



广西医科大学
GUANGXI MEDICAL UNIVERSITY

密级：
学号：200910056

广西医科大学 博士学位论文

三七总皂苷对顺铂、马兜铃酸肾损害的 保护作用研究

杨玉芳

指导教师姓名 刘华钢 教授

专业名称 药理学

申请学位类型 科学学位

二〇一二年六月

独 创 声 明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含未获得其他教育机构的学位或证书使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名：杨玉芳

签字日期：2012年 6月15 日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解广西医科大学有关保留、使用学位论文的规定，有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权广西医科大学可以将学位论文的全部或部分内 容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同时授权中国科学技术信息研究所将本学位论文收录到《中国学位论文全文数据库》，并通过网络向社会公众提供信息服务。（保密的学位论文在解密后适用本授权书）

学位论文作者签名：杨玉芳

导师签字：

朱玉刚

签字日期：2012年 6 月15 日

签字日期：2012年 6 月15 日

目 录

英文缩略词表	3
中文摘要	5
英文摘要	9
前言	15
第一部分 三七总皂苷对顺铂肾损害大鼠肾功能的保护作用.....	18
1. 材料.....	18
2. 方法.....	19
3. 结果.....	20
4. 讨论.....	23
第二部分 三七总皂苷对顺铂肾损害大鼠肾组织的差异表达	
蛋白质的影响.....	26
1. 材料.....	26
2. 方法.....	28
3. 结果.....	36
4. 讨论.....	46
第三部分 三七总皂苷对马兜铃酸肾损害大鼠肾功能的保护作用.....	51
1. 材料.....	51
2. 方法.....	52
3. 结果.....	54
4. 讨论.....	58
第四部分 三七总皂苷对马兜铃酸肾损害大鼠肾组织差异表达	
蛋白质的影响.....	62

1. 材料	62
2. 方法	63
3. 结果	65
4. 讨论	73
第五部分 三七总皂苷对体外顺铂损害人肾小管 上皮细胞的保护作用研究	78
1. 材料	78
2. 方法	80
3. 结果	83
4. 讨论	85
第六部分 全文总结	88
参考文献	91
综述	101
致谢	124
发表论文目录	125

附录

主要英文缩略词表

英文缩写	英文全称	中文
AA	Aristolochic Acid	马兜铃酸
AAN	Aristolochic Acid Nephropathy	马兜铃酸肾病
BMP-7	Bone Morphogenetic Protein 7	促成骨形成蛋白 7
BUN	Blood Urea Nitrogen	血尿素氮
CAAN	Chronic Aristolochic Acid Nephropathy	慢性马兜铃酸肾病
CCK8	cell counting kit 8	细胞计数试剂盒 8
CDDP	Cis-dichlorodiammine-platinum	顺式二氯二氨合铂
DTT	Dithio-threitol	二巯基苏糖醇
GSH-Px	Glutathione Peroxidase	谷胱甘肽过氧化物酶
HK-2	Human Kiney Tubule Epithelial Cell 2	人肾小管上皮细胞 2
HSP	Heat Shock Protein	热休克蛋白
HSF1	Heat Shock Factor 1	热休克因子 1
MALDI-TOF-MS/MS	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry/Mass Spectrometry	基质辅助激 光解析电离飞 行时间串联质谱
mHSP	Mitochondrial Heat Shock Protein	线粒体热休克蛋白
MDA	Malondialdehyde	丙二醛
MPT	Mitochondrial Permeability Transition	线粒体通透性转换
NAG	N-acetyl- β -glucosaminidase	N-乙酰- β -氨基葡萄糖苷酶
OATs	Organic Anion Transporters	有机阴离子转运蛋白
OD	Optical density	光密度

PNS	Panax Notoginseng Saponins	三七总皂苷
PNSH	High dose of Panax Notoginseng Saponins	三七总皂苷高剂量
PNSL	Low dose of Panax Notoginseng Saponins	三七总皂苷低剂量
PNSM	Middle dose of Panax Notoginseng Saponins	三七总皂苷中剂量
ROS	Reactive Oxygen Species	活性氧
Scr	Serum creatinine	血清肌酐
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate	十二烷基硫酸钠
SPA	Sinapinic acid	能量吸收分子—芥子酸
SELDI-TOF-MS	Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry	表面增强激光解析电 离飞行时间质谱
TEC	Renal Tubule Epithelial Cell	肾小管上皮细胞
TGF- β	Transforming Growth Factor β	转化生长因子 β

三七总皂苷对顺铂、马兜铃酸肾损害的保护作用研究

摘要

目的：研究三七总皂苷(Panax Notoginseng Saponins, PNS)对顺铂、马兜铃酸肾损害的保护作用，并从蛋白质组学的角度探讨其可能的作用机制，为PNS治疗顺铂肾损害、马兜铃酸肾损害提供理论依据。

方法：建立顺铂肾损害、马兜铃酸肾损害的大鼠模型，以及通过培养人肾小管上皮细胞(HK-2)建立体外顺铂肾小管上皮细胞损害模型，并给以PNS进行干预，检测大鼠尿 β -N-乙酰胺基葡萄糖苷酶(NAG)、24 h 尿蛋白定量、血清肌酐(Scr)和尿素氮(BUN)，以及肾小管上皮细胞的光密度(OD)；采用表面增强激光解析电离飞行时间质谱(surface-enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, SELDI-TOF-MS)技术筛选各组大鼠肾组织、HK-2细胞的差异表达蛋白质，并利用基质辅助激光解析电离飞行时间串联质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry/Mass spectrometry, MALDI-TOF-MS/MS)对部分差异表达蛋白质进行分离鉴定。

1、PNS对大鼠顺铂肾损害的保护作用：SD大鼠随机分为正常对照组(d1~d10注射与PNS等容量的生理盐水)、顺铂模型组(d1注射顺铂 5mg/kg, d2~d10注射生理盐水)、阳性对照组(d1注射氨磷汀, 30min后注射顺铂, d2~d10注射等容量的生理盐水)、PNS高、中、低剂量组(d1注射顺铂和高、中、低剂量的PNS, d2~d10注射PNS)。均腹腔注射，每天1次。10d后收集尿液、血液和肾脏组织进行生化检测、电镜检查 and 差异表达蛋白质的筛选、鉴定。

2、PNS 对大鼠马兜铃酸肾损害的保护作用：大鼠随机分为空白对照组、马兜铃酸模型组、阳性对照组及 PNS 低、中、高剂量组（PNSL、PNSM、PNSH）。造模大鼠灌服关木通浸膏，4 h 后 PNS 各组灌服不同剂量 PNS 溶液，阳性组对照组（强的松组）灌服泼尼松 $3.15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ，马兜铃酸模型组灌服等体积生理盐水。分别于实验第 12、16、20w 处死大鼠。留取血液、尿液及肾组织标本，检测大鼠 24 h 尿蛋白含量、尿 NAG，以及 Scr、BUN 的含量。取肾组织作光镜和电镜检查，以及差异表达蛋白质的筛选和鉴定。

3、PNS 对顺铂损伤HK-2细胞的影响：

(1) 顺铂、PNS 对HK-2细胞增殖的影响。实验分为① 顺铂细胞组：细胞在含不同浓度顺铂的培养基中培养；② PNS 细胞组：在培养基中加入不同浓度的PNS；③空白细胞组：含10%新生小牛血清。培养48 h。

(2) PNS 对顺铂抑制HK-2细胞增殖的影响。实验分为① 空白细胞组：只含10%新生小牛血清；② 顺铂细胞组：顺铂 12.5 ug/L 和10%新生小牛血清；③ 顺铂PNS细胞组：在含顺铂 12.5 ug/L 的10%新生小牛血清，培养12 h后，分别加入不同浓度的PNS。共培养48 h。取空白细胞组、顺铂细胞组、顺铂PNS细胞组（含 50 ug/L PNS），进行差异表达蛋白质筛选、鉴定。

结果：

1、PNS 对大鼠顺铂肾损害的保护作用：① 顺铂模型组与正常对照组比较，血清BUN、Scr以及尿的NAG酶均明显升高（ $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ），PNS各组及氨磷汀组可显著降低上述各指标，其中PNS中剂量组的效果较好。② 顺铂模型组大鼠肾小管上皮细胞片状坏死，线粒体明显肿胀，线粒体脊模糊不清或完全消失；PNS各组及氨磷汀组的病理损害有所减轻，正常对照组大鼠无明显病变。③ 顺铂模型组分别与正常对照组、PNS治疗组的肾组织存在多种差异表达蛋白质。④ 蛋白质 m/z 10815.42被鉴定为线粒体的热休克蛋白，该蛋白质在PNS治疗组大鼠肾组织中高表达，较顺铂模型组表达上调2被以上。蛋白质 m/z 16021.67被鉴定为血红蛋白 β 1亚基和血

红蛋白 $\beta 2$ 亚基, 该蛋白质在顺铂模型组中较正常对照组高表达。

2、PNS 对大鼠马兜铃酸肾损害的保护作用: ① 马兜铃酸模型组大鼠血清 Scr、BUN、24h 尿蛋白及尿 NAG 酶均较空白对照组的显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且随着给药时间延长逐渐加重。PNS 各组及强的松组的上述指标均较马兜铃酸模型组的显著下降。② 模型组大鼠肾小管肿胀、萎缩及间质纤维化; 肾小管上皮细胞线粒体肿胀, 吞噬泡及溶酶体增多。PNS 治疗组及强的松组的肾小管病变及间质纤维化有所改善, 肾小管上皮细胞线粒体肿胀有所减轻。③ 马兜铃酸模型组分别与空白对照组、PNS 20w 组、强的松组大鼠之间均存在多个肾组织的差异表达蛋白质。④ 蛋白质 m/z 10082.07 被鉴定为乙酰辅酶 A 结合蛋白, 该蛋白质在强的松组大鼠肾组织中高表达, 较马兜铃酸模型组的上调 2 倍以上。⑤ 在“顺铂肾损害”、“马兜铃酸肾损害”这两部分内容中筛选出 5 个共同的差异表达蛋白质, 说明在这两个药物引起的肾损害的发生或发展过程中可能涉及到一些共同的蛋白质改变; 在顺铂肾损害中, PNS 可使蛋白质 m/z 1428 表达下调, 而在马兜铃酸肾损害中, PNS 却使其上调。具体原因有待进一步研究。

3、PNS 对顺铂损伤 HK-2 细胞的影响: ① 顺铂显著抑制 HK-2 细胞的增殖, 且随着浓度的增加抑制作用越明显; PNS 可促进 HK-2 细胞的增殖, 且随着浓度的增大作用越明显。② PNS 可减轻顺铂对 HK-2 细胞增殖的抑制。③ 暂时未能筛选出差异表达蛋白质。

结论:

1、三七总皂苷对顺铂肾损害大鼠、顺铂损伤 HK-2 细胞、马兜铃酸肾损害大鼠均有一定的保护作用。

2、顺铂模型组分别与正常对照组、PNS 治疗组的肾组织存在多种差异表达蛋白质。其中蛋白质 m/z 10815.42 被鉴定为线粒体的热休克蛋白, 该蛋白质在 PNS 治疗组大鼠肾组织中高表达, 较顺铂模型组的上调 2 倍以上。蛋白质 m/z 16021.67 被鉴定为血红蛋白 $\beta 1$ 亚基和血红蛋白 $\beta 2$ 亚基。这

两种蛋白质与顺铂肾损害、PNS 保护作用的关系有待进一步的研究。

3、马兜铃酸模型组分别与空白对照组、PNS 20w 组、强的松组大鼠之间均存在多个肾组织的差异表达蛋白质。其中蛋白质 m/z 10082.07 被鉴定为乙酰辅酶 A 结合蛋白，其在马兜铃酸肾损害中的作用有待进一步的研究。

4、在“顺铂肾损害”、“马兜铃酸肾损害”这两部分内容中筛选出 5 个共同的差异表达蛋白质，说明在这两种药物对肾脏的损害过程中可能涉及到一些共同的蛋白质改变。

5、差异表达蛋白质有待纯化分离鉴定，才能确定其性质、功能，以及进一步了解它们在顺铂肾损害、马兜铃酸肾损害、PNS 干预中所起的作用。

6、虽然本课题目前只取得初步的研究结果，但为后续的研究工作提供新的思路和方法，为全面、系统地探讨顺铂肾损害、马兜铃酸肾损害的机制以及 PNS 的保护作用提供理论基础。

关键词 三七总皂苷，顺铂，马兜铃酸，肾损害，差异表达，蛋白质组

PROTECTIVE EFFECTS OF PANAX NOTO- GINSENOSES ON CISPLATIN AND ARISTOLO- CHIC ACID-INDUCED RENAL DAMAGE

ABSTRACT

Objective: To study the protective effects of PNS on cisplatin- and aristolochic acid (AA)-induced kidney damage, and explore its possible mechanism from the perspective of proteomics, to provide theoretical basis for treatment to cisplatin- and AA -induced kidney damage with PNS.

Methods: Established the model of cisplatin-and AA-induced kidney damage in rats and the vitro model of cisplatin-induced renal tubular epithelial cell damage by culturing the HK-2, which was intervened by PNS. And then detected the Urine beta N-ethyl amide base glycosidase enzymes (NAG), 24 hours urinary protein, serum creatinine (Scr) ,urea nitrogen (BUN) and the proliferation of renal tubular epithelial cell,screened the differential expression protein in renal tissue and HK-2 cells of rats with surface-enhanced laser desorption/ ionization time-of-flight mass spectrometry(SELDI-TOF-MS) , isolated and identified some of these differential expression proteins with matrix-assisted laser desorp- tion/ionization time-of-flight mass spectrometry/ Mass spectrometry(MALDI-TOF- MS/MS).

1. The protective effects of PNS on cisplatin-induced kidney damage in rats: Sprague-Dawley rats were divided randomly into six groups: control group (received the same volume of saline with PNS for ten days), cisplatin model group (first day was given 5mg/kg cisplatin, and injected with saline the next day until the tenth day.), positive control group (received cisplatin after administration of amifostine 30 minutes, the same volume of saline with amifostine was given in the next nine days.), high, middle and low dose of PNS groups (was given cisplatin and High, middle and low dose of PNS respectively on the first day, only PNS was injected in the next nine days.). Drugs and saline were given into rats by intraperitoneal injection once daily. Ten days later, Urine, blood and renal tissue were collected for biochemical detection, electron microscopic examination, screening and identification of the differential expression protein.

2. The protective effects of PNS on AA-induced kidney damage in rats: Wistar rats were divided randomly into blank control group, AA model group, positive control group and three PNS groups (high dose, middle dose and low dose). The rats were treated with extract of *Aristolochia manshuriensis* Kom by gastric gavage, and 4 hours later, PNS groups were gavaged with different doses of PNS; positive control group (prednisone treated group) received 3.15 mg.kg⁻¹.d⁻¹ prednisone, while AA model group was only given the same volume of saline. Then rats were killed at 12th, 16th, and 20th weeks after experiencing different treatment. Blood, urine and renal tissue were collected; and 24 hours urinary protein, urinary NAG, serum creatinine (Scr) and urea nitrogen (BUN) were detected. Renal tissues were provided for light and electron microscopy examination and also for screening and identification of the differential expression protein.

3. Effects of PNS on HK-2 cells with cisplatin-induced damage:

(1) Effects of cisplatin and PNS on proliferation of HK-2 cells. Three groups were established in the experiment: ① Cisplatin cell group: Cells were cultivated in culture fluid containing different concentrations of cisplatin; ② PNS cell group: Different concentrations of PNS were added to culture medium; ③ blank cell group, which were cultivated in culture fluid containing 10% newborn calf serum. All groups were cultivated for 48 hours.

(2) Effects of PNS on proliferation of HK-2 cells inhibited by cisplatin. Three groups were established in the experiment: ① Blank cell group: only containing 10% newborn calf serum; ② Cisplatin cell group: containing 12.5 μg/L Cisplatin and 10% newborn calf serum; ③ Cisplatin with PNS group, which was grown in culture fluid containing 12.5 μg/L cisplatin and 10% newborn calf serum for 12 hours and then was cultivated for another 48 hours after adding different concentrations of PNS. Blank cell group, Cisplatin cell group (12.5 μg/L Cisplatin) and Cisplatin with PNS group (50 μg/L PNS after 12.5 μg/L Cisplatin for 12h) were taken to screen and identify the differential expression protein.

Results:

1. The protective effects of PNS on cisplatin-induced kidney damage in rats: ① Serum BUN, serum creatinine, and urinary NAG enzyme were significantly increased ($p < 0.05$ or $p < 0.01$) in cisplatin model group compared to that in controls, while these indexes were significantly decreased in PNS group and amifostine group, especially in middle dose of PNS group. ② It had found that patchy necrosis in rat renal tubular epithelial cells, obvious swelling of mitochondria under the electron microscopy and mitochondria cristae were obscured, even vanished completely; PNS group and amifostine group can

reduce pathological damage of renal tubular epithelial cells,however,there was no obvious lesion in control group. ③There were kinds of differential expression protein in renal tissue among cisplatin model group, control group and PNS treated group.④Protein at m/z 10815.42 was identified as heat shock protein of mitochondria and it showed high expression in rat renal tissue in PNS treated group and more than two times in cisplatin model. Besides, protein at m/z 16021.67 was identified as hemoglobin β_1 , β_2 -chain,which showed higher expression in cisplatin model group than in control group.

2. The protective effects of PNS on AA-induced kidney damage in rats: ① Compared with blank control group, serum creatinine (Scr), urea nitrogen (BUN) ,4 hours urinary protein and urinary NAG enzyme showed a obvious increasing($p<0.05$ or $p<0.01$) in AA model group,and the increased degree had been gradually serious along with the prolonged time of administration of treatment.These indexes were significantly decreased in PNS groups and prednisone treated group when compared to AA model group. ②Light microscopy showed that model rats developed tubular swelling, atrophy and interstitial fibrosis gradually. Renal tubular lesion and interstitial fibrosis were improved in PNS groups and prednisone treated group. On the other hand,Electron microscopy showed that there were renal tubular epithelial cell mitochondrial swelling and increased lysosome and phagocytic vacuole in renal tubular cells in AA model group. PNS group and prednisone treated group can reduce pathological changes ③Renal tissue in AA model group, blank control group, PNS 20w group and prednisone treated group were found a number of differentially expressed proteins. ④ Protein at m/z 10082.07 was identified as Acyl-CoA-binding protein that showed two times higher expression in prednisone treated group than in AA model group. ⑤There are five common

differential expression proteins in the experiment of cisplatin- and AA-induced kidney damage. These indicated that the occurrence or development of cisplatin- and AA-induced kidney damage may involve the changes of common proteins. In addition, PNS can decrease expression of protein at m/z 1428 in cisplatin model group, but raised in AA model group. The specific reasons need further research.

3. Effects of PNS on HK-2 cells with cisplatin-induced damage: ①cisplatin can inhibit the appreciation rate of HK-2 cells while PNS can promote it in a concentration-dependent manner. ②PNS can reduced the inhibition of cisplatin-induced proliferation of HK-2 Cell. ③The differential expression protein was failed to screen out for the time being.

Conclusions:

1. PNS may play a protective role in rats respectively with cisplatin-induced kidney damage, AA-induced kidney damage and HK-2 cells with cisplatin-induced damage

2. There were kinds of differential expression protein in renal tissue among cisplatin model group, control group and PNS treated group. Protein at m/z 10815.42 was identified as heat shock protein of mitochondria and it showed high expression in rat renal tissue in PNS treated group and more than two times in cisplatin model. Besides, protein at m/z 16021.67 was identified as hemoglobin β_1 , β_2 -chain. It need further studies to realize the relationship among the two proteins and cisplatin kidney damage, protection of PNS.

3. There are a number of differentially expressed proteins in renal tissue between AA model group and blank control group, PNS20w group, prednisone group respectively. The protein at m/z 10082.07 was identified as

Acyl-CoA-binding protein whose effects on AA-induced kidney damage need further studies.

4. There are five common differential expression proteins in the experiment of cisplatin- and AA-induced kidney damage. These indicated that the occurrence or development of cisplatin- and AA-induced kidney damage may involve the changes of proteins

5. The differential expression protein that had been screened need to be the next step of isolation and identification to confirm their character and function. Meanwhile,it is important to realize effects of differential expression protein on cisplatin-,AA-induced kidney damage and PNS treated.

6. Though the study on this topic had only obtained preliminary results at present,it can provide new ideas and methods for follow-up research work, and theoretical basis for discussing mechanism of cisplatin- ,AA-induced kidney damage and protective action of PNS.

KEY WORDS panax notoginsenosides,cisplatin, aristolochic acid,renal damage, differentially expressed, proteomics

前言

顺铂为金属铂类络合物顺式-二氯二氨合铂（cis-dichlorodiammine-platinum, CDDP）的俗称，能与DNA结合形成交叉键，从而使DNA失去复制的功能；高浓度时也抑制RNA及蛋白质的合成，为周期非特异性抗肿瘤药物。顺铂具有抗瘤谱广、对乏氧细胞有效的特点，对多种实体肿瘤均有效^[1]，是临床上最常用的化疗药物之一。然而顺铂在肾脏高聚集、高排泄、高代谢的特点使其肾损害作用尤其明显，且其肾毒性、疗效都与剂量呈正相关，肾损害严重时可致急性肾功能衰竭，甚至死亡；而顺铂减量或停药将影响患者化疗的连续性，导致癌症患者的生活质量严重恶化^[2]。因此肾损害是限制顺铂临床应用剂量的主要不良反应，如何在不影响疗效的同时降低顺铂的肾毒性，这一直是临床上急需解决的难题。

有关顺铂肾损害的机制报道很多，涉及脂质过氧化^[3]、巯基耗竭、细胞凋亡^[4]、微循环障碍等。但这些报道多是停留在一些生化、免疫学等指标的检测上，或是从单一、独立的某个环节、途径来研究，缺乏联系性和系统性。而顺铂肾损害的发生发展是多个部位、多个环节及多种途径共同作用的结果，采用传统的研究方法很难达到全面的了解，例如还有哪些机制参与？哪种是始发机制？在其发生发展过程中哪种机制起主要作用？各种机制之间存在怎样的关系？等等这些问题仍未得到阐明，严重影响着顺铂肾损害防治措施的进一步改善。因此有必要采用高通量筛选技术系统地探讨顺铂肾损害的发生发展机制。

临床上多采用水化疗法辅以利尿药和脱水剂防治顺铂肾损害，有一定效果。由于水化法输入的液体量大、输注时间长等，易致水、电解质以及酸碱的失衡、加重心脏负担等原因，所以对于部分患者并不适用。谷胱甘

肽、氨磷汀等对顺铂肾损害有一定的缓解作用，但这些药物的应用多是以水化和利尿为基础，而且存在远期疗效差、药品价格昂贵等缺点。因此寻找对顺铂肾损害有保护作用的药物是临床急需解决的难题。不少研究发现单味中药如 PNS、冬虫夏草等，或复方制剂例如芎黄汤等对顺铂肾损害均有不同程度的保护作用，中医药在防治顺铂肾损害方面凸显其优势，但这些研究多停留在检测肾功能、氧化损伤等指标上，缺乏系统的、内在的药理作用机制研究，也就缺乏完整的理论体系来指导临床使用中医药防治顺铂肾损害。

马兜铃酸肾病 (aristolochic acid nephropathy, AAN) 是指服用含有马兜铃酸 (aristolochic acid, AA) 的药物而导致的肾脏损害，持续或间断小量服用含 AA 药物可发生慢性马兜铃酸肾病 (chronic aristolochic acid nephropathy, CAAN)。AAN 一般进展迅速，最终发展为终末期肾功能衰竭，甚至诱发肿瘤的发生^[5, 6]。目前临床上对 AAN 缺乏有效的治疗方法，因此关键在于预防 AAN 的发生，以及延缓 AAN 的进展。AAN 发生发展的机制目前尚未完全明确，研究表明 AAN 的发生发展可能与缺血缺氧、细胞毒、凋亡、免疫反应以及肾小管上皮细胞的转分化等机制有关。由此可见，AAN 的发生发展可能涉及多种机制、多条途径，采用传统的研究方法很难对其进行全面、系统地了解，对其治疗措施也难以得到改善。

三七总皂苷 (Panax Notoginsenosides, PNS) 在临床上主要用于心脑血管疾病的治疗^[7]，近年来研究发现 PNS 对肾脏疾病，如缺血性肾损伤^[8]、阿霉素肾病^[9]、庆大霉素肾毒性等有保护作用；PNS 可通过多种途径抑制肾小管上皮细胞转分化，从而抑制肾小管间质的纤维化^[10, 11, 12]。

虽然有关 PNS 对顺铂肾损害或马兜铃酸肾损害的报道较少，但研究表明 PNS 可降低顺铂肾损害小鼠的 SCr、BUN 水平，及增加肾小管上皮细胞存活率^[13]。同时因 PNS 具有提高机体免疫功能以及抑制肿瘤生长^[14, 15]的作用，能对顺铂肾损害有保护作用而又不抑制顺铂的抗肿瘤效应。有关 PNS 对

AAN 的保护作用研究发现^[16、17、18]，PNS可能通过抗氧化、抑制细胞转分化等对AAN 起保护作用。PNS对顺铂肾损害、马兜铃酸肾损害的保护作用机制尚未完全阐明。PNS主要含有三七皂苷R1，以及人参皂苷Rg1、Rb1、Re、Rd等多种成分，具有抗氧化、抗增殖、促凋亡等活性^[19]，药理作用较广泛，其对顺铂肾损害、马兜铃酸肾损害的保护作用可能涉及多位点、多途径、多机制，传统的研究方法对其无法作到全面系统的了解。只有采用高通量检测和分析的技术来研究，才能系统、全面地阐明其作用机制，从而为其临床应用提供理论基础。目前尚未见有关利用蛋白质组学等高通量筛选技术来研究PNS防治某种疾病的报道。基于上述原因，本课题建立顺铂肾损害、慢性马兜铃酸肾损害的大鼠模型，以及通过培养HK-2细胞建立体外顺铂肾小管上皮细胞损害模型，并分别给以PNS进行干预，了解PNS对顺铂、马兜铃酸肾损害的保护作用，并从蛋白质组学的角度探讨其可能的作用机制，为PNS治疗顺铂肾损害、马兜铃酸肾损害提供理论依据。

第一部分 三七总皂苷对顺铂肾损害大鼠肾功能的保护作用

1. 材料

1.1 动物

SD 雄性大鼠，体重 $200\text{g}\pm 20\text{g}$ ，SPF 级。由广西医科大学实验动物中心提供。试验动物合格证号 SCSK2009-002。

1.2 药品与主要试剂

三七总皂苷粉针剂	广西梧州制药(集团)股份有限公司，批号：20110115，临用前以生理盐水溶解。
顺铂粉针剂	齐鲁制药有限公司，批号 0070152DB
氨磷汀注射液	大连美罗大药厂，批号：53110301。 临用前用生理盐水稀释。
生理盐水	徐州莱恩药业有限公司，批号：1005281
BUN(尿酶法) 试剂盒	南京建成生物工程研究所,批号为 20100806
Scr 试剂盒	南京建成生物工程研究所,批号 20100806
NAG 试剂盒	南京建成生物工程研究所,批号 20100709
蒸馏水，去离子水	自制

1.3 主要仪器

722S 可见光分光光度计	上海精密科学仪器有限公司
5415R 小型台式离心机	德国 Eppendorf
AL204101 型电子天平	上海亚荣生化仪器厂
电镜仪器	日立 H-7650

2. 方法

2.1 实验动物分组

大鼠适应性喂养 2w 后，随机分为正常对照组、顺铂模型组、阳性对照组（氨磷汀组），以及三七总皂苷的三个剂量组（PNS 低剂量组、PNS 中剂量组、PNS 高剂量组），每组 12 只。

2.2 各组大鼠的给药方法

顺铂、氨磷汀、PNS 的给药剂量是参照徐淑云等主编的第三版《药理实验方法学》，由成人的临床常用剂量换算成大鼠的剂量。PNS 由成人的临床常用剂量换算成大鼠的剂量后作为 PNS 中剂量组的给药剂量。

(1)、正常对照组：d1~d10 腹腔注射与PNS等容量的生理盐水，每天1次。

(2)、顺铂模型组：实验 d1 腹腔注射单剂顺铂 5mg / kg，d2~d10 腹腔注射与PNS等容量的生理盐水，每天1次。

(3)、PNS高、中、低剂量组：实验 d1 腹腔注射单剂顺铂（5mg / kg）后，即腹腔注射PNS（分别为62.70mg/kg、31.35mg/kg、15.63mg/kg）1次，d2~d10 腹腔注射PNS，每天1次。

