 5%,凝胶厚度为 1 mm,考马斯亮蓝快速染色(G250)方法进行凝胶染色,染色后的凝胶用 BIO-RAD 扫描仪进行扫描,重复 3 次,并利用 Image Lab 4.0.1 软件进行图像分析。

2.2 样品酶解实验步骤 蛋白定量后取 100 μg 蛋白溶液置于离心管中;加入 4 μL Reducing Reagent, 37 度反应 1 h;加入 2 μL Cysteine-Blocking Reagent, 室温 10 min;将还原烷基化后的蛋白溶液加入 10K 的超滤管中,12 000 转离心 20 min,弃掉收集管底部溶液;加入 iTRAQ®试剂盒中的 Dissolution Buffer 100 μL ,12 000 转离心 20 min,弃掉收集管底部溶液,重复 3 次;更换新的收集管,在超滤管中加入胰蛋白酶,总量 2~4 μg ,37 °C 反应过夜;次日,12 000 转离心 20 min,酶解消化后的肽段溶液离心于收集管底部;在超滤管中加入 50 μL Dissolution Buffer,12 000 转离心 20 min,与上步合并,收集管底部共得到 150 μL 酶解后的样品。

2.3 标记步骤 从冰箱中取出 iTRAQ®试剂,平衡到室温,将 iTRAQ®试剂离心至管底;向每管 iTRAQ®试剂中加入 200 μL 乙醇,涡旋振荡;取 75 μL 样品(100 μg 酶解产物)转移到新的离心管中;将 iTRAQ®试剂填加到样品中,空白组:114,附子组:115,干姜组:116,花椒组:117。涡旋振荡,室温反应 2 h;加入 100 μL 水终止反应;混合标记后的样品,涡旋振荡;真空冷冻离心干燥;抽干后的样品冷冻保存待用。

2.4 高 pH 反相分级 流动相 A (pH = 10 2% ACN,0.1% FA)。流动相 B (20 mM Ammonium for-

mate (pH = 10), 80% ACN)。将标记抽干后的样品用 150 μL 流动相 A 复溶,涡旋振荡,12 000 转离心 20 min,吸取上清供检测,进样量 100 μL ;准备 46 个空白 1.5 mL 离心管,依次标记为 1-46,用于收集分离得到的组份 1-46;流速 0.8 mL/min;分离梯度为 0—6 min,5% B;6—6.1 min,5% ~ 8% B;6.1—30 min,8% ~ 30% B;30—39 min,30% ~ 50% B;39—40 min,50% ~ 80% B;40—44 min,80% B;44—45 min,80 ~ 5% B;45—55 min,5% B。从第 5 min 开始,收集每分钟的洗脱物依次到 1-46 号离心管中;真空冷冻离心干燥;抽干后的样品冷冻保存待用。

2.5 纳升级反相色谱-TripleTOFTM 5600 进行蛋白质分析 根据紫外监测情况,将高 pH 反相分离得到的 46 个组分合并为 10 个组分,合并时采用 30 μL 2% ACN,0.1% FA,加入第一个离心管,涡旋振荡并离心后,转入第二个离心管,依次直至合并组分最后一管;12 000 转离心 10 min,吸取上清上样;上样体积 8 μL ,采取夹心法上样;流动相 A (2% ACN + 0.1% FA),流动相 B (98% ACN + 0.1% FA);Loading Pump 流速 2 $\mu\text{L}/\text{min}$,15 min,流动相 A;gradient1 分离流速 0.3 $\mu\text{L}/\text{min}$,流动相为 A,B;洗脱梯度为 0—0.1 min,5% ~ 8% B;0.1—60 min,8% ~ 27% B;60—74.9 min,27% ~ 50% B;74.9—75 min,50% ~ 80% B;75—80 min,80% B;80—80.5 min,80% ~ 5% B;80.5—90 min,5% B。质谱参数设置:源气参数:Ion spray voltage:2.3 kv;GS1:3;Curtain gas:30 或 35;DP:100 或 80;TOF MS: m/z: 350-1250;accumulation time:0.25 s;product ion scan:IDA number: 30; m/z: 100-1500;accumulation time:0.1 s;Dynamic exclusion time:25 s;Rolling CE: enabled;Adjust CE when using iTRAQ® reagent: enabled;CES:5。

2.6 数据库搜索 采用 ProteinPilot™ 4.5 和 DAVID Bioinformatics Resources 6.7 鉴定差异蛋白和差异蛋白代谢通路分析。Cytoscape 3.2.0、IntAct^[11] 和 MINT^[12] 对差异蛋白进行蛋白相互作用分析。

3 实验结果

3.1 2D LC-MS/MS 定量肝脏共有差异蛋白 采用 ProteinPilot™ Software 4.5 筛选鉴定出差异蛋白,ProteinPilot™ Software 软件操作简单,简化蛋白鉴定和定量的过程,可以同时鉴定成百上千的肽段修饰和非胰酶的断裂;方便地区分蛋白异构体、蛋白亚群,抑制蛋白鉴定假阳性结果;并以可视化方式明确展现肽段—蛋白之间的相互关联。筛选的差异表达的蛋白需同时满足下列条件:在两次技术重复中均

