

知柏地黄丸对阴虚“上火”证血清 抗炎凝血蛋白的影响

毛连根¹ 刘昌铭¹ 杨 粟¹ 江婷婷² 陈钟梁¹ 屠慧惠¹
陈 静¹ 胡玉婷² 甘 霖² 李仲杰¹ 李继承^{1,2}

(1 浙江大学细胞生物学研究所, 杭州, 310058; 2 华南理工大学医学院, 广州, 510006)

摘要 目的:探究知柏地黄丸(Zhibai Dihuang Granule;ZDG)对阴虚“上火”证血清抗炎凝血蛋白的影响。方法:通过腹腔注射三碘甲状腺原氨酸(Triiodothyronine;T3)处理SD大鼠建立阴虚模型。在该模型基础上往大鼠牙龈出滴加牙龈卟啉单胞菌叠加口腔牙龈炎模型,建立阴虚“上火”证大鼠模型。用滋阴降火药知柏地黄丸对大鼠进行治疗,以iTRAQ-2DLC-MS/MS蛋白组学技术与生物信息学手段分析治疗前后阴虚“上火”大鼠血清差异性蛋白表达谱,探索知柏地黄丸治疗阴虚“上火”的生物学机制。结果:知柏地黄丸观察组大鼠血清凝溶胶蛋白(Gsn)、纤溶酶原(Plg)、纤维蛋白原 α 链(Fga)、胸腺素 β 4(Tmsb4x)比值显著上调(Fold Change > 1.25);胶原蛋白 α 2-I型链(Colla2)比值显著下调(Fold Change < 0.8)。Gsn是肌动蛋白丝的切割蛋白,参与细胞凋亡、清除损伤组织、调节炎症介质等生物学功能;Plg是血液纤维蛋白水解酶无活性的前体,参与机体纤溶、细胞迁移、细胞外基质降解等多种生物过程;Fga是由肝脏合成的纤维蛋白前体,能在内源凝血因子或外源组织因子作用下生成纤维蛋白,参与机体的凝血过程;Colla2是由肝、巨核细胞合成的凝血蛋白酶,是活化Fga的凝血稳定因子,Fga在Colla2的作用下参与完成凝血过程;T- β 4是由胸腺产生的淋巴生长因子,具有通过抑制巨噬细胞的迁移、增强抗原呈递细胞功能、抑制炎症因子、促进组织重塑、血管生成和伤口愈合修复等生物学功能。结论:知柏地黄丸通过对Gsn、Plg、Fga、Colla2、T- β 4水平的调节,清除损伤组织,释放肌动蛋白、细菌脂多糖,抑制细胞凋亡作用;并且可以调节炎症因子,改变炎症反应部位血液流动动力学障碍,促进炎症反应损伤的愈合的作用。

关键词 知柏地黄丸;阴虚“上火”;蛋白组学;抗炎;凝血;发病机制

Effect of Zhibai Dihuang Granule on Anti-inflammatory and Clotting Serum Proteins in Yin-deficiency Shanghuo Syndrome

Mao Liangen¹, Liu Changming¹, Yang Su¹, Jiang Tingting², Chen Zhongliang¹, Tu Huihui¹,
Chen Jing¹, Hu Yuting², Gan Lin², Li Zhongjie¹, Li Jicheng^{1,2}

(1 Institute of Cell Biology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2 School of Medicine,
South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract Objective: To explore the influence of Zhibai Dihuang Granule (ZDG) on the anti-inflammatory clotting serum proteins in Yin-deficiency Shanghuo (YDS) syndrome. Yin-deficiency SD rats were induced by intraperitoneal injection of Triiodothyronine (T3). The models of gingivitis in rats were induced by dropwise add of porphyromonas gingivalis model. YDS syndrome rats were treated with ZDG for 1 week. iTRAQ-2DLC-MS/MS was used in screening and identifying the serum differential proteins. With the treatment of ZDG, the serum level of Gelsolin (Gsn), Plasminogen (Plg), Fibronogen alpha chain (Fga), and Thymus beta-4 (T- β 4) were significantly increased (fold change > 1.25), while the serum level of Collagulation factor XIII Achain and Colla2 were significantly decreased (fold change < 0.8). Gsn possesses the function of removing damaged tissue, releasing the actin, inhibiting the apoptosis of the cells, and inhibiting the apoptosis of the cells. Colla2 and Plg can regulated the change of blood rheology in the inflammatory site. Gsn and T-beta 4 presented the ability in regulating inflammatory cytokines to promote the healing of inflammatory damage. **Conclusion:** ZDG may play an important role in clearing actin and lipopolysaccharide released by damage tissue and inhibiting the cell apoptosis. Besides, ZDG may regulate inflammatory factors, change the blood rheology of the inflammatory site, promote the healing of inflammatory damage. In short, ZDG treats YDS syndrome by regulating these proteins associated with anti-inflammatory and clotting.

