

沉香是传统天然香料和名贵中药材,具有与氯丙嗪类似的神经药理活性,对中枢神经系统起着抑制作用。本文通过对沉香挥发油进行抗氧化损伤作用的研究,证实了沉香挥发油能通过增强细胞内抗氧化酶活力,起到保护细胞对抗氧化损伤的作用。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录 92.
- [2] 国家食品药品监督管理局. 药物研究技术指导原则(中药、天然药物刺激性和溶血性研究的技术指导原则)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2005: 230.
- [3] 刘军民, 徐鸿华. 国产沉香研究进展[J]. 中药材, 2005, 28(7): 627-632.
- [4] Kanako S, Fumikon, Itsu k. Inhibition of H^+ , K^+ -ATPase by

hinesol, a major component of Sojut-su, by interaction with enzyme in the E, state[J]. Biochemical Pharmacology, 2000, 59(7): 881-886.

- [5] 黄宜生, 贾钰华. 酸枣仁总皂苷对过氧化氢损伤心肌细胞的保护作用及机制研究[J]. 中药新药与临床药理, 2013, 24(2): 135-139.
- [6] 徐先祥, 夏伦祝, 高家荣. 中药皂苷类物质抗氧化作用研究进展[J]. 中国中医药科技, 2004, 11(2): 126-128.
- [7] 程吟梅, 葛炜, 张曙云, 等. 老年痴呆患者血中氧自由基反应的相关指标[J]. 科技通报, 1999, 15(12): 68-69.
- [8] 吴军, 周春详, 赵凤鸣, 等. 麻黄连翘赤小豆汤三方对 H_2O_2 诱导损伤的 L-02 人肝细胞的保护作用[J]. 中药新药与临床药理, 2013, 24(4): 367-370.
- [9] 夏新, 钟振国, 冯丹霞. 三七总皂苷保护 PC12 细胞对抗过氧化氢损伤的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(4): 216-219.
- [10] 江湧, 方永奇, 何玉萍. 石菖蒲有效成分配伍对 $A\beta$ 损伤 PC12 细胞的保护作用[J]. 中药新药与临床药理, 2006, 17(5): 335-338.

(编辑: 邓响潮)

琼玉膏对 D- 半乳糖所致衰老大鼠差异蛋白质表达的影响

刘焕兰, 武夏林, 曲卫玲(广州中医药大学基础医学院, 广东 广州 510006)

摘要: 目的 采用蛋白质组学方法, 在下丘脑中探索琼玉膏对衰老大鼠产生调节作用的相关蛋白质, 从而在分子水平上解释抗衰老方剂琼玉膏的作用机理。**方法** 将 2~3 月龄 42 只 SD 大鼠, 随机分为正常对照组、模型组、琼玉膏组, 每组 14 只。给药结束后, 抽提下丘脑全蛋白。利用荧光双向差异凝胶电泳、图像分析、胶内酶切、质谱鉴定等蛋白质组学技术, 分离、分析、鉴定大鼠下丘脑差异蛋白质; 通过数据库检索和生物信息学方法, 分析差异蛋白的功能及属性。**结果** 1. 成功复制亚急性衰老大鼠动物模型; 2. 获得了正常对照组、模型组和琼玉膏组下丘脑组织的全蛋白表达荧光双向差异凝胶电泳图谱; 3. 运用蛋白质组学技术, 比较正常对照组、模型组及琼玉膏组的下丘脑组织, 确认了 15 种表达量发生了变化的蛋白质。**结论** 鉴定出差异常蛋白主要涉及有突触形成相关蛋白、线粒体相关蛋白、能量代谢相关蛋白、抗氧化、细胞骨架蛋白、细胞分化、增殖和凋亡蛋白等, 为进一步筛选特异相关蛋白和药物靶位治疗奠定基础。

关键词: 琼玉膏; 延缓衰老; 蛋白质组学; 荧光双向差异凝胶电泳; 下丘脑

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)01-0032-05

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.01.009

Effect of *Qiongyu* Extract on Differential Protein Expression in D-galactose-induced Senile Rats