表 1 附子、干姜、花椒与空白对照组比较共有差异蛋白

蛋白号	GENE-ID	GENE	蛋白名称	附子	干姜	花椒	正常
P09811	64035	Pygl	糖原磷酸化酶 ↑	3. 2810 ↑	2. 3335 ↑	2. 4660 ↑	1
Q9JLA3	171129	Uggt1	UDP 葡萄糖-糖蛋白的糖基转移酶 1 ↑	1. 5560 ↑	1. 4588 ↑	1. 3062 ↑	1
Q5QE80	493909	Aox3	醛氧化酶 3 ↑	2. 6546 ↑	1. 7378 ↑	1. 7865 ↑	1
P07153	无	Rpn1	多萜基二磷酸寡聚糖蛋白糖基转移酶 1 ↑	1. 5849 ↑	1. 6144 ↑	1. 3677 ↑	1
Q63041	252922	A1 m	α1-巨球蛋白 ↑	3. 5318 ↑	1. 5417 ↑	1. 9588 ↑	1
Q66HF8	298079	Aldh1b1	醛脱氢酶 X ↑	2. 3335 ↑	3. 1333 ↑	1. 5849 ↑	1
Q6AYT9	361637	Acsm5	酰基辅酶 A 合成酶 ↑	4. 5490 ↑	9. 4624 ↑	2. 2699 ↑	1
P05545	24794	Serpina3k	丝氨酸蛋白酶抑制蛋白 A3K ↑	5. 7016 ↑	1. 7701 ↑	4. 0179 ↑	1
P07379	362282	Pck1	磷酸烯醇丙酮酸羧激酶 ↑	4. 2855 ↑	4. 5709 ↑	5. 5463 ↑	1
P17625	无	Gys2	糖原合成酶 ↑	2. 4889 ↑	2. 5823 ↑	2. 8840 ↑	1
P48450	81681	Lss	羊毛甾醇合酶 ↑	10. 471 ↑	12. 942 ↑	8. 7096 ↑	1
P11715	25146	Cyp17a1	17-α-羟化酶/17,20 碳链裂解酶 ↑	2. 6062 ↑	2. 5823 ↑	3. 2211 ↑	1
O35078	114027	Dao	D-氨基酸氧化酶 ↑	2. 2080 ↑	4. 4463 ↑	3. 1046 ↑	1
Q64581	252931	Cyp3a18	细胞色素 p450 3A18 ↑	2. 5119 ↑	10. 568 ↑	7. 5858 ↑	1
P97544	无	Ppap2b	磷脂磷酸水解酶 3 ↑	1. 2706 ↑	1. 2706 ↑	1. 2246 ↑	1
P04785	25506	P4hb	蛋白质二硫键异构酶 ↑	2. 1281 ↑	1. 8535 ↑	1. 8707 ↑	1
P46462	116643	Vcp	Transitional endoplasmic reticulum ATPase ↑	1. 7701 ↑	1. 5849 ↑	1. 6904 ↑	1
P25093	29383	Fah	延胡索酰乙乙酰酸酶 ↑	1. 8197 ↑	1. 5417 ↑	1. 4723 ↑	1
P20070	25035	Cyb5r3	NADH-细胞色素 b5 还原酶 3 ↑	1. 4454 ↑	1. 2823 ↑	1. 2823 ↑	1
Q9ES38	79111	Slc27a5	胆酰 CoA 合成酶 ↑	1. 4997 ↑	2. 7040 ↑	1. 4191 ↑	1
Q63108	无	Ces1e	羧酸酯酶 1E ↑	1. 2246 ↑	1. 4060 ↑	1. 2823 ↑	1
P18886	25413	Cpt2	O-肉碱棕榈酰转移酶 II ↑	3. 4674 ↑	2. 3121 ↑	1. 2942 ↑	1
P04041	24404	Gpx1	谷胱甘肽过氧化物酶 1 ↑	2. 7290 ↑	2. 0512 ↑	1. 2823 ↑	1
O70199	83472	Ugdh	UDP-glucose 6-dehydrogenase ↑	1. 8880 ↑	1. 7539 ↑	2. 0137 ↑	1
P14141	54232	Ca3	碳酸酐酶 3 ↑	2. 0701 ↑	1. 8707 ↑	2. 6303 ↑	1
P23514	114023	Copb1	Coatomer subunit beta ↑	1. 6144 ↑	1. 3554 ↑	1. 5417 ↑	1
P70473	无	Amacr	α-甲基酰基辅酶 A 消旋酶 ↑	1. 5996 ↑	1. 5136 ↑	1. 8030 ↑	1
P48679	无	Lmna	Prelamin-A/C ↑	2. 0701 ↑	1. 4588 ↑	1. 8707 ↑	1
P05544	无	Serpina31	丝氨酸蛋白酶抑制剂 A3L ↑	4. 6132 ↑	1. 4723 ↑	3. 6644 ↑	1
P06214	25374	Alad	δ-氨基乙酰丙酸脱水酶 ↑	1. 4060 ↑	1. 5996 ↑	1. 6904 ↑	1
P10959	24346	Ces1c	羧酸酯酶 1 c ↑	2. 2080 ↑	1. 4322 ↑	2. 3121 ↑	1
B0BNN3	310218	Car1	碳酸酐酶 1 ↑	9. 6383 ↑	3. 6983 ↑	4. 0926 ↑	1
Q9QZH8	57300	Aadac	芳乙酰胺脱乙酰酶 ↑	2. 3550 ↑	1. 8197 ↑	1. 8365 ↑	1
P54020	无	rp4	角鲨烯单加氧酶 ↑	1. 3428 ↑	1. 3428 ↑	1. 9409 ↑	1
P04906	24426	Gstp1	谷胱甘肽 S-转换酶 P ↑	2. 3335 ↑	2. 7797 ↑	1. 7219 ↑	1
P02401	140662	Rplp2	60S acidic ribosomal protein P2 ↑	2. 4434 ↑	2. 4210 ↑	1. 5417 ↑	1
P20760	无	Igg-2a	Ig gamma-2A chain C region ↑	8. 7096 ↑	14. 996 ↑	1. 3804 ↑	1
P97524	65192	Slc27a2	Very long-chain acyl-CoA synthetase ↑	1. 2706 ↑	1. 2076 ↑	1. 2246 ↑	1
Q4G064	304542	Coq5	2-methoxy-6-polyprenyl-1,4-benzoquinol methylase ↑	1. 6904 ↑	2. 4434 ↑	2. 2080 ↑	1
P12785	50671	Fasn	脂肪酸合酶 ↓	0. 2512 ↓	0. 3733 ↓	0. 1380 ↓	1
P16638	24159	Acly	ATP-柠檬酸合成酶 ↓	0. 1138 ↓	0. 1786 ↓	0. 1754 ↓	1
P22734	24267	Comt	儿茶酚-O-甲基转移酶 ↓	0. 3945 ↓	0. 4365 ↓	0. 4699 ↓	1
P12928	24651	Pklr	丙酮酸激酶 ↓	0. 4446 ↓	0. 5395 ↓	0. 4325 ↓	1
P31210	192242	Akr1d1	3-氧基-5-β-类固醇-4 脱氢酶 ↓	0. 4920 ↓	0. 3133 ↓	0. 4246 ↓	1
P13697	无	Me1	NADP-苹果酸酶 ↓	0. 1706 ↓	0. 3105 ↓	0. 3342 ↓	1
Q64611	60356	Csad	半胱氨酸亚磺酸脱羧酶 ↓	0. 4656 ↓	0. 2355 ↓	0. 4246 ↓	1
P80299	65030	Ephx2	双官能环氧化物水解酶 2 ↓	0. 3631 ↓	0. 5058 ↓	0. 5754 ↓	1
P05370	24377	G6pdx	葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 ↓	0. 1854 ↓	0. 3802 ↓	0. 3192 ↓	1
Q9Z122	83512	Fads2	脂肪酸去饱和酶 2 ↓	0. 1660 ↓	0. 3499 ↓	0. 2312 ↓	1
P25409	81670	Gpt	丙氨酸转氨酶 1 ↓	0. 4406 ↓	0. 6960 ↓	0. 6330 ↓	1

注：↑：差异蛋白在肝脏中高表达，↓：差异蛋白在肝脏中低表达。

被鉴定为差异蛋白质；蛋白的鉴定基于两个或两个以上特异性肽段；蛋白的差异在两次实验中的蛋白质平均变化比率上调 1.2 倍以上或者下调 0.6 倍以上。在肝脏中共鉴定出 2 047 个蛋白。依据上述要

求,附子、干姜、花椒与空白组比较鉴定出 50 个差异蛋白,下调 11 个差异蛋白,上调 39 个差异蛋白。详见表 1。

3.2 附子、干姜、花椒共有差异蛋白的药理作用分析 中药药性是中医基础理论的核心,药理作用是药物发挥作用效果的高度概括和总结,药性和药理作用相互影响,是将中医和西医联系的有效方法,也是揭示中药药性本质的有效手段。中药药性理论研究的最佳方法是基于中药药理作用。研究药性在药理作用方面的特性和规律性,具有一定的典型性和示范性。本研究以中药药性、药效及能量代谢的相关性为主,将中药传统理论与蛋白质组学成果联系起来,在蛋白质组学方面建立符合中医药思想的中草药药性组方体系^[13-14]。

附子、干姜、花椒,三者性味皆辛热,均具有温里散寒之功,这是主要共同点。综合现代药理学研究报道可知,附子、干姜、花椒共有的药理作用包括抗肿瘤、抗衰老、镇痛、抗炎、保肝、对心血管系统的作用等^[15-17]。本文从附子、干姜、花椒共筛选出 50 个共有、且作用趋向一致的差异蛋白,首先采用 UniProt(<http://www.uniprot.org/>) 数据库确认蛋白功能,并通过网络可视化和分析软件 Cytoscape 联合差异蛋白文献将差异蛋白进行系统地归纳分析。如图 1。

3.2.1 附子、干姜、花椒的抗肿瘤作用 本次研究发现大鼠灌胃给予附子、干姜、花椒水煎液后,与抗肿瘤相关的蛋白谷胱甘肽过氧化物酶 1、糖原磷酸化酶、碳酸酐酶 1、碳酸酐酶 3 表达上调。目前,GSH-Px 至少有 4 种同工酶,谷胱甘肽过氧化物酶 1^[18] (GPX1) 是谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px) 家族中的重要成员之一。广泛分布于机体各个组织,主要功能是将脂质过氧化物和过氧化氢催化分解成相应的醛类和水,许多研究显示在动脉粥样硬化、血管壁抗氧化应激和肝癌中 GPX1 发挥主要作用。研究表明,GSH-Px 在肝癌组织表达明显降低。碳酸酐酶^[19-20] (carbonic anhydrase,CA) 广泛存在哺乳动物中,几乎各个组织中都可以检测到 CA 的存在,CA 机体的生理过程和物质代谢发挥重要作用,如生理过程的酸碱平衡、骨吸收、唾液和胃酸的生成等,以及物质代谢中的尿素生成、糖异生和脂肪生成等。CA 与癌症的发生和发展密切相关,随着肿瘤病理机制不断深入的研究,碳酸酐酶与肿瘤的关系已成为研究的热点。CA1、CA2、CA3 在肝癌组织中表达下调,能促进肿瘤细胞的生长和转移。糖原磷酸化

酶^[21] Glycogen phosphorylase, GP) 是糖原代谢过程中的关键酶,在糖原分解反应的第一步 CP 利用无机磷酸盐将糖原转化为 1-磷酸葡萄糖。主要包括亚型即肌型(Muscle-type GP, PYGM)、肝型(Liver-type GP, PYGL) 与脑型(Brain-type GP, BGP 或 PYGB) 三种亚型,PYGL 在调节细胞死亡上发挥主要作用,在增殖快、分化差的肝癌细胞系中 PYGL 的表达缺失或降低。已有文献证明附子、干姜、花椒具有抗肿瘤作用^[22-24]。本实验可见附子、干姜、花椒能诱导谷胱甘肽过氧化物酶 1、糖原磷酸化酶、碳酸酐酶 1、碳酸酐酶 3 的表达上调,与三者均具有抗肿瘤作用相一致,同时表明这可能是抑制肿瘤作用的分子学机制之一。