(4)、氨磷汀组：d1 腹腔注射氨磷汀 1.0mg/kg，30分钟后腹腔注射单剂顺铂（5mg / kg），d2~d10 腹腔注射等容量的生理盐水，每天1次。

2.3 标本收集及检测指标

2.3.1 标本的收集、处理

实验 10d 后，大鼠在戊巴比妥钠麻醉下（腹腔注射戊巴比妥钠 30mg / kg），腹部正中切口，打开腹腔后，自腹主动脉采血，于 4℃以 4000rpm / min 离心 5min，取血清保存于-20℃冰柜，备用检测生化指标。游离出腹主动脉，夹闭肾动脉分支以上的近心段，在肾动脉分支以下进行腹主动脉插管，剪开左肾静脉，用预冷的生理盐水由动脉插管处进行肾脏原位灌洗，

待到肾脏变白后取下双肾脏，取部分肾脏组织放入液氮中保存，留作“第二部分”的差异表达蛋白质的筛选与鉴定；另取一部分肾脏组织用 3%戊二醛固定 2h 后送电镜室，观察肾脏组织病理学的改变。

2.3.2 观察及检测指标

(1)、大鼠常规喂养，每天观察大鼠一般情况，包括精神状态、毛色、摄食与活动情况。

(2)、Scr、BUN 的测定分别采用氧化酶法、速率法，尿 NAG 酶的测定采用对硝基酚比色法。均严格按照试剂盒说明书的要求进行操作。

(3)、电镜：观察肾脏组织病理学变化。

2.3 统计学处理方法

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 13.0 软件，运用单因素方差分析法进行组间比较。

3. 结果

3.1 大鼠的一般情况

腹腔注射顺铂的各组大鼠在使用顺铂后第二天即出现进食量下降，之后逐渐出现毛色无光泽、脱落，活动减少。尤以顺铂模型组大鼠为重，出现明显的精神萎靡、活动迟缓、消瘦，部分大鼠常埋头蜷缩。正常对照组一般情况良好。

3.2 各组大鼠血清 SCr、BUN 水平检测结果

各组大鼠血清 SCr、BUN 和尿 NAG 水平的检测结果见表 1-1。顺铂模型组的血清 Cr、BUN 和尿 NAG 与正常对照组的比较均有显著性差异 ($P < 0.01$)。PNS 各剂量组的血清 BUN、尿 NAG 较顺铂模型组均显著下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，其中 PNS 中剂量组的效果似乎较好。PNS 中剂量组和低剂量组的 Scr 水平较顺铂模型组的降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，而 PNS

高剂量组的 Scr 与顺铂模型组的没有差异。

表1-1 各组大鼠血清BUN、SCr和尿NAG水平比较($\bar{x} \pm s$) (n=12)

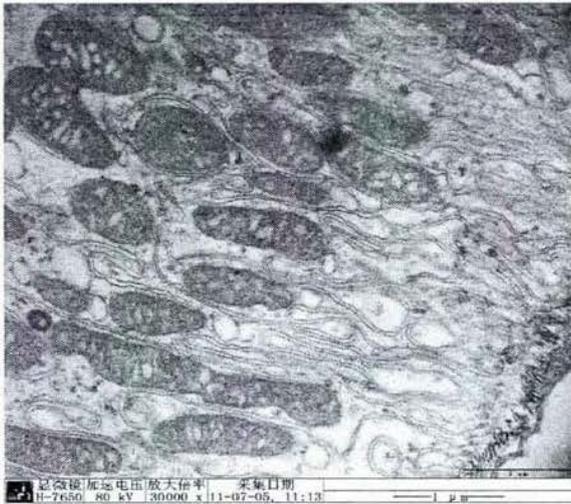
Tab. 1-1 The BUN,SCr and NAG among each group of rats($\bar{x} \pm s$) (n=12)

组别	BUN (mmol/L)	SCr (umol/L)	尿 NAG (U · L ⁻¹)
正常对照组	8.919±1.571	86.780±15.460	2.08±0.34
顺铂模型组	13.646±0.506 [△]	133.22±11.722 [△]	6.64±0.96 [△]
阳性对照组	9.993±1.935*	103.889±12.222**	4.08±0.65**
PNS 低剂量组	11.329±0.900*	120.078±14.042*	4.73±0.47**
PNS 中剂量组	9.604±0.736**	91.972±19.083**	2.14±0.57**
PNS 高剂量组	12.106±5.308*	122.833±27.088	3.98±1.34**

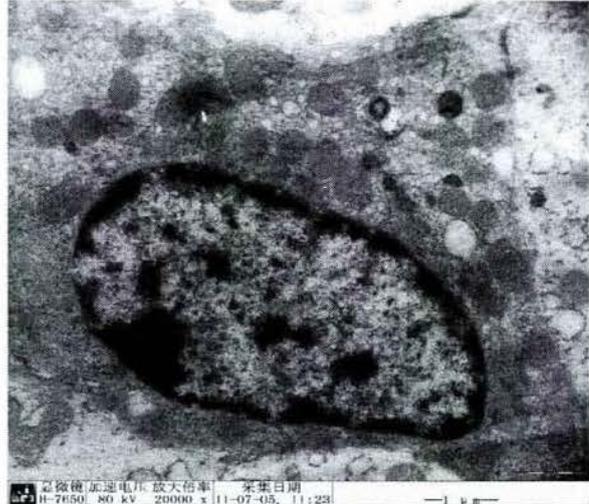
注：与正常对照组比较, $\Delta P < 0.01$ ；与顺铂模型组比较, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 。

3.3 肾组织病理学检查结果

肉眼观察可见正常对照组大鼠的肾脏为暗红色，剖面结构清晰；顺铂模型组大鼠肾脏呈暗紫色、被膜紧张。PNS中剂量组肾脏呈暗紫色。电镜观察见正常对照组肾小球、肾小管、肾间质结构清楚，未见异常变化；正常对照组肾小管上皮细胞的线粒体丰富、形态规则，线粒体脊清晰无断裂。顺铂模型组肾小球结构尚完整，损害主要表现在肾小管，出现肾小管上皮细胞片状坏死，肾小管上皮细胞的线粒体明显肿胀，线粒体脊模糊不清或完全消失。PNS中剂量组肾小管上皮细胞的线粒体肿胀程度较顺铂模型组减轻，线粒体嵴尚存在或部分有断裂，溶酶体增多。见图1-1。



Normal control group $\times 30000$



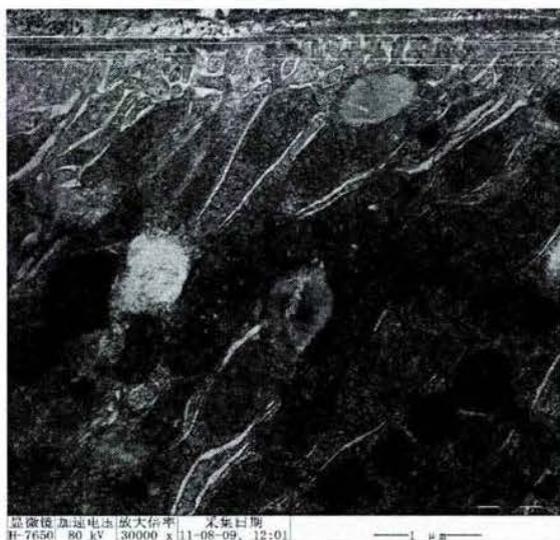
Normal control group $\times 20000$



Model control group $\times 30000$



Model control group $\times 20000$



PNSH group $\times 30000$



PNSH group $\times 20000$

图 1-1: 各组大鼠肾小管上皮细胞的电镜检查结果

Figure 1-1: Electron micrograph in nephridial tissue of rats

4. 讨论

4.1 顺铂肾损害模型的建立

在制作顺铂肾损害的动物模型时，参考了相关的文献，发现给大鼠腹腔注射单剂的顺铂 5mg / kg，可得到典型的顺铂肾损害模型，剂量越大损害越重^[20]；同时将大鼠使用5mg / kg的剂量换算成人的剂量后，符合顺铂在临床上的使用剂量范围。在预实验中，设了两个顺铂的剂量组（2mg / kg、5mg / kg），发现 5mg / kg剂量组的肾损害更典型，所以采用了这个剂量作为制模的顺铂剂量。

从表 1-1 中可见，顺铂模型组大鼠的血清 BUN、Scr 和尿 NAG 均显著高于正常对照组。肾组织病理学检查结果显示，顺铂模型组大鼠的肾小管上皮细胞出现片状坏死，上皮细胞内线粒体明显肿胀、线粒体脊模糊不清或完全消失。说明顺铂肾损害模型制作成功。

4.2 PNS 对顺铂肾损害的保护作用

PNS 各剂量组的血清 BUN、尿 NAG，以及 PNS 中剂量组和低剂量组的 Scr 水平均较顺铂模型组显著下降；肾组织病理学检查发现 PNS 中剂量组肾小管上皮细胞坏死、线粒体肿胀的程度有所减轻，表明 PNS 对顺铂肾损害有保护作用。

其中 PNS 中剂量组对降低 BUN、SCr 的效果与氨磷汀阳性对照组的相当，似乎优于 PNS 高剂量组，PNS 高剂量组的 SCr 与顺铂模型组无显著差异。原因不明，可能与下列因素有关：PNS 的成分复杂，包括对肾脏有保护作用的各种成分，也包含有杂质甚至可能含有对肾脏有害的物质，当剂量高到一定的程度就会增加肾脏的负担。

4.3 PNS保护顺铂肾损害的可能机制

顺铂肾损害可能涉及多种机制、多条途径。不少研究表明,除了过氧化损伤以外,顺铂肾损害的发生机制可能还包括:顺铂可诱导肾小管上皮细胞发生凋亡^[21、22]、顺铂与DNA形成加合物而发生直接毒性作用^[13],以及顺铂可通过某些物质(例如血管紧张素等)介导而减少肾脏血流量等等。

(1) 本实验选择氨磷汀作为阳性对照药物,是由于该药成分单一,在临床上用于减少化疗药物等引起的正常组织器官的损害^[23、24],有一定的疗效。本实验结果显示,氨磷汀可显著降低顺铂肾损害大鼠血清Cr、BUN和尿NAG水平,电镜下可见氨磷汀组的肾损害程度减轻,说明氨磷汀对顺铂肾损害有保护作用。这与研究报道的相符^[25、26]。氨磷汀在组织中被碱性磷酸酶脱磷酸后,变成带有游离巯基的活性代谢产物;由于正常组织的巯基代谢产物浓度高,可与顺铂活性代谢产物结合后降低其毒性,也可清除活性氧自由基。由此可知,过氧化损伤在顺铂肾损害中起重要的作用^[27、28]。

(2) PNS含有三七皂苷R1,人参皂苷Rg1、Rb1、Re等多种活性成分,具有抗氧化、抗增殖、促凋亡等多种药理作用。本部分实验中,PNS对顺铂肾损害具有保护作用,PNS中剂量组对顺铂肾损害的保护作用效果与氨磷汀组的相似;本课题组的前期研究发现,PNS可提高顺铂导致的大鼠肾组织中SOD、GSH-Px活性的下降^[29],提示PNS可通过抗氧化损伤对顺铂肾损害起保护作用。另有报道,PNS可预防顺铂的肾毒性,其机制是降低顺铂导致的DNA链间交联、DNA-蛋白交联和钙离子超载^[13]。因此推测,PNS对顺铂肾损害的保护作用可能涉及多种机制和位点。

4.4 肾组织病理学检查

顺铂肾损害主要涉及肾小管尤其是近端肾小管,而细胞器的损害则以线粒体为突出。电镜下可见顺铂模型组肾小管上皮细胞的线粒体肿胀严重,线粒体脊消失。有报道肾脏外髓外侧带对顺铂具有高敏感性,因为顺铂肾损害常以该部位最严重,认为可能与该区域内肾小管上皮细胞的主动转运活跃而需要大量的能量有关。线粒体损害导致ATP生成障碍,最先受累的常

是需要大量ATP来完成其生命活动的部位。

线粒体是细胞进行生物氧化，为机体提供能量的主要场所，细胞生命活动所需能量的95%均来自线粒体，是细胞内的“动力工厂”。线粒体的蛋白质含量为65%~70%，而且线粒体内含有生物氧化所需的完整酶系，是细胞中含酶最多的细胞器；另外线粒体含有内膜和外膜，内膜向内腔突起折叠形成脊，所以膜表面积丰富。由于线粒体具有以上的功能与结构特点，使其容易受到氧自由基的攻击，并产生严重的后果。不少研究表明顺铂肾损害与氧化损伤有关^[28、30]：顺铂可使大鼠血浆和肾皮质的丙二醛（MDA）增高，以及谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）减少，而一些抗氧化剂可显著降低顺铂染毒大鼠的BUN、Cr水平，或提高顺铂肾损害大鼠的SOD水平以及降低MDA含量等等。结合本课题的前期研究结果^[29]，PNS各组肾组织匀浆中SOD活性、GSH-Px活性较顺铂模型组的明显增高，而MDA含量明显降低，提示氧化损伤机制参与了顺铂的肾损害，而PNS可通过抗氧化损伤而起到保护的作用。顺铂在水合代谢中可产生大量活性氧（ROS），使膜脂质过氧化反应，以及膜蛋白功能障碍，表现在细胞膜流动性增加，膜通透性增高^[31、32]，细胞外Ca²⁺内流致使细胞内钙超载。脂质过氧化改变了线粒体膜的结构与功能，抑制其蛋白质功能或使酶活性丧失，ATP生成大量减少，出现能量代谢障碍。同时线粒体的损伤可将使其通过转移钙以调节细胞内钙水平的功能发生障碍，细胞内钙超载加重。因此细胞内钙超载在顺铂肾损害中也产生重要的作用^[33]，最终导致细胞肿胀死亡。

PNS组大鼠肾小管上皮细胞线粒体的损害程度较顺铂模型组减轻，提示PNS对肾小管上皮细胞线粒体可能具有保护作用。具体的作用机制有待进一步研究。

第二部分 三七总皂苷对顺铂肾损害大鼠肾组织差异表达蛋白质的影响

1. 材料

1.1 主要试剂

三氟乙酸(TFA)	色谱级产品, 美国 Sigma 公司
二 硫 基 苏 糖 醇 (dithio-threitol, DTT)	色谱级产品, 美国 Sigma 公司
三羟基甲基氨基甲烷-盐酸 缓冲液 (Tris-HCL)	色谱级产品, 美国 Sigma 公司
N-2-羟乙基哌嗪-N-2- 乙烷磺酸(HEPES)	色谱级产品, 美国 Sigma 公司
3-[(3-胆酰氨基丙基) 二 甲氨基] - 1 - 丙磺酸盐 (CHAPS)	色谱级产品, 美国 Sigma 公司
能量吸收分子-芥子酸 (sinapinic acid, SPA)	色谱级产品, 美国 Sigma 公司
HPLC 水	色谱级产品, 美国 Sigma 公司
尿素(urea)	色谱级产品, 美国 Sigma 公司
醋酸钠 (NaAC)	色谱级产品, 美国 Sigma 公司
盐酸 (HCL)	色谱级产品, 美国 Sigma 公司
乙氰 (CAN)	色谱级产品, 美国 Sigma 公司
溴酚蓝	色谱级产品, 美国 Sigma 公司
胰蛋白酶	美国 promega
N, N' -甲叉双丙丙烯酰胺	美国 Amresco 批号: 0172

十二烷基硫酸钠(SDS)	美国 Amresco 批号: 0227
三羟基甲基氨基甲烷 (Tris)	北京 Solarbio 批号: T8060
Tricine	北京 Solarbio 批号: T8190
考马斯亮蓝 R250	美国 Amresco 批号: 0615
甲醇	色谱级产品, 美国 Fisher Scientific 公司
过硫酸铵	Sigma 批号: A6761
四乙基乙二胺 (TEMED)	美国 Amresco 批号: 0761
冰乙酸	成都市科龙化工试剂厂 批号: 20110722
无水乙醇	成都市科龙化工试剂厂, 批号 AR20100119
蒸馏水, 去离子水	自制

1.2 主要仪器

冷冻高速离心机	型号: Eppendorf 5810R 德国 Eppendorf Cetrifuge 公司
蛋白质浓度测定仪	Narodrop 2000(ND-2000)
紫外 spectrophotometer	Thermo scientific 公司
冷冻真空干燥机	LGJ-18, 北京松源华兴科技发展有限公司
Ultra Micro Spin Column (C18 柱)	郑州英诺高科有限公司
蛋白质芯片	CM-10 型弱阳离子交换芯片 美国 Cuphergen 公司
蛋白芯片阅读机	Protein Chip Biology System(PBS II C)型, 美国 Cuphergen 公司
质谱仪	5800 MALDI-TOF-MS/MS ABSCIX 公司

2 方法

2.1 大鼠肾组织标本的选择

选择“第一部分”实验中正常对照组、顺铂模型组，以及 PNS 中剂量组（PNS 治疗组）大鼠的肾脏组织作为差异表达蛋白质的筛选和鉴定的标本。

2.2 所用制剂的配制

2.2.1 组织裂解液的配制：100 ml（9.5 M Urea，2% W/V CHAPS，1% W/V DTT）

（1）先量 60ml HPLC H₂₀，倒入烧杯中；

（2）称取 57.06g Urea(MW 60.06, 终浓度为 9.5M), 加入盛有 60ml HPLC H₂₀ 的烧杯中，用玻棒搅拌使之充分溶解。（注意：加温不能超过 37℃，如果难溶，可添加少量 HPLC H₂₀）

（3）在上述溶液中，加入 2.00g CHAPS 和 1.00g DTT，并搅拌使之充分溶解后，再用 HPLC H₂₀ 定容至 100 ml；

（4）分装：将配好的溶液分装入 10ml 离心管中，每管 10ml，然后用封口膜密封，放 -80℃ 保存。（目的是防反复冻融）

2.2.2 CM10 buffer 即结合缓冲液的配制(200ml, pH4.0, 100mM NaAC)：

称取无水 NaAC(MW 为 82.03, 最终浓度为 100mM) 1.64g, 溶于 180ml HPLC H₂₀ 中；用 HCL 将 pH 调至 4.0；用 HPLC H₂₀ 定容至 200ml 后，置 4℃ 保存。

2.2.3 SPA 饱和溶液的配制方法

（1）1%TFA 溶液的配制：于 990 μl HPLC H₂₀ 中加入 10 μl TFA，混合后封口，避光、4℃ 保存，使用周期 ≤ 3 天。

（2）分装 CAN：取 1ml ACN 分装为 10 管，每管 100 μl，锡纸包严后，于 4℃ 保存。使用周期 ≤ 1 周。

(3) 配制 SPA 溶液: 使用 SPA 溶液前, 先取 $80 \mu\text{l}$ 1%TFA 溶液和 $80 \mu\text{l}$ 1 ACN, 同时加到 SPA 分装管中; 于涡旋混合器上充分混匀(约 3 分钟)后, 静置 5min, 以 10000rpm 离心 5 分钟, 取上清液使用。

2.3 肾脏组织裂解

(1) 将肾脏组织从 -80°C 冰箱中取出, 置于冰盒中解冻, 用生理盐水冲洗后, 用滤纸吸去多余的液体, 称量重量并记录;

(2) 在陶瓷研钵中倒入少量液氮, 将肾脏组织放入有液氮的研钵内, 用陶瓷杵研磨。

(3) 当所有的液氮都挥发后, 按 100mg 组织大约需要 1ml 的裂解液, 加入裂解液彻底裂解组织后, 将组织转入 1.5ml 离心管中。

(4) 将装有组织标本的离心管置于冰盒中, 待处理完所有的标本以后, 统一将离心管置于冷冻离心机中, 4°C , 12000rpm/min 离心 1 个小时。

(5) 吸取上清用 Narodrop 2000 (ND-2000) 仪进行蛋白质定量, 调整蛋白浓度至 $60\sim 80 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, 分装成 $50 \mu\text{l}/\text{管}$, 保存于 -80°C 冰箱备用。

2.4 肾脏组织差异表达蛋白的检测

采用表面增强基质辅助激光解析离子化-飞行时间质谱 (surface enhanced laser desorption / ionization-time of flight-mass spectrometry, SELDI-TOF-MS) 法, 对以上各组标本进行差异表达蛋白质谱检测。

2.4.1 CM-10型蛋白芯片的处理和上样

(1) 小心取出CM-10型芯片, 在芯片的背面标记上时间和芯片种类。

(2) 将CM10芯片装入芯片处理器 (Bioprocessor), 每孔芯池中加人 $200 \mu\text{l}$ 的结合缓冲液 (使弱阳离子与芯池活性表面螯合), 置振荡器 (200转 / 分) 振荡 5min, 甩掉缓冲液; 重复一次。

(3) 标本上样前的处理: 将标本从 -80°C 冰箱中取出, 置冰盒上融解, 以 10,000rpm, 4°C 离心 5 分钟。然后取 $50 \mu\text{l}$ 上清, 加入 $80 \mu\text{l}$ CM10 buffer, 立刻充分混合, 再以 10 000rpm, 4°C 离心 5 分钟后即可上样。

(4) 每芯池中加入处理好的标本 $100\ \mu\text{l}$ ，置振荡器（400转/分）， 4°C 振荡1 h，弃去多余的液体。

(5) 于每芯池加入 $200\ \mu\text{l}$ 结合缓冲液，置振荡器（200转/分）振荡 5 min 后，甩掉缓冲液；重复一次。

(6) 于每芯池加入 1mM HEPE $200\ \mu\text{l}$ ，洗脱掉未与芯池表面结合的蛋白质或肽段。

(7) 立刻取出芯片，风干后每芯孔加SPA $0.5\ \mu\text{l}$ ，风干后每孔再次加SPA $0.5\ \mu\text{l}$ 。干后即可用蛋白芯片阅读机（PBS II C型）进行蛋白质谱检测分析。

2.4.2 肾组织差异表达蛋白质的检测方法

用标准芯片校正质谱仪，仪器参数的设定为：最高分子量为 50 000 道尔顿，优化范围 2 000~20 000 道尔顿；激光强度为 190，检测敏感度为 8，每个样本取 130 个点的平均值。将处理好的芯片置于 SELDI-TOF 质谱阅读器中，进行数据采集和结果分析；使用 Ciphergen Protein Chip 3.2 软件自动采集数据，并快速准确绘制出蛋白质的质谱图，其中纵坐标为蛋白峰强度，横坐标为蛋白质的质荷比。信号噪声(signal-to-noise ratio, S/N)大于 5 为有效波峰。经统计学分析， $P < 0.05$ 的蛋白峰定义为差异蛋白峰。

2.4.3 统计学处理方法

蛋白质的质荷比以 m/z 值表示，采用软件Biomarker Wizard对 m/z 相同的蛋白在各组之间峰值差异含量进行快速计算。使用 P 值表示其差异程度， $P < 0.05$ 者为差异有统计学意义。

2.5 差异表达蛋白质的分离纯化

从 CM10 芯片检测到的差异表达蛋白质中，筛选鉴定候选蛋白质，入选标准为：① P 值 < 0.05 ，而且尽可能小。② Mean 值大于 SD 值。③ Mean 值大，而且 Mean 值之比大于 2。

采用 Tricine-SDS-PAGE 分离纯化差异表达蛋白质。

2.5.1 凝胶贮存液的配制

(1)、A 贮液，即 49.5%T，3.0%C 丙烯酰胺的贮存液（T 代表丙烯酰胺的总浓度，C 代表交联度）：

称取 48.00g 丙烯酰胺和 1.50g N, N' -甲叉双丙丙烯酰胺溶于 100 ml 的 dd H₂O，溶液充分混匀后经滤纸过滤，备用。

(2)、B 贮液，即 49.5%T，6.0%C 丙烯酰胺的贮存液（T 代表丙烯酰胺的总浓度，C 代表交联度）：

称取 46.50g 丙烯酰胺和 3.00g N, N' -甲叉双丙丙烯酰胺，溶于 100 ml 的 dd H₂O，溶液充分混匀后经 Whatman 滤纸过滤。

(3)、凝胶缓冲液的配制（3.0M Tris，0.03g/L SDS，PH 8.45）：

称取 36.342 g Tris，0.30 g SDS 溶入 80ml dd H₂O 中，用 HCl 调 pH 值至 8.45，再用 dd H₂O 定容至 100 ml。

2.5.2 电泳缓冲液的配制

(1)、阳极缓冲液的配制（0.2 M Tris，pH 8.9）：

称取 12.114 g Tris，溶于 400 ml 的 dd H₂O 中，用 HCl 将 pH 值调至 8.9，再用 dd H₂O 定容至 500 ml。

(2)、阴极缓冲液的配制（10×缓冲液：0.1 M Tricine，0.1 M Tris，1.0 g/L SDS，pH 8.25）：

称取 8.96 g Tricine，6.057 g Tris，0.50 g SDS，溶于 450 ml dd H₂O 中，用 HCl 调 pH 值至 8.25，再用 dd H₂O 定容至 500 ml。

(3)、标本上样缓冲液的配制：（0.25mol/L Tris·HCl pH6.8，10%SDS，0.5mol/L 二硫叔糖醇，50%甘油，0.5%溴酚蓝）

依次加入以下试剂：0.5 mol/L Tris·HCl（pH6.8）2.5ml，二硫叔糖醇 0.39g（DTT，MW154.5），SDS 0.50g，溴酚蓝 0.025，甘油 2.5ml。混匀后分装。

2.5.3 染色液、脱色液的配制

(1)、0.25%考马斯亮蓝 R250 染色液的配制：

称取 0.25 g 的考马斯亮蓝 R250, 并量取 10 ml 乙酸, 45 ml 乙醇, 再加入 dd H₂O, 充分溶解后定容至 100 ml。

(2)、脱色液的配制:

量取 40 ml 乙醇, 4 ml 乙酸, 加入 dd H₂O 定容至 100 ml。

2.5.4 按表 2-1 配制 Tricine-SDS-PAGE 凝胶

表 2-1 尿素 Tricine 胶的构成

Tab.2-1 the formation of urea Tricine gel

凝胶构成	分离胶	中间胶	浓缩胶
A 贮液 (μl)	—	300	150
B 贮液 (μl)	825	—	—
凝胶缓冲液 (μl)	825	500	465
ddH ₂ O (μl)	900	700	635
10%过硫酸铵 (μl)	11	10	12.5
TEMED (μl)	1.1	1	1.2
灌胶高度 (cm)	4	2	2
尿素 (g)	0.9	—	—
ddH ₂ O (μl)	800	700	635

注: A 贮液为 49.5%T, 3%C 丙烯酰胺贮存液, B 贮液为 49.5%T, 6%C 丙烯酰胺贮存液

2.5.5 标本的处理

将肾组织裂解标本从-80℃冰箱中取出, 置冰盒上融解, 以 10000rpm, 4℃离心 3min。取 7.5 μl 上清液加入 2.5 μl 标本上样缓冲液, 混合后再以 10000rpm, 4℃离心 1min, 然后置于沸水中煮 8min, 冷却后 10000rpm 离心 2min, 即可上样电泳。

2.5.6 电泳分离蛋白

电泳时采用 2X 阴极缓冲液, 电压为 75 伏。具体操作步骤如下:

- (1)、将电泳槽前面(有字面)面对操作者放在操作台上。
- (2)、用双蒸水冲洗干净 Tricine-SDS-PAGE 凝胶。
- (3)、在电泳胶架的一面放一块 Tricine-SDS-PAGE 凝胶, 另一面放缓冲

液挡板。

(4)、将胶架按照上面的阴、阳极标记正确放入电泳槽内（符号“+”为阳极，“-”为阴极）。

(5)、将凝胶上的梳子轻轻拔出，用 2X 的电泳缓冲液冲洗上样孔 3 次。

(6)、灌入电泳缓冲液后，用微量进样器取处理好的标本 $10\ \mu\text{l}$ ，小心加到上样孔中，并取 $7\ \mu\text{l}$ Mark 加到上样孔。

(7)、接上电源开始电泳。

2.5.7 电泳凝胶的染色与脱色

(1)染色：用双蒸水将电泳后的 Tricine-SDS-PAGE 凝胶冲洗干净，加入染色液 50ml，在振荡器中振荡染色 4h~6h。

(2)脱色：将染色液倒掉，用双蒸水冲洗凝胶 3~5 次后，加入脱色液 50ml，在振荡器中振荡脱色 2h~4h。

2.6 蛋白质胶内酶解

2.6.1 切胶

用双蒸水冲洗脱色后的凝胶 3~5 次后，将目标蛋白质从相应的凝胶条带上切下。具体步骤如下：

- (1) 用剪刀剪断 Tip（进口 Tip），把目标蛋白质从相应的条带上切下凝胶，置于 1.5 ml 进口的 EP 管内，每管加 400 μL Milli-Q 水，振荡洗涤 2min，吸出液体后重复 1 次，以保证酸液被洗干净。
- (2) 取 400 μL 100mM NH_4HCO_3 /30% CAN 溶液加到 EP 管中，静置 2min 左右，待胶粒的蓝色褪却时，加入 Milli-Q 水 400 μL ，以终止反应。析出液体后，重新加入 400 μL Milli-Q 水清洗凝胶至透明，吸出多余的液体。
- (3) 每管加入 10 μL 100mM DTT、90 μL 100mM NH_4HCO_3 后，56 $^\circ\text{C}$ 孵化 30min，以还原蛋白质。
- (4) 去掉上清后，每管加入 100 μL 100%ACN 溶液，5min 后吸去。
- (5) 每管加入 100mM NH_4HCO_3 溶液 70 μL ，30 μL 200mM IAA（现配，避光保