Key Words Zhibai Dihuang Granule; Yin-deficiency Shanghuo syndrome; Proteomics; Anti-inflammatory; Clotting; Pathogenesis

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2014CB543002)

作者简介:毛连根(1957.06—),男,硕士,实验师,研究方向:药理学,E-mail:zdmlg301@126.com

通信作者:李继承(1957.12—),男,硕士,教授,浙江大学细胞生物学研究所所长,研究方向:肺结核生物学标志物及其中医证候的生物学研究,E-mail:lijichen@zju.edu.cn

中图分类号:R285.6 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2017.12.006

中医认为情志是机体的精神状态,是人对外界事物和现象所做出的7种不同情绪反映^[1]。情志与脏腑的功能活动密切相关,情志过激可致相火妄动,相火妄动是导致疾病的因素之一^[2-3]。以腹腔注射三碘甲状腺原氨酸(Triiodothyronine; T₃)处理SD大鼠建立阴虚模型^[4],并在模型基础上叠加口腔牙龈炎模型,建立阴虚“上火”证(Yin-deficiency-Shanghuo Syndrome, YDS)大鼠模型;以iTRAQ-2DLC-MS/MS蛋白组筛选鉴定技术与生物学信息手段探究知柏地黄丸对YDS大鼠血清抗炎凝血生物物质的变化,为探究阐明知柏地黄丸滋阴降火治疗机制与阴虚“上火”证病机提供现代生物学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 选取SPF级雌性SD大鼠30只(浙江省医科院实验动物中心提供,生产许可批准文号:SCXK(浙)2014-0001)。

1.1.2 药物 三碘甲状腺原氨酸(Triiodothyronine; T₃,北京百灵威科技有限公司,生产批号:L840063);牙髓卟啉单胞菌冷冻干菌粉(广东省微生物菌种保藏中心,生产批号:201505);戊巴比妥钠(中国医药上海化学试剂公司(进口分装),生产批号:020402);知柏地黄丸(ZhibaiDihuangGranule; ZDG,仲景宛西制药股份有限公司,生产批号:161204)。

1.1.3 试剂与仪器 iTRAQ试剂盒(Applied Biosystems, Foster city, CA, USA); LCMS-8030、Triple Quadrupole MS/MS(日本岛津制作所);超低温冰箱THERMO(902-ULTS);离心机(SIGMA, 2K15C)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 取5~6周龄,体重220~240 g SPF级雌性SD大鼠30只。称重,随机分成YDH模型组(简称:模型组)、生理盐水对照组(简称:对照组)、知柏地黄丸观察组(简称:观察组)3组,每组10只。第2天开始,模型组、观察组每天下午4点腹腔注射T₃(2.5 mg%, 0.2 mL/100(g·d))、对照组腹腔注射0.9%生理盐水(0.2 mL/100(g·d)),连续造模6 d。此间,模型组、观察组大鼠,于腹腔注射T₃第4天以2%戊巴比妥钠(0.2 mL/100 g)腹腔注射麻醉,用丝线结扎下门齿,剥离部分牙龈,滴注PBS(pH7.2)稀释至近似 3×10^8 /mL的牙髓卟啉单胞菌液,200 μ L/(次·d),共4次进行

牙龈炎造模。对照组大鼠不进行牙龈炎造模。第7天起,观察组灌胃知柏地黄丸中药(0.8 g/1 mL, 1 mL/100(g·d))、模型组与对照组灌胃(0.9%生理盐水, 1 mL/100(g·d))。连续给药治疗7 d。给药治疗第8天,观察组于给药后2 h(对照组、模型组于给生理盐水后2 h)以2%戊巴比妥钠(0.2 mL/100 g)腹腔注射麻醉,进行颈中动脉插管手术取血采样。将血分别置于无肝素试管,室温静置2 h, 3 000 r/min,离心10 min,提取血清,置-80℃备用。