3.2.2 附子、干姜、花椒的抗衰老作用 细胞衰老是个复杂而渐进的过程。它是指细胞在外在微环境变化或内在特定基因表达与失活等因素作用下脱离细胞周期,并不可逆地丧失增殖能力后进入的一种相对稳定状态。引起细胞衰老的因素很多,具有综合性和复杂性。实验研究发现酰基 CoA 合成酶^[25] 在老年大鼠肝脏组织中表达减少,可能与脂质代谢异常调节相关。细胞衰老时,游离脂肪酸增多,对细胞损害增加,脂的降解能清除有害的游离脂肪酸,使这些降解的脂肪酸重新进入到合成途径中。我们研究发现附子、干姜、花椒可以上调酰基 CoA 合成酶起到抗衰老的作用。这与文献报道附子、干姜、花椒抗衰老机制一致^[26-28]。

3.2.3 附子、干姜、花椒的镇痛、抗炎作用 本文研究发现大鼠灌胃给予附子、干姜、花椒水煎液后,与镇痛、抗炎相关的羧酸酯酶 1 表达上调,儿茶酚-O-甲基转移酶表达下调。羧酸酯酶 1^[29] (Carboxylesterase1, CES1) 是胆固醇酯水解酶家族成员之一,主要功能是将胆固醇酯水解成为游离胆固醇并且排出巨噬细胞,使泡沫细胞的形成减少。最近研究表明^[30-31]:CES1 对系统和脂肪组织的炎症反应有降低作用,使胰岛素敏感性增强和糖耐量增加等作用。其中,CES1 主要在肝脏中表达。大量研究表明:在感染和炎症等病理状态下,大多数药物代谢酶在肝脏中的表达水平降低、活性下降,导致药物清除率下降,进而引起血浆药物浓度增高发生药物毒性反应。儿茶酚-O-甲基转移酶(catechol-O-methyltransferase, COMT) 主要功能是灭活含有儿茶酚结构的神经递质,在神经系统和机体组织内分布,文献研究表明^[30-31],COMT 抑制剂目前在临床上主要协助治疗帕金森病、抗抑郁、抗 II 型精神失常和治疗神经痛等

疾病。已有文献证明,附子、干姜、花椒都具有镇痛^[32-34]、抗炎^[35-37]的作用,干姜的醚提物和水提物都具有显著镇痛抗炎作用。附子煎剂对急性炎症模型有明显抑制作用,同时对热刺激所致小鼠疼痛有显著抗炎镇痛作用。实验证明,花椒和青椒的水提液都有明显的镇痛作用。临床上用花椒乙醚提取物或花椒挥发油作为口腔科的安抚剂,进行消炎止痛。结合药理学研究的文献报道结果,认为附子、干姜、花椒可能通过诱导羧酸酯酶 1 蛋白的表达发挥抗炎作用,通过下调儿茶酚-O-甲基转移酶的表达而发挥镇痛作用。三者下调儿茶酚-O-甲基转移酶的表达,能否成为该酶的抑制剂,需要我们进一步实验研究。

3.2.4 附子、干姜、花椒对心血管的作用 本文研究发现大鼠灌胃给予附子、干姜、花椒水煎液后,与心血管相关的蛋白质二硫键异构酶、O-肉碱棕榈酰转移酶 II 表达上调,儿茶酚-O-甲基转移酶表达下调。蛋白质二硫键异构酶^[38] (protein disulfide isomerase, PDI) 是氧化还原酶之一,主要功能包括促进二硫键的形成与异构化、促进蛋白质正常折叠与恢复未折叠和错误折叠等,参与众多蛋白的合成、成熟,在人体健康与复杂机制的疾病中发挥重要作用。最近研究发现:缺血性心脏病是导致死逐年增加,合并糖尿病患者死亡率明显增加。PDI 在心脏病中发挥关键作用,PDI 表达上调能降低心肌梗死面积,减少心肌细胞凋亡。O-肉碱棕榈酰转移酶 II^[39] (CPT II) 缺乏会导致机体出现心律失常,临床主要表现为心率慢、心音低钝,心电图表现为房室传导阻滞,药物治疗无效。多巴胺(DA)主要参与人体精神活动和调控椎体外系的运动功能。疾病的发生和发展都与多巴胺的增多和减少有关。但是 DA 代谢降解主要由儿茶酚-O-甲基转移酶(COMT)完成。COMT 抑制剂可以减慢 DA 的代谢,且可以延长左旋多巴(L-dopa)在体内的半衰期,达到治疗由于 DA 减少的引起帕金森、抑郁等相关疾病^[40]。附子、干姜、花椒在临床上被广泛应该在心血管相关疾病中^[41-43],本实验筛选出的 50 个差异蛋白,其中蛋白质二硫键异构酶、儿茶酚-O-甲基转移酶和 O-肉碱棕榈酰转移酶 II 在心血管中发挥重要作用。

3.2.5 附子、干姜、花椒的保肝作用 目前,附子、干姜、花椒对消化系统的作用主要表现在抗消化道溃疡、保肝利胆、治疗腹泻等。本文研究发现大鼠灌胃给予附子、干姜、花椒水煎液后,与保肝相关的蛋白质丙氨酸转氨酶在肝脏中低表达、谷胱甘肽过氧化物酶在肝脏中高表达。丙氨酸转氨酶^[44] 又称谷

丙转氨酶,是肝功能检查中常用指标之一,主要分布在肝脏、心脏和骨骼肌,当肝细胞受到破坏损伤或坏死时,血液中的丙氨酸转氨酶表达增高。因此,该酶是反映肝细胞受损程度最灵敏的指标。谷胱甘肽过氧化物酶^[45] (Glutathione peroxidase, GSH-Px) 是体内广泛存在的一种重要的过氧化物分解酶。肝脏是合成多种抗氧化酶的主要器官,机体氧应激时存在损伤肝脏,而肝脏受损后,合成抗氧化酶减少,进一步加重机体的氧化应激。脂质过氧化在众多肝病的发病机制中起到重要作用,作为集体抗氧化预防重要部分的 GSH-Px 在肝脏中分布丰富,因此 GSH-Px 与各种肝病关系密切。文献表明附子、干姜、花椒都具有保肝作用^[46-48],主要通过影响丙氨酸转氨酶和谷胱甘肽过氧化物酶的表达达到保肝效果。

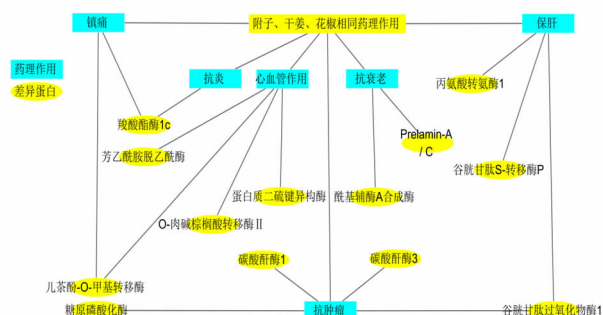


图1 附子、干姜、花椒共有药理作用与差异蛋白分析

3.3 附子、干姜、花椒对机体物质代谢和能量代谢的影响 采用 DAVID 数据库对差异蛋白进行 Pathway 注释,得到差异蛋白所参与的所有途径,筛选出差异蛋白显著参与的途径。附子、干姜、花椒共有的 50 个共有差异蛋白,主要分布在与能量代谢相关的通路或途径。进一步分析表明,附子、干姜、花椒主要是通过增加体内热量生成和提高对能量的利用两大方面影响机体的能量代谢。从能量供应的角度看,糖、脂及蛋白质三大营养素可以互相代替,并互相制约。由于糖、脂、蛋白质分解代有共同的通路,所以,任何一个供能物质的分解代谢占优势,常能抑制和节约其他供能物质的降解。体内糖、脂、蛋白质和核酸等的代谢不是彼此独立,而是相互关联,它们通过共同的中间代谢物,三羧酸循环和生物氧化等联成整体。三者之间可以互相转变,当一种物质代谢障碍时可引起其他物质代谢的紊乱。详见图 2。

本课题组在匡海学教授假说的支持下,早前已经完成典型的寒性中药(黄连、黄芩、黄柏)和热性中药(附子、干姜、花椒)代谢组学的研究,为寒热药性理论的研究创建了一个新的方法学平台。2011 年,匡海学等^[49] 采用 UPLC-QTOF-MS 法、主成分分