存), 于暗处 20 min。

- (6) 吸去上清, 每管加入 100mM NH_4HCO_3 溶液 100 μl , 室温下 15min 后去掉上清, 加入 100 μl 100%ACN, 5 分钟后吸去。将装有胶粒的离心管开盖置于真空浓缩仪中干燥处理 10 min。

2.6.2 酶解凝胶中的蛋白质

具体步骤如下:

- (1) 根据离心管中胶粒的多少, 加入合适体积的胰蛋白酶工作液(浓度 10ng/ μL), 以完全盖住胶粒为准。冰浴 45 min, 使胶粒充分吸收酶解液后, 吸出打掉剩余液体。
- (2) 加入 30 μL 50mM NH_4HCO_3 缓冲液(无 Trypsin, pH 8.03), 缓冲液体积没过胶块约 20 μl 。
- (3) 将离心管倒置, 放在 37 $^\circ\text{C}$ 烘箱中孵育过夜 (12~16 h)。
- (4) 吸出酶解液体至新 EP 管中, 原管加入 100 μl 60% ACN /0.1%TFA 液体, 振荡洗涤 15 min 后吸出溶液, 将其并入前次溶液中。这样反复抽提 3 次, 合并提取的溶液。
- (5) 将上述多次合并的液体于离心机内离心 (10000rpm/min, 5 min), 吸出上层溶液并转移至新的 EP 管内。注意不要吸取到底部, 因为可能存在有微小胶粒沉淀。
- (6) 将装有抽提液的离心管开口置于真空干燥机内, 浓缩抽干(约需 3h)后, 置于 -20 $^\circ\text{C}$ 冻存, 以备下一步的差异表达蛋白质的质谱鉴定时使用。

2.7 差异表达蛋白质的质谱鉴定

2.7.1 上样标本脱盐

使用 Ultra Micro Spin Column (C18 柱) 进行脱盐处理, 具体步骤如下:

(1) 先配制以下三种溶液:

- ① 配制 0.1%TFA (三氟乙酸) 15ml;
- ② 100% CAN (乙腈);
- ③ 70%ACN 0.1%TFA 8ml。

(2) 将 spin column 放入 2ml 的离心管内。

(3) 平衡柱子:

吸 200 μ l 100% ACN 到柱子内, 静置 0.5 min, 以 200g 的离心力 (相当于 eppendorf 5424 型离心机的 1500 rpm/min) 离心 1min, 去掉收集管中的液体。这个步骤共重复 3 次。

吸 200 μ l 0.1%TFA 到柱子内, 静置 0.5 min, 以 200g 的离心力 (约 1500 rpm/min) 离心 1min, 去掉收集管中的液体。此步骤共重复 3 次。

(4) 标本的处理:

将标本自-20 $^{\circ}$ C 冰箱中取出, 用 20 μ l 的 0.1%TFA 液体复融, 然后将标本加到柱子内, 静置 0.5 min, 以 200g 的离心力离心 1 min。(这时多肽、蛋白和变性剂将被保留, 同时盐离子和极性物质如 DNA 将被洗脱到收集管中)。将收集管中的液体吸到柱子内, 再以 200g 的离心力离心 1min 后, 去掉收集管中的液体。

吸 200 μ l 0.1%TFA 液体到柱子内, 静置 0.5 min, 以 200g 的离心力离心 1 min, 丢掉收集管中的液体。此步骤共重复 5 次。

(5) 标本的回收:

取 70%ACN 0.1%TFA 溶液 200 μ l 到柱子内, 然后将柱子放入一个新的 2ml 离心管, 以 200g 的离心力离心 1 min。将离心管中的洗脱下来的标本收集到新的离心管中。共重复操作 3 次后, 合并每次洗脱下来的标本。

(6) 将回收的标本置于冷冻真空干燥器中, 干燥后放-20 $^{\circ}$ C 冰箱。

2.7.2 通过质谱鉴定目标蛋白质:

将回收的标本自冰箱取出, 用 0.1%TFA 溶液 10 μ l 溶解。每个标本以及校正标准品各取 1 μ l, 分别点在 384 靶盘上, 风干后, 每个标本点再加上 1 μ l 的基质, 干后可上质谱检测。

采用 MALDI-TOF-MS/MS 获取蛋白质的肽图谱, 然后通过 Mascot 软件查询 NCBI、SWISS-PROT 数据库进行搜索比对。

3. 结果

3.1 顺铂模型组与正常对照组之间的差异表达蛋白质

从 CM10 芯片上捕获的顺铂模型组与正常对照组大鼠的肾组织蛋白质质谱峰共 95 个；经 Biomark Wizard 软件分析后发现，两组间存在差异表达的蛋白峰 20 个 ($P < 0.05$)，其中 7 个蛋白质在顺铂模型组中表达下调，且均比正常组下调 2 倍以上；而其余的 13 个蛋白质在顺铂模型组中表达上调，比正常组上调大于 2 倍小于 5 倍的蛋白质有 4 个，5 个蛋白质上调 5 倍以上。m/z 18695.15 的蛋白质 P 值最小，蛋白质 m/z 16021.67 在顺铂模型组中表达量最大，其次是 m/z 1234.96 蛋白质，而蛋白质 m/z 12151.56 在正常对照组中表达量最大。详见表 2-2。图 2-1 为顺铂模型组与正常对照组之间的差异表达蛋白质质谱图。

3.2 顺铂模型组与 PNS 治疗组之间存在表达差异的蛋白质

从 CM10 芯片上捕获的顺铂模型组与 PNS 治疗组大鼠的肾组织蛋白质质谱峰共 95 个；采用 Biomark Wizard 软件对两组中 m/z 相同的蛋白质强度值进行 t 检验，发现两组间存在差异表达的蛋白峰 18 个 ($P < 0.05$)，其中 11 个蛋白质在 PNS 治疗组中表达下调，而其余的 7 个蛋白质在 PNS 治疗组中表达上调。在 PNS 治疗组比顺铂模型组上调大于 2 倍小于 5 倍的蛋白质有 5 个，上调 5 倍以上的蛋白质有 1 个；有 8 个蛋白质在 PNS 治疗组比顺铂模型组下调大于 2 倍小于 5 倍，2 个蛋白质下调 5 倍以上；m/z 1245.95 的蛋白质 P 值最小，其次是 m/z 分别为 1402.78、5653.62 的蛋白质。蛋白质 m/z 3763.05 在 PNS 治疗组中表达量最大。详见表 2-3。图 2-2 为顺铂模型组与 PNS 治疗组之间的差异表达蛋白质质谱图。

3.3 正常对照组与 PNS 治疗组之间未检出差异表达蛋白质

从 CM10 芯片上捕获的正常对照组与 PNS 治疗组大鼠的肾组织蛋白质质谱峰, 经软件 Biomark Wizard 分析后, 未发现两组间存在差异表达的蛋白质。

3.4 顺铂模型组分别与正常对照组、PNS 治疗组之间共同存在的差异表达蛋白质

如表 2-4 所示, 这 6 个蛋白质在顺铂模型组与正常对照组、顺铂模型组与 PNS 治疗组之间表达均有差异。其中前 4 个在顺铂模型组表达较正常对照组上调, 而在 PNS 治疗组的表达较顺铂模型组下调; 后 2 个蛋白质在顺铂模型组较正常对照组下调, 在 PNS 治疗组的表达较顺铂模型组上调。

3.5 差异表达蛋白质的鉴定结果

3.5.1 Tricine-SDS-PAGE 凝胶电泳结果

本实验从表 2-2、表 2-3 中选择 m/z 分别为 7998.084、10815.42、12256.24、16489.31 的差异表达蛋白质作为目标蛋白质进行分离鉴定。

首先从质谱图中查找这些目标蛋白质的质谱峰, 以质谱峰最高的标本作为分离鉴定的标本。

标本经 Tricine-SDS-PAGE 凝胶电泳分离后, 可取得清晰的蛋白质条带。见图 2-3。以 mark 的电泳结果作对照, 从凝胶上切下目标蛋白质相对应的条带, 经酶解后点板, 最后通过质谱鉴定。

3.5.2 目标蛋白质鉴定的结果

(1) 除了蛋白质 m/z 10815.42 和 m/z 16021.67 以外, 其他几个目标蛋白质的匹配得分均在 50 分以下, 未达到可信的分值。

(2) m/z 10815.42 目标蛋白质经 MALDI-TOF-MS/MS 检测后, 在蛋白质数据库中搜索比对, 发现与线粒体热休克蛋白匹配上 8 个肽段, 得分为 96 分 (见表 2-5、图 2-4)。

(3) m/z 16021.67 目标蛋白质经 MALDI-TOF-MS/MS 检测后, 在蛋白

质数据库中搜索比对, 发现与血红蛋白 β 1 亚基和血红蛋白 β 2 亚基分别匹配上 13、10 个肽段, 得分分别为 256 分、97 分。详见表 2-6、2-7, 图 2-5。

表 2-2 正常对照组与顺铂模型组大鼠肾组织差异表达蛋白质 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.2-2 the differentially expressed proteins of renal tissue in normal control group and cisplatin model

group ($\bar{x} \pm s$)

m/z	p	正常对照组	顺铂模型组	expression of Biomarkers
1021.26	0.036714	0.64±1.14	3.23±2.45	↑
1088.62	0.018771	0.01±0.69	2.05±1.79	↑
1227.54	0.018771	1.75±1.09	6.50±4.27	↑
1234.96	0.036714	2.57±1.78	20.01±15.08	↑
1365.93	0.006112	-0.10±0.90	2.15±1.34	↑
1402.78	0.036714	0.86±1.73	4.32±2.17	↑
7998.08	0.026453	2.69±1.62	6.47±2.74	↑
9688.70	0.026453	3.17±3.48	0.70±0.75	↓
12151.56	0.036714	43.16±28.70	14.43±21.00	↓
12256.24	0.026453	8.44±4.03	2.74±4.05	↓
12356.94	0.018771	11.64±6.42	3.51±4.74	↓
12453.41	0.018771	3.52±1.77	0.90±1.36	↓
13096.76	0.036714	0.88±0.59	0.20±0.35	↓
16021.67	0.036714	14.59±9.90	23.31±8.25	↑
16252.45	0.036714	6.56±4.29	11.28±4.037	↑
16489.31	0.026453	3.76±2.57	7.61±2.82	↑
16683.03	0.036714	3.63±2.49	6.52±2.50	↑
16951.44	0.026453	2.14±1.58	3.80±1.57	↑
18695.15	0.004075	0.28±0.05	0.07±0.09	↓
23879.25	0.026453	0.12±0.07	0.46±0.25	↑

表 2-3 顺铂模型组与 PNS 治疗组大鼠肾组织差异表达蛋白质 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.2-3 the differentially expressed proteins of renal tissue in cisplatin model group and PNS treatment

group ($\bar{x} \pm s$)				
m/z	p	顺铂模型组	PNS 治疗组	expression of Biomarkers
1064.09	0.033311	4.25±3.88	0.87±1.11	↓
1088.62	0.009847	2.05±1.79	-0.12±1.17	↓
1143.63	0.012753	2.14±1.71	0.20±1.16	↓
1227.54	0.020919	6.50±4.27	1.84±1.39	↓
1234.97	0.020919	20.01±15.08	4.53±3.38	↓
1245.95	0.004333	4.81±2.35	1.58±1.49	↓
1271.42	0.007546	3.13±2.04	0.72±0.57	↓
1391.52	0.026495	3.13±1.99	1.22±0.81	↓
1402.78	0.00574	4.32±2.17	1.71±1.08	↓
1428.98	0.041575	3.99±2.61	1.99±0.89	↓
3763.05	0.041575	3.42±8.75	21.07±21.85	↑
5653.62	0.00574	0.72±0.65	2.21±1.38	↑
10773.33	0.041575	1.03±0.31	1.84±1.03	↑
10815.42	0.026495	1.34±0.46	3.24±2.16	↑
12256.24	0.041575	2.74±4.05	7.30±6.48	↑
18695.15	0.016394	0.07±0.09	0.22±0.13	↑
21525.65	0.033311	0.25±0.09	0.15±0.11	↓
26996.44	0.026495	0.47±0.37	0.98±0.64	↑

表 2-4 各组大鼠肾组织中共同存在的差异表达蛋白质 ($\bar{x} \pm s$)Tab.2-4 common differentially expressed proteins of renal tissue in each group ($\bar{x} \pm s$)

m/z	正常对照组	Mean-顺铂	PNS 治疗组
1088.62	0.01±0.69	2.05±1.79	-0.12±1.17
1227.54	1.75±1.09	6.50±4.27	1.84±1.39
1234.96	2.57±1.78	20.01±15.08	4.53±3.38
1402.78	0.86±1.73	4.32±2.17	1.71±1.08
12256.24	8.44±4.03	2.74±4.05	7.30±6.48
18695.15	0.28±0.05	0.07±0.09	0.22±0.13

表 2-5 与线粒体热休克蛋白匹配上的 8 个肽段

Tab.2-5 8 peptides which match with mitochondrial heat shock protein

NO.	Accession	Score	Protein names				
1	<u>P26772</u>	96	heat shock protein, mitochondrial				
Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Start	End	Miss Ions	Peptide
860.6098	859.6025	859.4473	0.1552	29	36	0	--- K.GGIMLPEK.S + Oxidation (M)
907.6849	906.6776	906.4963	0.1813	9	15	0	5 K.FLPLFDR.V
907.6849	906.6776	906.4963	0.1813	9	15	0	--- K.FLPLFDR.V
1035.7985	1034.7912	1034.5913	0.1999	8	15	1	4 R.KFLPLFDR.V
1035.7985	1034.7912	1034.5913	0.1999	8	15	1	--- R.KFLPLFDR.V
1402.9392	1401.9319	1401.7827	0.1492	16	28	1	--- R.VLVERSAAETVTK.G
1530.0907	1529.0834	1528.7926	0.2908	81	92	1	--- K.VVLDDKDYFLFR.D
1530.0907	1529.0834	1528.7926	0.2908	81	92	1	65 K.VVLDDKDYFLFR.D

表 2-6 与血红蛋白 $\beta 1$ 亚基匹配上的 13 个肽段

Tab.2-6 13 peptides which match with Hemoglobin subunit beta-1

Accession		Score	Protein names				
<u>P02091</u>		256	Hemoglobin subunit beta-1				
Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Start	End	Miss Ions	Peptide
1090.8014	1089.7941	1089.5818	0.2123	68	77	0	--- K.VINAFNDGLK.H
1126.7814	1125.7741	1125.5567	0.2174	97	105	0	--- K.LHVDPENFR.L
1218.9176	1217.9103	1217.6768	0.2335	67	77	1	--- K.KVINAFNDGLK.H
1274.9630	1273.9557	1273.7183	0.2374	32	41	0	--- R.LLVVYPWTQR.Y
1274.9630	1273.9557	1273.7183	0.2374	32	41	0	46 R.LLVVYPWTQR.Y
1298.8834	1297.8761	1297.6263	0.2499	19	31	0	--- K.VNPDDVGGEALGR.L
1298.8834	1297.8761	1297.6263	0.2499	19	31	0	41 K.VNPDDVGGEALGR.L
1397.9153	1396.9080	1396.6445	0.2635	122	133	0	--- K.EFTPCAQAAFQK.V
1714.3420	1713.3347	1713.0124	0.3224	106	121	0	--- R.LLGNMIVIVLGHHLGK. E
1730.3340	1729.3267	1729.0073	0.3194	106	121	0	--- R.LLGNMIVIVLGHHLGK. E + Oxidation (M)
2007.3062	2006.2989	2005.9091	0.3898	42	60	0	--- R.YFDSFGDLSSASAIMGN PK.V
2023.3076	2022.3003	2021.9041	0.3963	42	60	0	--- R.YFDSFGDLSSASAIMGN PK.V + Oxidation (M)
2023.3076	2022.3003	2021.9041	0.3963	42	60	0	117 R.YFDSFGDLSSASAIMGN PK.V + Oxidation (M)

表 2-7 与血红蛋白 $\beta 2$ 亚基匹配上的 10 个肽段

Tab.2-7 10 peptides which match with Hemoglobin subunit beta-2

Accession	Score		Protein names						
<u>P11517</u>	97		Hemoglobin subunit beta-2						
Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Ions	Peptide	
1090.8014	1089.7941	1089.5818	0.2123	68	77	0	---	K.VINAFNDGLK.H	
1126.7814	1125.7741	1125.5567	0.2174	97	105	0	---	K.LHVDPENFR.L	
1218.9176	1217.9103	1217.6768	0.2335	67	77	1	---	K.KVINAFNDGLK.H	
1274.9630	1273.9557	1273.7183	0.2374	32	41	0	---	R.LLVVYPWTQR.Y	
1274.9630	1273.9557	1273.7183	0.2374	32	41	0	46	R.LLVVYPWTQR.Y	
1397.9153	1396.9080	1396.6445	0.2635	122	133	0	---	K.EFTPCAQAAFQK.V	
1714.3420	1713.3347	1713.0124	0.3224	106	121	0	---	R.LLGNMIVIVLGHHLGK.E	
1722.2030	1721.1957	1720.8454	0.3503	46	62	0	---	K.FGDLSSASAIMGNPQVK.A	
1730.3340	1729.3267	1729.0073	0.3194	106	121	0	---	R.LLGNMIVIVLGHHLGK.E + Oxidation (M)	
1959.2924	1958.2851	1957.9931	0.2920	1	18	1	---	-.MVHLTDAEKATVSGLWGK.V + Oxidation (M)	

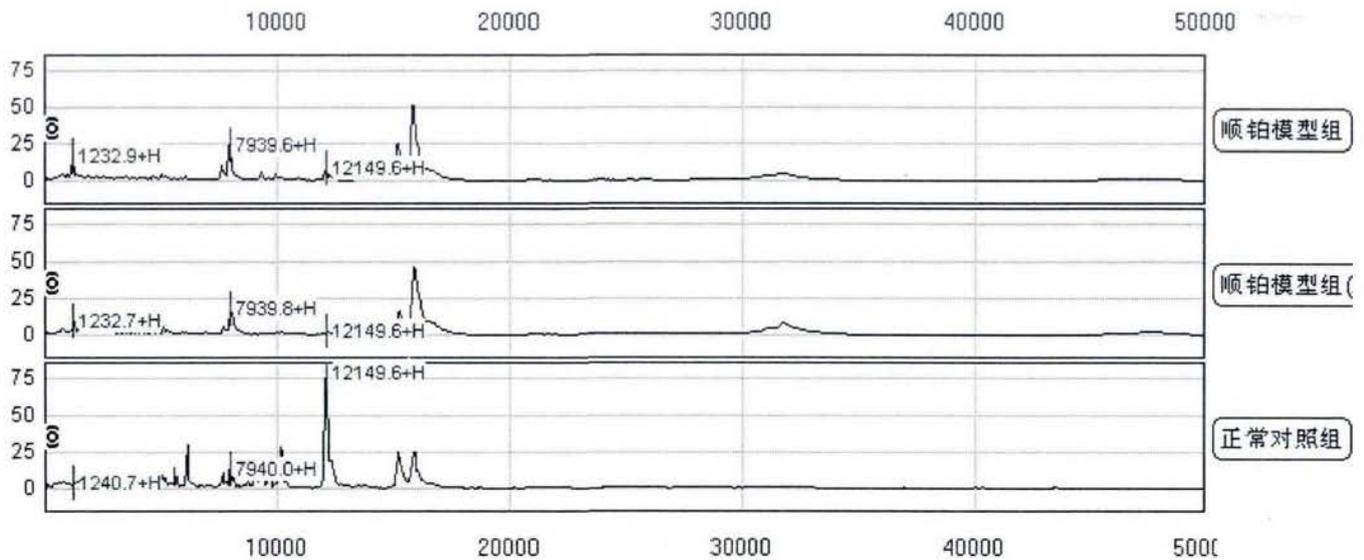


图 2-1 CM10 蛋白芯片筛选的顺铂模型组与正常对照组肾组织的部分差异表达蛋白质的质谱图
注：纵坐标为蛋白质峰强度，横坐标为蛋白质荷质比。

Figure2-1. The Mass Spectrum of some differentially expressed proteins in cisplatin model group and normal control group selected by CM10 protein chip

Horizontal coordinate is m/z of protein, Vertical coordinate is Peak intensity.

(注：表 2-2 中的结果显示， m/z 为 1234.96 的蛋白质分子可能是区分顺铂模型组和正常对照组的候选差异蛋白。由于 SELDI-TOF-MS 激发得到的蛋白分子带单电荷，则蛋白质 m/z 值与分子量 M 数值相符，例如可认为图 2-2 中 m/z 1232 的蛋白分子质量 M 为 1232 Da。此外，氨基酸的平均分子量约 110 Da，所以表 2-2、表 2-3 中的 m/z 1234.96 与图 2-1 中 m/z 1232、 m/z 1240 上下相差不超过 100 Da，即可认为是同一蛋白分子。图 2-1 和图 2-2 中标出的其它差异表达蛋白质与上述的情况相同。)

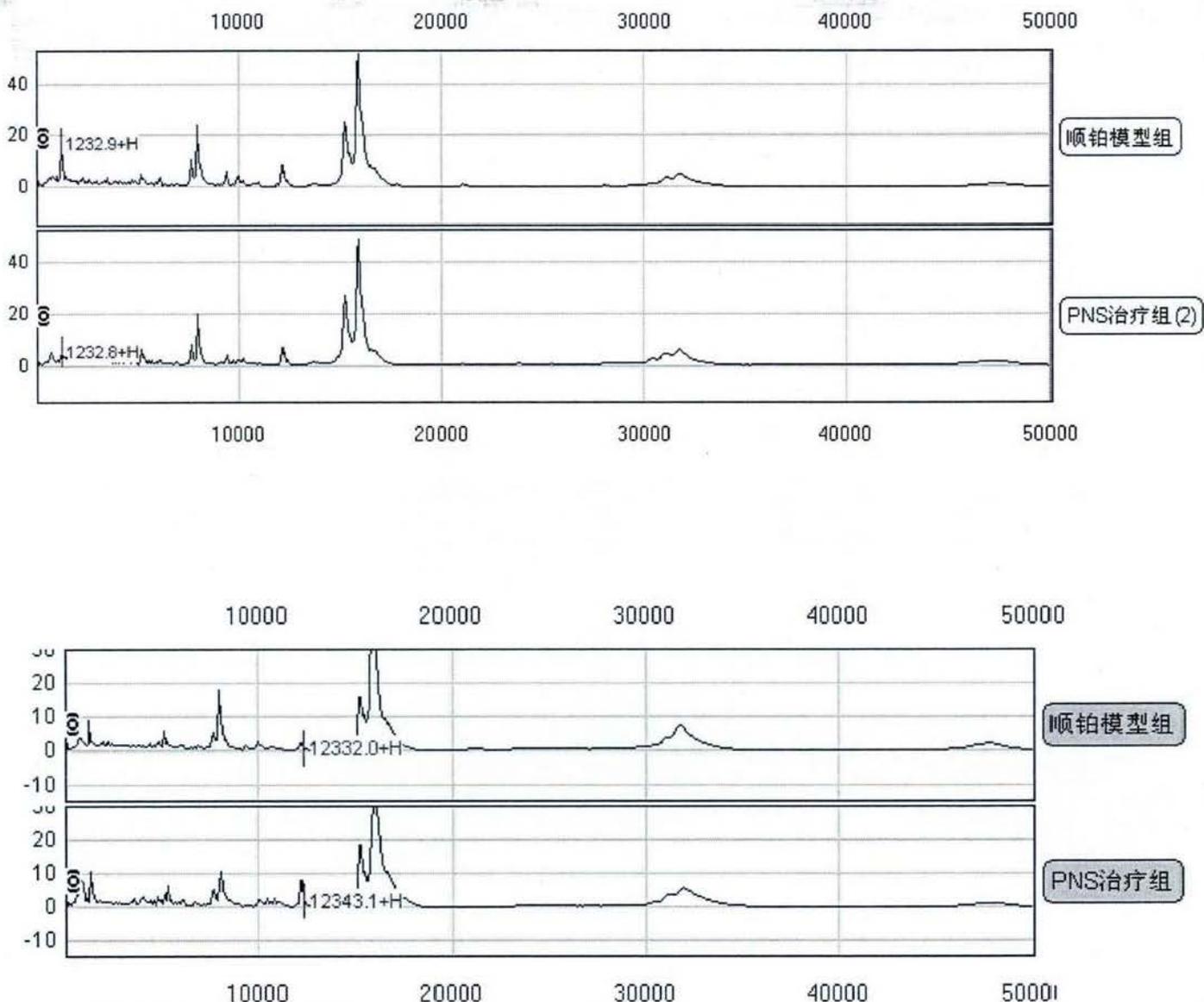


图 2-2 m/z12256.24、m/z 1234.963 在顺铂模型组和 PNS 治疗组的质谱图

注：纵坐标为蛋白质峰强度，横坐标为蛋白质荷质比。

Figure2-2. the mass spectrum of m/z12256.24、m/z 1234.96 in cisplatin model group and PNS treated group

Horizontal coordinate is m/z of protein,Vertical coordinate is Peak intensity.

标本编号: 1 1 2 3 3 mark 3 2 2 1

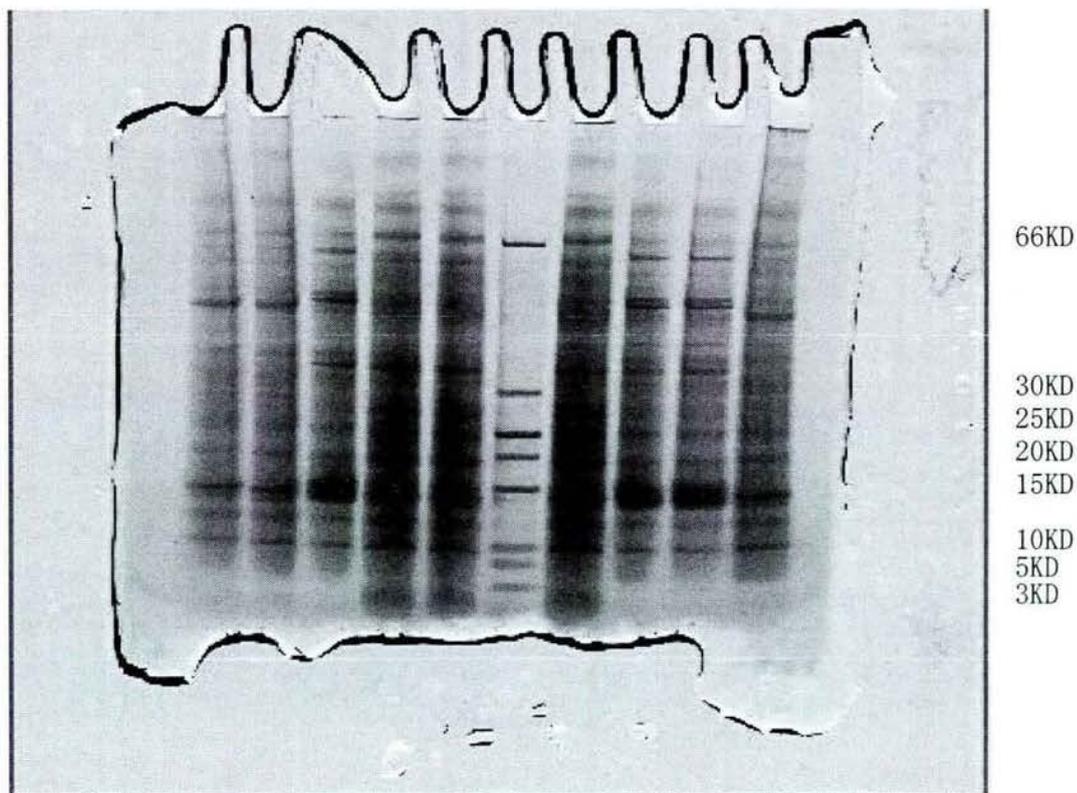


图 2-3 Tricine-SDS-PAGE 凝胶电泳结果

Figure.2-3 The result of Tricine-SDS-PAGE gel electrophoresis

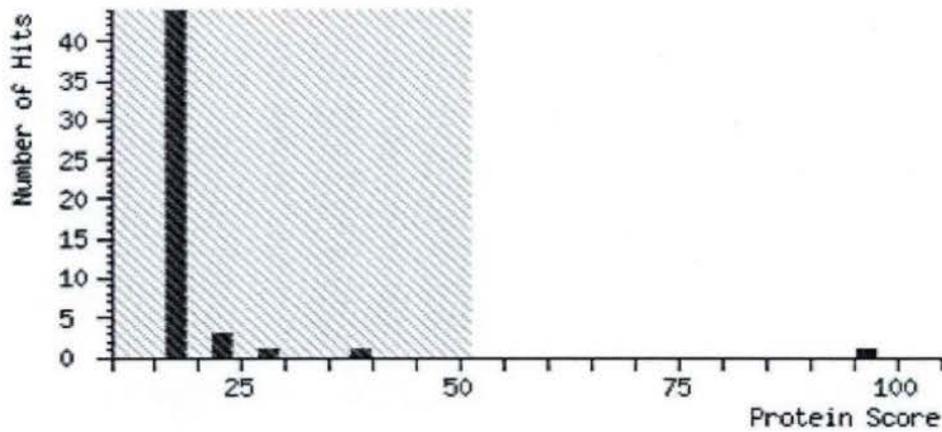


图 2-4 m/z 10815.42 目标蛋白质的质谱鉴定结果

横坐标为匹配分数, 纵坐标为蛋白质种数

Figure 2-4. The identification result of target protein m/z 10815.42 by mass spectrometry

Horizontal coordinate is protein score, Vertical coordinate is number of hits.

