

当归拈痛汤防治类风湿性关节炎大鼠滑膜病变的蛋白质组学研究

袁立霞, 李青原, 易国仲, 许伏龙, 刘亚伟(南方医科大学, 广东 广州 510515)

摘要: **目的** 观察当归拈痛汤干预类风湿性关节炎(RA)大鼠滑膜病变的蛋白质改变, 分析当归拈痛汤治疗 RA 可能的作用机制。**方法** 将 SD 大鼠随机分为空白对照组、模型组、当归拈痛汤组 3 组, 每组 10 只。双向电泳(2-DE)分离滑膜组织蛋白质, 用 PDQuest7.1.0 软件包进行差异表达蛋白质组分析, 基质辅助激光解吸离子化飞行时间质谱(MALDI-TOF)鉴定蛋白质。选择 2 个差异蛋白用实时荧光定量 PCR(Q-PCR)和蛋白质印迹法(Western-blot)进行验证。**结果** 获得 8 个差异表达的蛋白: Myosin regulatory light chain 2, 40S ribosomal protein SA, Mimecan, Heat shock protein beta-1, Vimentin, Peroxiredoxin-2, Interleukin-1 receptor antagonist protein, Lamin A。Q-PCR 和 Western-blot 验证 Hsp27 Peroxiredoxin-2 表达水平变化与 2-DE 结果一致。**结论** 当归拈痛汤可能通过以下机制抑制 RA 滑膜组织的炎症反应: (1)抑制组织局部的炎症反应信号通路; (2)保护细胞结构; (3)抑制氧化应激反应。

关键词: 当归拈痛汤; 类风湿性关节炎; 蛋白质组学; 大鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)06-0565-05

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.06.010

Proteomic Study of *Danggui Niantong* Decoction on Synovium Pathological Changes in Rheumatoid Arthritis Rat Model

YUAN Lixia, LI Qingyuan, YI Guozhong, XU Fulong, LIU Yawei(Southern Medical University, Guangzhou 510515 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of *Danggui Niantong* Decoction on the synovial proteome of rheumatoid arthritis (RA) rats by and to analyze the therapeutic mechanism of *Danggui Niantong* Decoction for RA. **Methods** Thirty rats were equally divided into blank control group, model group and *Danggui Niantong* Decoction group. Two-dimensional electrophoresis (2-DE) was used for the isolation of proteins. PDQuest 7.1.0 software was used to analyze differential expression of proteome. Matrix associated laser desorption ionization- time of the flight (MALDI-TOF) was used to identify proteins. Two differential proteins were chosen for confirmation by fluorescence quantitative PCR and Western blotting methods. **Results** Eight differently-expressed proteins were obtained, and they were: Myosin regulatory light chain 2, 40S ribosomal protein SA, Mimecan, Heat shock protein beta-1, Vimentin, Peroxiredoxin-2, Interleukin-1 receptor antagonist protein and Lamin A. The change of Hsp27 Peroxiredoxin-2 expression confirmed by Q-PCR and western-blot was consistent with that detected by 2-DE. **Conclusion** The mechanism of *Danggui Niantong* Decoction in inhibiting the inflammation of RA synovial tissue maybe associated with inhibiting the signaling pathway of inflammatory response in local tissue, protecting cell structure, and inhibiting oxidative stress response.

Keywords: *Danggui Niantong* Decoction; Rheumatoid arthritis; Proteomics; Rats

收稿日期: 2013-07-24

作者简介: 袁立霞, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 方剂作用机理及配伍研究。Email: cnylxtcm@163.com。通讯作者: 刘亚伟, 研究方向: 抗肿瘤药物的药理机制研究。Email: limpduck@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金课题(81001498); 广东省自然科学基金博士启动项目(S2012040007081)。