析(PCA)和正交偏最小二乘-判别分析(OPLS-DA)等技术,确定18个与能量代谢相关的内源性生物标志物。其中天冬氨酸、L-2-氨基乙二酸、5-磷酸核糖、木酮糖等与能量代谢相关的生物标记物在附子、干姜、花椒中上调。天冬氨酸又称天门冬氨酸,是一种 α -氨基酸,天冬氨酸的L-异构物是20种蛋白氨基酸之一,即蛋白质的构造单位^[50]。它是生物体内赖氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸等氨基酸及嘌呤、嘧啶碱基的合成前体。它可作为 K^+ 、 Mg^{2+} 离子的载体向心肌输送电解质,从而改善心肌收缩功能,同时降低氧消耗,在冠状动脉循环障碍缺氧时,对心肌有保护作用,它参与鸟氨酸循环,促进氧和二氧化碳生成尿素,降低血液中氮和二氧化碳的量,增强肝脏功能,消除疲劳,天冬氨酸主要参与氨基酸代谢影响机体的能量代谢;半乳糖是一种由六个碳和一个醛组成的单糖,归类为醛糖和己糖。它常以D-半乳糖苷的形式存在于大脑和神经组织中,也是某些糖蛋白的重要成分,是由乳类食物中的乳糖水解而来,其代谢主要是通过半乳糖激酶、半乳糖-1-磷酸尿苷转移酶及其所催化的酶促反应转变为葡萄糖而被利用,主要参与半乳糖代谢影响机体的能量代谢;6-磷酸葡萄糖醛酸和5-磷酸核糖是磷酸戊糖途径的中间产物,5-磷酸核糖是嘌呤核苷酸合成的原料。磷酸戊糖途径产生NADPH,作为供氢体,参与体内多种生物合成^[51];木酮糖是一种戊酮糖。在生物体内L型与D型的木酮糖先还原成木糖醇,继之再氧化而相互转换。D-木酮糖与ATP反应生成D-木酮糖-5-磷酸而进入磷酸戊糖途径。因此成为另一糖酵解途径的磷酸戊糖途径的重要的中间物;白三烯具有共轭三烯结构的二十碳不饱和酸,参与花生四烯酸代谢,白三烯在呼吸道的炎症、诱导鼻过敏反应中发挥重要作用。这些代谢物主要参与氨基酸代谢、糖代谢、花生四烯酸代谢、磷酸戊糖途径来影响机体的能量代谢。

本实验差异蛋白共有18个代谢通路与能量代谢相关,其中糖代谢、磷酸戊糖途径、氨基酸代谢等途径与匡海学教授研究的代谢组学影响能量代谢途径相一致,将代谢组学和蛋白质组学结果相结合,发现附子、干姜、花椒无论是大分子还是小分子都主要参与糖代谢、脂肪酸代谢、磷酸戊糖途径、氨基酸代谢等途径增加机体内热量的生成,提高对能量的利用来影响机体的能量代谢。

3.3.1 附子、干姜、花椒增加机体内热量生成 本

文通过蛋白质组学研究发现,附子、干姜、花椒参与能量代谢的主要途径如下。

丙酮酸代谢途径^[52]:丙酮酸是体内产生的三碳酮酸,它是糖酵解途径的最终产物,在细胞浆中还原成乳酸供能,或进入线粒体内氧化生成乙酰CoA,进入三羧酸循环,被氧化成二氧化碳和水,完成葡萄糖的有氧化供能过程。因此,丙酮酸在三大营养物质的代谢联系中起着重要的枢纽作用。本实验研究表明:附子、干姜、花椒上调醛脱氢酶、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶有影响丙酮酸代谢途径,进而增加机体内热量的生成。

三羧酸循环(Tricarboxylic Acid Cycle, TCA)途径:TCA是主要的能量代谢途径之一,大多数需氧生物体内存在的代谢途径,不仅是糖类、脂类、氨基酸的最终代谢通路,也是糖类、脂类、氨基酸代谢之间关联的枢纽中心。三羧酸循环另一重要功能是为其他合成代谢提供小分子前体。附子、干姜、花椒可以上调磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶,加快三羧酸循环,增加体内热量的生成。

淀粉-蔗糖代谢途径:机体的各个方面都受到糖类的影响,其不仅能提供呼吸底物和中间代谢产物所需要的能量,还能适用于生命基础物质的合成和生命物质的结构成分。糖原磷酸化酶^[53](glycogen phosphorylase)是催化糖原降(glycogenolysis)的关键酶,该酶催化糖原的磷酸解,产生的葡萄糖-1-磷酸在磷酸葡萄糖变位酶催化下转变成葡萄糖-6-磷酸,后者或是在葡萄糖-6-磷酸酶催化下生成葡萄糖,为机体组织提供葡萄糖,或是直接进入无氧代谢和有氧代谢途径以参与能量供应。附子、干姜、花椒可以上调糖原磷酸化酶、UDP-葡萄糖-6-脱氢酶影响淀粉-蔗糖代谢途径,使体内热量生成增加。

糖酵解/糖异生途径^[55]:糖异生作用和糖酵解作用是互相关联和制约。其中一条途径活跃时,另一途径的活性就相应降低,磷酸果糖激酶(糖酵解)和果糖-1,6-二磷酸酶(糖异生)是调控作用的关键酶。当葡萄糖供应相对比较充足时,果糖-2,6-二磷酸作为细胞内的分子信号也处于相对高水平。它能活化糖酵解作用并抑制糖异生途径。果糖-2,6-二磷酸受到破坏则引起果糖-1,6-二磷酸酶活性加强,从而加速糖异生作用。附子、干姜、花椒上调醛脱氢酶X、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶影响糖酵解/糖异生途径,进而影响能量代谢。

脂肪酸代谢途径^[56]:脂肪酸是机体主要能量来源之一。脂肪酸在有氧的情况下,可以氧化分解为

CO₂ 和 H₂O, 释放大量能量, 脂肪酸氧化最活跃的组织是肝脏和肌肉, 其最主要的氧化形式是 β -氧化。脂肪酸 β -氧化过程中生成的乙酰 CoA, 乙酰 CoA 作为重要的中间化合物, 不仅能进入三羧酸循环氧化供能, 还是许多重要化合物 (酮体、胆固醇和类固醇) 合成的原料。附子、干姜、花椒上调 O-肉碱棕榈酰转移酶 2、醛脱氢酶 X 影响脂肪酸代谢途径, 增加热量生成。

类固醇激素生物合成途径^[57]: 甾体激素具有极重要的医药价值, 在维持生命、调节性功能, 对机体发展、免疫调节、皮肤疾病治疗及生育控制方面有明确的作用。许多类固醇激素都有良好的调节糖代谢和水盐代谢的功能。附子、干姜、花椒上调类固醇 17- α -羟化酶、CYP4503A18、角鲨烯单加氧酶的表达, 调控参与类固醇激素的合成, 可促进激素转化, 减少其灭活和排泄。

过氧化物酶体增植物激活受体 (PPARs) 途径^[66-68]: 为核受体超家族之一, 主要包括 PPAR α 、PPAR β 和 PPAR γ 三种亚型, 主要参与调节糖代谢平衡、脂质和脂蛋白代谢、细胞增殖与分化和凋亡。近年来该信号通路的表达及干预的意义已开始成为国内外研究的热点, 酰基辅酶 A 合成酶 (ACS) 主要分布于肝脏和肾脏, 可促进肝脏摄取脂蛋白脂酶脂解生成的游离脂肪酸, 并转化为乙酰 CoA, 防止脂肪酸进入细胞后的流失。我们研究发现附子、干姜、花椒可以上调胆酰 CoA 合成酶, 增加乙酰 CoA 的生成, 进入三羧酸循环氧化供能, 热量生成增多。

花生四烯酸代谢^[63] (Arachidonic acid metabolism) 途径: 包括环氧化酶 (COX)、脂氧合酶 (LOX) 和细胞色素 P450 (CYP450) 3 种途径, 花生四烯酸系统对细胞和器官功能的影响主要依赖几十种相关酶的共同作用, 上百种代谢产物与相应的蛋白质 (包括受体、信号分子等) 结合和相互作用等共同介导。细胞功能状态改变或受到外界刺激能导致花生四烯酸代谢通路的改变, 同时也影响每个通路代谢产物之间的稳态, 从而导致细胞乃至机体的功能紊乱。特别是花生四烯酸代谢一条通路改变或出现异常时, 会直接或间接影响其他代谢途径、甚至会影响生物体的整体代谢。细胞色素 P450 (cytochrome P450 或 CYP450)^[64] 是一种含亚铁血红素的单加氧酶, 主要分布于肝脏, 在小肠、肺、肾、脑中也依次有少量分布。哺乳动物组织中 P450 在药物和异型生物的代谢。它参与内源性物质和外源性物质代谢。细胞色素 P450 作为一种末端加氧酶, 主要分布在内质网和