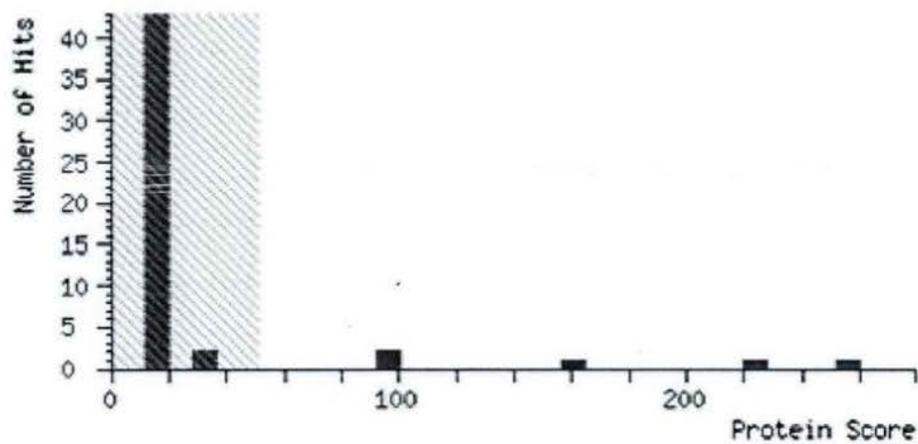


图 2-5 m/z 16021.67 目标蛋白质的质谱鉴定结果

横坐标为匹配分数, 纵坐标为蛋白质种数

Figure 2-5. The identification result of target protein m/z 16021.67 by mass spectrometry

Horizontal coordinate is protein score, Vertical coordinate is number of hits.

4. 讨论

4.1 肾组织差异表达蛋白质的筛选

蛋白质组学技术具有高灵敏度及特异性, 利于捕获疾病的发生、发展过程中存在的细微分子变化。差异蛋白质组学通过比较蛋白质在不同条件下的变化, 并对差异表达的蛋白质进行鉴定, 筛选出与疾病相关的蛋白质, 或者药物的靶标蛋白, 作为疾病的诊治、预后的标志物^[34]。SELDI-TOF-MS 属于敏感、高通量的差异蛋白质组学的研究方法, 由蛋白质芯片系统、质谱仪和分析软件构成, 可选择性地捕获标本中与其特异性结合的蛋白质, 为诊断、预防和治疗疾病提供重要线索^[35]。

顺铂肾损害的发生、发展是涉及多种机制^[3, 4]、多种信号途径的复杂过程, 伴随多种蛋白质的表达变化; PNS 含有多种有效的成分, 具有多种药理作用, 其对顺铂肾损害有保护作用, 可能涉及多个作用途径和多种机制; 这些变化可能体现在肾脏组织蛋白质的种类、数量或者性质等方面的改变。本实验采用 CM10 蛋白芯片结合 SELDI 技术, 对顺铂模型组、PNS 治疗组和正常对照组大鼠之间的肾组织差异表达蛋白进行筛选; 当 SELDI-TOF-MS 设置的激光强度为 190, 检测灵敏度 8 时, 可以良好的检测到 CM10 芯片捕获的蛋白质质谱峰, 蛋白质质谱峰主要集中在分子量 20000Da 以内; 筛选结果发现在顺铂模型组分别与 PNS 治疗组、正常对照组大鼠之间, CM10 芯片可捕获到多个差异表达蛋白质; 绝大多数蛋白质的分子量小于 20 000 Da, 这说明 SELDI-TOF-MS 技术对筛选低分子量蛋白质是有效、可行的。

4.2 肾脏组织差异表达的蛋白质

(1) 各组大鼠的肾脏组织中的差异表达蛋白质

从表 2-2 可知, 顺铂模型组与正常对照组大鼠之间存在的肾组织差异

表达蛋白质 20 个, 这些改变的蛋白质可能是顺铂损害肾脏的结果或者是导致肾脏损害的原因。PNS 治疗组与顺铂模型组大鼠之间存在 18 个肾组织差异表达蛋白质, 这些改变的蛋白质可能是 PNS 对顺铂损害肾脏的保护结果, 或者是通过改变这些蛋白质而发挥保护肾脏的作用。

PNS 治疗组与正常对照组大鼠之间未检测到差异表达蛋白质, 可能是两组之间的小分子量蛋白质的表达确实无显著性差异, 也可能是由于选择的蛋白芯片类型的影响, 或者在实验过程中蛋白质丢失等原因导致未能检测到差异表达的蛋白质。

(2) 共同存在的差异表达蛋白质

如表 2-4 所示, 在顺铂模型组与正常对照组、顺铂模型组与 PNS 治疗组之间有 6 个共同的差异表达蛋白质。这 6 个蛋白质在顺铂模型组的表达较正常对照组的上调或下调, 但在 PNS 治疗组均能回调到正常对照组的水平 (因为正常对照组与 PNS 治疗组之间未检测到差异表达的蛋白质), 提示: 顺铂可能通过改变这些蛋白质的表达而损害肾脏, PNS 则可能通过恢复这些蛋白质的表达而起到保护肾脏的作用; 或者由于顺铂对肾脏的损害而使蛋白质的表达发生改变, PNS 则可能对肾脏的保护作用而使这些蛋白质的表达接近正常。

(3) m/z 相近的差异表达蛋白质

在表 2-2 中, m/z 分别为 12151.56、12256.24、12356.94、12453.41 的蛋白质, 它们的 m/z 相差约 100Da, 推测其来源、性质等相似, 可能是同源蛋白, 它们或是前体与剪切后的, 或者是有突变的; 表 2-3 中也有类似的情况, 例如 m/z 分别为 1227.54、1234.96、1245.95、1271.42 等蛋白质的 m/z 很接近, 这种现象在本课题组的蛋白质差异表达研究中较常见。通过对这些蛋白质进行分离鉴定, 了解它们的性质与作用, 对于阐明顺铂肾损害和 PNS 保护作用的机制非常重要。

4.3 差异表达蛋白质的鉴定

4.3.1 热休克蛋白

在本部分的差异表达蛋白质分离鉴定的实验中, m/z 10815.42 目标蛋白质经过鉴定后, 发现与线粒体的热休克蛋白的匹配得分最高, 为96分。热休克蛋白 (heat shock protein, HSP) 也称为应激蛋白, 包括 HSP70家族、小分子 HSP 家族、HSP90 家族、HSP60 家族等等; 这类蛋白质在原核、真核生物细胞内广泛存在、高度保守。HSP在蛋白质的伸展、折叠和转运等方面起帮助作用, 并在形成或解聚寡聚体, 以及降解、修复受损蛋白质等方面发挥“分子伴侣”作用; HSP通过增强细胞对损害的耐受、细胞凋亡、协同免疫等, 从而维持细胞的正常生理功能。研究发现, HSP 在各种因素引起的肾损伤中发挥重要作用^[36、37], 包括肾缺血再灌注损伤、肾间质纤维化、糖尿病肾病等; 在药物或化学物质引起的肾脏损伤中, 肾脏HSP表达上升。利用免疫组化法观察HSP70在环孢素、庆大霉素诱导的急性肾损害大鼠肾组织的表达情况^[38、39], 发现HSP70在肾损害的早期表达显著升高, 认为可能与细胞启动了自我保护机制有关。但目前对于 HSP 的研究尚处在初期阶段, 而且主要的研究对象是 HSP70 家族的蛋白质, 对于小分子 HSP 的研究报道极少。本实验中鉴定出来的线粒体热休克蛋白质 (mHSP) 属于小分子蛋白质, 目前尚未见有关该蛋白质的研究报道。

不少研究表明, HSP与肾脏细胞线粒体功能密切相关^[40、41]。HSP 70可降低线粒体Bax的积累, 使 HSP 70 基因敲除细胞死亡率下降, 认为在缺血性损伤之前或之后增加热休克蛋白, 可对缺血引起的急性肾损伤起到保护作用^[36]。热休克因子1 (heat shock factor 1, HS F1) 基因敲除小鼠肾细胞 HSP25 和 HSP90 表达明显下降, 使线粒体的超氧化产物显著增多, 增加线粒体通透性转换孔开放和引起更大的线粒体膜电位的变化^[41]。在本课题的第一部分实验结果中, 肾脏组织的病理检查表明顺铂肾损害中肾小管损伤较重, 而线粒体是肾小管上皮细胞内损伤最显著的细胞器, PNS能减轻肾小管上皮细胞线粒体的损伤; 肾组织差异表达蛋白质的筛选鉴定结果发现,

蛋白质m/z 10815被鉴定为线粒体的热休克蛋白,该蛋白质在顺铂模型组与正常对照组大鼠肾脏组织中的表达并无差异,但在顺铂模型组与PNS治疗组大鼠肾脏组织中的表达有差异,在顺铂模型组 mHSP 表达平均为 1.34 ± 0.46 ,在PNS治疗组 mHSP的表达平均为 3.24 ± 2.16 ,表达上调2倍以上。结合HSP的生理作用,上述情况似乎与PNS对顺铂肾损害具有保护作用的结果相符。PNS是否通过上调线粒体 mHSP 发挥对顺铂肾损害的保护作用,以及该蛋白质在其中的具体作用、调节机制等均有待下一步的研究。

4.3.2 血红蛋白 β 亚基

血红蛋白是由4个亚基通过共价键结合而成的一种寡聚蛋白质,为 $\alpha_2\beta_2$ 结构,每个亚基均由1条多肽链和具有1个亚铁离子的血红素分子构成,含有1个血红素基团和1个氧结合部位;血红蛋白在生物体内起存储和运输氧气的作用,参与维持机体内环境的酸碱稳定。Johnson等^[42]对大鼠的血红蛋白的自动氧化和超氧化物酶的活性进行研究,发现GSHPx.1基因缺陷大鼠血红蛋白的自动氧化率很低,但是产生活性氧的能力很强,这可能与超氧化物歧化酶的活性有关;血红蛋白中 $\alpha_1\beta_1$ 亚基和 $\alpha_2\beta_2$ 亚基的接合部位能明显影响血红蛋白的氧亲和力和协同氧化过程^[43、44]。

肾脏是造血器官之一,同时对红细胞的生成起重要的作用。本实验中,发现血红蛋白 β_1 亚基和 β_2 亚基在顺铂模型组中较正常对照组的表达上调,在顺铂模型组与PNS治疗组之间的表达无差异。血红蛋白 β_1 亚基、 β_2 亚基与顺铂肾损害之间的关系尚有待研究。未见相关的研究报道。

4.4 存在的不足

采用SELDI技术筛选的差异表达蛋白质中,由于不同类型的蛋白质芯片与蛋白质的相互作用不同,因此不同的芯片所捕获到的蛋白质可能有所不同,只采用一种类型的芯片来筛选蛋白质,可能会导致一些与芯片类型不相符的差异表达蛋白质分子丢失。另外,蛋白质芯片上的标本经过筛选差

异表达蛋白质后，不能回收进行鉴定，因此筛选出来的差异表达蛋白质是属于已知的还是未知的蛋白质，以及其结构与功能等等仍是未明确，因此后续工作需要筛选出的差异表达蛋白质进行纯化鉴定、功能研究，例如采用电泳方法或色谱技术纯化出目标蛋白，再通过质谱鉴定获得目标蛋白质的肽指纹图谱，在蛋白质数据库中比对与其相匹配的蛋白质^[45]，例如本实验中分离鉴定出线粒体的热休克蛋白、血红蛋白 β 1、 β 2亚基。

SELDI技术对于筛选小分子的差异表达蛋白质很有效，这是传统的二维电泳筛选技术无法做到的，二维电泳技术对极小、极大、低溶解度及低丰度的蛋白质无法分离鉴定，因此这两种技术可互补不足。国内外已有不少的研究采用SELDI技术筛选差异表达蛋白质^[46、47]，尤其是与肿瘤相关的蛋白质组学研究^[48、49]。由于SELDI技术筛选的差异表达蛋白质多集中在20 000Da以下，如本实验的表2-2、表2-3所示；不少差异表达蛋白质的 m/z 甚至小于2000 Da，而且表达量低，在分离纯化过程中容易损失，因此后面的分离鉴定工作难度增大。但也正是小分子量蛋白质或多肽，在体内参与调节各系统、细胞的多种生理功能，例如激活体内的酶系统等，是机体完成各种复杂的生理功能所必需。因此通过对这些差异表达蛋白进行分离、鉴定，将有助于阐明顺铂肾损害，以及PNS的保护作用机制，为改善该病的防治措施以及PNS的临床应用提供理论基础。

虽然本实验只是取得了初步的研究结果，但可为以后的研究提供了新方向和思路；同时也说明通过 SELDI 等蛋白质组学技术筛选、鉴定顺铂肾损害、以及 PNS 治疗大鼠肾组织中的差异表达蛋白质的可行性。

第三部分 三七总皂苷对慢性马兜铃酸肾损害大鼠肾功能的保护作用

1. 材料

1.1 动物

雄性 Wistar 大鼠，体重 $180\pm 20\text{g}$ ，清洁级，由广西医科大学实验动物中心提供；试验动物合格证号 SCSK2009-002。

1.2 药品与主要试剂

三七总皂苷粉针剂	广西梧州制药(集团)股份有限公司，批号 100111。
醋酸泼尼松片	浙江仙琚制药股份有限公司，批号 091192
肌酐试剂盒	南京建成生物工程研究所，批号 20100806
NAG 试剂盒	南京建成生物工程研究所，批号 20100709
BUN(尿酶法)试剂盒	南京建成生物工程研究所，批号 20100806
马兜铃酸 I 标准品	中国药品生物制品检定所，批号 110746-200406
关木通	芷江县药材公司中药饮片厂，批号 090401
甲醇(色谱纯)	美国 Fisher Scientific 公司
无水乙醇	成都市科龙化工试剂厂，批号 AR2010019
蒸馏水，去离子水	自制

1.3 主要仪器

722S 可见光分光光度计	上海精密科学仪器有限公司
5415R 小型台式离心机	德国 Eppendorf
RE-52AA 旋转蒸发仪	上海 RE-52AA 旋转蒸发仪
AL204101 型电子天平	上海亚荣生化仪器厂
岛津高效液相色谱仪 LC-10AT 泵，SPD-10A 紫外检测器 DT-230A 柱温箱	

SB 超声波清洗器

上海 Branson

2. 方法

2.1 制备关木通浸膏及测定马兜铃酸 I 的含量

2.1.1 制备关木通浸膏

参照文献^[50]的方法进行制备关木通浸膏, 准确称取关木通饮片 10.0kg, 用 95%乙醇溶液反复提取 3 次, 用量依次分别为 8 倍量、6 倍量、6 倍量(95%乙醇溶液与关木通药材的体积重量比), 回流提取时间是 2.0 小时。回流结束后过滤, 合并 3 次滤液并浓缩成浸膏, 混匀后于-20℃冻存备用。

2.1.2 关木通浸膏中马兜铃酸 I 的测定

参照文献^[51]的方法, 采用高效液相色谱法测定关木通浸膏中的马兜铃酸 I 的含量, 标准曲线自行绘制。色谱条件为色谱柱为 Welchrom-C₁₈ 柱 (4.6mm*250mm, 5 μ m), 以甲醇-0.1%冰醋酸溶液(70:30)作为流动相, 流出速度: 1 mL · min⁻¹, 检测波长: 257nm; 柱温为 25℃; 进样量为 20 μ L。

检测结果: 关木通浸膏中马兜铃酸 I 含量是 26.04 mg · g⁻¹。

2.2 动物分组及给药

大鼠适应性喂养 1 周后, 随机分为空白对照组(20 只)、模型组(25 只)、阳性对照组(强的松组)(25 只)、PNS 高剂量组(PNS H, 25 只)、PNS 中剂量组(PNS M, 25 只)、PNS 低剂量组(PNS L, 25 只)。除空白对照组外, 其余各组按马兜铃酸 I 20 mg · kg⁻¹灌服关木通浸膏, 每天 1 次; 1 周后改为按马兜铃酸 I 15 mg · kg⁻¹灌服关木通浸膏^[52], 每天 1 次; 在灌服关木通浸膏 4 h 后, PNS L 组、PNSM 组、PNSH 组每天分别给以 100mg · kg⁻¹、200mg · kg⁻¹、400mg · kg⁻¹的 PNS, 模型组灌服等容量生理盐水; 阳性对照组每天灌服醋酸泼尼松片 3.15 mg · kg⁻¹, 空白对照组自由进食饮水。均通

过灌胃给药，共给药 20 周。

2.3 观察指标

每日观察大鼠的一般情况，包括精神状态、毛色、饮食及活动等情况；检测血清 BUN、Cr 水平，尿液 NAG 及 24h 尿蛋白含量，均严格按照试剂盒说明书进行操作。

2.4 标本的采集与处理

2.4.1 血液、尿液标本的采集和处理

分别于实验第 12w、16w、20w，用代谢笼留取大鼠 24h 尿液，计总量并离心取上清液，置 -20°C 保存。之后每组随机取 6 只大鼠，腹腔注射 10% 水合氯醛(0.3 mL / 100g 体重)，麻醉后自腹正中切开腹腔，采集腹主动脉血，于 4°C 以 4000rpm / min 离心 5min，取血清保存于 -20°C 冰柜，以统一检测血清 BUN、Cr 水平。

2.4.2 肾脏组织标本的采集和处理

给药至第 12w、16w 时，每组随机选取大鼠各 6 只，余下的在第 20w 结束时，腹腔注射 10% 水合氯醛(0.3 mL / 100g 体重)，麻醉后自腹正中切开腹腔；游离出腹主动脉，扎紧肾动脉分支以上的近心段，在肾动脉分支以下部位进行腹主动脉插管，并剪开左肾静脉，用预冷生理盐水进行肾脏原位灌洗。待肾脏颜色变白后，取肾脏。

(1) 取部分肾脏组织迅速放入液氮中，于 -80°C 冰箱保存，留作“第四部分”的差异表达蛋白筛选与鉴定。

(2) 取部分肾脏组织用 3% 戊二醛固定 2h 后环氧树脂包埋，制成超薄切片置于铜网上，经醋酸铀、枸橼酸铅双重染色后，电镜下观察细胞的超微结构。由广西医科大学电镜室制备电镜标本。

(3) 另取部分肾脏组织，用 4% 多聚甲醛固定后，经常规脱水，石蜡包埋、切片以及二甲苯脱蜡、梯度乙醇使切片水化等处理，光镜下观察肾脏组织纤维化程度。按照三色染色试剂盒的操作步骤严格进行。

2.5 统计学处理方法

所有数据均采用 SPSS 13.0 软件统计分析,并在 Excel 上进行处理,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析进行组间比较。 $P < 0.05$ 者为具有显著性差异。

3 结果

3.1 各组大鼠的一般情况

实验第 2w 开始,马兜铃酸模型组大鼠活动迟缓,逐渐出现毛色无光、掉毛、饮食减少。20w 后,造模组大鼠多数为耳部、趾甲苍白,以马兜铃酸模型组大鼠为甚。在实验过程中,马兜铃酸模型组大鼠死亡 5 只,PNS 高、中、低剂量组分别死亡 4 只、3 只、3 只大鼠,阳性对照组死亡 4 只大鼠。

3.2 各组大鼠的尿 NAG、24h 尿蛋白的比较

各组大鼠的 24h 尿蛋白及尿 NAG 检测结果见表 3-1、表 3-2。由表中可知,马兜铃酸模型组大鼠于 12w、16w、20w 的 24h 尿蛋白及尿 NAG 酶含量均显著高于空白对照组($P < 0.01$),而且随着给药时间的延长逐渐升高;于实验 20w,PNSM 组、PNSH 组及阳性对照组大鼠的 24h 尿蛋白水平均低于模型组($P < 0.01$);PNS 各剂量组、强的松组尿 NAG 酶水平于 16w、20w 均显著低于模型组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

3.3 各组大鼠血清 BUN、Cr 的比较

各组大鼠血 BUN、Cr 的检测结果见表 3-3、3-4。从表中可知,于实验 16w、20w 时,马兜铃酸模型组大鼠的血清 BUN、Cr 均明显高于空白对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$),且随着给药时间的延长而逐渐升高;PNS 各剂量组、强的松组大鼠血清 Cr 水平均显著低于马兜铃酸模型组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。而 PNS 各组及阳性对照组大鼠血清 BUN 于实验 20w 显著低于马兜铃酸模型组($P < 0.01$)。

3.4 肾脏组织病理学检查结果

图3-1、图3-2 分别为实验20w 时各组大鼠肾组织的Masson染色图片和电镜观察的图片。

光镜下见空白对照组大鼠在各个时间点的肾脏组织结构清晰，肾小球、肾小管以及细胞的形态、大小未见异常。马兜铃酸模型组大鼠可见肾小管上皮细胞肿胀、灶性坏死，肾小管管腔缩小，间质可见纤维化；随着给药时间的延长，肾小管上皮细胞出现萎缩，部分肾小管腔扩大，间质纤维化加重。

电镜观察空白对照组大鼠在各个时间点的肾组织，可见肾小管上皮细胞微绒毛规则排列，线粒体形态、结构正常。马兜铃酸模型组大鼠的肾小管上皮细胞微绒毛脱落、线粒体肿胀，可见较多溶酶体和吞噬泡。

PNS 各剂量组及强的松组大鼠的肾组织病理学改变均较马兜铃酸模型组的有所改善。

表 3-1 各组大鼠不同时间点的 24h 尿蛋白(n=6, $\bar{x} \pm s$, mg/L)

Tab.3-1 The 24-hour urine protein among each group at different observation times(n=6, $\bar{x} \pm s$, mg/L)

Group	12 th week	16 th week	20 th week
Model Control group	20.58 ± 4.03 ^{△△}	24.34 ± 3.24 ^{△△}	28.33 ± 4.72 ^{△△}
PNSL	14.99 ± 4.67	16.97 ± 2.26 ^{△△}	20.50 ± 2.95 [△]
PNSM	14.60 ± 5.99	16.74 ± 2.90 ^{**}	19.27 ± 3.08 ^{**△△}
PNSH	13.77 ± 2.97 ^{**}	14.97 ± 1.70 ^{**}	16.51 ± 3.03 ^{**△}
Prednisone Group	13.94 ± 2.50	14.53 ± 3.82 ^{**}	16.05 ± 5.01 ^{**}
Nomal Control Group	12.10 ± 1.34	13.77 ± 2.52	12.33 ± 3.28

Notes: vs.model control group, * P < 0.05, ** P < 0.01, vs.normal control group, △ P < 0.05, △△ P < 0.01

表 3-2 各组大鼠不同时间点的尿 NAG 的变化(n=6, $\bar{x} \pm s$, U/L)Tab.3-2 The NAG among each group of rats at different observation times(n=6, $\bar{x} \pm s$, U/L)

Group	12 th week	16 th week	20 th week
Model Control group	6.04±0.89 ^{△△}	18.5±4.79 ^{△△}	20.05±3.78 ^{△△}
PNSL	4.87±1.52	11.3±3.24 ^{*△}	15.02±2.39 ^{*△△}
PNSM	4.05±0.81 ^{**}	13.67±1.67 ^{*△}	14.69±2.72 ^{*△△}
PNSH	3.04±1.26 ^{**}	10.29±0.7 ^{**△}	12.5±2.72 ^{**△△}
Prednisone Group	3.57±1.14 ^{**}	9.61±4.44 ^{**}	12.02±2.55 ^{**△△}
Nomal Control Group	2.92±1.73	6.14±3.87	7.89±1.21

Notes: vs.model control group, * P <0.05, ** P <0.01, vs.normal control group,△P <0.05, △△P <0.01

表 3-3 各组大鼠不同时间点的 Scr 的变化(n=6, $\bar{x} \pm s$, μmol/L)Tab.3-3 The Scr among each group of rats at different observation times (n=6, $\bar{x} \pm s$, μmol/L)

Group	12 th week	16 th week	20 th week
Model Control group	83.26±17.73 [△]	100.07±14.03 ^{△△}	115.58±19.53 ^{△△}
PNSL	75.63±14.99	75.63±14.99 [*]	87.85±15.99 ^{*△△}
PNSM	66.46±16.07	73.33±15.34 ^{**}	84.79±13.52 ^{**△△}
PNSH	61.88±7.53 [*]	68.75±10.85 ^{**}	80.97±18.26 ^{**△}
Prednisone Group	61.11±21.82	66.46±12.55 ^{**}	79.44±16.57 ^{**△}
Nomal Control Group	60.35±10.62	61.11±7.48	62.64±5.55

Notes: vs.model control group, * P <0.05, ** P <0.01, vs.normal control group,△P <0.05, △△P <0.01

表 3-4 各组大鼠不同时间点的 BUN 的变化(n=6, $\bar{x} \pm s$, mmol/L)Tab.3-4 The BUN among each group of rats at different observation times(n=6, $\bar{x} \pm s$, mmol/L)

Group	12 th week	16 th week	20 th week
Model Control group	6.36±0.77	8.54±0.79 [△]	10.17±0.78 ^{△△}
PNSL	6.12±0.65	7.95±0.52	7.83±0.30 ^{**}
PNSM	6.02±0.58	7.73±0.64	7.90±0.69 ^{**}
PNSH	5.89±0.60	7.21±0.51 ^{**}	7.79±0.40 ^{**}
Prednisone Group	5.82±0.67	7.37±0.52 [*]	7.04±1.06 ^{**}
Nomal Control Group	5.75±1.10	7.14±0.99	7.48±0.64

Notes: vs.model control group, * P <0.05, ** P <0.01, vs.normal control group,△P <0.05, △△P <0.01



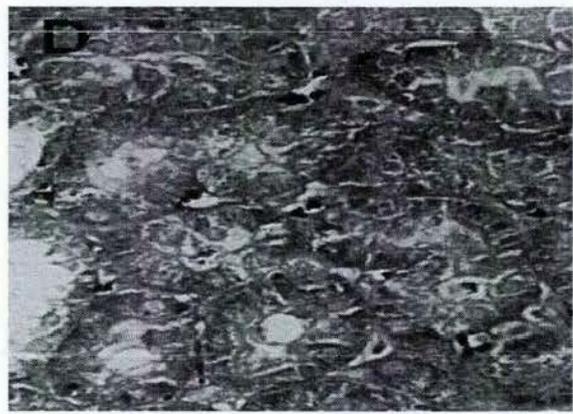
Nomal control group ×400



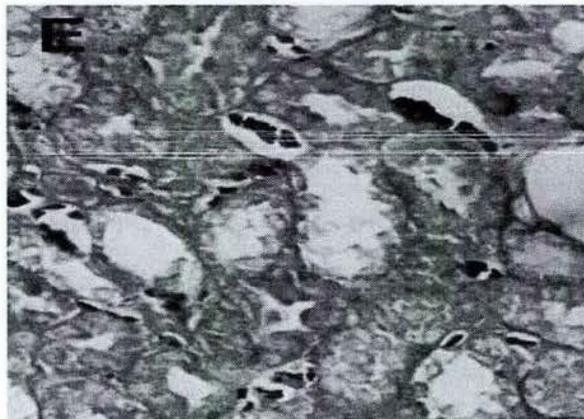
Prednisone Group ×400



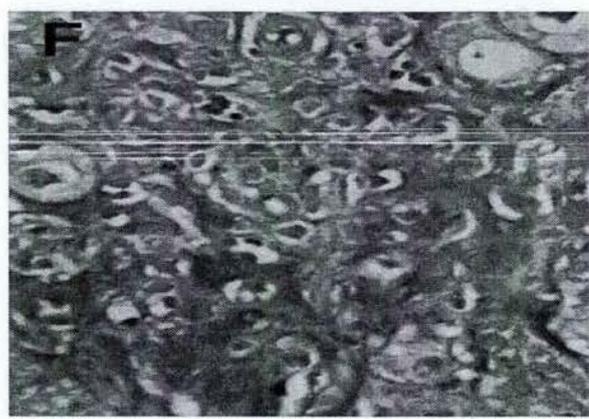
PNSH group ×400



PNSM group ×400



PNSL group ×400



Model control group ×400

图 3-1 20 周各组大鼠肾组织 Masson 染色

Fig.3-1 The light microscope bservation. results of Masson staining in nephridial tissue at the end of the 20th week