1.2.2 iTRAQ-2DLC-MS/MS血清差异蛋白筛选鉴定分析 血清高丰度蛋白去除:用 4.6×100 mm多亲和处理系统(MARS) LC Column-Human 14结合HPLC系统处理血清样品,除去14种高丰度蛋白(血清白蛋白、免疫球蛋白G、抗胰蛋白酶, IgA, IgM等)。iTRAQ试剂标记:每组取等量血清样本,先用预冷的丙酮处理,12 000 r/min离心15 min后弃去上清后,用试剂盒中自带的溶解液和1% SDS充分混悬溶解样品;还原试剂于60℃反应1 h;半胱氨酸封闭试剂于室温处理10 min;胰蛋白酶于37℃酶解过夜,使蛋白质酶解。在118、119、121各管标记试剂中加入50 μ L异丙醇,混匀,分别加入各组样品中于室温反应1 h,各加入3倍体积水,使标记试剂分解。最后合并各管标记好的样品,真空冷冻干燥处理。第一维SCX分离肽段:将iTRAQ试剂标记的样品混合物加入强阳离子交换(SCX)柱中多次洗脱。根据峰型和时间共收取10个梯度,真空离心浓缩后,用反相液相色谱的A相溶解。第二维反相液相色谱:用ZORBAX 300SB-C18column处理,用不同浓度的乙腈和甲酸的洗脱液洗脱。LC-MS/MS分析:将2DLC分离获得的蛋白质直接进行后续质谱扫描分析。在QSTAR XL在IDA模式下操作,在m/z 400-1 500范围内进行MS分析,在一个图谱选择20个最强的母离子进行串联扫描,扫描范围m/z 100-2 000。获得差异蛋白表达谱。

1.2.3 生物信息学分析 采用Protein Pilot 4.2 beta软件分析数据,检索International Protein Index (IPI)数据库,并对其定量。使用DAVID(<http://david.abcc.ncifcrf.gov>)方法对蛋白质注释和分类。蛋白之间的互作关系应用STRING软件完成(<http://string.embl.de/>)。

1.3 统计学方法 采用SPSS 19.0统计软件对数据进行统计学分析,采用t检验分析,非参数分析用

Mann-Whitney U-test 检测,组间差异比较采用单因素方差分析。差异蛋白比倍率 >1.25 或 <0.8 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 知柏地黄丸治疗阴虚大鼠“上火”血清差异性蛋白筛选鉴定分析结果 观察组血清凝溶胶蛋白(Gsn)、纤溶酶原(Plg)、纤维蛋白原 α 链(Fga)、胸腺素 β4(Tmsb4x) 比值显著上调(Fold change >1.25);胶原蛋白 α2-I 型链(Col1a2) 比值显著下调(Fold change <0.8)。见表 1。

表 1 知柏地黄丸对 YDH 大鼠血清抗炎凝蛋白组的作用(n=10)

Protein	Gene symbol	Proteins	Protein expression rate		
			M/C	T/C	T/M
Q68fpl	Gsn	Gelsolin	0.38	0.64	1.71
Q01177	Plg	Plasminogen	0.11	0.26	2.25
P06399	Fga	Fibrinogen alpha chain	0.43	1.03	2.38
P62329	Tmsb4x	Thymosin beta-4	0.36	0.7	1.94
P02466	Col1a2	Fibrinogen alpha chain	1.61	0.34	0.21

注:差异蛋白比倍率 >1.25 或 <0.8 认为差异有统计学意义

3 讨论

阴虚“上火”是现代社会多发频发病证,诱因复杂。现代医学对阴虚“上火”缺乏有效的治疗方法,但中医对阴虚“上火”的认识已历史悠久,《黄帝内经·素问》^[5],《景岳全书》^[6]等许多中医经典对“上火”证病机与治疗早有详细记载。阴虚“上火”系人体阴阳失衡内热亢盛,“相火妄动”所致,对于该证以滋阴降火为治疗原则。阴虚“上火”证主要表征为反复发作的口腔溃疡、牙龈肿痛炎、鼻扭、慢性咽喉炎等与皮肤黏膜关联密切的炎性反应,而炎性反应是机体血管生物物质对于机体损伤的防御反应,炎性反应发生进程中的血管中的抗炎与凝血生物物质对于防御反应具有重要作用。以知柏地黄丸为工具探究阴虚“上火”证血管中的抗炎与凝血生物物质的变化,对于阐明知柏地黄丸滋阴降火作用机制及阴虚“上火”证病机具有重要意义。