线粒体内膜上, 参与生物体内类固醇激素合成、胆汁酸、胆固醇及多未饱和脂肪酸转化为生物活性分子的过程中都起着重要作用^[65]。由于细胞色素 P450 也对细胞因子和体温调节都有重要影响, 附子、干姜、花椒可以上调细胞色素 P450 3A18, 调控参与类固醇激素的合成, 可促进激素转化, 减少其灭活和排泄, 提示附子、干姜、花椒促进生物体内类固醇代谢, 增强机体代谢过程。

3.3.2 附子、干姜、花椒提高对能量的利用 附子、干姜、花椒提高对能量的利用主要通过如下途径。

氨基酸代谢途径^[58]: 氨基酸是构成蛋白质分子的基本单位, 也能作为嘧啶、嘌呤、卟啉等生物合成的前体。其主要功能是合成蛋白质, 也合成多肽及其他含氮的生理活性物质, 体内的各种含氮物质几种都可由氨基酸转变而成, 包括蛋白质、肽类激素、氨基酸衍生物、黑色素、肌酸、胺类、辅酶或辅基等, 并可以氧化分解代谢提供机体所需能量; 氨基酸分解所生成的 α -酮酸可以转变成糖、脂类或再合成某些非必需氨基酸, 也可以经过三羧酸循环氧化成二氧化碳和水, 并放出能量。本次研究发现大鼠灌胃给予附子、干姜、花椒水煎液后, 与氨基酸代谢相关的蛋白醛氧化酶 X、D-氨基酸氧化酶上调, 醛氧化酶 (Aldehyde Oxidase, AOX) 是一类高度保守的钼-黄素蛋白, 主要存在于哺乳动物细胞质中, 具有广泛的底物特异性, 可催化醛类及含氮、含氧杂环类化合物的氧化反应。该酶体内分布较广, 存在种属及个体间差异, 在药物及外源物的 I 相代谢中发挥重要作用。AOX 依赖的代谢反应可能影响相关药物的药效、代谢特性与毒性反应。D-氨基酸氧化酶 (D-amino Acid Oxidase; Oxidoreductase, DAAO)^[59] 是一种典型黄素蛋白酶, 以黄素腺嘌呤为辅基。可氧化 D-氨基酸的氨基生成相应的酮酸和氨, 使生糖、生酮氨基酸分解加快, 提高对能量的利用。

N-聚糖生物合成途径: N-聚糖主要参与新生肽链的折叠、维持蛋白质正确构象的生理过程, 极性细胞中蛋白质的分拣。N-聚糖生物合成需要消耗能量, 本实验上调 N-聚糖生物合成途径中的多萜基二磷酸寡聚糖蛋白糖基转移酶 1, 提高对能量的利用。

核糖体 (Ribosome)^[54], 又称核蛋白体, 细胞中普遍存在核糖体除哺乳动物成熟的红细胞。核糖体是细胞内一种核糖核蛋白颗粒 (ribonucleoprotein particle), 主要由 RNA (rRNA) 和蛋白质构成, 其惟一功能是按照 mRNA 的指令将氨基酸合成蛋白质多肽链, 所以核糖体是细胞内蛋白质合成的分子机

器。附子、干姜、花椒上调 60S 酸性核糖体磷蛋白 P2, 蛋白质合成旺盛, 耗能增多。

脂肪酸生物合成途径^[60]: 脂肪酸生物合成是机体代谢途径之一, 具有广泛的应用前景, 肝脏是脂肪酸生物合成的主要部位, 同时也在脑、肺、肾等组织中合成。脂肪酸合成的起始原料是乙酰辅酶 A, 在细胞液中进行。机体内的脂肪酸大部分来源于食物, 为外源性脂肪酸, 在体内可通过改造加工被机体利用。同时机体还可以利用糖和蛋白转变为脂肪酸称为内源性脂肪酸, 用于甘油三酯的生成, 贮存能量。脂肪酸合酶^[61] (Fatty Acid Synthase, FASN) 是多功能酶复合体, 主要参与内源性长链脂肪酸的合成, 是体内合成内源性饱和脂肪酸的关键酶, 在体内各组织中广泛存在, 参与细胞增殖、分化和机体能量代谢、脂类代谢等重要生命活动。有研究表明^[69]: 抑制 FASN, 可使乙酰 CoA 更多进入三羧酸循环产生能量而被消耗, 从而减少脂肪的合成和储存。Kim 等研究表明, FASN 的抑制剂 C75 可以通过激活 CPT-1 酶使得小鼠周围脂肪组织的 β 氧化活跃, 增加机体的脂肪消耗。附子、干姜、花椒可以抑制脂肪酸合酶, 提高对机体能量的利用。

胰岛素信号通路^[62]: 肝脏在人体的葡萄糖代谢中有着重要作用, 从胰岛素与其受体 (InsR) 结合开始, 肝脏糖代谢构成了一个复杂的传导通路, 起到稳定血糖的生理作用。肝脏胰岛素抵抗主要表现为胰岛素抑制内源性葡萄糖生成的能力减弱和肝糖原合成减少。肝脏是人体内葡萄糖摄取和利用的重要场所。葡萄糖进入肝细胞后, 一部分进入三羧酸循环进行氧化磷酸化为细胞提供能量, 另一部分在糖原合成酶的作用下合成肝糖元。糖原磷酸化酶^[53] (glycogen phosphorylase) 是催化糖原降解的关键酶, 为机体组织提供葡萄糖, 或是直接进入无氧代谢和有氧代谢途径以参与能量供应。糖原合酶是糖原合成过程的限速酶, 糖原合成是耗能过程。本次研究发现大鼠灌胃给予附子、干姜、花椒水煎液后, 与胰岛素信号通路相关的蛋白糖原合酶上调, 糖原合成增多, 耗能增多, 但是同时能上调糖原磷酸化, 加快肝糖原分解, 供应机体所需能量。

机体内糖、脂肪和蛋白质的氧化分解提供人体一切生命活动所需要的全部能量, 糖、脂肪和蛋白质这三类营养物质中包含能被机体利用的化学能, 是人体活动的直接能源物质。能量代谢与物质代谢相互影响, 物质在合成代谢时, 需要获取能量, 而物质在氧化分解过程中, 伴有能量的释放。通常我们把

伴随物质代谢过程中发生的能量的贮存、释放、转移和利用称为能量代谢。热性中药附子、干姜、花椒主要通过调控代谢相关蛋白的表达来影响机体代谢过程, 增加体内热量的产生和提高对热量的利用两方面影响机体的能量代谢。其中主要通过调控脂肪酸代谢、类固醇激素生物合成、谷胱甘肽代谢、细胞色素 P450 代谢、糖代谢、柠檬酸循环等十几个代谢途径增加机体热量的生成, 通过控制和调节氨基酸代谢、N-聚糖生物合成、核糖体、脂肪酸生物合成、胰岛素信号通路 5 个代谢途径提高机体对能量的利用。本文实验结果进一步证明附子、干姜、花椒是通过不同途径影响机体的能量代谢, 促进机体能量代谢的中药具有热 (或温) 性, 与匡海学教授的中药性味科学内涵新假说相一致。

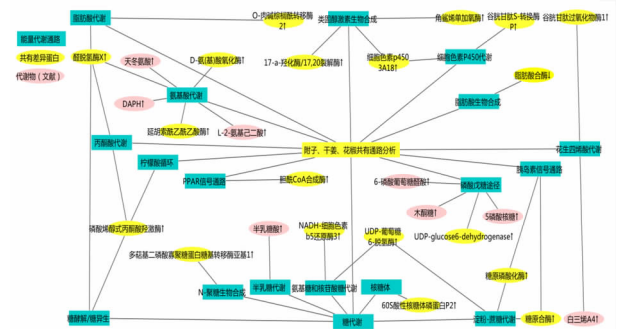


图2 热性中药的共有差异蛋白通路分析

4 讨论

蛋白质组学是指在特定的时间和空间内一个基因组、一种组织或一种生物、细胞所表达的包括所有亚型以及经过修饰的全部蛋白质。蛋白质的表达、蛋白质的结构和蛋白质的功能分别称为表达蛋白质组学、结构蛋白质组学和功能蛋白质组学, 是蛋白质组学主要研究内容。现阶段, 蛋白质组学的研究受到国内外广泛关注, 因为人体的各种代谢和调控途径主要由蛋白质执行, 我们只有不断进行筛选和鉴定样本中的蛋白, 才能进一步探明疾病的发生、监控疾病的进程和每个阶段相应的蛋白表达水平的关联性及规律性。为寻找药物的作用靶点、作用模式、药物的功效, 毒理研究和筛选疾病的标志性蛋白奠定理论基础。使我们对人类生命本质的认识和疾病的发生发展机制提升到一个更高的层次。