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以关节及关节周围组织慢性炎症病变为主要表现的自身免疫性疾病,严重危害人类健康,是临床多发病、疑难病,发病特点是反复发作,病情缠绵,且有较高的致残率。据统计,国外发病率约为1%~2%,个别地区高达5%,我国各地的发病率略有差别,平均为0.32%~0.36%。以此发病率来计算,我国患者总数高达400~500万^[1]。本课题组和其他学者研究表明,当归拈痛汤对RA有确切疗效^[2-4],该方长于分消湿热、调理寒温、健脾祛邪。但当归拈痛汤防治RA的作用机理尚不明确,因此本实验采用热杀死分支结核杆菌(heat-killed mycobacterium tuberculosis H37Ra, Mtb)诱导复制实验性关节炎大鼠模型,应用二维凝胶电泳和质谱技术筛选、鉴定RA模型大鼠与当归拈痛汤干预后大鼠滑膜组织的差异表达蛋白并进行验证,以期找到与RA病变相关的蛋白质及当归拈痛汤作用的蛋白质,探讨当归拈痛汤治疗RA可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 中药复方的制备 当归拈痛汤组成:羌活15 g、茵陈15 g、炙甘草15 g、猪苓9 g、泽泻9 g、防风9 g、知母9 g、苍术9 g、当归9 g、葛根6 g、苦参6 g、人参6 g、升麻3 g、黄芩3 g、白术3 g。药材购自南方医院中药房,经鉴定后,取中药浸泡30 min,第一次加12倍量水,煎煮30 min后过滤药渣,再加8倍量水煎煮40 min,过滤,合并2次滤液,浓缩后4℃保存。使用前加温至37℃。

1.2 试剂 固相pH梯度干胶条(IPG dry strip pH4~7, 24 cm)及IPG缓冲液Bio-Lytes+4/7,美国通用(GE)公司;尿素、二硫苏糖醇(DL-Dithiothreitol, DTT)、3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙铵]-丙磺酸[3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]propanesulfonic acid, CHAPS)、十二烷基磺酸钠(Sodium dodecyl sulfate, SDS)、三羧基氨基甲烷(Tris base)、丙烯酰胺(Acrylamide, Arc)、甲叉双丙烯酰胺(Bis-Acrylamide, Bis)、甘氨酸、过硫酸铵、碘代乙酰胺(Iodoacetamide, IAA)、矿物油、甘油、硫脲,美国Sigma公司产品;硫代硫酸钠、无水碳酸钠、甲醛、硝酸银、乙醇、冰醋酸、醋酸钠、甘氨酸均为国产分析纯。所有缓冲液均用Milli-Q水配制。TRIzol试剂盒、转染试剂Transfectamin2000,美国Invitrogen

公司;实时荧光定量PCR(Q-PCR)引物由广州市启动力生物科技有限公司设计,上海英骏公司合成;逆转录试剂盒、Q-PCR试剂盒、Quantitect SYBR Green PCR Kit,大连宝生物公司;兔抗HSP27多抗(Anti-HSP27 antibody, ab5549)、兔抗Peroxiredoxin 2多抗(Anti-Peroxiredoxin 2 antibody, ab59539),美国Abcam公司;内参照 β -actin一抗、羊抗兔二抗,上海碧云天公司。显色试剂盒,美国Pierce公司。

1.3 仪器 IPG-Phor II型等电聚焦仪、垂直电泳系统(GE Ettan DALTsix, 26×20 cm)、LKB-MultiTemp II低温循环水浴箱、透射扫描仪(UMAX PowerLook 1100),美国GE公司;图像分析软件PDQuest 7.1.0软件包,美国,BIORAD公司;Milli-Q超纯水仪,美国Millipore公司;Voyager-DE STR质谱仪,美国Applied Biosystems公司;低温高速离心机,德国Beckman公司;SpectraMax M5多功能酶标仪,美国分子仪器公司。

1.4 方法

1.4.1 佐剂性关节炎大鼠模型复制^[5] (1)Mtb诱导剂的制备:准确称取Mtb 60 mg,放入高压消毒的研钵中,在无菌条件下充分研磨,使Mtb的颜色由灰色变为白色,然后加入少量矿物油,使Mtb与矿物油充分混合,再研磨,最后加入矿物油使浓度到达5 mg·mL⁻¹,将该混悬液吸入特制玻璃注射器中,连接2只注射器与三通管上,使Mtb-矿物油混悬液充分混合均匀,备用。(2)大鼠尾根部皮下注射Mtb诱导剂:SD大鼠固定在大鼠固定器上,剃掉尾根部的毛发,以75%乙醇消毒,然后在尾根部经皮下注射Mtb诱导剂0.2 mL,注射后,立即用消毒棉球压住注射部位,防止液体溢出。