LIU Huanlan, WU Xialin, QU Weiling(Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

Abstract: Objective Proteomics technique was used to investigate the regulatory effect of *Qiongyu* Extract on the

收稿日期: 2013-09-11

作者简介: 刘焕兰, 男, 博士生导师, 教授, 研究方向: 中医养生学理论与方法的创新研究。Email: 630178083@qq.com。

基金项目: 广东省自然科学基金(10151040701000058); 国家自然科学基金(81173318)。

hypothalamic relevant proteins of aging rats, and to expound its anti-aging mechanism on molecular level. **Methods** Forty-two SD rats aged 2~3 months were equally randomized into 3 groups. Sub-acute aging model was established. After medication for 8 weeks, the whole protein in the rat hypothalamus was extracted for the analysis of differential protein by two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis, proteomics technique, and bioinformatics technique. And then the function and attribute of the differential proteins were analyzed through database search and the method of biological information. **Results** (1)Sub-acute aging rat model has been established successfully. (2) The two-dimensional fluorescence difference gel electrophoretograms of the hypothalamic whole protein had obtained for the model group, normal control group and *Qiongyu* Extract group. (3)Fifteen kinds of proteins with differential expression had been identified through the proteomics technique. **Conclusion** Differential proteins involving synapse formation protein, mitochondrial protein, energy metabolism related protein, antioxidant protein, cytoskeletal protein, and cell differentiation, proliferation and apoptosis protein have been identified, which will supply evidence for the further screening of the disease-specific markers and intervention targets.

Keywords: *Qiongyu* Extract; Anti-aging; Proteomics; Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis; Hypothalamus

人口老龄化已经是全球化的现象, 预计“十二五”期间我国老年人口将突破 2 亿, 到 21 世纪中叶将达到 4.5 亿, 约占总人口的 1/3^[1]。早在 2000 多年前, 祖国传统医学就形成了初步的衰老与抗衰老学术思想, 拥有诸多内容丰富值得挖掘、探讨和提高的抗衰老药物和方剂。琼玉膏首载于宋·洪遵《洪氏集验方》卷一^[2], 由生地、茯苓、人参、蜂蜜组成, 具有健脾补肾、养阴益气等作用, 是集治疗与保健为一体的古代抗衰老的经典名方。研究表明, 仅大约有 2 % 的疾病与基因序列有关, 剩余的 98 % 的疾病与蛋白质的表达相关, 因此大多数科学家认为基因组并没有直接编码衰老的程序, 而是通过编码的蛋白质等因素间接影响寿命长短。通过蛋白质组学的研究, 可以在蛋白质水平弄清衰老发生、发展的分子机制, 有助于衰老机制的研究^[3]。本试验采用双向荧光差异凝胶电泳, 分析其下丘脑蛋白质, 寻找差异蛋白, 从蛋白质角度探讨琼玉膏抗衰老机制。