本实验选择 iTRAQ 技术, 该技术是在 2004 年由美国应用生物系统公司推出的一项新的同位素标记技术。基本工作原理为: iTRAQ 标记试剂能与赖氨酸侧链或肽段的 N 端发生反应, 完成对肽段的标记。标记完成后对本次实验所有样本进行混合, 一次可同时处理的样本数为 8 个。首先进行一级质

谱,在选择母离子时,不同标记的样本同一个肽段表现为一个峰,和一级质谱强度相比较增强了 8 倍,有利于广泛的鉴定。然后进行二级质谱,iTRAQ 试剂发生断裂,其中平衡基团发生中性丢失,该基团主要使 iTRAQ 试剂整体质量一样。报告基团的强度直接反映肽段的相对丰度,其质量从 113-121,但是不包括 120,因为 120 和苯丙氨酸的亚胺离子相同。在蛋白质组学研究中,相对于传统的定性及定量方法,该技术对蛋白的检测范围广泛,pH 值检测线性范围为 0-13;对蛋白的分子量检测范围更广泛,可以检测蛋白的分子量为 8-280KD 的蛋白;iTRAQ 技术可以检测出更多的低丰度(蛋白含量)蛋白,甚至对其他技术不能检测到的跨膜蛋白也可以灵敏的检测到。因具有高灵敏度、标记效率高、高分辨率、样品兼容性好、重复性好等优点,使该技术在蛋白质组学的研究和应用中被广泛应用。

匡海学教授提出的中药性(气)味科学内涵的新假说,其核心内容之一是“中药的药性(气)是药物通过不同途径以主要影响机体的能量代谢、物质代谢为特征的,可影响药物疗效发挥或与副作用发生有关的一类生物学效应。促进机体能量代谢、物质代谢的中药具有热(或温)性,抑制机体能量代谢、物质代谢的中药具有寒(或凉)性。”据此可以认为,能够系统反映机体代谢状况的代谢组学技术与方法以及能够系统反映调控机体代谢状况的蛋白质组学技术与方法,是非常适于中药药性研究的技术与方法。

本文依据匡海学教授的中药性味科学内涵新假说,基于蛋白质组学技术的研究方法,通过对代表性的温热中药附子、干姜和花椒开展大鼠能量代谢和生物标志物相结合的研究,探讨温热中药在影响机体物质代谢和能量代谢以及三者药味和功效中存在的共性。

众所周知,附子、干姜、花椒均为温热中药,并具有相似的药味和功效,现代研究也证明三者药理作用上存在共性,为加强治疗效果,有时临床还配伍使用。

本文研究结果表明:附子、干姜、花椒筛选出共同差异蛋白(诱导或抑制相关蛋白),在抗肿瘤、抗衰老、保肝、镇痛、抗炎、对心血管的作用中能对抗相关疾病的发生、发展,这可能是三者具有相似药味和功效的真正内涵,也为揭示中医临床“同病异治”,临床应用中药配伍的复方提供理论依据。

研究结果还证明,温热中药附子、干姜和花椒的

确都能通过多途径增强机体的物质代谢和能量代谢。同时,筛选出温热中药附子、干姜和花椒与机体物质代谢和能量代谢相关的 50 个差异蛋白。在此基础上,通过 DAVID 蛋白通路分析,筛选出与能量代谢相关通路 18 个。通过本文蛋白质组学的研究阐明,热性中药附子、干姜、花椒影响机体物质代谢和能量代谢主要通过两条途径来实现的。一是主要通过调控代谢相关蛋白的表达,如通过上调糖原磷酸化酶、UDP-葡萄糖 6-脱氢酶、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶等相关蛋白的表达,调节丙酮酸代谢途径、三羧酸循环、脂肪酸代谢、糖代谢(淀粉-蔗糖代谢、核糖体、糖酵解/糖异生)等途径的相关蛋白质来影响机体代谢过程,加快肝糖原分解,减少糖原合成,增加体内热量的产生;并通过上调 O-肉碱棕榈酰转移酶 2、醛脱氢酶 X 蛋白的表达,促进脂肪酸代谢,增加体内热量的产生;通过过氧化物酶体增殖物激活受体(PPARs)途径上调胆酰 CoA 合成酶,增加乙酰 CoA 的生成,进入三羧酸循环氧化供能,热量生成增多;通过花生四烯酸代谢(Arachidonic Acid Metabolism)途径,上调细胞色素 p450 3A18,调控参与类固醇激素的合成,可促进激素转化,减少其灭活和排泄,增强机体代谢过程。二是热性中药附子、干姜、花椒通过调控氨基酸代谢相关蛋白的表达,如通过氨基酸代谢途径,上调蛋白醛氧化酶 X、D-氨基酸氧化酶,增强体内氨基酸代谢、生酮或生糖氨基酸的分解代谢,产生三羧酸循环的中间产物或转变为糖或继续氧化提供能量;通过上调类固醇 17- α -羟化酶的表达,调控参与类固醇激素的合成,促进生物体内类固醇代谢,并能通过 N-聚糖生物合成途径,上调 N-聚糖生物合成途径中的多萜基二磷酸寡聚糖蛋白糖基转移酶 1,提高对能量的利用;通过脂肪酸生物合成途径,下调脂肪酸合酶的表达,提高对机体能量的利用;通过胰岛素信号通路上调相关的蛋白糖原合酶,使糖原合成增多,耗能增多。

这些研究结果,与此前匡海学等^[38]采用 UPLC-QTOF-MS 法确定 18 个与能量代谢相关的内源性生物标志物,而这些代谢物主要参与氨基酸代谢、糖代谢、花生四烯酸代谢、磷酸戊糖途径来影响机体的能量代谢结果相一致。这也进一步验证了匡海学教授提出的中药性味科学内涵新假说的客观性。

综上所述,中药药性具有整体性、动态性、时空性、复杂性等特点,这与蛋白质组和代谢组学的很多特征相似,所以以蛋白质组学为切入点进行中药药性实质研究具有很大的优势,目前的研究成果也表

明,这一研究思路是可行的,突破了中药药性理论研究的局限性,成为理论与实验研究的桥梁。因此将蛋白质组和代谢组结合为切入点,深入进行中药药性实质的研究,不仅有利于从微观的角度了解中药药性的物质基础,而且将为中药药效的研究提供理论依据,也将为中药药性研究提供新的思路和方法,这些对促进中医药现代化将具有重要作用。组学概念的提出为作者提供一个整体研究中药药性的新思路。通过高通量、大规模的整体研究模式,从系统生物学(蛋白质组学、代谢组学、基因组学、转录组学)系统地研究中药药性理论,可以全面了解相关基因、蛋白质或代谢物在机体发生、发展过程中的变化规律。目前,对于中药药性的研究,蛋白质组学和代谢组学研究的相比较多。建立和完善蛋白质组学和代谢组学技术平台,可从两个水平(蛋白组学、代谢组学)检测目的样品的差异性,筛选出组织、细胞、机体的病理生理或代谢水平的潜在变化。代谢组(metabolomics)学来源于代谢谱分析。代谢组学不仅能全面定量的阐释内源性代谢物,还对内因和外因变化规律有一定的影响,代谢组学方面是筛选代谢循环中相对分子质量小于 1000 的小分子内源性代谢物的变化,检测的内源性代谢物直接参与机体的各种代谢、循环,其水平高低在一定程度上反映了机体生化代谢的功能和状态或细胞、组织的代谢应答变化。蛋白质组学主要采用双向凝胶电泳(2DE)、双向荧光差异凝胶电泳(DIGE)、质谱(MS)及蛋白芯片等方法对蛋白的表达、分布、相互作用等进行全面的、整体的研究,即研究组织或细胞中全部蛋白质的科学。主要采用分子生物学先进的筛选技术,对组织或细胞中蛋白质的整体进行归类、鉴定并分析感兴趣的差异表达的蛋白质,最终明确它们的功能、相互作用。中药药性在蛋白质组学和代谢组学方面的任务不仅是鉴定出差异蛋白质和差异代谢产物,关于蛋白质组学,要进一步明确蛋白质功能和全面了解蛋白质及它们的修饰和相互作用网络分析,关于代谢组学,是要去分析影响中药药性的代谢途径,并将代谢组学和蛋白质组学关联起来,整合成垂直型分析,这样能够较完整地揭示药物如何通过多种途径作用于生物体多个靶点发挥整合调节的优越性及其机理,同时对疗效评估也具有重要意义。这种“整合”的研究方式也正是系统生物学的重点。希望在代谢组学的协助下,中药药性在蛋白质组学上能够将基础研究成果快速转化成实用方法,应用到更多领域中。