1.4.2 分组 SD大鼠,体质量(160±2)g,动物合格证号:SCXK[粤]2011-0015,由南方医科大学动物实验中心提供。随机分为3组,即空白对照组、模型组、当归拈痛汤组,每组10只。

1.4.3 给药方法 当归拈痛汤组从注射Mtb当天开始灌胃(ig)给药,每天ig当归拈痛汤11.34 g·kg⁻¹,空白对照组、模型组给予等体积蒸馏水,连续28 d。于实验第28天末次给药2 h后对大鼠进行相应处理。

1.4.4 蛋白质样品制备 滑膜组织样品液氮研磨后,每100 mg组织加入400 μ L裂解液(8 mol·L⁻¹尿素,4% CHAPS,0.48% Tris base,40 mmol·L⁻¹ DTT,用时加入10 mmol·L⁻¹苯甲基磺酰氟)混悬样

品, 置室温裂解 60 min 后, 在低温离心机中以 4 ℃, 15 000 r·min⁻¹ 离心 60 min, 取上清分装, 取少量用 2D QUANT 蛋白定量试剂盒进行定量, 其余分装冻存于液氮中。

1.4.5 双向凝胶电泳 (Two-dimensional Gel Electrophoresis, 2-DE) 分离蛋白质 选用 24 cm、pH 4~7 非线性干胶条。取含蛋白质 300 μg 蛋白样品与上样缓冲液 (7 mol·L⁻¹ 尿素, 2 mol·L⁻¹ 硫脲, 4 % 3-[(3-胆固醇氨丙基)二甲基氨基]-1-丙磺酸 (CHAPS), 65 mmol·L⁻¹ 二硫疏糖醇 (DTT), 0.2 % 两性电解质, 少量溴酚蓝) 充分混合, 总体积调整为 450 μL, 进行胶条重水化; 然后将胶条转移至等电聚焦仪的聚焦盘, 进行等电聚焦; 等电聚焦完成后进行二向的 SDS-PAGE 凝胶电泳; 电泳结束后, 采用质谱兼容的硝酸银染色方法进行染色。

1.4.6 凝胶图像分析 利用 UMAX PowerLook 1100 透射扫描仪获取图像, 用 PDQuest 7.1.0 软件包进行图像分析, 从空白对照组凝胶中选取一块作为参考胶 (Reference gel)。对比分析本实验 3 组凝胶, 选取表达量差异 2 倍以上的点作为后续质谱分析的候选蛋白质点, 同时满足下面条件的差异点入选: ①模型组凝胶相对于空白对照组之间存在差异; ②在当归拈痛汤组凝胶与模型组比较时上述差异点仍存在差异。

1.4.7 胶内酶切与 MALDI-TOF 质谱分析 将上述差异蛋白点从凝胶中切出并转入 1.5 mL Ep 管中, 经过 100 mmol·L⁻¹ 的 NH₄HCO₃ (pH8.0) 平衡、乙腈脱水、真空离心干燥后, 加入 10 μL 测序级胰蛋白酶 (2 ng·μL⁻¹, 用含 9 % ACN 的 40 mmol·L⁻¹ NH₄HCO₃ 溶解), 37 ℃ 过夜消化并经冷冻干燥仪浓缩至 4~5 μL 后, 取 1 μL 含多肽混合物的样品与每 μL 含 10 mg·mL⁻¹ α-氰基-4-羟基肉桂酸的溶液 (用含 0.05 % TFA 和 50 % ACN 的溶液配制) 混合点样于该质谱分析板上, 空气中自然干燥后用 Voyager-DE STR 质谱仪进行分析。所得到的 PMF 数据用 Mascot 数据库 (<http://www.matrixscience.com/>) 解析, 搜索条件如下: 大鼠, 胰酶酶切 (允许 1 个漏切位点), 半胱氨酸碘乙酰化, 质量误差: 100 ppm。