研究结果显示,知柏地黄丸具有上调血清 Gsn、Plg、Fga 表达的作用。Plg 是机动蛋白丝的切割蛋白,在 CaCl₂、pH、磷酸磷脂酰肌醇等作用下,能参与对肌动蛋白丝的剪切、聚合和解聚;也可以作为细胞凋亡过程中关键的执行分子之一胱天蛋白酶的底物与二磷酸磷脂酰肌醇-3 形成的复合体,降低二磷酸磷脂酰肌醇-3 活性,进而抑制细胞凋亡过程^[7];Gsn 还能与脂多糖结合蛋白(LBP) 竞争性结合脂多糖,抑制与肌动蛋白的结合活性和血清肌动蛋白的解聚

活性;Gsn 能在清除损伤组织细胞释放的肌动蛋白同时,对炎性反应递质进行调节^[8-9]。血液中 Gsn 过表达有利于减轻炎性反应与炎性反应损伤的愈合^[10]。知柏地黄丸对 Gsn 的上调作用提示知柏地黄丸具有清除损伤组织细胞释放的肌动蛋白、降解脂多糖,减轻炎性反应促进炎性反应损伤愈合和抑制细胞凋亡的作用。

研究结果显示,知柏地黄丸组还具有上调 Plg、Fga 下调 Colla2 的作用。Plg 是血液纤维蛋白水解酶无活性的前体,其能在内源性纤溶酶原激活物或外源激活物的作用下活化成纤溶酶,参与机体纤溶、细胞迁移、细胞外基质降解等多种生物过程。知柏地黄丸上调 Plg 表达,提示知柏地黄丸具有提高纤溶酶生成基质,促进纤溶酶生成量进而改变炎性反应损伤组织部位血液流变动力学障碍,促进炎性反应伤口愈合作用。Fga 是由肝脏合成的纤维蛋白前体,能在内源凝血因子或外源组织因子作用下生成纤维蛋白,参与机体的凝血过程。Colla2 是由肝、巨核细胞合成的凝血蛋白酶,是活化 Fga 的凝血稳定因子,Fga 在 Colla2 的作用下参与完成凝血过程。知柏地黄丸上调血清 Fga 表达,但对 Colla2 显著下调,这样仍然影响凝血形成过程。这提示知柏地黄丸具有抗凝血形成的促进血液循环作用。

研究结果还显示,知柏地黄丸具有上调 T-β4 表达作用。T-β4 是由胸腺产生的淋巴生长因子,其具有通过抑制巨噬细胞的迁移,增强抗原呈递细胞功能,抑制炎性因子,降低炎性反应细胞的浸润,减轻炎性反应与防止新生组织受到炎性反应的损害的作用^[11];T-β4 还具有促进组织重塑、血管生成和伤口愈合修复等功能^[12]。知柏地黄丸上调 T-β4 表达的作用,这表明知柏地黄丸具抑制炎性因子,增强抗炎与炎性反应伤口愈合修复能力的作用。

上述结果提示:知柏地黄丸通过对 Gsn、Plg、Fga、Colla2、T-β4 蛋白组的调节改变阴虚“上火”证炎性反应损伤组织部位的血液流变动力学障碍,促进血液循环及抑制细胞凋亡,增强抗炎与炎性反应伤口愈合修复能力。这结果也提示阴虚“上火”证炎性反应反复发作与这些蛋白的调节改变密切相关。

参考文献

[1] 孙广仁. 中医基础理论[M]. 北京:中国中医药出版社,2002:225.
[2] 包洁,周传龙,谢志军,等. 从情志理论探析中医“上火”[J]. 山西中医学院学报,2015,16(4):8-15.
[3] 朱震享. 丹溪心法[M]. 北京:人民卫生出版社,2017:6.

阳气才得以振奋,较少或者几乎无体育锻炼,使人体气机失于畅达,导致脾胃等脏腑功能呆滞,久之则气郁化火,轻则表现为“上火”等亚健康状态,重则营养失调,正气虚弱,变生它病。长时间的睡眠不足(失眠),会导致机体阴阳平衡失调,阴不入阳,阴虚阳盛则体内火热郁积过多,从而产生各种“上火”等亚健康症状。熬夜,是导致睡眠不足的基本形式,都属于不规律的生活作息,长久下去,会引起机体生理功能和免疫力的紊乱,甚至诱发其他病变。