本文借助蛋白组学研究思路与技术,针对复杂生物样本的特殊性,开发了全新的目标蛋白富集、目标蛋白定性定量—iTRAQ 技术。建立的这种基于 iTRAQ 技术结合 2D-LC-MS/MS 评价温热中药(附子、干姜、花椒)对机体肝脏组织的能量代谢及物质代谢相关蛋白定量的方法,也可作为评价中药寒热药性的普适性方法。

实际上,寒热药性是从药物对机体阴阳盛衰、寒热变化的影响这一特定角度概括药物的作用的,并不能包括药物的所有功效。本次获得的蛋白质组学的数据与信息,不仅包含了药物寒热药性的信息,肯定也包含着药物药味(功效或药效)的信息,亦或有些信息既是药物寒热药性的信息,同时也是药物药味(功效或药效)的信息。这也证实了匡海学教授的中药性味科学内涵新假说中关于“中药同时具有性(气)与味,性(气)与味是中药(包括方剂、单味中药、有效部位或组分、单体化合物)同时兼具的两种特性。药味与药物的具体功效相关。”的正确性。另一方面,在这些信息中,不仅能够找出温热中药的共有生物标志物信息,如同本文所述的那样,也能找到或发现不同温热中药的特有的生物标志物的信息。因此,对获得的这些蛋白质组学信息的深入发掘,进一步对中药的四性与五味,甚至与归经等开展综合研究,全面认识和掌握中药的性能将成为我们后续的一项重要研究工作。

参考文献

- [1] Cai Z, Chiu JF, He QY. Application of proteomics in the study of tumor metastasis[J]. *Geno Prot Bioinfo*, 2004, 2(3): 154-166.
- [2] Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, et al. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis [J]. *Biotechnology*, 1996, 14(1): 61-64.
- [3] Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium* [J]. *Electrophoresis*, 1995, 16(7): 1090-1093.
- [4] Anderson NL, Matheson AD, Steiner S. Proteomics: applications in basic and applied biology [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2000, 11(4): 408-412.
- [5] 隋峰, 杨娜, 张畅斌, 等. 寒热性中药成分对 TRPV1 和 TRPM8 通道蛋白基因表达的影响[J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(12): 1594-1597.
- [6] 崔光志, 李峰, 宋晓玲, 等. 胡椒、荜茇对正常大鼠肝脏能量代谢因子的影响[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2013, 15(6): 1314-1316.
- [7] 李毅, 杨贞, 许健. 温热中药对寒症模型大鼠肝线粒体蛋白质组的影响[J]. *中草药*, 2014, 45(3): 373-378.
- [8] 彭淑红, 黄丽萍, 高小恒, 等. 寒性中药对大鼠骨骼肌能量代谢相

- 关因子的影响[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(23): 3064-3066.
- [9] 李健, 李峰, 王厚伟, 等. 中药药性与蛋白质含量相关性研究[J]. 山东中医药大学学报, 2009, 33(3): 181-183.
- [10] 黄丽萍, 彭淑红, 蒙晓芳, 等. 热证大鼠脂肪代谢及解耦联蛋白 1 mRNA 表达的相关研究[J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(3): 541-543.
- [11] Aranda B, Achuthan P, Alam-Faruque Y, et al. The IntAct molecular interaction database in 2010 [C]. Nucleic Acids Res, 2010, 38: D525-531.
- [12] Ceol A, Chatr Aryamontri A, Licata L, et al. MINT, the molecular interaction database; 2009 update [J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38: D532-539.
- [13] 姜萍, 李晓, 李寿松. 从中药四气五味归经功效分析丁书文教授治疗高血压病用药特色[J]. 中华中医药杂志, 2013, 7(28): 1951-1953.
- [14] 卢训丛. 中药性味归经理论的研究思路与方法[J]. 中国中医基础医学杂志, 2006, 12(11): 803-804.
- [15] 阎爱荣, 张宏. 附子的药理研究[J]. 中国药物与临床, 2008, 9(8): 745-747.
- [16] 龙全江, 徐雪琴. 干姜化学成分、药理作用及加工炮制研究文献分析[J]. 现代中药研究与实践, 2015, 29(1): 82-83.
- [17] 朱雪, 王亮. 花椒药理作用研究进展[J]. 社区医学杂志, 2010, 8(7): 43-45.
- [18] 郑美莲, 黄家深. 硒谷胱甘肽过氧化物酶与肿瘤[J]. 癌症, 1989, 8(5): 399-401.
- [19] 姜亮, 韩金祥, 常晓天. 碳酸酐酶与肿瘤相关性研究进展[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2012, 19(18): 1433-1436.
- [20] 朱玉丹, 王蕾, 方利洲, 等. 胸部肿瘤患者肋间肌碳酸酐酶Ⅲ及其 mRNA 表达的研究[J]. 中国癌症杂志, 2014, 12(24): 895-900.
- [21] 汤菲, 安黎云, 贾克然. 脑型糖原磷酸化酶在人结、直肠肿瘤中的表达[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(23): 3187-3189.
- [22] 董兰凤, 刘京生, 苗智慧, 等. 附子多糖对 H22 和 S180 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2003, 9(9): 14-17.
- [23] 蒲华清, 王秉翔, 杜爱玲, 等. 6-姜酚在不同环境中对人肝癌细胞株杀伤和化疗增敏作用的研究[J]. 中华老年医学杂志, 2014, 33(4): 424-428.
- [24] 袁太宁, 肖长义, 汪璩植. 花椒抗宫颈癌 Caski 细胞作用及其机制的初步研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(5): 1119-1120.
- [25] 王兆君, 李田昌, 杨峰, 等. 非诺贝特对衰老大鼠肝脏组织酰基辅酶 A 合成酶的影响[J]. 医药导报, 2012, 31(6): 698-700.
- [26] 田秋芬, 龚传美. 附子泻心汤煎剂抗衰老药理作用的实验观察[J]. 解放军医学高等专科学校学报, 1996, 24(3): 58-59.
- [27] 李爱华. 生姜抗氧化作用的研究[J]. 食品科学, 1995, 16(12): 35-38.
- [28] 凌智群, 万杰, 胡苗苗, 等. 花椒多酚类化合物抗自由基抗氧化损伤的研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(8): 1941-1943.
- [29] 甄为. 羧酸酯酶 1 对大鼠颈动脉损伤后血管狭窄及炎症反应的影响[D]. 沈阳: 辽宁医学院, 2014.
- [30] 高博闻, 孙凡, 朱亮. 儿茶酚-O-甲基转移酶抑制剂临床应用进展[J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(5): 982-985.
- [31] 张野, 江三多, 钱伊萍, 等. 情感性精神障碍与儿茶酚邻位甲基转移酶基因的关联性研究[J]. 中华精神科杂志, 2002, 35(4): 206-208.
- [32] 徐红萌, 姜慧卿. 附子对神经病理性疼痛大鼠的镇痛作用[J]. 中华麻醉学杂志, 2005, 25(5): 381-384.
- [33] 王梦, 钱红美, 苏简单. 干姜乙醇提取物解热镇痛及体外抑菌作用研究[J]. 中药新药与临床药理, 2003, 14(5): 299.
- [34] 王朝晖. 花椒挥发油镇痛作用的实验研究[J]. 中国药房, 2011, 22(3): 218-219.
- [35] 杨景峰, 赵天才. 芍甘附子汤对 AA 大鼠免疫调节及关节滑膜超微结构形态的影响[J]. 陕西中医学院学报, 2004, 27(3): 65-67.
- [36] 蒋苏贞, 廖康. 干姜醇提取物对实验性胃溃疡的影响[J]. 中国民族民间医药, 2010, 19(8): 79-80.
- [37] 袁娟丽. 花椒挥发油的抗炎、镇痛作用[J]. 中药材, 2010, 33(5): 794-797.
- [38] 秦冉冉, 王志浩. 蛋白质二硫键异构酶参与血栓形成的研究进展[J]. 心血管病学进展, 2015, 36(4): 519-523.
- [39] 崇爱国, 刘伏元, 许明生, 等. 兔动脉粥样硬化形成过程中血管平滑肌细胞层肉碱棕榈酰转移酶 I mRNA 表达下调[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15(8): 618-621.
- [40] 高博闻, 孙凡, 朱亮. 儿茶酚-O-甲基转移酶抑制剂临床应用进展[J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(5): 982-984.
- [41] 秦永刚, 张美荣, 张建平, 等. 不同蒸煮时间对附子强心作用及心脏毒性的影响[J]. 医学信息, 2002, 15(10): 618-619.
- [42] 周静, 杨卫平, 李应龙, 等. 干姜水煎液对急性心肌梗死大鼠血浆血管紧张素 II、血清肿瘤坏死因子 α 、丙二醛、一氧化氮的影响[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(2): 288-290.
- [43] 许青媛, 杨甫昭. 花椒粗提物对应激性心肌损伤的保护作用[J]. 中草药, 1993, 24(5): 277-277.
- [44] 许沙沙, 郭连峰, 吴妍, 等. 235 例孕妇乙肝病毒标志物检测结果及丙氨酸转氨酶变化分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2015(25): 2355-2359.
- [45] 蔡晓波, 陆伦根. 谷胱甘肽过氧化物酶与肝脏疾病[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(32): 3279-3282.
- [46] 郭尹玲, 扈晓宇, 钟森, 白松林. 附子对免疫性肝损伤模型大鼠的影响及代谢组学研究[J]. 西部医学, 2010, 22(5): 797-799.
- [47] 张明发, 苏晓玲, 沈雅琴. 干姜现代药理研究概述[J]. 中国中医药科技, 1996, 3(2): 46-48.
- [48] 张明发, 沈雅琴, 朱自平, 等. 花椒“温中止痛”药理研究[J]. 中国中药杂志, 1991, 16(8): 493-497.
- [49] Kuang HX, Wang YY, Wang QH, et al. Metabonomics research of the four properties in traditional Chinese medicine based on UPLC-QTOF-MS system [M]. Edited by Haixue Kuang, Theories and Practice of Chinese Medicine, Intech, 2011: 13-28.
- [50] 吴东辉, 杨权, 许崇涛. 应激对大鼠海马谷氨酸、天冬氨酸和 γ -氨基丁酸含量的影响[J]. 中华精神科杂志, 2003, 36(2): 98-100.
- [51] 傅雯萍, 王维亚, 王恒. 葡萄糖醛酸转移酶 1A1G71R 突变和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺陷对新生儿胆红素浓度的影响[J]. 中国实用儿科杂志, 2006, 21(6): 453-454.
- [52] 朱惠莲. 丙酮酸对肥胖大鼠体重和脂肪代谢的影响[J]. 营养学报, 2002, 24(3): 229-232.