1 材料与方法

1.1 动物 SD 大鼠, 42 只, 质量 180~220 g, 由广州中医药大学实验动物中心提供。准许证号: SCXK(粤)2008-0020。

1.2 药物及试剂 蜂蜜, 蕉岭县延源长寿食品实业有限公司; 生地、茯苓、人参, 汕头市创美中药饮片有限公司; 琼玉膏, 由广州中医药大学养生教研室

提供, 测比重为 1.40 kg·L⁻¹。尿素(Urea, 批号: U5128)、硫脲(Thiourea, 批号: T8656)、3-[(3-胆固醇氨丙基)二甲基氨基]-1-丙磺酸(CHAPS, 批号: C3023)、甲叉二丙烯酰胺(N,N'-Methylenebisacrylamide, 批号: M7256)、过硫酸铵(AP, 批号: A3678)、碘乙酰胺(IAA, 批号: I1149), 美国 Sigma 公司; DIGE 染料试剂盒(批号: 25-8010-65)、IPG 缓冲液 pH4~7(IPG buffer)、24 cmIPG 胶条, pH4~7(批号: 17-6002-46)、低熔点琼脂糖(Low melt-Agarose, 批号: 32829), 美国 GE 公司; 丙酮(Acetone)、甲醇(Methanol), 美国 Fisher 公司; 二硫苏糖醇(DTT)、Tris-base、丙烯酰胺(Acrylamide)、甘氨酸(Glycine)、甘油(Glycerol), 美国 Amresco 公司; 十二烷基硫酸钠(SDS), 美国 Promega 公司; 普通琼脂糖(Agarose), BIOWEST; 蛋白酶抑制剂(PMSF, 批号: P0754)、胎牛血清标准品(BSA, 批号: A0332)、考马斯亮蓝 G-250(Coomassie brilliant blue G-250, 批号: C0615)、溴酚蓝(Bromophenol blue)、N, N, N', N'-四甲基乙二胺(TEMED, 批号: B0449), 上海生工(进口分装)。

1.3 仪器 冷冻离心机, 珠海黑马医学仪器有限公司; 超声仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 分光光度计, 上海光谱仪器有限公司; 激光扫描仪 Typhoon 9400, 美国 GE 公司; Autoflex speed™

MALDI-TOF-TOF 质谱仪、数据库检索软件 flexAnalysis、BioTools, 德国布鲁克(Bruker Dalton)仪器有限公司; HoeferMiniVE 垂直电泳仪、一向等电聚焦仪 IPGphor、二向垂直电泳仪 Ettan™ DALTTwelve, 美国 Bio-Rad 公司。

1.4 方法

1.4.1 实验分组及亚急性衰老大鼠模型复制 取 2~3 月龄健康雌性 SD 大鼠, 随机分为 3 组(每组 14 只): 正常对照组、模型组、琼玉膏组。正常对照组每天灌胃给予蒸馏水 10 mL·kg⁻¹, 皮下注射生理盐水 2.5 mL·kg⁻¹; 模型组每天灌胃给予蒸馏水 10 mL·kg⁻¹, 皮下注射 D-gal 2.5 mL·kg⁻¹; 琼玉膏组每天灌胃给予琼玉膏, 皮下注射 D-gal 2.5 mL·kg⁻¹。模型复制采用广西医科大学邱柏程^[4]的造模方法, 大鼠出现衰老体征时, 以水迷宫智力实验证实其抗疲劳、学习记忆能力减退即复制成功亚急性衰老大鼠模型。

1.4.2 荧光双向差异凝胶电泳、质谱鉴定 ①一向等电聚焦: 在干燥后的蛋白质团块中加入 200 μL LB, 用枪头将蛋白质团块戳小后反复吹打直至蛋白质充分分散。进行蛋白质定量、DIGE 荧光标记、分析胶(银染)的上样量为 120 μg, 质谱胶(考染)的上样量为 1200 μg; ②二向 SDS-PAGE; ③扫描: 选择 500 microns 预扫描, 测定图像最大灰度值, 调节各通道的 PMT 值, 使图像的最大灰度值在 60000~90000 之间, 100 microns 正式扫描; ④图像分析: 运用 Image Master 2D Platinum 7.0 软件进行凝胶图谱的蛋白质检测和背景消减, 然后将数据输入 BVA 软件中, 蛋白质点的确认、匹配、统计学分析均在 DeCyder-BVA 软件中完成, 最终找出差异倍数大于 1, $P < 0.05$ 的点, 配合人工校正, 保证准确性; ⑤质谱前处理; ⑥利用Autoflex speed™ MALDI-TOF-TOF 质谱仪进行质谱分析。UV 波长为 355 nm, 重复速率为 200 Hz, 加速电压为 20000 V, 最优质量分辨率为 1500 Da。扫描质量范围为 700~3200 Da, 收集信号。胰酶自切峰为内标校正质谱仪。所有实验样品的质谱图均以用默认模式获得。

1.5 统计学处理方法 采用 SPSS10.0 统计软件, 数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 用单因素方差分析进行组间比较。