综上所述,我们认为“上火”是以口、眼、咽干燥、口渴欲饮、口腔溃疡、牙龈或咽喉肿痛、眼睛胀痛、面部丘疱疹,以及小便黄热、大便干结等为主的一种火热病症。虽然,表现形式多样,但凡出现相关的某一症状即可诊断。易引起“上火”诱导因素有饮料、炙烤食品、酒、辛辣食品、零食、炒货、橘子等,而粗粮、海鲜、竹笋、橙类则是“上火”的保护因素,多食用可起到降火作用。同时,较少的体育锻炼或者几乎无锻炼、失眠以及熬夜等不良的生活方式也是引起“上火”的因素之一,这些对临床预防“上火”有着重要的指导意义。

参考文献

[1] 钱苏海,钱俊华. 中医“上火”的内涵、表述及其应用初探[J]. 浙江中医药大学学报,2015,39(6):430-433.

(上接第 2891 页)

[4] 付晓伶,方肇勤. 阴虚证动物模型的造模方法及评析[J]. 上海中医药大学学报,2004,18(2):51-54.

[5] 金·刘完素. 素问玄机原病式[M]. 北京:人民卫生出版社,1983.

[6] 汉·张仲景. 伤寒论[M]. 北京:人民卫生出版社,2005.

[7] Philchenkov AA. Caspases as regulators of apoptosis and other cell functions[J]. Biochemistry Biokhimiia,2003,68(4):365-376.

[8] Bucki R, Georges PC, Espinassous Q, et al. Inactivation of endotoxin by human plasma gelsolin[J]. Biochemistry, 2005, 44(28):9590-9597.

[9] DiNubile MJ. Plasma gelsolin as a biomarker of inflammation[J]. Ar-

[2] 林富祥,陈玮莹. 1051 例大学生“上火”的调查研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2012,14(1):1306-1310.

[3] 谢志军,王伟杰. 上火病因病机初探[J]. 浙江中医药大学学报,2013,37(3):226-228.

[4] 戴天木. 《金匱要略》治渴六法[J]. 国医论坛,2003,18(1):5-6.

[5] 张军. 消渴与消渴病异同考辨[J]. 光明中医,2002,17(100):7-9.

[6] 郑亚楠,陶钧,龚茜,等. 医学院校大学生复发性阿弗他溃疡发病率及其与 A 型人格关系的调查分析[J]. 上海市口腔医学,2017(5):553-556.

[7] 周海文,吴岚,周曾同. 口腔黏膜病临床治疗 VI. 复发性阿弗他溃疡的诊断与治疗[J]. 中华口腔医学杂志,2007,42(1):57-59.

[8] Natch SS, Kontinen YT, Enattah NS. Recurrent aphthous ulcers today: a review of the growing knowledge[J]. Int Oral Maxillofac Surg, 2004,33(3):221-234.

[9] 石宇文,翁志强,谢利平,等. 广州某医学院医学生复发性阿弗他溃疡危险因素分析[J]. 广东医学,2010,31(6):772-774.

[10] 曾荣今,陈云. 食物“上火”与水分子氢键的关系研究[J]. 湘潭师范学院学报:自然科学版,2002,24(1):34-35.

[11] 李晨晨,王莹,向孙敏,等. 酒的功用及发展历史[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(11):365-369.

[12] 周璇,吴颖昕,戴建国. 中医酒病病因病机考略[J]. 中医学报,2013,23(8):17-18.

[13] 常改,郑文龙. 粗粮的功与过[J]. 食品与健康,2005(6):28.

[14] 潘照,朱星瑜,范永升. 从能量代谢及粘膜免疫看“上火”与肠道菌群的关系[J]. 浙江中医药大学学报,2015,39(8):591-594.

(2017-11-03 收稿 责任编辑:张文婷)

thritis Research & Therapy,2008,10(6):124.

[10] 王艺萍,肖菲. 查尔森合并症指数联合血浆凝溶胶蛋白水平预测脓毒症患者的死亡风险[J]. 中国急救医学,2014,34(12):1057-1060.

[11] Sosne G, Chan CC, Thai K, et al. Thymosin beta 4 promotes corneal wound healing and modulates inflammatory mediators in vivo[J]. Experimental Eye Research,2001,72(5):605-608.

[12] Qiu P, Kurpakus-Wheater M, Sosne G. Matrix metalloproteinase activity is necessary for thymosin beta 4 promotion of epithelial cell migration[J]. J Cell Physiol,2007,212(1):165-173.

(2017-11-03 收稿 责任编辑:张文婷)