1.4.8 实时荧光定量 PCR (Real-time Quantitative PCR, Q-PCR) 实验验证差异点 首先按照试剂盒说明书步骤提取本实验 3 组滑膜组织各样品总 RNA, 在管中加 20 μL 的 DEPC 水溶解, 取 1 μL 立即用于逆转录, 其余 RNA 于 -80 ℃ 保存。然后用 AMV 逆转录

酶进行相应基因的 RT (10 μL 体积) 反应, 按其相关试剂盒操作说明进行。然后以逆转录产物进行 Q-PCR 反应, PCR 反应结束后, 分析 PCR 溶解曲线, 每个样本设 3 个平行孔并重复 3 次, 靶基因的表达水平以看家基因 GAPDH 作为内参照, 比较平均的 ΔCT 值进行计算。

1.4.9 蛋白质印迹法 (Western-blot) 验证 用 RIPA 裂解液提取各组滑膜组织总蛋白质, 取等量蛋白进行分析, 以 β-actin 作内参照。先在 5 % 聚丙烯酰胺浓缩胶中 60 V 电泳至分离胶, 后在 12 % 聚丙烯酰胺分离胶中 100 V 继续电泳直至溴酚兰到底, 湿转法转移至 PVDF 膜, 电流 100 mA 2 h, 再用 5 % TBSA 脱脂奶粉封闭 2 h, 加入 1:500~1:1000 抗体反应过夜, 二抗孵育后, ECL 化学发光检测。本实验重复 3 次。

1.5 统计学处理方法 所得数据均用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 SPSS12.0 软件进行统计分析, 资料符合正态分布且方差齐。两组比较采用独立样本 *t* 检验, 以 *P* < 0.01 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 双向凝胶电泳分析结果 见图 1。空白对照组、模型组、当归拈痛汤组 3 组细胞蛋白质双向凝胶电泳银染图谱, 图像清晰, 没有背景条纹的干扰, 蛋白质斑点分离完全, 在相同条件下, 反复 3 次重复的实验结果图大致相同, 3 组图谱图像分析后平均检测到 1016 个蛋白质斑点。选取 1 张空白对照组图谱作为参考胶, 其他 2 组胶与参考胶匹配, 使各凝胶中的蛋白质斑点与参考胶中的对应起来, 与参考胶中同一蛋白质斑点相匹配的点为同一种蛋白质。匹配结果显示 3 组胶蛋白质斑点匹配百分率约为 90.84 %。

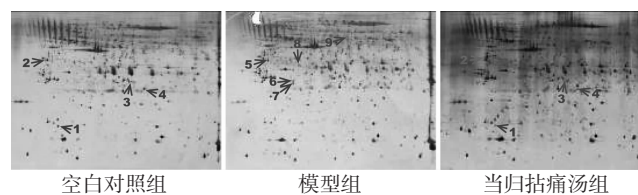


图 1 各组 RA 大鼠关节滑膜组织的 2-DE 电泳图

Figure 1 Two-DE analysis on articular synovial tissue in RA rat with intervention treatment of Dangui Niantong decoction

2.2 差异点分析及质谱分析结果 见表 1、图 2。经过软件以及肉眼分辨, 比较分析筛选出具有显著差异的蛋白质斑点, 同时满足上述 2 个差异条件, 且变化趋势 2 倍以上的蛋白质点 9 个, 其中模型组相对于空

白对照组下调而当归拈痛汤组相对于模型组上调蛋白质4个；与其趋势相反蛋白质5个。经过质谱鉴定得到蛋白质8个(其中编号6,7点为同一蛋白质)。模型组相对于空白对照组下调,而当归拈痛汤治疗组相对于模型组上调的蛋白质包括: Myosin regulatory light chain 2, 40S ribosomal protein SA, Mimecan, Heat shock protein beta-1; 模型组相对于空白对照组上调,而当归拈痛汤组相对于模型组下调的蛋白质包括: Vimentin, Peroxiredoxin-2, Interleukin-1 receptor antagonist protein, Lamin A。