2 结果

2.1 Morris 水迷宫实验对衰老大鼠行为学指标的测

定 见表 1。与正常对照组比较, 模型组在第 3 天开始潜伏期延长, 差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$), 说明模型复制成功。与模型组比较, 琼玉膏组在第 4 天起潜伏期明显缩短, 差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠在 Morris 水迷宫不同时间的潜伏期比较($\bar{x} \pm s$, $n=14$)

Table 1 Comparison of the latent period of rats in each group at different time

组别	潜伏期 / s			
	3 d	4 d	5 d	6 d
正常对照组	47.20 ± 11.26	16.30 ± 8.86	15.10 ± 6.99	9.75 ± 5.33
模型组	59.70 ± 11.30*	37.25 ± 14.82**	17.10 ± 4.72**	17.10 ± 5.72**
琼玉组	50.70 ± 11.84	32.00 ± 15.51 [#]	16.50 ± 11.54 [#]	12.51 ± 6.01 [#]

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$ 。第 1~2 天为学习训练不计入统计分析。

2.2 下丘脑蛋白质组的 2D-DIGE 差异分析 见图 2。将各组大鼠下丘脑组织蛋白进行 2D-DIGE 凝胶电泳分离, 各重复 4 次, 经过图像扫描得到两者的 2D-DIGE 凝胶电泳图谱。将荧光图像利用 Decyder 软件的 BVA 模块在凝胶之间进行匹配, 在相同设定值条件下获取各自的蛋白斑点, 并以蛋白点最多的 MASTER 胶为参考胶, 进行胶间的斑点匹配, 平均匹配率为 90 % 以上, 发现 18 个蛋白点表达量出现显著变化($P < 0.05$), 选择差异倍数一倍以上者制作整体差异图。

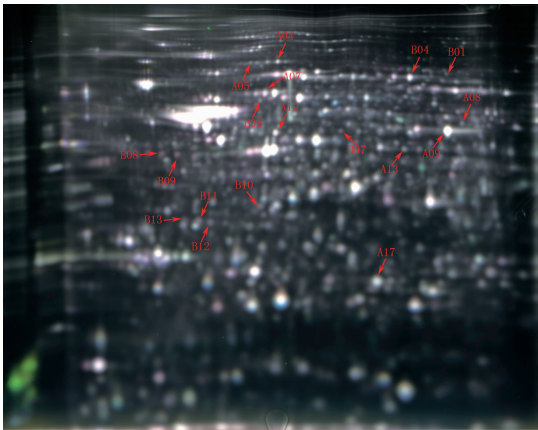


图 1 2D-DIGE 电泳扫描叠加图(整体差异蛋白质比较)

Figure 1 2D-DIGE electrophoresis scanning overlay chart

2.3 差异蛋白质质谱鉴定 通过数据库检索, 获得候选蛋白的信息, 见表 2。对候选蛋白设置的鉴定标准是: 蛋白积分大于 75, 肽段中氨基酸序列覆盖率大于 30 %, 等电点和分子量与凝胶蛋白点的相一致。

表 2 琼玉膏对 D- 半乳糖所致衰老大鼠蛋白质鉴定表

编号	登陆号	蛋白名称	分数	等电点	分子量	覆盖率 /%
A04	NDUS1_RAT	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	349	5.65	80331	47
A05	NDUS1_RAT	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	232	5.65	80331	37
A07	AINX_RAT	Alpha-internexin	407	5.2	56253	50
A08	SEP11_RAT	Septin-11 OS=Rattusnorvegicus GN=Sept11 PE=1 SV=1	87	6.24	50005	27
A09	ENOA_RAT	Alpha-enolase	250	6.16	47440	17
A10	QCR1_RAT	Cytochrome b-c1 complex subunit 1	109	5.57	53500	23
A13	ADK_RAT	Adenosine kinase OS=Rattusnorvegicus GN=Adk PE=1 SV=3	182	5.72	40450	36
A17	PRDX6_RAT	Peroxiredoxin-6	150	5.64	24860	48
B01	DHSA_RAT	Succinatedehydrogenase [ubiquinone] flavoproteinsubunit, mitochondrial	374	6.75	72596	48
B04	ALBU_RAT	Serum albumin	326	6.09	70682	29
B06	AINX_RAT	Alpha-internexin OS=Rattusnorvegicus GN=Ina PE=1 SV=2	108	5.2	56253	30
B07	ARP3_RAT	Actin-related protein 3	295	5.61	47783	47
B08	RSSA_RAT	40S ribosomal protein SA	416	4.8	32917	64
B09	PP1R7_RAT	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7	221	4.84	41385	48
B10	SNAB_RAT	Beta-soluble NSF attachment protein	231	5.32	33791	67
B11	EFHD2_RAT	EF-hand domain-containing protein D2	394	5.01	26743	47
B12	EFHD2_RAT	EF-hand domain-containing protein D2	277	5.01	26743	31
B13	ENOPH_RAT	Enolase-phosphatase E1	199	4.85	28971	41