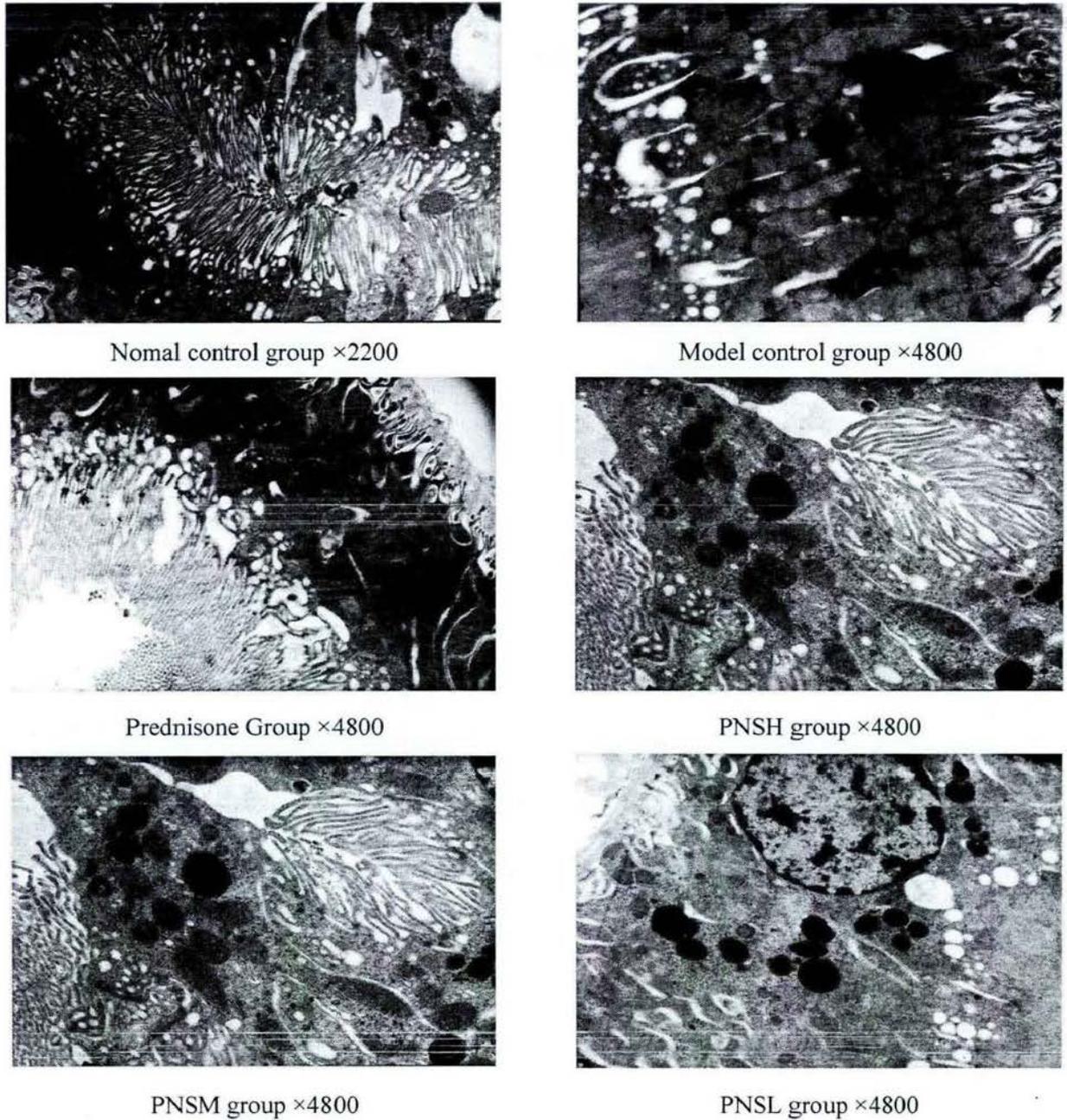


图 3-2 20 周各组大鼠肾组织电镜检查结果

Fig.3-2 Electron micrograph in nephridial tissue of rats of the 20th week

4. 讨论

4.1 关木通流浸膏马兜铃酸I含量的测定

由于马兜铃酸肾损害的动物实验一般需要经过5~6个月的时间，如果通过反复进行预实验来了解给药剂量以及给药时间，则可能需要1年半到2

年的时间。因此关木通流浸膏中马兜铃酸I含量的测定非常重要,根据马兜铃酸I含量,结合一些研究报道可以为马兜铃酸肾损害的动物实验部分估计给药剂量、给药时间。假如给药量太大,可能造成急性肾损害而不是慢性肾损害;而假如给药量太小或时间不足,那么可能制作的肾损害模型不典型,影响实验结果。同时,通过高效液相色谱法测定关木通浸膏中马兜铃酸I含量,可鉴定关木通药材的真伪。

4.2 大鼠慢性马兜铃酸肾损害模型制作

马兜铃酸(aristolochic acid, AA)为马兜铃属植物例如马兜铃、关木通等的主要成分,包括一系列结构相类似的硝基菲类化合物,其中主要的有AAI及其8-位去甲氧基的马兜铃酸II(AAII)。马兜铃酸肾病(aristolochic acid nephropathy, AAN)是指服用含有AA的药物而导致的肾脏损害,短期大量服用含AA的药物可致急性AAN,持续或间断小量服用含AA药物则可发生慢性马兜铃酸肾病(chronic aristolochic acid nephropathy, CAAN)。AAN的病理表现主要是肾小管萎缩和肾间质纤维化^[53, 54],是个进展迅速的肾小管间质肾病,最终导致严重贫血和终末期肾脏疾病。

本实验通过每天给大鼠灌服关木通浸膏,共20w,以建立慢性马兜铃酸肾损害的动物模型。于实验12w,马兜铃酸模型组大鼠的尿NAG、24h尿蛋白含量以及血清Cr水平均显著高于空白对照组;于实验16w和20w,血清BUN水平及以上各指标均显著高于空白对照组,而且随着给药时间的延长,以上各项指标逐渐升高。肾脏组织的病理学检查发现,随着给药时间的延长,肾小管损害和间质纤维化逐渐加重,表明大鼠慢性马兜铃酸肾损害模型制作成功。

4.3 PNS对慢性马兜铃酸肾损害大鼠的保护效果

AAN一般进展迅速,最终发展为终末期肾功能衰竭,甚至诱发肿瘤的发生^[5, 6]。目前临床上对AAN缺乏有效的治疗方法,因此关键在于预防AAN的发生,以及延缓AAN的进展。肾上腺糖皮质激素是临床上用于治疗肾小

球疾病的主要药物^[55、56]。实验研究表明,强的松可延缓AAN的进展。给大鼠灌胃关木通水煎剂12周后,发现强的松可改善马兜铃酸肾损害大鼠肾功能,以及减轻肾组织的纤维化^[58]。有报道^[57]临床上使用强的松治疗马兜铃酸肾病,可改善其肾功能。因此本实验采用强的松作为阳性对照组药物。

本实验结果表明,PNS 和强的松均可显著降低 AA 导致的大鼠血清BUN、Scr 以及尿 NAG、24h 尿蛋白的升高,其中 PNS H 组与强的松组的效果相当。病理检查发现,光镜下 PNS 各组、强的松组的肾小管萎缩、间质纤维化都较马兜铃酸模型组有不同程度的减轻;电镜下 PNS 各组、强的松组的细胞线粒体病变均较马兜铃酸模型组有所改善。说明 PNS 对 AAN 有一定的保护作用。

4.4 肾组织病理检查结果

在本实验的病理组织学检查中,光镜下于实验 12w 就可观察到肾间质纤维化;而孙世仁等^[59]报道,在实验 20w 时仍未见肾间质纤维化,于 24w 可观察到纤维化。本实验与孙世仁等报道的肾纤维化出现的时间不一致,原因可能是:在本实验中每天给以的 AA 量(每天灌胃含 AA I 20 mg/kg 关木通浸膏,1 w 后改为每天含 AA 15mg/kg,共 20w)大于报道的剂量,报道的是每天腹膜注射 AA 剂量 5mg/kg,共 16 w;虽然在本实验中是灌胃给药,但剂量是孙世仁等报道的 3~4 倍。AAN 发生的时间、严重程度与给药剂量有关。

4.5 AAN 的发生发展及 PNS 的保护作用机制

AAN发生发展的机制目前尚未完全明确,有关AAN发生机制的研究不少,存在多种学说。有人认为缺血缺氧^[53、60]是AA致大鼠严重的肾小管间质纤维化的重要的原因;促进骨形成蛋白-7(BMP-7)和CD 34 表达升高可显著改善肾微血管损伤^[61]。凋亡在AAN中占有重要的地位,AA与DNA形成加合物,可导致肾小管上皮细胞(renal tubular epithelial cells, TEC)通过

p53介导的信号通路发生凋亡^[62]；AA在野生型小鼠可诱导急性马兜铃酸肾病，造成大量细胞凋亡、坏死和急性肾功能衰竭，p53基因缺陷小鼠和阻断p53的TEC损伤显著减轻。另外，一些细胞、细胞因子或离子均可在AAN发生发展中起重要作用，例如，大量的肥大细胞在慢性马兜铃酸肾病纤维化区域堆积，小管间质肥大细胞的数量与肾纤维化程度呈正相关^[63]；转化生长因子- β (TGF- β) / Smad 3蛋白信号转导通路的封锁可能对慢性马兜铃酸肾病有潜在的治疗作用^[64]；近曲肾小管细胞的有机阴离子转运蛋白(OATs)可以介导近曲肾小管细胞吸收AA，从而参与肾细胞损伤^[65]；在钙($2+$)存在下AAI可导致线粒体肿胀、细胞膜去极化、钙($2+$)泄漏，并释放细胞色素；线粒体通透性转换(MPT)AAI诱导肾损伤中发挥着重要作用^[66]。药物代谢的基因多态性与AAN的易感性相关^[19]。由此可见，AAN的发生发展的可能机制包括缺血缺氧、细胞毒、免疫反应以及肾小管上皮细胞的转分化假说等，是多个机制、多途径共同作用的结果，采用传统的研究方法很难对其进行全面、系统地了解，对其治疗措施也难以得到改善。

本实验中，PNS对慢性马兜铃酸肾损害大鼠有一定的保护作用，PNS高剂量组的保护效果与强的松组的相近。有关PNS对AAN的干预作用研究较少。苏丽娜等研究发现PNS可升高慢性马兜铃酸肾损害大鼠的肾组织SOD、GSH-PX水平，明显降低肾组织的MDA^[16]，说明PNS可通过抗氧化作用保护马兜铃酸肾损害；徐亚吉等^[17、18]报道AAI可诱导HK-2细胞转分化，PNS可能通过抑制TGF- β 1、CTGF的表达而起到抑制HK-2细胞转分化的作用。PNS含有多种有效成分，具有抗氧化、抗增殖、促凋亡等活性^[67]，其对马兜铃酸肾损害的保护作用机制可能涉及多环节、多途径，需要采用高通量的技术对其作用进行全面、系统的研究。

第四部分 三七总皂苷对马兜铃酸肾损害大鼠肾组织差异表达蛋白质的影响

1 材料

1.1 主要试剂

TFA	色谱级产品, 美国 Sigma 公司
DTT	色谱级产品, 美国 Sigma 公司
Tris-HCL	色谱级产品, 美国 Sigma 公司
HEPES	色谱级产品, 美国 Sigma 公司
CHAPS	色谱级产品, 美国 Sigma 公司
SPA	色谱级产品, 美国 Sigma 公司
HPLC 水	色谱级产品, 美国 Sigmaa 公司
Urea	色谱级产品, 美国 Sigma 公司
NaAC	色谱级产品, 美国 Sigma 公司
CAN	色谱级产品, 美国 Sigma 公司
溴酚蓝	色谱级产品, 美国 Sigmaa 公司
胰蛋白酶	美国 promega
N, N' -甲叉双丙丙烯酰胺	美国 Amresco 批号: 0172
十二烷基硫酸钠(SDS)	美国 Amresco 批号: 0227
三羟基甲基氨基甲烷 (Tris)	北京 Solarbio 批号: T8060
Tricine	北京 Solarbio 批号: T8190
考马斯亮蓝 R250	美国 Amresco 批号: 0615
甲醇	色谱级产品, 美国 Fisher Scientific 公司
过硫酸铵	Sigma 批号: A6761
TEMED	美国 Amresco 批号: 0761

1.2 主要仪器

冷冻高速离心机	型号: Eppendorf 5810R 德国 Eppendorf Cetrifuge 公司
蛋白质浓度测定仪	Narodrop 2000(ND-2000)
紫外 spectrophotometer	Thermo scientific 公司
冷冻真空干燥机	LGJ-18, 北京松源华兴科技发展有限公司
Ultra Micro Spin Column (C18 柱)	郑州英诺高科有限公司
蛋白质芯片	CM-10 型弱阳离子交换芯片 美国 Cuphergen 公司
蛋白芯片阅读机	Protein Chip Biology System(PBS II C)型, 美国 Cuphergen 公司
质谱仪	5800 MALDI-TOF-MS/MS ABSCIX 公司

2 方法

2.1 大鼠肾组织标本的选择

选择“第三部分”实验中的 16w 时 PNSH 组大鼠 (PNS16w 组), 以及实验 20w 的空白对照组、马兜铃酸模型组、PNSH 组 (PNS20w 组)、阳性对组 (强的松组) 大鼠的肾脏组织作为差异表达蛋白质的筛选和鉴定的标本。

2.2 所用制剂的配制

按照本论文“第二部分”实验中的方法, 配制组织裂解液、CM10 buffer(100mM NaAC, pH4.0)、SPA 饱和溶液、Tricine-SDS-PAGE 凝胶贮存

液、标本上样缓冲液 (0.25mol/L Tris·HCl pH6.8, 10%SDS, 0.5mol/L 二硫叔糖醇, 50%甘油, 0.5%溴酚蓝)、电泳缓冲液。

2.3 肾脏组织裂解

肾脏组织解冻后用生理盐水冲洗, 并称重; 将肾脏组织放入有液氮的研钵内研磨, 然后按 100mg 组织加入 1ml 的裂解液, 彻底裂解组织后, 于 4℃, 12000rpm/min 离心 1 个小时。最后调整蛋白浓度至 60~80 μg/μl, 分装成 50 μl/管, 保存于-80℃冰箱备用。

2.4 肾脏组织差异表达蛋白质的检测

采用SELDI-TOF-MS法, 对以上各组标本进行差异表达蛋白质谱检测。

取 100 μl 处理好的肾组织标本, 于 CM-10 型蛋白芯片上点样, 将处理好的芯片置于 SELDI-TOF 质谱阅读器中, 进行数据采集和结果分析; 使用软件 Ciphergen Protein Chip 3.2 自动采集数据, 并快速准确绘制出蛋白质的质谱图, 其中纵坐标为蛋白峰强度, 横坐标为蛋白质的质荷比。信号噪声 (signal-to-noise ratio, S / N) 大于 5 为有效波峰。用标准芯片校正质谱仪, 仪器参数的设定为: 最高分子量为 50 000 道尔顿, 优化范围 2 000~20000 道尔顿; 激光强度为 190, 检测敏感度为 8, 每个样本取 130 个点的平均值。

蛋白质的质荷比以 m/z 值表示, 采用软件 Biomarker Wizard 对 m/z 相同的蛋白在各组之间峰值差异含量进行快速计算。使用 P 值表示其差异程度, 经统计学分析, $P < 0.05$ 的蛋白峰定义为差异蛋白峰。

2.5 差异表达蛋白质的分离纯化

从 CM10 芯片检测到的差异表达蛋白质中, 筛选鉴定候选蛋白质, 入选标准为: ① P 值 < 0.05 , 而且尽可能小。② Mean 值大于 SD 值。③ Mean 值大, 而且 Mean 值之比大于 2。

采用 Tricine-SDS-PAGE 凝胶分离纯化差异表达蛋白质: 肾组织裂解标本融解后离心, 取 7.5 μl 上清液加入 2.5 μl 标本上样缓冲液, 置于沸水中煮 8min 后, 在预先配制好的 Tricine-SDS-PAGE 凝胶上电泳。

用双蒸水将电泳后的 Tricine-SDS-PAGE 凝胶冲洗干净, 加入染色液 50ml, 在振荡器中振荡染色 4h~6h。将染色液倒掉, 用双蒸水冲洗凝胶 3~5 次后, 加入脱色液 50ml, 在振荡器中振荡脱色 2h~4h。

2.6 蛋白质胶内酶解

用双蒸水冲洗脱色后的凝胶 3~5 次后, 将目标蛋白质从相应的凝胶条带上切下, 经过一系列处理后, 加入胰蛋白酶工作液 (浓度 10ng/ μ L) 过夜, 以充分酶解凝胶中的蛋白质。吸取酶解液体置于 -20℃ 冻存, 以备下一步的差异表达蛋白质的质谱鉴定时使用。

2.7 差异表达蛋白质的质谱鉴定

采用 Ultra Micro Spin Column (C18 柱) 对酶解液体进行脱盐处理后, 在 384 靶盘上点靶, 采用 MALDI-TOF-MS/MS 获取目标蛋白质的肽图谱, 最后通过 Mascot 软件查询 NCBI、SWISS-PROT 数据库进行搜索比对。

3 结果

3.1 差异表达蛋白质的筛选

3.1.1 马兜铃酸模型组与空白对照组之间的差异表达蛋白质

从 CM10 芯片上筛选的马兜铃酸模型组与空白对照组大鼠肾组织蛋白质质谱图, 两种肾组织检测到蛋白质质谱峰共 92 个; 经 Biomark Wizard 软件分析后发现差异表达的蛋白峰 23 个, 其中 9 个蛋白质在马兜铃酸模型组中表达下调, 而其余的 14 个蛋白质在马兜铃酸模型组中表达上调; 在马兜铃酸模型组比正常组上调大于 2 倍而小于 5 倍的蛋白质有 9 个, 上调 5 倍以上的蛋白质 2 个, 6 个蛋白质下调 2 倍以上; m/z 7998.97 的蛋白质 P 值最小, m/z 12151.08 的蛋白质在模型组及空白对照组中表达量最大, 其次是 m/z 9361.14。详见表 4-1。图 4-1。

3.1.2 PNS20w 组与马兜铃酸模型组之间存在表达差异蛋白质

从 CM10 芯片上筛选的马兜铃酸模型组与 PNS20w 组大鼠肾组织蛋白质质谱图, 两种肾组织检测到蛋白质质谱峰共 92 个; 经软件 Biomark Wizard 分析后发现差异表达的蛋白峰 15 个, 其中 4 种蛋白质在 PNS20w 组中表达下调, 而其余的 11 种蛋白质在 PNS20w 组中表达上调。在 PNS20w 组比模型组上调大于 2 倍而小于 5 倍的蛋白质有 5 个, 上调 5 倍以上的蛋白质有 3 个; 在 PNS20w 组比模型组下调大于 2 倍而小于 5 倍的蛋白质有 1 个, 下调 5 倍以上的有 1 个; 蛋白质 m/z 8696.91 在 PNS 20w 组中表达量最大, 由模型组的 8.07 上调到 PNS 20w 组的 21.24。详见表 4-2。图 4-2。

3.1.3 PNS16w 组与 PNS20w 组之间未检测到表达差异蛋白质

从 CM10 芯片上筛选的 PNS16w 组与 PNS20w 组大鼠肾组织蛋白质质谱图, 两种肾组织检测到蛋白质质谱峰共 95 个; 经 Biomark Wizard 软件分析后发现, 有差异表达的蛋白峰为 0 个。

3.1.4 阳性对照组 (强的松组) 与 PNS20w 组之间未检测到表达差异蛋白质

从 CM10 芯片上筛选的强的松组与 PNS 20w 组大鼠肾组织蛋白质质谱图, 两种肾组织检测到蛋白质质谱峰共 95 个; 经 Biomark Wizard 软件分析后发现, 有差异表达的蛋白峰为 0 个。

3.1.5 阳性对照组 (强的松组) 与马兜铃酸组之间存在表达差异蛋白质

从 CM10 芯片上筛选的强的松组与马兜铃酸组大鼠肾组织蛋白质质谱图, 两种肾组织检测到蛋白质质谱峰共 92 个; 经软件 Biomark Wizard 分析后发现差异表达的蛋白峰为 41 个。其中 25 个蛋白质在强的松组表达下调, 而其余的 16 个蛋白质在强的松组表达上调。在强的松组比模型组上调大于 2 倍而小于 5 倍的蛋白质有 6 个, 上调 5 倍以上的蛋白质有 10 个; 在强的松组比模型组下调大于 2 倍而小于 5 倍的蛋白质有 14 个, 下调 5 倍以上的有 10 个; 表达量最大的是 m/z 12151.08, 由马兜铃酸组的 70.52 下调到强的松组的 30.13, 空白对照组的为 40.89; 其次是 m/z 15879.99, 由马

兜铃酸组的 40.58 下调到强的松组的 13.04。详见表 4-3。图 4-3。

3.2 肾脏组织差异表达蛋白质的质谱鉴定结果

m/z 10082.07 目标蛋白质经过质谱获得蛋白质的肽指纹谱后, 通过软件 Mascot 在 NCBI 及 SWISS-PROT 数据库中比对, 结果发现只有乙酰辅酶 A 结合蛋白的匹配得分为 128 分, 匹配上 8 个肽段。见表 4-6, 图 4-4。

表 4-1 马兜铃酸组与空白对照组大鼠肾组织差异表达蛋白质 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.4-1 The differentially expressed proteins of renal tissue in aristolochic acid group and blank control group ($\bar{x} \pm s$)

m/z	p	空白对照组	马兜铃酸模型组	expression of Biomarkers
1142.21	0.032125	0.56±0.94	2.25±1.66	↑
1388.33	0.010128	0.13±0.22	0.53±0.39	↑
1522.74	0.022271	0.29±0.16	-0.18±0.35	↓
5085.35	0.015158	1.66±1.21	0.51±0.49	↓
7440.14	0.032125	1.68±1.09	0.41±0.31	↓
7731.18	0.032125	2.63±0.83	1.52±0.64	↓
7998.93	0.0027	3.24±0.63	0.84±0.80	↓
8045.44	0.006642	3.73±1.02	1.95±0.62	↓
8458.63	0.032125	1.99±0.91	0.58±0.29	↓
9361.14	0.0027	9.89±4.92	26.96±8.45	↑
10082.07	0.006642	2.08±1.59	0.57±0.27	↓
10185.10	0.0455	2.18±1.82	5.32±3.59	↑
10227.80	0.032125	3.00±2.63	6.71±4.53	↑
10774.05	0.010128	1.88±0.88	3.50±1.12	↑
10816.75	0.006642	1.70±0.86	4.50±2.32	↑
10964.34	0.015158	1.75±1.36	4.39±2.11	↑
12151.08	0.022271	40.89±19.66	70.52±24.23	↑
13101.25	0.010128	0.59±0.67	13.59±11.47	↑
13491.70	0.032125	2.91±1.13	5.06±1.75	↑
16277.21	0.022271	2.04±1.25	5.67±2.75	↑
16973.93	0.010128	0.60±0.55	6.08±3.40	↑
17783.38	0.006642	1.03±0.46	2.64±0.69	↑
23880.17	0.010128	0.56±0.21	0.23±0.14	↓

表 4-2 PNS20w 组大鼠与马兜铃酸模型组肾组织中有差异表达的蛋白质情况 ($\bar{x} \pm s$)Tab.4-2 The differentially expressed proteins of renal tissue in PNS20w group and aristolochic acid model group ($\bar{x} \pm s$)

m/z	p	马兜铃酸模型组	PNS20w 组	expression of Biomarkers
1004.9	0.02846	2.82 ± 1.61	8.66 ± 4.58	↑
1282.09	0.04461	0.12 ± 0.49	0.61 ± 0.29	↑
1388.33	0.010587	0.53 ± 0.32	-0.06 ± 0.20	↓
1428.89	0.04461	0.26 ± 0.45	1.10 ± 0.53	↑
1522.74	0.02846	-0.18 ± 0.35	0.36 ± 0.19	↑
3364.68	0.00617	0.59 ± 0.30	5.28 ± 2.95	↑
3840.88	0.017622	0.12 ± 0.16	0.68 ± 0.41	↑
7731.18	0.02846	1.52 ± 0.64	3.02 ± 1.17	↑
8696.91	0.010587	8.07 ± 3.86	21.24 ± 7.70	↑
9099.60	0.04461	9.56 ± 3.91	16.23 ± 5.55	↑
9586.73	0.04461	1.58 ± 0.94	2.45 ± 0.73	↑
10964.34	0.017622	4.39 ± 2.11	1.84 ± 0.95	↓
12453.9	0.04461	1.09 ± 0.77	2.49 ± 1.07	↑
17783.38	0.02846	2.64 ± 0.69	1.76 ± 0.55	↓
28023.28	0.02846	0.96 ± 0.17	0.68 ± 0.18	↓

表 4-3 强的松组与马兜铃酸组大鼠肾组织差异表达蛋白质 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.4-3 The differentially expressed proteins of renal tissue in prednisone group and aristolochic acid

model group ($\bar{x} \pm s$)

m/z	p	马兜铃酸模型组	强的松组	expression of Biomarkers
1205.30	0.04461	0.44 ± 1.30	2.92 ± 2.03	↑
1282.09	0.04461	0.12 ± 0.49	4.22 ± 4.45	↑
1378.02	0.00617	0.47 ± 0.45	6.26 ± 5.25	↑
1428.89	0.00617	0.26 ± 0.45	4.43 ± 2.85	↑
1488.08	0.00617	0.30 ± 0.40	5.42 ± 2.87	↑
1522.74	0.00617	-0.18 ± 0.35	7.38 ± 3.40	↑

1533.65	0.00617	1.44±1.16	6.52±3.89	↑
1560.04	0.017622	1.35±0.92	6.62±4.15	↑
3764.08	0.02846	0.17±0.33	1.09±0.73	↑
4645.41	0.02846	0.27±0.47	1.85±1.40	↑
5085.35	0.017622	0.51±0.49	3.05±1.68	↑
5162.37	0.04461	2.66±1.77	0.54±0.98	↓
7440.14	0.010587	0.41±0.31	3.75±2.82	↑
8140.14	0.00617	10.75±5.43	1.93±0.59	↓
8930.52	0.02846	4.24±2.26	1.21±0.81	↓
9361.14	0.00617	26.96±8.45	5.35±7.45	↓
9689.07	0.02846	6.03±2.53	1.51±2.32	↓
9963.09	0.00617	13.19±7.40	1.98±0.82	↓
9995.44	0.00617	8.03±3.68	1.50±0.47	↓
10082.07	0.017622	0.57±0.27	1.46±0.99	↑
10185.1	0.010587	5.32±3.59	1.12±0.55	↓
10227.8	0.04461	6.71±4.53	1.95±1.28	↓
10774.05	0.00617	3.50±1.12	0.34±0.32	↓
10816.75	0.010587	4.50±2.32	1.00±0.78	↓
10964.34	0.00617	4.39±2.11	0.80±0.38	↓
11928.28	0.010587	3.26±0.95	1.48±0.59	↓
12151.08	0.02846	70.52±24.23	30.13±17.98	↓
12453.9	0.04461	1.085±0.77	3.18±2.23	↑
13101.25	0.017622	13.59±11.47	0.85±1.07	↓
13491.7	0.00617	5.06±1.75	0.86±0.59	↓
13644.05	0.017622	2.55±0.89	0.96±0.64	↓
15208.93	0.010587	35.89±18.15	11.24±2.56	↓
15879.99	0.02846	40.58±26.07	13.04±9.18	↓
16682.37	0.00617	0.56±0.40	2.48±1.59	↑
17783.38	0.00617	2.64±0.69	0.46±0.49	↓
18695.87	0.00617	0.90±0.50	0.06±0.13	↓
20994.47	0.00617	0.76±0.19	0.23±0.10	↓
21525.26	0.04461	0.57±0.24	0.27±0.12	↑
25834.17	0.017622	0.77±0.17	0.32±0.28	↓
26997.48	0.010587	0.16±0.10	0.51±0.19	↓
28023.28	0.04461	0.96±0.17	0.65±0.25	↓