表 1 质谱鉴定获得的蛋白质信息

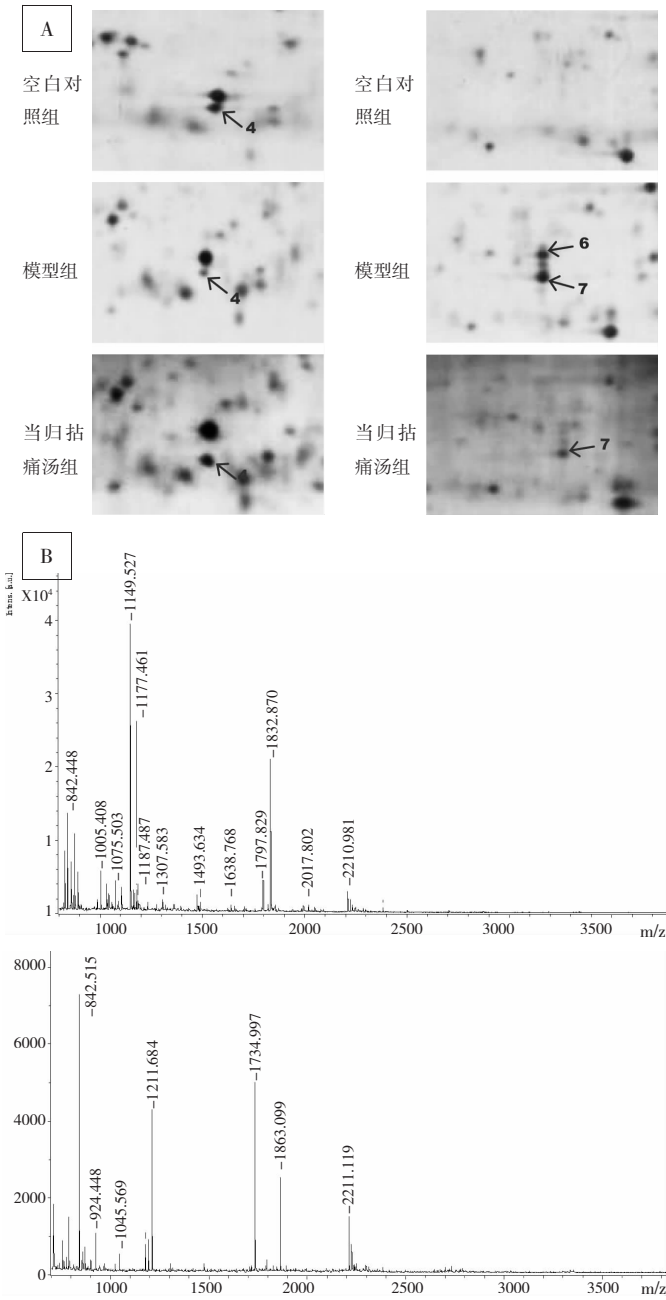
Table 1 Protein mass spectrum identification results

Spot	Proteins name	Accession No.	Gene	Score	MW(D)	PI
1	Myosin regulatory light chain 2	P04466	Myhpf	143	19071	4.79
2	40S ribosomal protein SA	P38983	Rpsa	70	32824	4.80
3	Mimecan	Q62000	Ogn	87	34333	5.52
4	Heat shock protein beta-1	P42930	Hspb1	143	22936	6.12
5	Vimentin	P08670	Vim	92	53652	5.05
6	Peroxiredoxin-2	P35704	Prdx2	71	21784	5.34
7	Peroxiredoxin-2	P35704	Prdx2	65	21784	5.34
8	Interleukin-1 receptor antagonist protein	P25086	Il1rn	61	20282	6.42
9	Lamin A	P48679	Lmna	66	74139	6.57

2.3 Q-PCR 及 Western-blot 验证 Hsp27 及 Peroxiredoxin-2 表达 见图 3。经过 Q-PCR 及 Western-blot 在 mRNA 水平和蛋白水平对 Hsp27(Hspb1)及 Peroxiredoxin-2(Prdx2)表达进行验证,发现两者表达趋势与 2-DE 结果一致,即 Hsp27 在模型组表达下调,经过当归拈痛汤治疗后,其表达水平又增加,与空白对照组接近。Peroxiredoxin-2 的表达变化趋势与 Hsp27 相反。