共鉴定出 15 种蛋白质，详见表 2。

3 讨论

中医认为，“精、气、神”是支配着人体生命的三大元素，精亏、气虚、神萎等整体表现是衰老的征象，“脑为元神之府”，衰老与脑的功能变化密切相关。目前已有不少学者在基因组和蛋白质组水平对衰老的本质做了有益探索。蛋白质组学在整体、动态、网络的研究方法学与中医衰老机理的整体观、辩证观有很多相似之处。中医衰老学说注重脾肾在衰老过程中的作用，琼玉膏健脾补肾，肾主骨生髓通脑，而西医认为下丘脑作为神经内分泌免疫网络中枢，很可能是关键的“衰老钟”。

中药的成分复杂，复方更是如此。它们对人体疾病的调节是多种成分复杂作用的综合结果，但其最终取效也往往落实到蛋白质，通过一系列蛋白质表达的调控而发挥作用。方药成分进入体内发挥疗效的基本环节是药物分子与人体内分子之间的直接或间接地相互作用，这种作用必然会引起从遗传物质到细胞器、细胞、器官、整体多个层面的结构与功能的调整。其中最基本的调整点是相关功能基因，最终最直接的影响层面是相关蛋白质^[9]。蛋白质组学具有的整体性、复杂性、动态性、阶段性以及稳定的特性与中医“证”的特征不谋而合，成为了方药作用靶点和物质

基础^[6]。因此，我们通过蛋白质组学技术，确定琼玉膏对应的靶点与功能蛋白，以期从蛋白质水平阐明琼玉膏抗衰老机制。

本实验结果表明，相对于正常对照组，模型组大鼠下丘脑中高表达而被琼玉膏下调至正常对照组水平的蛋白质有 a 烯醇化酶、NADH 泛氧化还原酶、a-internexin 神经中间丝蛋白、线粒体琥珀酸脱氢酶黄素蛋白、血清白蛋白、肌动蛋白相关蛋白 3、40S 核糖体蛋白 SA、蛋白磷酸酶；在模型组下丘脑中低表达而被琼玉膏上调至正常对照组水平的蛋白质有 Septin-11、细胞色素、腺苷激酶、过氧化物酶 6、βNSF 附着蛋白、EF、磷酸烯醇式 E1。这些标志蛋白质主要有突触形成相关蛋白、线粒体相关蛋白、能量代谢相关蛋白、抗氧化、细胞骨架蛋白、细胞分化、增殖和凋亡蛋白等。

本研究结果探究了琼玉膏延缓亚急性衰老大鼠的下丘脑差异蛋白，并将其中可能对抗衰老起到作用的蛋白进行分类分析，将为深入揭示衰老的基本生命规律及其防治提供新的思路和科学实验数据，并为研制开发应用琼玉膏提供实验和理论依据。

参考文献：

[1] 曾尔亢, 孙煜昊, 段凌, 等. 我国人口老龄化与衰老科学[J]. 中国社会医学杂志, 2012, 29(6): 388-389.