表 4-4 在表 4-1、表 4-2 和表 4-3 中均存在的差异表达蛋白质 ($\bar{x} \pm s$)Tab.4-4 The common differentially expressed proteins among Tab.4-1, Tab.4-2 and Tab.4-3 ($\bar{x} \pm s$)

m/z	空白对照组	马兜铃酸模型组	强的松组	PNS20w 组
1282.09		0.12±0.49	0.61±0.29	4.22±4.45
1428.89		0.26±0.45	1.10±0.53	4.43±2.85
1388.33	0.13±0.22	0.53±0.32		-0.06±0.20
1522.74	0.29±0.16	-0.18±0.35	7.38±3.40	0.36±0.19
5085.35	1.66±1.21	0.51±0.49	3.05±1.68	
7440.14	1.68±1.09	0.41±0.31	3.75±2.82	
7731.18	2.63±0.83	1.52±0.64		3.02±1.17
9361.14	9.89±4.92	26.96±8.45	5.35±7.45	
10082.07	2.08±1.59	0.57±0.27	1.46±0.99	
10185.1	2.18±1.82	5.32±3.59	1.12±0.56	
10227.8	3.00±2.63	6.71±4.53	1.95±1.28	
10774.05	1.88±0.88	3.50±1.12	0.34±0.32	
10816.75	1.70±0.86	4.50±2.32	0.96±0.78	
10964.34	1.75±1.36	4.39±2.11	0.80±0.38	1.84±0.95
12151.08	40.89±19.66	70.52±24.23	30.13±17.98	
12453.9		1.09±0.77	2.49±1.07	3.18±2.23
13101.25	0.59±0.67	13.59±11.47	0.85±1.07	
13491.7	2.91±1.13	5.06±1.75	0.86±0.59	
17783.38	1.03±0.46	2.64±0.69	0.46±0.49	1.76±0.55
28023.28		0.96±0.17	0.68±0.18	0.65±0.25

表 4-5 在顺铂肾损害、马兜铃酸肾损害中共同存在的差异表达蛋白质 ($\bar{x} \pm s$)Tab.4-5 The common differentially expressed proteins in cisplatin kidney damage and aristolochic acid kidney damage ($\bar{x} \pm s$)

m/z	正常对照组	顺铂模型组	PNS 治疗组	空白对照组	马兜铃酸模型组	PNS20w	强的松组
1428		3.99±2.61	1.99±0.89		0.26±0.45	1.10±0.53	4.43±2.85
12151	43.16±28.7	14.43±21.0		40.89±19.66	70.52±24.23		30.13±17.98
12453	3.52±1.77	0.90±1.36			1.09±0.77	2.49±1.07	3.18±2.23
18695	0.28±0.05	0.07±0.09	0.22±0.13		0.90±0.50		0.06±0.13
21525		0.25±0.09	0.15±0.11		0.57±0.24		0.27±0.12

表 4-6 与乙酰基辅酶 A 结合蛋白匹配的 8 个肽段

Tab.4-6 the 8 peptides which match with acetyl-coA-binding protein

Accession	Mass	Score	Protein name					
P11030	10021	128	Acyl-CoA-binding protein					
Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Ions	Peptide
1034.4790	1033.4717	1033.4981	-0.0264	54	61	1	---	K.AKWDSWNK.L
1237.5673	1236.5600	1236.6601	-0.1001	73	82	1	---	K.TYVEKVEELK.K
1911.9508	1910.9435	1911.0062	-0.0626	34	51	0	---	K.QATVGDVNTDRPGLLDLK.G
1911.9508	1910.9435	1911.0062	-0.0626	34	51	0	98	K.QATVGDVNTDRPGLLDLK.G
1985.8655	1984.8582	1984.9241	-0.0658	18	33	0	---	K.TQPTDEEMLFYSHFK.Q
2001.8771	2000.8698	2000.9190	-0.0492	18	33	0	---	K.TQPTDEEMLFYSHFK.Q + Oxidation (M)
2227.0344	2226.0271	2226.1031	-0.0759	16	33	1	---	R.LKTQPTDEEMLFYSHFK.Q
2243.0479	2242.0406	2242.0980	-0.0574	16	33	1	---	R.LKTQPTDEEMLFYSHFK.Q + Oxidation (M)

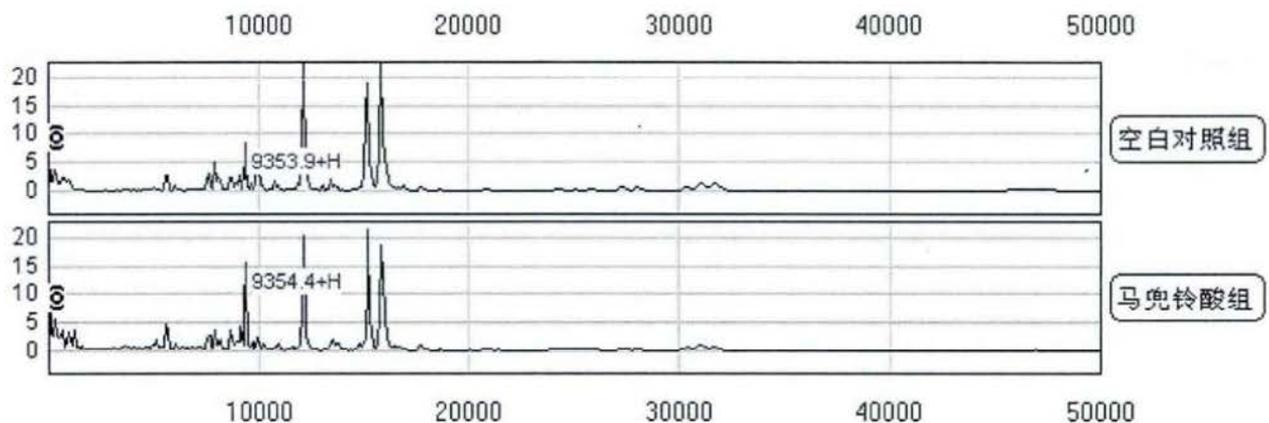


图 4-1 m/z 9361.14 蛋白质在马兜铃酸模型组比空白对照组表达上调

注：纵坐标为蛋白质峰强度，横坐标为蛋白质荷质比。

m/z 9361.14 upregulation of expression in aristolochic acid model group compared with blank control group

Horizontal coordinate is m/z, Vertical coordinate is Peak intensity.

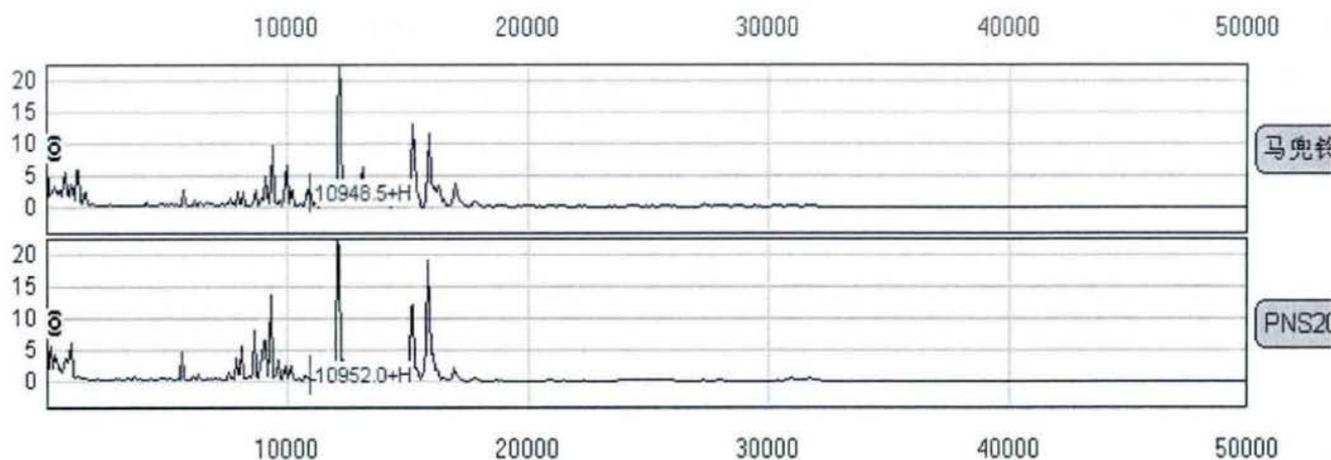


图 4-2 m/z 10964.34 蛋白质在 PNS20w 组中表达较马兜铃酸模型组下调

注：纵坐标为蛋白质峰强度，横坐标为蛋白质荷质比。

m/z 10964.34 downregulation of expression in PNS20w group compared with aristolochic acid model group

Horizontal coordinate is m/z , Vertical coordinate is Peak intensity.

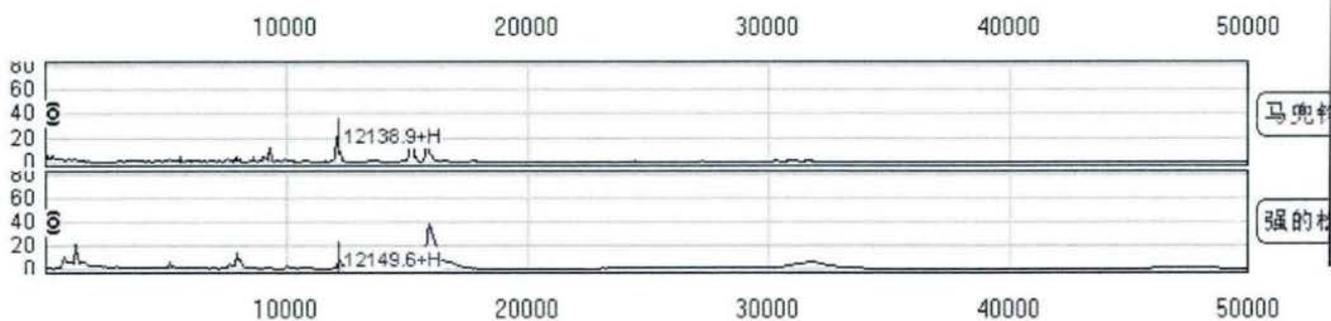


图 4-3 m/z 12151.08 蛋白质在强的松组中表达较马兜铃酸模型组下调

注：纵坐标为蛋白质峰强度，横坐标为蛋白质荷质比。

m/z 12151.08 downregulation of expression in prednisone group compared with aristolochic acid model group

Horizontal coordinate is m/z , Vertical coordinate is Peak intensity.

(注：表 4-3 中的结果显示， m/z 约为 1234.96 的蛋白质分子可能是区分顺铂模型组和正常对照组的候选差异蛋白。由于 SELDI-TOF-NS 激发得到的蛋白分子带单电荷，则蛋白质 m/z 值与分子量 M 数值相符，可认为 m/z 12138.9 的蛋白分子质量 M 为 12138.9 Da。此外，氨基酸的平均分子量约 110 Da，所以表 4-1、表 4-3 中的 m/z 12151.08 与图 4-3 中 m/z 12138.9、 m/z 12149.9 上下相差不超过 100 Da，即可认为是同一蛋白分子。在图 4-1 和图 4-2 中标出的差异表达蛋白质的情况与上述的相同。)

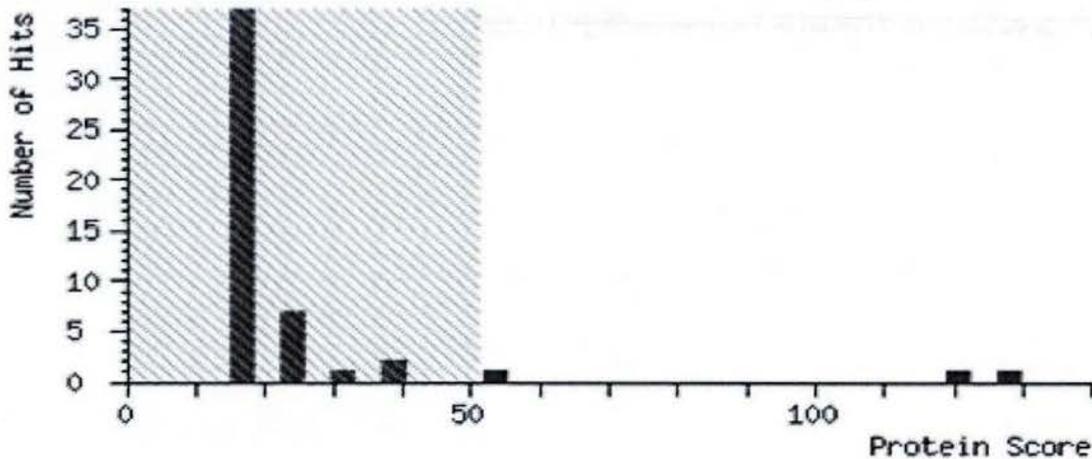


图 4-4 蛋白 m/z 10082.07 的质谱鉴定结果

横坐标为匹配分数，纵坐标为蛋白质种数

Figure4-4. The MS identification results of m/z 10082.07

Horizontal coordinate is protein score, Vertical coordinate is number of hits.

4 讨论

4.1 差异表达蛋白质的筛选

理论上，蛋白质是体内组织、细胞生命活动的具体体现和执行者，当体内正常组织、细胞受到药物的损害而发生功能或状态的改变时，其组织、细胞内蛋白质的数量、种类等也可能会产生变化。在本课题的“第三部分”实验中观察到马兜铃酸模型组的血清 BUN、SCr 等指标显著高于空白对照组，病理学检查发现该组的肾组织发生严重病变，说明 AA 对肾脏造成了严重的损害；PNS 则可以减轻马兜铃酸对大鼠肾脏组织的损害；推测在以上各组大鼠肾脏组织的蛋白质水平上会产生相应的改变。因此本部分实验采用 SELDI-TOF-MS 技术筛选差异表达蛋白质，结果发现在马兜铃酸模型组与空白对照组之间、PNS 20w 组与马兜铃酸模型组之间，以及马兜铃酸模型组和强的松组之间均存在多种差异表达蛋白质；这也说明 SELDI 技术

用于筛选差异表达蛋白质的可行性。已经有不少关于采用该技术成功筛选差异蛋白质的报道^[46、47、68]，但主要用于与肿瘤相关的研究中^[48、49]，用于微生物方面的研究也不少^[69、70]，而用于药源性疾病方面的研究极少见报道。

对这些蛋白质进行分离鉴定，了解它们的性质与功能，将有助于阐明 AAN 的发生发展以及 PNS 的保护作用机制。

4.2 各组大鼠之间的差异表达蛋白质

(1) PNS16w 组与 PNS 20w 组之间、强的松组与 PNS 20w 组之间大鼠的肾组织未检测出表达差异蛋白质，原因可能是：① 这些组别的小分子量蛋白质的表达确实无显著性差异。② 由于本实验的动物例数较少，影响差异表达蛋白的筛选，导致一些差异表达的蛋白质未能检出。③ 一些与 CM10 芯片的特性不相匹配的蛋白质丢失。④ 差异表达的蛋白质不在 SELDI 的检测范围，SELDI 技术筛选的是小分子量蛋白质，可弥补二维电泳对低丰度、极小 (<10 000Da) 等蛋白质无法鉴定的不足。

(2) 强的松组与马兜铃酸组之间的差异蛋白

在临床上强的松是用于治疗肾小球疾病的主要药物^[55、56]，有报道^[57]用强的松治疗马兜铃酸肾病，可改善其肾功能；而实验研究^[58]也表明强的松可改善马兜铃酸肾损害大鼠肾功能，以及减轻肾组织的纤维化；在本课题的“第三部分”实验结果发现，强的松对马兜铃酸肾损害大鼠的肾功能具有一定的保护作用。由此推测，马兜铃酸以及强的松对肾脏组织的影响可能会体现在蛋白质的改变上；通过采用 SELDI 技术筛选，结果发现在强的松组与马兜铃酸组之间的肾组织差异蛋白峰有 41 个。

本实验筛选出来的强的松组与马兜铃酸组之间的肾组织差异蛋白质的个数多于其它组别的，推测可能与以下原因有关：强的松在体内具有抗炎、抗过敏、抑制结缔组织增生，以及促进蛋白质分解等多种药理作用^[71]，并涉及到水、电解质、糖的代谢等，影响范围广。

4.3 共同存在的差异表达蛋白质

(1) 在表 4-1、表 4-2 中共同存在的差异表达蛋白质：见表 4-4

在 PNS 20w 组与马兜铃酸组之间的 15 个差异表达蛋白中，有 5 个出现在表 4-1 中，它们的 m/z 分别为 1388.329、1522.736、7731.179、10964.34、17783.38。这 5 个蛋白质在马兜铃酸组较空白对照组上调或下调，而 PNS 可将其回调到空白对照组的水平。说明马兜铃酸可能通过改变这些蛋白质的表达而产生肾毒性，或者由于马兜铃酸对肾脏的损害而改变了它们的表达；PNS 可能通过调节这些表达改变的蛋白质，使之回归正常而起到保护肾脏的作用，或者是由于 PNS 对肾脏的保护作用而使蛋白质的表达回归正常。

(2) 在表 4-2、表 4-3 中共同存在的差异表达蛋白质：见表 4-4

在 PNS20w 组与马兜铃酸模型组大鼠的 15 种差异表达蛋白质中（表 4-2），有 7 种蛋白质出现在表 4-3 中，它们分别 m/z 为 1282.093、1428.885、1522.736、10964.34、12453.9、17783.38、28023.28 等，其中 m/z 分别为 1282.093、1428.885、1522.736、12453.9 的蛋白质在强的松组、PNS20w 组均较模型组表达上调， m/z 分别为 10964.34、17783.38、28023.28 的蛋白质在强的松组、PNS20w 组均较模型组表达下调。强的松组与 PNS20w 组之间不存在表达差异蛋白质。推测 PNS 对马兜铃酸肾损害的作用可能有一部分与强的松的相似。

(3) 在表 4-1、表 4-3 中共同存在的差异表达蛋白质：见表 4-4

在马兜铃酸模型组与空白对照组大鼠的 23 种差异表达蛋白质中（表 4-1），有 14 种出现在表 4-3 中，它们的 m/z 分别为 1522.74、5085.35、7440.14、9361.14、10082.07、10185.1、10227.8、10774.05、10816.75、10964.34、12151.08、13101.25、13491.7、17783.38 等，这 14 个蛋白质在马兜铃酸模型组较空白对照组表达上调或下调，而强的松可将其回调。推测马兜铃酸可能通过改变这些蛋白质的表达而产生肾毒性，或者是马兜铃酸对肾脏的损害而改变了它们的表达；强的松可能通过调节这些表达改变的蛋白质，使之回归正常而起到保护肾脏的作用，或是强的松的保护作

用而使蛋白质的表达回归正常。

(4) 在表 4-1、表 4-2、表 4-3 中共同存在的差异表达蛋白质：见表 4-4 m/z 分别为 1522.74、10964.34、17783.38 的 3 个蛋白质均同时出现在表 4-1、表 4-2 和表 4-3 中，其中 m/z 1522.74 在马兜铃酸模型组中表达下调，而在 PNS 20w 组、强的松组中均表达上调；m/z 10964.34、m/z 17783.38 在马兜铃酸模型组中表达上调，在 PNS 20w 组、强的松组中均表达下调。提示马兜铃酸可能通过改变这些蛋白质的表达而损害肾脏，PNS、强的松可能通过调节这些蛋白质的表达，对肾脏起保护作用。由表 4-4 可知，PNS 可使这 3 个蛋白质回调到空白对照组的水平，而强的松使其回调的程度更大。

4.4 在顺铂肾损害、马兜铃酸肾损害中存在的共同差异表达蛋白质

经比较表 2-2、表 2-3，以及表 4-1、表 4-2、表 4-3 后，发现共有 5 个差异表达蛋白质在“第二部分”和“第四部分”实验中均被筛选出来，即为这两部分实验的共同的差异表达蛋白质（见表 4-5），说明在顺铂肾损害、马兜铃酸肾损害的发生或发展过程中均涉及到一些共同的蛋白质改变。

共同的差异表达蛋白质，① 例如 m/z 12151 蛋白质在顺铂模型组的表达较正常对照组下调，而在马兜铃酸模型组的表达却较空白对照组上调。②PNS 在这两个肾损害模型中的作用似乎有所不同，例如在顺铂肾损害模型中，PNS 可使蛋白质 m/z 1428 的表达下调，而在马兜铃酸肾损害模型中，PNS 却使 m/z 1428 上调，与强的松在这个肾损害模型中的作用相同（强的松也使该蛋白质上调）。具体原因有待进一步研究。

4.5 筛选出的差异表达蛋白质的特点

(1) 有关马兜铃酸肾损害的差异表达蛋白质的研究极少。孙世仁等报道^[13]，在马兜铃酸组与正常组大鼠的肾组织中筛选出多种差异表达蛋白质。该报道采用的是二维电泳技术，无法分离鉴定低丰度、极小（小于 10 000Da）蛋白质；本实验采用的是 SELDI-TOF-MS 技术，该技术对筛选小分子量蛋白质特别有效的特点，因此以上两种技术可相互弥补各自的不足。本部分

筛选出不少小分子蛋白质，其中部分蛋白质分子量在 2000 Da 以下，而且表达量低，在接下来的蛋白质分离鉴定过程中容易损失。但也正是小分子量蛋白质，它们在体内非常活跃，对维持机体的正常生理机能起非常重要的作用，因此这些小分子量蛋白质的分离鉴定将为阐明马兜铃酸肾损害机制，提高其防治水平提供重要的基础。

(2) 与本课题的“第二部分”实验中筛选出来的差异表达蛋白质的特点一样，本部分筛选出的部分差异表达蛋白质的 m/z 很接近，可能是来源于同一个家族的蛋白质，可考虑对其进行分离鉴定以了解其性质与作用。

4.6 差异表达蛋白质的分离鉴定

酰基辅酶A结合蛋白 (ACBP) 是一个小的细胞内的蛋白质，能特异性结合和运输中长链酰基辅酶A酯，在细胞内酰基辅酶A运输和储存发挥重要作用。以往的研究表明ACBP在体内广泛表达，但在脂质的细胞类型以及在许多上皮细胞中表达尤其高；ACBP对于维持完整尿液浓缩能力是必要的；ACBP (-/-) 小鼠的尿液浓缩能力不足可能是由于肾水通道蛋白3减少而导致在集合管基底膜受损流出^[72]。脂肪酰基辅酶A酯在细胞稳态方面非常重要，是脂质代谢和翻译后蛋白质修饰的中间体；研究发现，在体外重组酰基辅酶A结合蛋白有效地结合棕榈酰辅酶A，这与配体结合的能力参与了红细胞膜磷脂酰胆碱重塑^[73]。由此可知，乙酰辅酶A结合蛋白在体内参与脂肪代谢、蛋白质修饰、细胞膜修复重建，以及水、电解质平衡等。

本实验中， m/z 10082.07 目标蛋白质经鉴定为乙酰辅酶A结合蛋白。该蛋白质在马兜铃酸模型组中较空白对照组低表达，而在强的松组中表达上调。马兜铃酸可能通过减少乙酰辅酶A结合蛋白的表达，损害大鼠的肾功能；而强的松提高乙酰辅酶A结合蛋白的表达，可能对肾功能起保护作用。

第五部分 三七总皂苷对顺铂损害肾小管上皮细胞的保护作用研究

1 材料

1.1 实验对象

人肾小管上皮细胞株 (HK-2), 购自中南大学湘雅中心实验室。

1.2 药品与主要试剂

三七总皂苷粉针剂	广西梧州制药(集团)股份有限公司, 批号: 20110115。临用前以生理盐水配制。
顺铂粉针剂	齐鲁制药有限公司, 批号: 1020032DB 临用前用生理盐水溶解。
生理盐水	徐州莱恩药业有限公司, 批号: 1005281
DMEM 培养基	美国 Hyclone 公司
新生小牛血清	美国 Hyclone 公司
胰蛋白酶	Sigma 公司
细胞活性计数试剂盒	CCK8, 同仁公司产品
三氟乙酸(TFA)	色谱级产品, 美国 Sigma 公司
SPA	色谱级产品, 美国 Sigma 公司
HEPES	色谱级产品, 美国 Sigma 公司
Tris- HCL	色谱级产品, 美国 Sigma 公司
CHAPS	色谱级产品, 美国 Sigma 公司
DTT	色谱级产品, 美国 Sigma 公司
HPLC 水	色谱级产品, 美国 Sigma 公司

尿素 (urea)	色谱级产品, 美国 Sigma 公司
醋酸钠 (NaAC)	色谱级产品, 美国 Sigma 公司
盐酸 (HCL)	色谱级产品, 美国 Sigma 公司
乙氰 (CAN)	色谱级产品, 美国 Sigma 公司
溴酚蓝	色谱级产品, 美国 Sigma 公司
N, N' -甲叉双丙丙烯 酰胺	美国 Amresco 批号: 0172
SDS	美国 Amresco 批号: 0227
Tris	北京 Solarbio 批号: T8060
Tricine	北京 Solarbio 批号: T8190
考马斯亮蓝 R250	美国 Amresco 批号: 0615
甲醇	色谱级产品, 美国 Fisher Scientific 公司
过硫酸铵	Sigma 批号: A6761
TEMED	美国 Amresco 批号: 0761

1.3 主要仪器

细胞培养瓶	国产
超净工作台	国产
倒置光学显微镜	Axiovert 200 型, 德国 Zeiss 公司
CO ₂ 培养箱	Thermo Forma, 美国 Forma 公司
酶联免疫检测仪	Model-450, 美国 Bio-Rad 公司
冷冻高速离心机	型号: Eppendorf 5810R 德国 Eppendorf Cetrifuge 公司
蛋白质浓度测定仪	Narodrop 2000 (ND-2000)
紫外 spectrophotometer	Thermo scientific 公司

冷冻真空干燥机	LGJ-18, 北京松源华兴科技发展有限公司
Ultra Micro Spin Column (C18 柱)	郑州英诺高科有限公司
蛋白质芯片	CM-10 型弱阳离子交换芯片 美国 Cuphergen 公司
蛋白芯片阅读机	Protein Chip Biology System(PBS II C) 型, 美国 Cuphergen 公司
质谱仪	5800 MALDI-TOF-MS/MS ABSCIX 公司

2 方法

2.1 实验用HK-2细胞株培养

(1)HK-2细胞株用含10%新生牛血清的DMEM 培养液 (pH 7.4), 于37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

(2) 吸弃旧的培养液, 加入少许消化液 (0.25%胰酶), 镜下观察细胞, 若细胞已经相互分离, 间隙加大、胞体趋于变圆的时候, 即刻终止消化。视生长状况每 2 d 或 3d 用0.25%胰酶消化一次。

(3) 弃掉消化液, 以 1×PBS 清洗细胞1到2次。

(4) 加入培养液后用弯头的吸管吹打细胞, 以制备单细胞悬液。

(5) 将细胞悬液转入到大培养瓶, 于37℃培养箱内培养。

⑥ 利用对数生长期的细胞进行实验。

2.2 顺铂、PNS对HK-2细胞增殖的影响

(1) 实验分为3组 (n=6), ① 顺铂细胞组, HK-2细胞分别在含50、25、

12.5、6.25、3.12ug/ml 顺铂的培养液中培养；② PNS细胞组：HK-2细胞分别在含6.25、12.5、25、50、100ug/L PNS的培养液中培养；③空白细胞组，在含10%新生小牛血清的DMEM 培养液中培养。以上各组细胞均培养48 h。（根据预实验的结果，在培养48 h时，顺铂、PNS对HK-2 细胞的作用最显著。）

(2) 加入WST-8 试剂 20ul，再继续培养 3 h。

(3) 置于酶标仪检测，检测波长490 nm，参比波长 630 nm，记录光密度OD值。实验重复3次。

2.3 PNS 对顺铂抑制HK-2细胞增殖的影响

(1) 实验分为3组(n=6)：① 空白细胞组，在含10%新生小牛血清的DMEM 培养液中培养48 h；② 顺铂细胞组，细胞在含顺铂 12.5ug/L和10%新生小牛血清的DMEM培养液中培养48 h（根据以上“2.2 顺铂、PNS对HK-2细胞增殖的影响”的结果，选择顺铂对细胞增殖抑制达非常显著(P<0.01)作用时的剂量)；③ 顺铂PNS 组：细胞在含顺铂12.5ug/L的10%新生小牛血清的DMEM培养液中培养12 h后，加入PNS（12.5ug/L的、50ug/L、100ug/L），继续培养48 h。

(2) 加入WST-8 试剂 20ul，再继续培养 3 h。

(3)置于酶标仪检测，检测波长 490 nm，参比波长 630 nm，记录光密度 OD 值。实验重复 3 次。

2.4 细胞差异表达蛋白质的筛选与鉴定

2.4.1 所用制剂的配制

(-) 细胞裂解液的配制：25 ml (9 M Urea、1%W/V DTT、4%W/V CHAPS)

(1) 称取 Sigma 级 Urea (MW 60.06，终浓度为 9 mol/L)，加入 1ml Sigma 级 Tris-HCl 和 HPLC 水 15 ml，并充分溶解（注意：加热溶解时温度不能大于 37 °C；如果难溶则添加少量的 HPLC 水）；

(2) 于上述溶液中加入 1.00 g CHAPS (终浓度为 4.0 %)，充分溶解

后再用 HPLC 水定容至 25 ml。

(3) PH 调至 9.0, 并加入 1 片蛋白酶抑制剂;

(4) 取出 12.5 ml 上述溶液, 加入 Sigma 级 DTT 0.125 g (终浓度为 1.0%)。

(5) 把溶液分装入 1.5 ml EP 管 (每管 1 ml), 做好标记后于 -80°C 保存以防反复冻融。

(二) SPA 饱和溶液、CM10 buffer 溶液 (100mM NaAC pH4.0) 的配制

按照本论文的“第二部分”中的方法配制 SPA 饱和溶液、200 ml 的 CM10 buffer 溶液。

2.4.2 肾小管上皮细胞的裂解

取本实验中培养的以下三组细胞进行差异表达蛋白质的筛选鉴定:

①空白细胞组(含 10%新生小牛血清的 DMEM 培养液中培养 48 h);
②顺铂细胞组(含顺铂 $12.50\ \mu\text{g/L}$); ③顺铂 PNS 细胞组(含 $12.50\ \mu\text{g/L}$ 顺铂培养 12h 后, 加入 PNS $50\ \mu\text{g/L}$ 继续培养 48h)。

(1) 直接用预冷的 PBS 将培养的 HK-2 细胞冲洗 3 次。

(2) 按培养瓶底面积 每 1 平方厘米加入 $10\sim 15\ \mu\text{l}$ 的细胞裂解液, 于冰上静置 30 min; 快速混匀器混合 5 秒, 重复 1 次, 4°C 、12 000 rpm/min 离心 20 min。

(3) 取少量上清用于测定蛋白质的浓度, 其余上清液分装冻存于 -80°C 备用。临用前将蛋白质调整至同一浓度。

3.2 所用制剂的配制

按照本论文“第二部分”实验中的方法, 配制组织裂解液、CM10 buffer(100mM NaAC, pH4.0)、SPA 饱和溶液、Tricine-SDS-PAGE 凝胶贮存液、标本上样缓冲液 (0.25mol/L Tris·HCl pH6.8, 10%SDS, 0.5mol/L 二硫叔糖醇, 50%甘油, 0.5%溴酚蓝)、电泳缓冲液。

2.4.3 肾小管上皮细胞差异表达蛋白质的筛选

采用 SELDI-TOF-MS 法, 对各组标本进行差异表达蛋白质谱检测。具体检测方法与本论文的“第二部分”实验中的相同。

2.4.4 肾小管上皮细胞差异表达蛋白质的分离纯化

从 CM10 芯片检测到的差异表达蛋白质中, 筛选鉴定候选蛋白质, 入选标准为: ① P 值 < 0.05 , 而且尽可能小。② Mean 值大于 SD 值。③ Mean 值大, 而且 Mean 值之比大于 2。

采用 Tricine-SDS-PAGE 凝胶分离纯化差异表达蛋白质。具体实验方法参见本论文的“第二部分”实验。

2.4.5 肾小管上皮细胞差异表达蛋白质的质谱鉴定

目标蛋白质经过胶内酶解后, 采用 MALDI-TOF-MS/MS 获取目标蛋白质的肽图谱, 最后通过 Mascot 软件查询 NCBI、SWISS-PROT 数据库进行搜索比对。具体实验方法参见本论文的“第二部分”实验。

2.5 统计学分析方法

在细胞培养的结果部分, 采用 $\bar{x} \pm s$ 表示各组所得计量数据, 用 SPSS13.0 软件处理, 采用 t 检验进行两组间均数的比较。蛋白质的质荷比以 m/z 值表示, 采用软件 Biomarker Wizard 对相同 m/z 的蛋白在各组之间峰值差异含量进行快速计算, 使用 P 值表示其差异程度, $P < 0.05$ 者为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 顺铂、PNS 对 HK-2 细胞增殖的影响

顺铂对 HK-2 细胞的增殖有抑制作用, 而且抑制作用随顺铂浓度的增加而增强。PNS 对 HK-2 细胞的增殖有促进作用, 且作用随 PNS 浓度的增加而增大。见表 5-1。顺铂浓度在 $12.5 \mu\text{g/L}$ 时, 对 HK-2 细胞增殖的抑制作用可达到非常显著差异 ($P < 0.01$), 所以选择该浓度作为下一步实验“PNS

对顺铂抑制 HK-2 细胞增殖的影响”中的顺铂的浓度。

3.2 PNS 对顺铂抑制 HK-2 细胞增殖的影响

PNS 可减轻顺铂对 HK-2 细胞增殖的抑制作用，随着 PNS 浓度的增加作用增强，见表 5-2。

表 5-1 顺铂、PNS 各浓度组 HK-2 细胞的 OD 值 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.5-1 the OD of HK-2 cell in cisplatin group, PNS group ($\bar{x} \pm s$)

顺铂 $\mu\text{g/L}$	OD 值	PNS 浓度 ($\mu\text{g/L}$)	OD 值
0	0.88 \pm 0.02	0	0.75 \pm 0.01
3.12	0.83 \pm 0.03*	6.25	0.80 \pm 0.01
6.25	0.76 \pm 0.04*	12.5	0.89 \pm 0.05**
12.5	0.72 \pm 0.02**	25.0	0.96 \pm 0.07**
25.0	0.58 \pm 0.02**	50.0	0.99 \pm 0.02**
50.0	0.40 \pm 0.03**	100.0	1.21 \pm 0.03**

注：与空白细胞组比较，*为 $P < 0.05$ ，**为 $P < 0.01$ 。

5-2 顺铂 PNS 细胞组的 OD 值 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.5-2 the OD of HK-2 cell in cisplatin PNS group ($\bar{x} \pm s$)

PNS ($\mu\text{g/L}$)	OD 值
0	0.35 \pm 0.02
6.12	0.39 \pm 0.02*
12.5	0.55 \pm 0.01**
25	0.61 \pm 0.03**
50	0.64 \pm 0.04**
100	0.68 \pm 0.01**

注：与空白细胞组比较，*为 $P < 0.05$ ，**为 $P < 0.01$ 。

3.3 各组 HK-2 细胞之间差异表达蛋白质的筛选与分离鉴定

本实验分别取空白细胞组、顺铂细胞组、顺铂 PNS 细胞组的标本，在 CM 10 蛋白质芯片上点样后进行差异表达蛋白质的检测；结果发现从芯片上捕获的 HK-2 细胞的蛋白质质谱图中，有的细胞组的蛋白峰数量少、强度

小,未达到统计学分析的要求,这可能是人为因素造成的,故本部分未能成功筛选差异表达蛋白质。

4 讨论

4.1 体外培养细胞

由于机体内细胞的生长状态、生物学活性等受到体内各种复杂因素的影响,所以体外培养的细胞株不能完全反映体内细胞的特性,但体外培养的细胞株成分较单一、均质性好,避免了因组织细胞成分复杂等而造成对实验结果的影响;而且有的实验只能在体外进行^[74]。细胞体外培养可分为原代培养和传代培养。由于组织、细胞刚离体,其生物学性状尚无明显改变^[75],能很好地显现与亲体组织紧密结合等形态学特征,一定程度上反映了体内的状态,这是细胞原代培养的最大优点。但细胞原代培养也有其不足之处,例如机体组织一般由多种细胞成分组成,即便是同一类型的细胞也仍具异质性,以及细胞群生长效果可因个体差异或其他的原因而不一致等,这些原因可对实验的结果造成一定的影响。细胞传代培养因具有可繁殖增加细胞数量、细胞的同质性较好,以及可进行特征的鉴定和冷冻保存等优点,至今仍被广泛使用^[76、77、78]。本实验中考虑到选择人的TEC来培养更接近临床,故采用人的TEC来建立细胞体外培养模型;由于人的肾脏组织来源困难,在本实验中采用人的TEC进行原代培养不具备可行性,因此我们采用HK-2细胞株进行传代培养,这样还可避免原代培养中细胞分离纯化的繁琐过程,减少了其它细胞对实验造成的影响,同时可节省实验时间,而且容易获得足够的细胞数。

肾小管是顺铂肾损害的主要靶部位^[79、4],而肾小管主要由TEC(肾小管上皮细胞)组成。如“第一部分”实验结果中所见,顺铂模型组的TEC出现片状坏死,细胞内线粒体肿胀、线粒体脊模糊不清或完全消失,而用PNS

干预后, TEC 的病理学变化明显减轻, 表明顺铂可严重损害 TEC, 而 PNS 对其具有保护作用。因此本实验通过体外培养 TEC, 建立顺铂损害 TEC 的体外模型, 并给以 PNS 干预, 观察顺铂、PNS 对细胞增殖的影响, 探讨 PNS 对顺铂 HK-2 损害的保护作用, 并为后面的 TEC 差异表达蛋白质筛选与鉴定做好准备。

4.2 PNS 对顺铂损害 HK-2 细胞具有保护作用

本实验中, 顺铂显著抑制 HK-2 细胞的增殖, 且随着剂量的增加抑制作用越明显; 而 PNS 可减轻顺铂对 HK-2 细胞增殖的抑制。

有报道^[80] PNS 对顺铂肾小管细胞损伤有一定的保护作用, 顺铂可损伤原代培养的兔肾小管细胞的刷状缘、溶酶体, 以及降低细胞活性; 而 PNS 可保护顺铂对 TEC 的活力和溶酶体的损伤, 但对顺铂损害 TEC 的刷状缘没有保护作用。PNS 可预防顺铂的肾毒性, 其机制是可能是降低顺铂导致的 DNA 链间交联、DNA-蛋白交联和钙离子超载^[13]。

4.2 肾小管上皮细胞差异表达蛋白质的筛选

对于体外培养的细胞, 国内外均有采用 SELDI-TOF-MS 技术成功筛选差异表达蛋白质的报道^[68、81、82]。张强^[82]等采用 SELDI-TOF-MS 技术对正常肾细胞株、肾癌细胞株的差异表达蛋白进行检测, 发现这两种细胞株之间存在一系列的差异表达蛋白质; 通过体外培养肝癌细胞株、转染了 HBV 的肝癌细胞株, 利用蛋白质芯片飞行质谱的技术来检测分析差异表达的蛋白质, 结果发现在这两个细胞株之间筛选出 19 个差异表达蛋白^[83]。但这些研究中主要是与肿瘤有关^[84], 而与药源性疾病相关的研究极少见报道。

在本实验中, 顺铂可显著降低 HK-2 细胞的增殖, 而 PNS 对 HK-2 细胞的增殖有促进作用, 同时可减轻顺铂对 HK-2 细胞增殖的抑制作用。有报道^[8]顺铂对原代培养的兔肾小管细胞的刷状缘、溶酶体有损伤作用, 而 PNS 可保护顺铂对 TEC 的损伤。从理论上讲, 体外培养的细胞在顺铂、PNS 等干预后, 细胞的增殖发生显著改变, 这些改变可能会体现在细胞内的蛋白

质水平上, 有的变化可能只存在于细胞内, 而不代谢或分泌到细胞外, 这部分的蛋白质可能是与顺铂肾损害以及 PNS 的保护作用密切相关的调节蛋白质和功能蛋白质。本实验培养了 HK-2 细胞, 并给以顺铂、PNS 干预, 采用 SELDI-TOF-MS 技术检测分析顺铂细胞组分别与空白细胞组、顺铂 PNS 细胞组之间的差异表达蛋白质, 旨在探讨顺铂损害肾小管上皮细胞的机制, 以及 PNS 保护作用的机制。

4.3 存在的不足与改善措施

本部分实验在差异表达蛋白质的筛选中, 发现 CM10 蛋白芯片上的蛋白峰数量较少、强度较小, 未能达到统计学分析的要求。原因可能与下列人为因素有关: (1) 最主要的原因可能是标本中蛋白质浓度低。通过体外培养获得的细胞数量较肾组织的相对少, 细胞裂解后标本中的蛋白质浓度低, 在本次实验的标本中蛋白质的浓度为 $40\sim 50\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$, 明显低于肾组织标本的 $60\sim 70\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。由于当时考虑到标本量少, 未进一步浓缩以提高蛋白质浓度。(2) 蛋白质在标本处理和上样等过程中丢失。标本自冰箱取出后, 经过多个处理环节, 包括多次的离心等, 每一个环节都可使蛋白质损失。(3) 在给芯孔点 SPA 时, 可能没点好。针对以上这些可能的原因, 在下一步的研究中, 可以通过将细胞裂解标本进一步浓缩, 提高标本的蛋白质浓度后, 再进行差异蛋白的筛选; 在操作过程中, 每一个环节都要注意, 尽量减少蛋白质的丢失; 尤其在给芯孔点 SPA 时, 要注意风干后点第二次, 同时枪头不要碰到芯孔。通过以上的改善措施, 相信会取得好的实验结果。

第六部分 全文总结

一、本课题取得的成绩及创新点：

1、实验结果表明，三七总皂苷对顺铂肾损害大鼠、顺铂损害 HK-2 细胞、马兜铃酸肾损害大鼠均有一定的保护作用。

2、顺铂模型组分别与正常对照组、PNS 治疗组之间存在多种肾组织的差异表达蛋白质。马兜铃酸模型组分别与空白对照组、PNS 20w 组、强的松组大鼠之间均存在多个肾组织的差异表达蛋白质。

3、在“顺铂肾损害”、“马兜铃酸肾损害”这两部分实验中筛选出 5 个共同的差异表达蛋白质，说明在这两种药物对肾脏的损害过程中可能涉及到一些共同的蛋白质改变。

4、在 PNS 治疗组较顺铂模型组中表达上调 2 倍以上的蛋白质 m/z 10815.42 被鉴定为线粒体的热休克蛋白；在顺铂模型组中较正常对照组表达上调的蛋白质 m/z 16021.67 被鉴定为血红蛋白 β 1 亚基和血红蛋白 β 2 亚基。这两种蛋白质与顺铂肾损害、PNS 保护作用的关系有待进一步的研究。在马兜铃酸模型组较空白对照组低表达，而在强的松组中表达上调的蛋白质 m/z 10082.07 被鉴定为乙酰辅酶 A 结合蛋白，其在马兜铃酸肾损害中的作用有待进一步的研究。

5、本课题最大的创新点是在药源性疾病的发病机制、中医药对药源性疾病的防治研究中引进了 SELDI-TOF-MS 等高通量检测的技术，并成功筛选出顺铂肾损害、马兜铃酸肾损害的肾组织差异表达蛋白质，以及通过 MALDI-TOF-MS/MS 技术鉴定出部分的差异表达蛋白质，从而从蛋白质组学的角度，系统、全面地探讨顺铂肾损害、马兜铃酸肾损害的机制以及 PNS 的保护作用机制。

二、本课题研究存在的缺点：

1、本实验采用 CM10 蛋白芯片结合 SELDI 技术筛选肾组织差异表达蛋白，当 SELDI-TOF-MS 设置的激光强度为 190，检测灵敏度 8 时，可以良好的检测到 CM10 芯片捕获的蛋白质质谱峰，蛋白质质谱峰主要集中在分子量 20000Da 以内，这说明 SELDI-TOF-MS 技术对筛选低分子量蛋白质是有效、可行的。

SELDI 技术对于筛选小分子的差异表达蛋白质很有效，国内外已有不少的研究采用 SELDI 技术筛选差异表达蛋白质。由于 SELDI 技术筛选的差异表达蛋白质多集中在 20 000Da 以下；不少差异表达蛋白质的 m/z 甚至小于 2000 Da，而且表达量低，在分离纯化过程中容易损失，因此后面的分离鉴定工作难度增大。

2、采用 SELDI 技术筛选的差异表达蛋白质中，由于不同类型的蛋白质芯片与蛋白质的相互作用不同，因此不同的芯片所捕获到的蛋白质有所不同，只采用一种类型的芯片来筛选蛋白质，可能会导致一些与芯片类型不相符的差异表达蛋白质分子丢失。

3、蛋白质芯片上的标本经过筛选差异表达蛋白质后，不能直接回收进行蛋白质结构的鉴定，因此筛选出来的差异表达蛋白质是属于已知的还是未知的蛋白质，以及其结构与功能等等信息仍是未明确，因此后续工作需要对筛选出的差异表达蛋白质进行纯化鉴定、功能研究。

4、细胞培养部分的差异表达蛋白质的筛选和鉴定实验没有成功，需要寻找原因和解决的办法，继续将这部分实验完成。

三、展望

虽然本实验只是取得了初步的研究结果，但可为以后的研究提供了新方向和思路，本课题接下来的工作可以往以下几个方面开展研究，相信随着实验的进一步开展，PNS 对顺铂、马兜铃酸肾损害的保护作用将逐渐得到

阐明。

1、继续对筛选出来的差异表达蛋白质进行分离和鉴定，例如采用电泳方法或色谱技术纯化出目标蛋白，再通过质谱鉴定获得目标蛋白质的肽指纹图谱，在蛋白质数据库中比对与其相匹配的蛋白质。随着对差异表达蛋白质的生物信息的了解，将逐渐了解PNS对顺铂、马兜铃酸肾损害保护作用的机制。

2、采用**Western blotting**，对鉴定出来的蛋白质例如线粒体热休克蛋白进行验证，以证实肾组织中是否真正存在该差异表达蛋白质。

3、可以从基因组学的角度进行研究。例如对鉴定出来的蛋白质，可了解其相应基因的表达是否与蛋白质的表达一样存在差异。

4、对鉴定出来的蛋白质进行有关功能验证的实验，以明确其与PNS对顺铂、马兜铃酸肾损害的保护作用的关系。

参考文献

- [1] 陈新谦, 金有豫, 汤光, 主编. 新编药理学, 第 17 版, 北京: 人民卫生出版社, 2011 年, 760
- [2] Sánchez-González PD, López-Hernández FJ, López-Novoa JM, et al. An integrative view of the pathophysiological events leading to cisplatin nephrotoxicity[J]. *Crit Rev Toxicol.* 2011; 41(10): 803-821.
- [3] Sahu BD, Rentam KK, Putcha UK, et al. Carnosic acid attenuates renal injury in an experimental model of rat cisplatin-induced nephrotoxicity. *Food Chem Toxicol.* 2011 Dec; 49(12): 3090-3097.
- [4] Clark JS, Faisal A, Baliga R, et al. Cisplatin induces apoptosis through the ERK-p66shc pathway in renal proximal tubule cells. *Cancer Lett.* 2010; 297(2): 165-170.
- [5] Li HZ, Xia M, Han Y, Xu XG, Zhang YS. De novo urothelial carcinoma in kidney transplantation patients with end-stage aristolochic acid nephropathy in China. *Urol Int.* 2009; 83(2): 200-205.
- [6] Slade N, Moll UM, Brdar B, Zorić A, Jelaković B. p53 mutations as fingerprints for aristolochic acid: an environmental carcinogen in endemic (Balkan) nephropathy. *Mutat Res.* 2009 Apr 26; 663(1-2): 1-6.
- [7] 白羽, 张淑瑶, 任杰, 等. 三七总皂苷注射液治疗脑梗死的多中心研究. *中国新药与临床杂志*, 2001 年, 20(4): 257-259
- [8] Liu WJ, Tang HT, Jia YT, et al. Notoginsenoside R1 attenuates renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Shock*, 2010; 34(3): 314-320.
- [9] 仇琪, 赵宗江, 杨美娟. 三七总皂苷对阿霉素肾病大鼠肾组织 CTGF 蛋白及其 mRNA 表达的影响. *中华中医药学刊*, 2008, 26(11): 2358-2361.

- [10] Xie XS, Yang M, Liu HC, et al. Ginsenoside Rg1, a major active component isolated from *Panax notoginseng*, restrains tubular epithelial to myofibroblast transition in vitro. *J Ethnopharmacol*. 2009 Feb 25; 122(1): 35-41.
- [11] Feng Sheng-gang, Li Guang-ming. The effect of PNS on the Renal tubulointerstitial damage and inflammatory cell soakage. *Modern Preventive Medicine*, 2007, 34(18): 3449-3452.
- [12] 刘海燕, 陈孝文. 三七总甙对尿毒血清诱导的肾小管上皮细胞 TGF- β 、CTGF 基因表达和蛋白分泌的影响[J]. *中国药理学通报*, 2005, 21(11): 1366-1370.
- [13] Liu SJ, Zhou SW. *Panax notoginseng* saponins attenuated cisplatin-induced nephrotoxicity. *Acta Pharmacol Sin*, 2000 Mar; 21(3): 257-260.
- [14] 李元青, 马成杰, 陈信义. 三七活性成分抗肿瘤作用及其免疫学机制初探[J]. *北京中医药大学学报(中医临床版)*, 2008, 15(1): 17-19.
- [15] 刘丽丽, 刘艳娥, 房国涛. 三七总皂苷逆转乳腺癌细胞 MCF-7/ADM 多药耐药的实验研究[J]. *时珍国医国药*, 2008, 19(4): 954-956.
- [16] 苏丽娜, 刘华钢, 刘丽敏, 等. 三七总皂苷对慢性马兜铃酸肾病大鼠体内抗氧化作用的研究[J]. *齐鲁药事*, 2011, 30(4): 190-192.
- [17] 徐亚吉, 冯志强, 朱敏侠, 等. 三七总皂苷对马兜铃酸 I 诱导的人肾小管上皮细胞转分化的影响. *国际病理科学与临床杂志*, 2008年, 28(4): 282-286.
- [18] 徐亚吉, 冯志强, 古天明, 等. 三七总皂甙对马兜铃酸 I 诱导人肾小管上皮细胞转分化的作用及机制. *山东医药*, 2009年, 49(51): 7-9.
- [19] He NW, Zhao Y, Guo L, et al. Antioxidant, Antiproliferative, and Pro-Apoptotic Activities of a Saponin Extract Derived from the Roots

- of *Panax notoginseng* (Burk.) F.H. Chen. *J Med Food*. 2012, Apr;15(4):350-359.
- [20] 石凡华, 梁瑞兰, 高慧英, 等. 顺铂剂量与肾功能损伤相关性的实验观察. *潍坊医学院学报*, 2005年, 27 (4) : 262-263.
- [21] Masahiro Okuda, Koichi Masaki, Sachio Fukatsu, et al. Role of apoptosis in cisplatin-induced toxicity in the renal epithelial cell line LLC-PK1. *Biochemical Pharmacology*, 2000, 59 (2) : 195-201.
- [22] Kazuhiko Tsuruya, Toshiharu Ninomiya, Masanori Tokumoto, et al. Direct involvement of the receptor-mediated apoptotic pathways in cisplatin induced renal tubular cell death. *Kidney International*, 2003, 63 (1) : 72-82.
- [23] Hartmann JT, Fels LM, Knop S, et al. A randomized trial comparing the nephrotoxicity of cisplatin/ifosfamide-based combination chemotherapy with or without amifostine in patients with solid tumors. *Invest New Drugs*. 2000 Aug;18 (3) : 281-289.
- [24] 刘伟先, 赵靓, 张萍, 等. 氨磷汀预防顺铂化疗的血液毒性和肾毒性疗效观察. *山东医药*, 2011年, 51 (25) : 90-91.
- [25] Zhang J, Wang X, Lu H. Amifostine increases cure rate of cisplatin on ascites hepatoma 22 via selectively protecting renal thioredoxin reductase. *Cancer Lett*. 2008 Feb 18;260 (1-2) : 127-136.
- [26] Asna N, Lewy H, Ashkenazi IE, et al. Time dependent protection of amifostine from renal and hematopoietic cisplatin induced toxicity. *Life Sci*. 2005 Mar 4;76 (16) : 1825-1834.
- [27] Kim CS, Choi JS, Park JW, et c. Altered regulation of nitric oxide and natriuretic peptide system in cisplatin-induced nephropathy. *Regul Pept*. 2012 Feb 10;174 (1-3) : 65-70.

- [28] Sabiha Fatima, NA Arivarasu, Riaz Mahmood. Vitamin C attenuates cisplatin-induced alterations in renal brush border membrane enzymes and phosphate transport. *Human & Experimental Toxicology*. 2007, 26 (5) :419-426.
- [29] 席加喜, 刘晓霞, 杨玉芳, 等. 血栓通对顺铂肾损伤大鼠的肾功能和氧化指标的影响. *中国实验方剂学杂志*, 2012年, 18 (10) : 225-228
- [30] Chirino YI, Trujillo J, Sánchez-González DJ, et c. Selective iNOS inhibition reduces renal damage induced by cisplatin. *Toxicol Lett*. 2008 Jan 4;176 (1) :48-57.
- [31] Lee JE, Nakagawa T, Kita T, et c. Mechanisms of apoptosis induced by cisplatin in marginal cells in mouse stria vascularis. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 2004;66 (3) :111-118.
- [32] 周世文, 刘世杰. 牛磺酸对顺铂引起的原代培养兔肾小管上皮细胞膜流动性的影响. *中国药房*, 2001, 12 (8): 460-461.
- [33] 方国祥. 中毒性肾病. 人民卫生出版社, 2006:120-123.
- [34] Tang W, Shi YQ, Zou JJ, et al. Serum biomarker of diabetic peripheral neuropathy indentified by differential proteomics. *Front Biosci*. 2011 Jun 1;17:2671-2681.
- [35] Lim JY, Cho J Y, Paik YH, et al. Diagnostic application of serum proteomic patterns in gastric cancer patients by Protein Chip surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Int J Biol Markers*. 2007 Oct-Dec; 22 (4) :281-286.
- [36] Wang Z, Gall JM, Bonegio RG, et al. Induction of heat shock protein 70 inhibits ischemic renal injury. *Kidney Int*. 2011; 79 (8) :861-870.

- [37] Patel AB, Robertson WG, Choong S, et al. Heat-shock protein 25 ameliorates calcium oxalate crystal-mediated oxidative stress in renal epithelial cells. *BJU Int.* 2006; 98(5):1094-1099.
- [38] 张鸿彦, 赵达亚, 孙玲娣. 环孢霉素 A 诱导急性肾损伤大鼠肾脏热休克蛋白 70 的表达. *哈尔滨医科大学学报*, 2007, 41(2): 136-139.
- [39] 张鸿彦, 孙玲娣, 赵达亚. 庆大霉素诱导急性肾损伤大鼠肾脏热休克蛋白 70 的表达. *实用儿科临床杂志*, 2007 年, 22(5): 333-335.
- [40] Bruschi SA, Lindsay JG. Mitochondrial stress protein actions during chemically induced renal proximal tubule cell death. *Biochem Cell Biol.* 1994; 72(11-12):663-667.
- [41] Yan LJ, Rajasekaran NS, Sathyanarayanan S, et al. Mouse HSF1 disruption perturbs redox state and increases mitochondrial oxidative stress in kidney. *Antioxid Redox Signal.* 2005; 7(3-4):465-471.
- [42] Johnson R M, Goyette G Jr, Ravindranath Y, et al. Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H₂O₂ levels in erythrocytes. *Free Radical Biology & Medicine*, 2005, 39(11): 1407-1417.
- [43] Tsai CH, Shen TJ, Ho NT, et al. Effects of substitutions of lysine and aspartic acid for asparagine at beta 108 and of tryptophan for valine at alpha 96 on the structural and functional properties of human normal adult hemoglobin: roles of alpha 1 beta 1 and alpha 1 beta 2 subunit interfaces in the cooperative oxygenation process. *Biochemistry.* 1999 Jul 6; 38(27):8751-8761.
- [44] Chang CK, Simplaceanu V, Ho C. Effects of amino acid substitutions at beta 131 on the structure and properties of hemoglobin: evidence for communication between alpha 1 beta 1- and alpha 1 beta 2-subunit interfaces. *Biochemistry.* 2002 Apr 30; 41(17):5644-5655.

- [45] Bouamrani A, Ternier J, Ratel D, et al. Direct-tissue SELDI-TOF mass spectrometry analysis: a new application for clinical proteomics. *Clin Chem*.2006; 52(11):2103-2106.
- [46] 郑华, 夏宁, 梁瑜祯. 应用SELDI-TOF-MS 技术筛选T1DM 患者血清蛋白标记物. *广西医科大学学报*, 2009年, 26(3): 376-379
- [47] Giacomelli C, Bazzichi L, Giusti L, et al. MALDI-TOF and SELDI-TOF analysis: "tandem" techniques to identify potential biomarker in fibromyalgia. *Reumatismo*. 2011 Nov 9; 63(3):165-170.
- [48] 冠潇, 黎丹戎, 王琪, 等. 应用SELDI-TOF-MS 技术筛选卵巢癌淋巴结对高转移特性细胞株差异表达蛋白. *癌症*, 2008, 27(11): 1155-1160
- [49] Fan NJ, Gao CF, Wang XL. Identification of Regional Lymph Node Involvement of Colorectal Cancer by Serum SELDI Proteomic Patterns. *Gastroenterol Res Pract*. 2011; 2011:784967.
- [50] 高艳丽, 邹万忠, 董鸿瑞, 等. 关木通对大鼠致癌性的实验研究. *中华肾脏病杂志*, 2003 年, 19(4):250-253.
- [51] 周士臻. 高效液相色谱法测定关木通药材中马兜铃酸 A 的含量. *海峡药学*, 2007, 19(5):46-47.
- [52] 王巍巍, 张金元, 韩国锋, 等. 丹参对慢性马兜铃酸肾病大鼠肾损害的保护作用. *上海中医药杂志*, 2007, 42(8): 69-71.
- [53] Sun D, Feng J, Dai C, et al. Role of peritubular capillary loss and hypoxia in progressive tubulointerstitial fibrosis in a rat model of aristolochic acidnephropathy. *Am J Nephrol*. 2006; 26(4):363-371.
- [54] Wu HZ, Guo L, Mak YF, et al. Proteomics investigation on aristolochic acid nephropathy: a case study on rat kidney tissues. *Anal*

Bioanal Chem. 2011 Apr; 399 (10):3431-3439.