- [53] 汤旭葵, 关腾, 钱貽崧, 等. 糖原磷酸化酶抑制剂山楂酸对小鼠血糖和肝糖原的影响[J]. 中国天然药物, 2008, 6(1): 53-56.
- [54] 王辉, 刘伟利. 核糖体蛋白基因表达与肿瘤的关系[J]. 生理科学进展, 2007, 38(4): 376-379.
- [55] 彭秋平. 糖酵解代谢在恶性肿瘤细胞中的特异性表型及其意义[J]. 临床肿瘤学, 2009, 5(14): 470-473.
- [56] 谭斌斌. 2 型糖尿病患者血浆中脂肪酸代谢谱的研究[D]. 长沙: 中南大学, 2010.
- [57] 王草叶, 王玉邦. 类固醇激素合成急性调节蛋白研究进展[J]. 中华男科学杂志, 2006, 12(08): 733-736.
- [58] 吴宏伟, 高健, 李韶菁, 等. 基于液相色谱-串联质谱的氨基酸代谢组学方法研究黄芪注射液治疗脑缺血[J]. 分析化学(FENXI HUAXUE) 研究报告, 2013, 3(41): 344-348.
- [59] 赵文娟, 殷明. 中枢神经系统 D-氨基酸氧化酶的研究进展[J]. 生理科学进展, 2008, 39(1): 64-65.
- [60] 武临专. 脂肪酸生物合成—发现抗菌药物的靶位[J]. 国外医药抗生素分册, 2003, 24(9): 208-212.
- [61] 杜建青, 赵婷婷, 许丹焰. 脂肪酸合酶与冠心病的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19(3): 277-231.
- [62] 李义. 由胰岛素信号通路筛选糖尿病药物作用靶点[J]. 基础医学与临床, 2004, 24(6): 602-605.
- [63] 夏炎枝, 王西明, 段秋红, 等. 软脂酸诱导 HepG2 细胞胰岛素抵抗及花生四烯酸防治作用的机制研究[J]. 中国老年学, 2005, 2(1): 25-27.
- [64] 程婕, 杨凌. 细胞色素 P450 氧化还原酶的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(2): 129-133.
- [65] 郭淑华. 促性腺激素(FSH)对甾类激素合成调节作用的研究[J]. 潍坊学院学报, 2015, 11(5): 72-74.
- [66] 陈蔚, 陈雯洁, 夏燕萍, 等. 黄芪多糖对糖尿病仓鼠脂代谢紊乱及心肌 PPAR- α 表达的影响[J]. 复旦学报, 2010, 37(2): 194-215.
- [67] 廖晨钟, 邓沱, 山松, 等. 以 PPAR- γ 为靶标的抗 2 型糖尿病药物研发策略[J]. 中国新药杂志, 2003, 12(12): 980-983.
- [68] 王芳, 马向华, 沈捷, 等. PPAR- γ 激动剂对瘦素刺激的血管平滑肌细胞增殖的影响[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2008, 28(3): 300-303.
- [69] 杜建青, 赵婷婷. 脂肪酸合酶与冠心病的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19(3): 227-231.

(2015-12-09 收稿 责任编辑: 洪志强)

(上接第 1823 页)

- [3] 赵文晓, 崔宁, 韩冰冰, 等. 黄芪及拆分组对脾虚水湿不化模型大鼠的影响[J]. 山东中医药大学学报, 2015, 39(3): 268-270.
- [4] 高洁, 韩冰冰, 韩旭, 等. 复合造模因素诱导脾虚水湿不化模型大鼠胃肠功能的改变[J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(9): 1999-2000.
- [5] Zhang XG, Zhang H, Tan R, et al. Mechanism of earthquake simulation as a prenatal stressor retarding rat offspring development and chinese medicine correcting the retardation: hormones and gene-expression alteration[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2012; 670362.
- [6] 李新, 范颖. 基于多指标正交设计考察黄芪有效部位干预糖尿病模型大鼠的药效机制及其交互关系[J]. 北京中医药大学学报, 2013, 36(7): 457-461.
- [7] 毛先晴, 欧阳静萍, 吴柯, 等. 黄芪多糖对糖尿病 KKAy 小鼠肝脏脂肪变性的影响[J]. 中国糖尿病杂志, 2008, 16(4): 233-236.
- [8] Usuda D, Kanda T. Peroxisome proliferator-activated receptors for hypertension[J]. World J Cardiol, 2014, 26(8): 744-754.
- [9] Burri L, Thoresen GH, Berge RK. The role of PPAR α acitivation in liver and muscle[J]. PPAR Res, 2010; 1-11.
- [10] Kersten S. Integrated physiology and systems biology of PPAR α [J]. Mol Metab, 2014, 3(4): 354-371.
- [11] 胡卫红, 乔杰, 李蓉, 等. 多囊卵巢综合征患者血清脂肪型脂肪酸结合蛋白水平与性激素及血脂的相关性研究[J]. 中华医学杂志, 2006, 86(45): 3186-3189.
- [12] 邢万佳, 高聆, 赵家军. 胆固醇 7-羟化酶 CYP7A1 表达及调控相关研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2012, 20(16): 1439-1446.
- [13] Li F, Patterson A D, Krausz K W, et al. Metabolomics reveals an essential role for peroxisome proliferator-activated receptor alpha in bile acid homeostasis[J]. J Lipid Res, 2012, 53(8): 1625-1635.
- [14] Hammond L E, Gallagher P A, Wang S, et al. Mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase-deficient mice have reduced weight and liver triacylglycerol content and altered glycerolipid fatty acid composition[J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(23): 8204-8214.
- [15] Wu B, Beitz E. Aquaporins with selectivity for unconventional permeants[J]. Cell Mol Life Sci, 2007, 64(18): 2413-2421.
- [16] 杨钦钦, 陈民利. 磷脂酶 A2 在心血管疾病动物实验中的研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(12): 55-61.

(2015-12-09 收稿 责任编辑: 洪志强)