- [2] 洪遵. 洪氏集验方[M]. 上海: 上海科技出版社, 2003: 4-4.
- [3] Gafni A. Proteomics in Aging-related Research [J]. Sci Aging Knowledge Environ, 2004(45): 41.
- [4] 邱柏程, 刘庆丰. D-半乳糖大鼠衰老模型的评价[J]. 广西医学, 2009, 31(7): 918-920.
- [5] 张星, 谢雁鸣. 后基因组时代中医药研究思路方法新探[J]. 中医药学报, 2001, 19: 426-427.
- [6] 孟庆宏, 王常松, 傅晓倩, 等. 蛋白质组学技术引入中医论证的可行性研究[J]. 中医学报, 2011, 2(26): 170-172.

(编辑: 邓响潮)

泽泻不同提取物对 SGC-7901 细胞线粒体能量代谢的影响

林文津, 徐榕青, 张亚敏, 李主泉, 张园秀, 郭娜 (福建省医学科学研究院 福建省医学测试重点实验室, 福建 福州 350001)

摘要: **目的** 比较泽泻不同提取物对细胞线粒体能量代谢的影响。**方法** 分别制备泽泻水提取物(WRE)、乙醇提取物(ERE)、超临界 CO₂ 萃取物(SFE), 以 SGC-7901 胃癌细胞为研究对象, 阳离子荧光染料 JC-1 染色, 采用倒置荧光显微镜观察结合流式细胞仪检测 3 种提取物对细胞线粒体膜电位的影响; 应用酶标仪检测 3 种提取物对琥珀酸脱氢酶(SDH)活性的影响。**结果** 红色荧光减弱(或绿色荧光增强)的程度: ERE < SFE < WRE。流式细胞仪检测结果显示, 正常对照组、WRE 组、ERE 组、SFE 组的单阳细胞比例分别为 3.5 %、14.8 %、9.8 %和 17.3 %, 与正常对照组比较, 3 组提取物单阳细胞比例均有增加, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 与 ERE 组比较, WRE 组单阳细胞比例更高($P < 0.01$)、SFE 组单阳细胞比例最高($P < 0.01$); SDH 检测结果显示, SFE 组对细胞 SDH 活性有抑制作用, 而 ERE 组和 WRE 组均有不同程度的促进作用, 且 ERE 组对 SDH 的促进作用大于 WRE 组; 与正常对照组比较, ERE 组和 WRE 组的 SDH 活性差异有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$); 与 ERE 组比较, WRE 组、SFE 组的 SDH 活性差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 泽泻醇提取物对线粒体膜电位的损害较小, 对 SDH 活性促进作用较显著, 提示泽泻醇提取物具有较明显改善线粒体能量代谢的作用。

关键词: 泽泻; 提取物; 线粒体能量代谢; 膜电位; 琥珀酸脱氢酶

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2014)01-0036-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.01.010

Effect of Rhizoma Alismatis Extracts on SGC-7901 Cell Mitochondrial Energy Metabolism

LIN Wenjin, XU Rongqing, ZHANG Yamin, LI Zhuquan, ZHANG Yuanxiu, GUO Na (Fujian Academy of Medical Sciences, Fujian Key Laboratory of Medical Measurement, Fuzhou 350001 Fujian, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of Rhizoma Alismatis (RA) extract on cell mitochondrial energy metabolism. **Methods** RA extracts were prepared by the water reflux extraction (WRE), ethanol reflux extraction (ERE) and the supercritical CO₂ fluid extraction (SFE), respectively. Human gastric carcinoma SGC-7901 cells were treated with the above three extracts, and then dyed by cation fluorescence carbocyanine JC-1. The mitochondrial membrane potential of SGC-7901 cells was determined by the inverted fluorescence microscope and flow cytometer, and the succinate dehydrogenase (SDH) activity was detected by microplate reader. **Results** The red fluorescence weakening (or green fluorescence strengthen) in the ERE, SFE, WRE groups was in increasing sequence, ERE <

收稿日期: 2013-09-26

作者简介: 林文津, 男, 副研究员, 研究方向: 中药资源开发利用与新药研究。Email: lwj680@139.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81102875); 福建省省属公益类科研院所基本科研专项(2013R0034-3)。