3 讨论

当归拈痛汤出自金代名医张元素的《医学启源》, 全方疏风, 清热, 利湿以蠲痹; 健脾、益气、养血以扶正, 以蠲除湿、热、风三邪为主, 临床适用于风湿热痹, 辨证属于湿重热轻的 RA 患者。本研究基于 2-DE 的蛋白质组学方法探讨了当归拈痛汤抗 RA 滑膜病变的可能机制。研究结果表明, 当归拈痛汤治疗后, RA 主要受损关节滑膜组织的一些蛋白质表达水平发生改变, 包括 Myosin regulatory light chain 2, Heat shock protein beta-1, 40S ribosomal protein SA, Mimecan, Vimentin, Peroxiredoxin-2, Interleukin-1 receptor antagonist protein, Lamin A。经过对随机选择

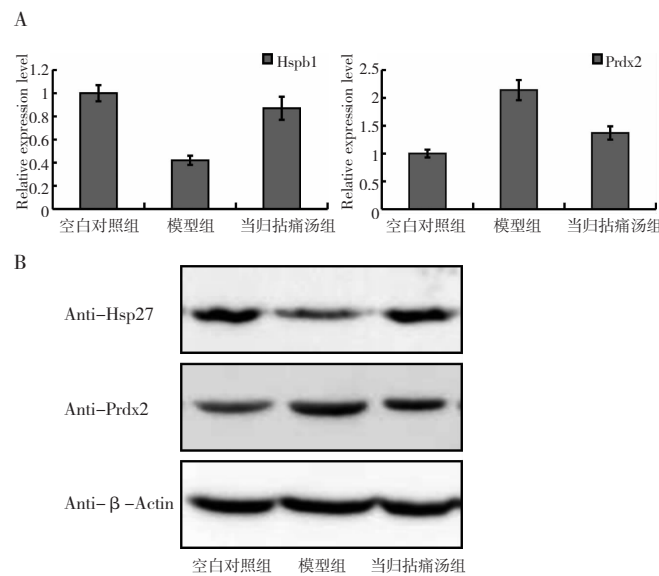


Score greater than 61 is significant, $P < 0.05$
图 2 2-DE 编号 4、6 的蛋白质斑点放大的截图及其 MALDI-TOF-MS 肽指纹图谱

Figure 2 Screenshots of magnified protein spots and MALDI-TOF-MS peptide fingerprint of number 4 and 6 in 2-DE analysis

的 Hsp27 及 Peroxiredoxin-2 验证, 表明其表达变化趋势与 2-DE 结果是一致的。

Myosin regulatory light chain 2 是肌球蛋白的组成部分, 在新生儿及成年人骨骼肌细胞中表达^[6]。Hspb1 也就是 Hsp27, 主要参与应激反应和肌动蛋白的组织, 与微管的 α -tubulin、 β -tubulin 相关^[7]。二者在 RA 滑膜组织中表达水平降低, 是 RA 造成肌肉组织破坏的表现, 而当归拈痛汤治疗后表达水平基本恢



A. Q-PCR 验证; B. western-blot 验证

图 3 各组 Hsp27、Peroxiredoxin-2 表达比较

Figure 3 Expression of Hsp27 and Peroxiredoxin-2 in blank control group, model group and Dangui Niantong decoction group

复到正常水平,说明治疗效果良好。40 S ribosomal protein SA 是 40 S 核糖体组装和维持稳定所需蛋白,在 RA 的研究中未见报道。但是研究发现该蛋白也可作为 laminin 的受体,在细胞与基底膜黏附及下游的细胞信号转导通路中发挥作用^[8]。Mimecan 与 TGFβ-1 或 TGFβ-2 结合可以诱导骨形成,因此,在 RA 进展过程中发挥重要作用,这已有大量报道^[9]。当归拈痛汤能够使 Mimecan 表达恢复,显示其在保护骨组织方面的作用。Vimentin 是Ⅲ型中间丝,在各种非上皮细胞尤其是间充质细胞中表达,与 RA 相关性报道甚多,目前作为诊断 RA 的重要指标之一^[10]。Peroxiredoxin-2、Interleukin-1 receptor antagonist protein 在 RA 中的变化已经在其他研究中得到证实^[11-12],均是 RA 的炎症发生过程中重要的分子。有学者研究^[13]表明, Lamin A 与 RA 关系密切,是核纤层的重要组成部分,核纤层是核膜内侧的纤维层,为核结构提供支撑作用,并且与染色质相互作用,该蛋白能够破坏平滑肌细胞的有丝分裂和 DNA,导致有丝分裂失败、基因组不稳,促进平滑肌细胞衰老^[14-15]。

综上所述,本研究结果提示当归拈痛汤抑制 RA 滑膜的病理改变作用明确,其可能机制包括:(1)抑制组织局部的炎症反应信号通路(Interleukin-1 receptor antagonist protein, Hsp27);(2)保护细胞结构(Myosin regulatory light chain 2, Mimecan, 40S ribosomal protein SA, Hsp27, Vimentin);(3)抑制氧

化应激反应(Peroxiredoxin-2)。本研究为揭示当归拈痛汤组方中药成分的分子作用机制提供了新的实验证据,也为从分子水平上全面准确地评价中药方剂及其活性成分的作用机制和药效提供方法学基础。

参考文献:

[1] 叶任高,陆再英. 内科学[M]. 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 886.

[2] 袁立霞. 当归拈痛汤治疗类风湿性关节炎 53 例疗效观察[J]. 山东中医药大学学报, 2008, 32(5): 407-408.

[3] 李冀,袁立霞. 从《金匱》历节理论浅析类风湿性关节炎的病因病机[J]. 四川中医, 2006, 24(1): 39-40.

[4] 方勇飞. 戴裕光教授学术思想及治疗类风湿关节炎的经验研究[D]. 北京: 中国人民解放军军医进修学院, 2009.

[5] 佟丽,辛增辉,陈育尧,等. Mtb 诱导的 SD 大鼠佐剂性关节炎模型的建立及评价[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(2): 259-63.

[6] Sachdev S, Raychowdhury MK, Sarkar S. Human fast skeletal myosin light chain 2 cDNA: isolation, tissue specific expression of the single copy gene, comparative sequence analysis of isoforms and evolutionary relationships[J]. DNA Seq, 2003, 14(5): 339-350.

[7] Jones Q, Voegeli TS, Li G, et al. Heat shock proteins protect against ischemia and inflammation through multiple mechanisms [J]. Inflamm Allergy Drug Targets, 2011, 10(4): 247-259.

[8] Lesot H, Kuehl U, von der Mark K. Isolation of a laminin-binding protein from muscle cell membranes[J]. EMBO J, 1983, 2: 861-865.

[9] Malik F, Ranganathan P. Methotrexate pharmacogenetics in rheumatoid arthritis: a status report[J]. Pharmacogenomics, 2013, 14 (3): 305-314.

[10] 陈凯,吴丹,张学军. 血清抗突变型瓜氨酸波形蛋白抗体在类风湿关节炎诊断中的价值[J]. 山东医药, 2012, 52(23): 28-30.

[11] Kim CW, Cho EH, Lee YJ, et al. Disease-specific proteins from rheumatoid arthritis patients[J]. J Korean Med Sci, 2006, 21(3): 478-84.

[12] Corr M, Boyle DL, Ronacher LM, et al. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the beneficial effects of systemic interferon beta in mice: implications for rheumatoid arthritis [J]. Ann Rheum Dis, 2011, 70(5): 858-863.

[13] Aicher WK, Pap T, Gay S, et al. Laminin-dependent inflammatory response in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis patients[J]. Z Rheumatol, 2008, 67(1): 59-61.

[14] De Vos WH, Houben F, Hoebe RA, et al. Increased plasticity of the nuclear envelope and hypermobility of telomeres due to the loss of A-type lamins[J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1800: 448-458.

[15] Ragnauth CD, Warren DT, Liu Y, et al. Prelamin A acts to accelerate smooth muscle cell senescence and is a novel biomarker of human vascular aging[J]. Circulation, 2010, 121: 2200-2210.

(编辑: 邓响潮)