- [55] 潘向荣. 益气补肾活血法加小剂量强的松治疗 IgA 肾病. 湖北中医杂志, 2010 年, 32 (2) : 56.
- [56] 李凌霞, 王桂琴, 兰涛, 等. 强的松对小儿原发性肾病综合症患者 PBMC HLA 表达的调节作用. 细胞与分子免疫学杂志, 2009 年, 25 (8) : 729-731.
- [57] 张敏 高秀, 杨立明. 金水宝胶囊联合强的松治疗早期马兜铃酸肾病的疗效观察. 首都医药, 2009, 8 (下) : 46-47.
- [58] 赵艳玲, 王宗谦, 冯江敏, 等. 强的松对大鼠马兜铃酸肾病肾组织纤维化的影响. 安徽医学, 2008 年, 29 (4) : 377-380.
- [59] 孙世仁, 陈光磊, 宁晓暄, 等. 慢性马兜铃酸肾病大鼠模型肾组织中蛋白质组的差异表达. 第四军医大学学报, 2006, 27 (11) : 961-963.
- [60] Tseng CS, Chen SM, Chien SC, et al. Pharmacokinetics of p-Aminohippuric Acid and Inulin in Rabbits with Aristolochic Acid Nephropathy. Adv Pharmacol Sci. 2011;2011:204501.
- [61] Wang Y, Fu W, Wang H, et al. Renal microvascular injury in chronic aristolochic acid nephropathy and protective effects of Cozaar. Ren Fail. 2012;34(1):60-67.
- [62] Zhou L, Fu P, Huang XR, et al. Activation of p53 promotes renal injury in acute aristolochic acid nephropathy. J Am Soc Nephrol. 2010 Jan; 21 (1) : 31-41.
- [63] Wu Y, Liu Z, Hu W, et al. Mast cell infiltration associated with tubulointerstitial fibrosis in chronic Aristolochic Acid Nephropathy. Hum Exp Toxicol. 2005 Feb; 24(2):41-47.

- [64] Zhou L, Fu P, Huang XR, et al. Mechanism of chronic aristolochic acid nephropathy: role of Smad3. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 Apr; 298(4):F1006-1017.
- [65] Bakhiya N, Arlt VM, Bahn A, et al. Molecular evidence for an involvement of organic anion transporters (OATs) in aristolochic acid nephropathy. *Toxicology*. 2009 Oct 1; 264(1-2):74-79.
- [66] Qi X, Cai Y, Gong L, et al. Role of mitochondrial permeability transition in human renal tubular epithelial cell death induced by aristolochic acid. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007 Jul 1; 222(1):105-110.
- [67] Chen B, Bai Y, Sun M, et al. Glutathione S-transferases T1 null genotype is associated with susceptibility to aristolochic acid nephropathy. *Int Urol Nephrol*. 2012 Feb; 44(1):301-307.
- [68] Ge Z, Zhu YL, Zhong X, et al. Discovering differential protein expression caused by CagA-induced ERK pathway activation in AGS cells using the SELDI-ProteinChip platform. *World J Gastroenterol*. 2008 Jan 28; 14(4):554-562.
- [69] He Z, Zhong H, Hu Y, et al. Analysis of differential protein expression in *Acidithiobacillus ferrooxidans* grown under different energy resources respectively using SELDI-ProteinChip technologies. *J Microbiol Methods*. 2006 Apr; 65(1):10-20.
- [70] Hodgetts A, Bossé JT, Kroll JS, et al. Analysis of differential protein expression in *Actinobacillus pleuropneumoniae* by Surface Enhanced Laser Desorption Ionisation--ProteinChip (SELDI) technology. *Vet Microbiol*. 2004 Apr 19; 99(3-4):215-225.
- [71] 陈新谦, 金有豫, 汤光, 主编. 新编药理学, 第15版, 北京: 人民卫生

出版社, 576

- [72] Langaa S, Bloksgaard M, Bek S, et al. Mice with targeted disruption of the acyl-CoA binding protein display attenuated urine concentrating ability and diminished renal aquaporin-3 abundance. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012 Jan 11.
- [73] Augoff K, Kolondra A, Chorzalska A, et al. Expression, purification and functional characterization of recombinant human acyl-CoA-binding protein (ACBP) from erythroid cells. *Acta Biochim Pol*. 2010;57(4):533-540.
- [74] Adamson RE, Frazier AA, Evans H, et al. In vitro primary cell culture as a physiologically relevant method for preclinical testing of human oncolytic adenovirus. *Hum Gene Ther*. 2012 Feb;23(2):218-230.
- [75] Bleier BS, Mulligan RM, Schlosser RJ. Primary human sinonasal epithelial cell culture model for topical drug delivery in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *J Pharm Pharmacol*. 2012 Mar;64(3):449-456.
- [76] Zhu S, Jin J, Wang Y, et al. The endoplasmic reticulum stress response is involved in apoptosis induced by aloe-emodin in HK-2 cells. *Food Chem Toxicol*. 2012 Mar;50(3-4):1149-1158.
- [77] Fernández-Martínez AB, Arenas Jiménez MI, Lucio Cazaña FJ. Retinoic acid increases hypoxia-inducible factor-1 α through intracrine prostaglandin E(2) signaling in human renal proximal tubular cells HK-2. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Apr;1821(4):672-683.
- [78] Wang HR, Chen DL, Zhao M, et al. C-Reactive Protein Induces Interleukin-6 and Thrombospondin-1 Protein and mRNA Expression through Activation of Nuclear Factor- κ B in HK-2 Cells. *Kidney Blood*

- Press Res. 2012 Jan 3;35(4):211-219.
- [79] Kröning R, Katz D, Lichtenstein AK, et al. Differential effects of cisplatin in proximal and distal renal tubule epithelial cell lines. *Br J Cancer*. 1999 Jan;79(2):293-299.
- [80] 刘世杰, 周世文. 顺铂对原代培养兔近端肾小管上皮细胞酶活力的影响以及牛磺酸、三七皂苷和茵陈素的保护作用. *中国药理学通报*, 1999年, 15(5): 452-455
- [81] Zhao XS, Song PL, Sun B, et al. Arsenic trioxide inhibits metastatic potential of mouse hepatoma H22 cells in vitro and in vivo. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2009 Oct;8(5):510-517.
- [82] 张强, 刘勇, 任禹菲. SELDI-TOF-MS 检测正常肾细胞株与肾癌细胞株的差异表达蛋白. *实用全科医学*, 2008年, 6(4): 333-334.
- [83] 丁守怡, 钱冬萌, 闫志勇, 等. 蛋白质芯片飞行质谱技术检测体外培养的肝癌细胞株与转染 HBV 的肝癌细胞株蛋白质的差异表达. *世界华人消化杂志*, 2005年, (14): 1684-1687.
- [84] 李鑫, 王志华, 马玉彦, 等. 应用 SELDI-TOF MS 技术分析高低转移肺腺癌细胞株差异表达蛋白. *实用肿瘤学杂志*, 2006年, 20(3): 183-186.

综述

蛋白质组学与药源性疾病

一、蛋白质组学

2003 年人类基因组计划的完成^[1]标志着生命科学已进入了后基因组时代。后基因组时代生命科学研究的重点是功能基因组学，而基因组对生命的整体控制必须通过它所表达的全部蛋白质来执行并发挥功能。也就是说，基因表达产物即蛋白质的变化是导致生命功能失常的直接原因。有研究表明，只有约 2% 的疾病与基因序列有关，98% 的疾病与蛋白质的表达有关^[2]，因此，仅依靠基因水平的分析有时并不足以了解疾病发生的机制。虽然药物基因组学在降低药物不良反应发生率方面提供了一个方向，但在疾病诊断上缺乏预见性及重要性。而蛋白质组学在诊断上可能更有预见性和可行性^[3]。

对于一个细胞来说，它所包含的基因组信息是固定不变的，而蛋白质的组成则有时空性和可调节性，在个体、细胞不同的发育时期，其蛋白质的种类、数量均有着很大的差别。因此蛋白质组是在特定时间、环境或实验条件下蛋白质的表达情况，反映了体内动态的、整体的变化过程。

1 蛋白质组学的相关概念

蛋白质组（proteome）的概念最早是由澳大利亚科学家 Wilkins 和 Williams 于 1994 年提出，并于 1995 年 7 月首次出现在《Electrophoresis》

杂志上,蛋白质组是指一种细胞、组织或机体所表达的全部蛋白质^[4]。蛋白质组学 (proteomics) 是研究一种生物体、器官或细胞器中所有蛋白质的特性、含量、结构、生化与细胞功能以及它们与空间、时间和生理状态的变化。根据研究方向和研究目的的不同,蛋白质组学又可分为以下三种类型^[5]

- ①对某个体系的蛋白质进行鉴定,并详细阐述其翻译后修饰的特性,即组成型蛋白质组学;
- ②以重要生命过程或人类重大疾病为对象,进行重要生理和病理体系或过程的蛋白质表达的比较,即差异显示蛋白质组学,也称比较蛋白质组学;
- ③通过各种先进技术研究蛋白质之间的相互作用,绘制某个体系的蛋白质作用的网络图谱,即相互作用蛋白质组学。

2 蛋白质组学相关的主要研究技术

蛋白质组学的研究技术主要包括 3 个方面^[6]:蛋白质的分离、鉴定及生物信息学分析,其中蛋白质的分离和鉴定是蛋白质组学研究的两个重要步骤。目前蛋白质分离技术主要有双向凝胶电泳法 (2-DE)、液相色谱串联质谱法 (LC-MS/MS) 或是两者并用^[7]。蛋白质的鉴定主要有质谱与质谱联用技术以及肽指纹图谱技术等;蛋白质的生物信息学分析主要有各种检索数据库以及各种高性能定量分析软件。

2.1 双向凝胶电泳法 (2-DE)

2-DE 的原理是基于蛋白质本身的特性—等电点与分子量。先将蛋白质根据其等电点在 PH 梯度胶内进行等电聚焦,然后按照它们的相对分子量大小进行 SDS-PAGE 第二次电泳分离。即在两个相互垂直的方向上,利用等电聚焦电泳和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 将大量不同的蛋白质成功分离。2-DE 的常规流程包括样品制备→第一向等电聚焦→第二向 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳→凝胶染色→图谱分析。理想的二维图谱中,每一个点代表一种蛋白质。根据研究需要,将感兴趣的蛋白质挖点后进行相应的

处理，可以经过质谱鉴定再进行后续的功能分析^[6]。

已经有不少的例子利用该技术成功分离出差异表达蛋白质，例如 Stephen 等测定给予嘧啶取代衍生物的大鼠肝脏中的蛋白质，结果表明，与对照组相比，给予嘧啶取代衍生物的大鼠肝脏中至少有 17 种蛋白质含量发生改变（12 种蛋白质含量降低，5 种蛋白质含量升高）^[8]。许多研究都利用 2-DE 去筛选差异表达蛋白质，并鉴定候选药靶蛋白，例如利用 2-DE 从众多蛋白中筛选鉴定癌症^[9]、心血管疾病^[10]、神经紊乱^[11]等患者组织中的差异表达蛋白。目前，双向凝胶电泳仍然是蛋白质组学研究的主要分离方法，也是目前唯一可以在一块凝胶上同时分离数千乃至上万个蛋白质的方法。

2.2 生物质谱技术

蛋白质组学研究上最重要的突破就是用质谱鉴定蛋白。质谱技术的原理是先将样品离子化，再根据不同离子间的荷质比 (m/z) 差异来分离蛋白质，并确定其分子量。到 20 世纪 80 年代，基质辅助激光解析电离质谱技术 (matrix assisted laserdesorption ionization, MALDI) 和电喷雾质谱技术 (electro-spray ionization mass spectrometry, ESI-MS) 等 2 项软电离质谱技术的发明，使得质谱技术取得了突破性进展。

2.2.1 ESI-MS

ESI-MS 是将消化后的多肽混合物用电喷雾法离子化，使质荷比 (m/z) 降低到多数质量分析仪都可检测的范围，然后进入串联质谱，从获得的数据中解析出多肽序列信息，再通过数据库检索确定相应的蛋白质。ESI-MS 最强的功能就是能够对蛋白质进行测序，以及具有样品用量少、可测定 N 端封闭的蛋白质序列等优点；另外，ESI-MS 可与多种分离技术例如液相色谱等联合使用。

2.2.2 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS)

MALDI 是以脉冲离子化方式使样品电离，常与飞行时间质谱 (TOF-MS) 联用，称为基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS)。MALDI-TOF-MS 是采用固相进样，样品蛋白质经过处理后置于质谱仪上，用一定激光打在样品上，使样品离子化，然后在电场力作用下飞行，通过检测离子的飞行时间 (TOF) 计算质荷比，从而得到一系列酶解肽段的分子量或部分肽序列等数据，最后通过相应的数据库来鉴定蛋白质。相较于 ESI-MS，MALDI-TOF-MS 在分析多肽混合物时，能耐受适量的缓冲剂、盐和其他物质，多肽混合物中的各个肽几乎均能产生单电荷离子，因此 MALDI-TOF-MS 成为肽质量指纹谱 (PMF) 分析的首选技术^[12]。

MALDI-TOF-MS 可与 2-DE 等技术联合使用。可收集 2-DE 凝胶上的目标斑点，通过酶解后进行 MALDI-TOF MS/MS 分析，但是敏感度较低，而且小分子量蛋白不能产生足够的信号，以及部分蛋白由于在蛋白数据库中缺乏整个全长序列等而不能通过图谱鉴定。

2.2.3 表面增强激光解析离子化飞行时间质谱 (SELDI-TOF-MS)

2002 年由诺贝尔化学奖得主田中发明的表面增强激光解析离子化飞行时间质谱 (SELDI-TOF-MS) 技术是目前蛋白质组学研究中比较理想的技术平台。SELDI-TOF-MS 将蛋白质芯片技术与 MALDI-TOF MS 技术联用，通过质谱峰强度直接反映样品中的蛋白差异。SELDI 技术分析的样品不用液相色谱或气相色谱预先纯化，SELDI 技术对于各种复杂标本中的高含量和低含量蛋白质，经芯片富集即可直接进行飞行质谱分析；该法灵敏度高，可发现低峰度以及小相对分子量的蛋白质，从而弥补了 2-DE 对低峰度、极端等电点值、极大和极小蛋白质无法鉴定的不足；所需样品量少，特异度高，并可进行高通量分析；在较短时间内就可得到结果，适合用于临床

诊断、监测、治疗,以及大规模筛选疾病相关生物标志物^[13]。SELDI-TOF-MS 不仅被用于研究肽和蛋白质,而且在寡核苷酸、细菌、小分子及植物分子的分析中也发挥重要作用。

目前 SELDI 技术已被广泛应用于多种疾病,尤其是在与肿瘤相关的体液蛋白质组学方面,主要用于肿瘤标志物的筛选和鉴定。如 Pan^[14]等采用 SELDI 蛋白质芯片技术分析前列腺癌病人和正常对照者血清样本,通过比较病例组和对照组,发现了 18 个血清差异蛋白峰。Yang^[15]等用 SELDI 蛋白质芯片技术检测了肺癌患者血清样本和正常人血清样本,结果发现了 5 个特异性蛋白质峰。这些差异表达的蛋白质有可能就是目标肿瘤标志物。可见利用 SELDI 蛋白质芯片可寻找与疾病有关或直接引发疾病的新蛋白,或是发现新的药物靶标和生物标记物。

2.2.4 相对和绝对定量同位素标记(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ) 技术

iTRAQ 技术可以寻找差异表达蛋白,并分析其蛋白功能,同时可以对 1 个基因组表达的全部蛋白质或 1 个复杂的混合体系中的所有蛋白质进行精确定量和鉴定。如今, iTRAQ 技术已经在蛋白质组学的定量研究中得到了极其广泛的应用,包括标记蛋白质的发现、信号转导及翻译后修饰研究、时程变化分析、基因与蛋白质表达相关分析、细胞膜与亚细胞结构分析和药物靶点分析等。

iTRAQ 技术的原理^[16]: 由于 iTRAQ 试剂是等量的,即不同同位素在标记同一多肽后在第一级质谱检测,分子量完全相同;在二级质谱分析过程中,报告基团、质量平衡基团和多肽反应基团之间的键断裂,质量平衡基团丢失,产生低质荷比(m/z)的报告离子。由于二级质谱可分析相对分子质量相差 1 的报告基团,不同报告基团离子强度的差异就代表了它所标记的多肽的相对丰度。同时,多肽内的酰胺键断裂,形成一系列 b 离子和 y 离子,得到离子片段的质量数,通过数据库查询和比较,可以鉴定出相应的

蛋白质前体。通过在样本中加入体外合成且经一种iTRAQ 标记的多肽标准品做内标, 还可进行蛋白质的绝对定量。

iTRAQ 技术操作流程^[17]: iTRAQ 技术使用不同的同位素试剂来同时标记和比较不同的蛋白质样品。样品先经胰蛋白酶裂解、烷基化、酶解为肽段, 所产生的肽段用iTRAQ 试剂多重标签进行差异标记, 再将标记样本相混合, 最后用LC-MS /MS 进行分析。

iTRAQ 技术的主要优点^[16, 18]: ① iTRAQ 标记可使多个样本同时相对量化, 标记过程更简单, 标记效率更高, 而且大大降低了实验过程中所引入的技术误差。② iTRAQ 可标记所有酶解肽段, 提高了蛋白质鉴定的覆盖率和可信度。③ iTRAQ 技术可使质谱图的复杂程度简化; 同时可以提高离子的检测丰度。④由于报告离子的相对分子质量较低, 而低分子量区是质谱定性(质量确定)和定量(丰度比较)较为准确的区域, 因此质谱检测更为灵敏可靠。⑤可在一次串联质谱过程中同时比较和鉴定蛋白质。⑥标记反应不在活细胞, 适合所有类型的蛋白质样品, 包括培养的细胞、组织, 以及血液、唾液、脑脊液和泪液等。

目前iTRAQ 技术的作用已经在不少生物体和组织研究中得到应用^[19, 20], 并逐渐显示其优越性。iTRAQ已经成为蛋白质组学的定量方法中十分重要的技术, 但由于iTRAQ 技术的一些特点可一定程度制约了其广泛应用, 例如① iTRAQ 试剂可与样本中的所有蛋白结合, 所以容易受样本中的杂质蛋白以及样本处理过程中缓冲液的污染; ②目前iTRAQ 试剂非常昂贵。

2.3 蛋白质芯片

继基因芯片(DNA 芯片)之后迅速发展起来的蛋白质芯片, 以蛋白质或多肽为材料, 可以从微量的样品中检测成千上万个蛋白质或多肽, 用于分析差异表达的蛋白质以及药物靶标的筛选和鉴定^[21]。蛋白质芯片因其具有适应性广、耐用性强、高通量、灵活性以及可靠性好而成为生物学研究中

的重要分析工具^[22]。目前已经有各种各样的蛋白质芯片，而每种芯片都具有不同针对性的用途。

SELDI 蛋白质芯片的原理是将不同生理状态的样品（体液、组织或培养的细胞）和蛋白质芯片结合，洗去未结合的蛋白质，使用脉冲氮激光能量使被捕获的靶蛋白从芯片表面电离出来，根据靶蛋白在离子装置中的飞行时间测出其分子量。根据芯片表面的物质不同，可将 SELDI 蛋白质芯片分为化学型和生物型两种，前者又可分为疏水、亲水、阳离子、阴离子和金属离子螯合芯片及混合芯片 6 种。由于不同芯片表面的化学成分不同，芯片与蛋白质的相互作用也不同，可根据不同情况下表达的蛋白质特点来选择，以实现最大化地结合与某疾病相关的蛋白质。例如表面含有阳离子四胺基团的芯片可结合表面负电荷蛋白质如谷氨酸、天冬氨酸，用于选择性分析低等电点蛋白质。生物型芯片分为抗体-抗原、受体-配体、酶-底物和 DNA-蛋白质芯片等种类，可检测相对应的蛋白质^[23]。

2.4 生物信息学

生物信息学（Bioinformatics）是在生命科学的研究中，运用数学和计算机手段对巨量生物信息资源进行收集、存储、检索和分析等的科学，由数据库、计算机网络和应用软件等 3 部分组成^[24-25]。其研究重点主要体现在基因组学和蛋白质组学两方面^[26]，蛋白质组信息学研究方法主要包括蛋白质序列比较分析、蛋白质结构-功能研究、点突变的设计及家族鉴定、蛋白质空间结构预测、建模和分子设计，以及分析蛋白质与蛋白质相互作用的数据库^[27-28]。

二、药源性疾病

从 20 世纪 60 年代的反应停致畸胎事件，到近年来的拜斯亭引起的横纹肌溶解致 30 例病患死亡^[6]，以及含马兜铃酸的中草药如关木通引致肾功能衰竭，甚至诱发肿瘤等^[29-30]，这一切都说明了药源性疾病已经成为主要

疾病之一，严重危害着人类的身体健康。世界卫生组织最近的一次全球调查结果显示，目前全世界死亡的人口中约 1 / 3 死于用药不当^[31-32]。在我国，每年因药物不良反应住院的有 250 多万人，因药物死亡者近 20 万人。药源性疾病的发生率呈明显增高趋势^[31]。药源性疾病在国内外均成为 21 世纪疾病谱变化的最大特点。因此，加强对药源性疾病的研究，提高药源性疾病的认识，防止或减轻药源性疾病对人类的危害。

1 药源性疾病的定义

药源性疾病 (drug-induced diseases, DID) 又称药物性疾病，简称“药物病”，为医源性疾病 (iatrogenic diseases) 主要组成部分，系指药物用于预防、诊断、治疗疾病过程中，因药物本身的作用、药物相互作用以及药物的使用引起机体组织或器官发生功能性或器质性损害而出现各种临床症状的异常状态^[2]。

2 诱发药源性疾病的因素

影响药源性疾病的发生、发展的因素可分为患者因素和药物因素。患者因素包括年龄、性别、机体的生理病理状态、遗传因素等，例如新生儿服用氯霉素后容易出现灰婴综合征；如老年人应用庆大霉素容易引起肾毒性和不可逆性听觉和前庭功能损害^[2]。女性比男性更易引起药源性疾病，例如保泰松等引起的粒细胞缺乏症及氯霉素引起的再生障碍性贫血中，女性的发生率分别高出男性 3 倍和 2 倍^[33-34]。

药物以及药物相互作用，导致药源性疾病的发生。例如链霉素的毒性作用可引起第八对颅神经损害，造成听力减退或永久性耳聋；在儿童聋哑病因中庆大霉素占 50% 以上，尤为 2 岁以内儿童的发病率高^[32]；异烟肼单独使用引发药物性肝炎的发生率为 0.1%，与利福平合用可使肝炎发生率提高 10 倍^[2]。

3 引起肝脏、肾脏损害的常见药物

人体全身各器官、系统都有可能成为药物损害的部位，而肾脏和肝脏则是最容易受到伤害。

肝脏是多种物质代谢的器官，因此多种药物都可以影响肝脏功能。药源性肝损害发生率为每年 15-40 /10 万，平均死亡率约 6%^[35]。美国疾病控制及预防中心新近调查数据显示每年有 1600 起新发急性肝衰竭，仅对乙酰氨基酚引起者就占 41%左右^[36]。药源性肝损害主要分为脂肪肝、胆汁淤积和肝坏死。引起药源性肝损害的常见药物有：①抗生素类：苯唑西林钠、红霉素、多西环素、阿奇霉素、喹诺酮类等。②解热镇痛药：对乙酰氨基酚、阿司匹林、消炎痛等。③抗结核药物：异烟肼，与利福平合用有时会引起爆发性肝炎。④消化道用药：西咪替丁、雷尼替丁和门冬酰胺等。⑤抗真菌药物：酮康唑和氟康唑等。⑥抗癫痫药：丙戊酸钠。⑦抗肿瘤药物亚砷酸、别嘌呤酸等。⑧中草药：川楝子、苍耳子、黄药子、雷公藤、草乌等可引起中毒性肝炎；桑寄生、姜半夏、天花粉、山慈菇可引起肝损害。另外，激素类、磺胺类、氯霉素、胺碘酮、卡托普利、硝苯地平、氯丙嗪等，也会引起中毒性肝损害。

由于大部分药物要经过肾代谢或排泄，药物毒副作用易对肾脏产生不良影响。不同种类的药物可通过直接的或间接的毒性，及免疫性损害导致多种形式的肾疾病发生。据临床统计，20%的成人急性肾衰是由药物引起，而近 10 多年来，药物性肾损害的发生率呈上升趋势^[37]。以下列举引起肾损害的常见药物：①抗菌药物类：氨基甙类、头孢菌素类、青霉素类、二性霉素 B、磺胺类、利福平、喹诺酮类、四环素、新霉素；②非甾体类抗炎药：水杨酸类如乙酰、水杨酸、双氟尼酸；类胺类如非那西丁、对乙酰氨基酚；吡唑酮类如保泰松、阿扎丙宗、羟保泰松。其它有机酸类如吲哚美辛、布洛芬、氟比芬；甲氧萘丙酸等。③抗肿瘤药：顺铂、别嘌呤醇、甲氨喋呤、无环鸟苷、氟脲嘧啶、丝裂霉素、长春新碱、环磷酰胺、氯磺丙

豚、碳铂、链脲霉素、司莫司汀、环己亚硝脲等。④重金属：汞、铅、锂、金、砷。⑤利尿剂：氨苯喋啶、速尿、噻嗪类。⑥造影剂：含碘和不含碘造影剂。⑦止痛剂：吗啡、哌替啶、海洛因等。⑧免疫抑制剂：环孢素、他可莫司等。⑨其它：硝基化合物，碳氢化合物，青霉胺，二甲麦角新碱，甲氰咪呱，胍苯哒嗪，普鲁卡因酰胺，他巴唑，开搏通等。⑩中药：植物类含生物碱类有雷公藤、草乌、麻黄等；含蛋白类有巴豆、黑豆等；含甙类：洋地黄、土牛膝、芦荟等；含酸 /醇类有马兜铃、关木通、广防己等。另外，含挥发油类的土荆芥等，以及动物类药物如蛇毒类、斑蝥类、胆酸类，矿物类含砷、汞类(砒霜、红矾、雄黄、朱砂、轻粉)及含铅(铅丹)等药物。

4 药源性疾病发生发展机制、治疗与预后

任何药物都有可能引起药源性疾病，不同的药物引发疾病的机制不同，同一种药物引起不同部位的疾病，其机制也不一样，而且同一种药源性疾病在发生发展过程中常涉及多种机制，例如顺铂肾损害、马兜铃酸肾病等，可能涉及脂质过氧化^[38]、缺血缺氧^[39]、细胞凋亡^[40]、免疫性损伤、细胞毒作用、细胞因子的作用^[41]等。虽然国内外有不少关于药源性疾病发生机制的研究报道，但绝大多数的研究停留在一些生化或免疫学指标的检测上，或是从单一、孤立的某些环节、途径来研究，缺乏联系性和系统性，因此对于发病机制复杂的药源性疾病无法全面、系统地了解其确切的发病机制。近几年来可见少数采用蛋白质组学技术研究一些药源性疾病的报道，取得一定的成果，给药源性疾病发病机制的研究提供了新的见解。

药源性疾病若能及时发现和正确地治疗，部分疾病可被治愈，但有的药源性疾病一旦发生就很难逆转，甚至严重者可造成死亡。具有有关部门统计，我国每年 20 万人死于药源性疾病，抗生素成为罪魁祸首^[42]。缺乏有效的治疗方法，治疗可能只起到延缓病情的作用，例如马兜铃酸肾损害、药

物引起的耳聋等，因此重要在于预防疾病的发生。更何况，不少药源性疾病的发生很难得到及时的发现。

有关药源性疾病的药物治疗的研究报道很多，尤其是有关中医药防治药源性肝脏疾病、肾脏疾病的报道不少，但这些研究多停留在检测肾功能、氧化损伤等指标上，缺乏系统的、内在的药理作用机制研究，也就缺乏完整的理论体系来指导临床使用中医药防治药源性疾病。而采用高通量技术例如蛋白质组学技术等对防治药源性疾病的研究极少见报道。

三、蛋白质组学在药源性疾病中的应用

药源性疾病与其他的疾病一样，其发生发展往往与蛋白质种类、数量、结构和性质等的改变密切相关；而且，不少药物以蛋白质作为作用靶点。

另外，药物安全性评价的目的是减少药源性疾病，目前其常规的评价是组织毒理病理学检查与生理功能和生化检查，这些在体内的研究通常产生假阴性结果和不可预期的毒性^[43]。组织毒理病理学检查与生理功能、生化检查的测定终点灵敏度较低，不能及时地发现药源性疾病和预见其发病机制。因而药源性疾病的研究突破点是确定测定终点—毒性生物标志物。毒性生物标志物是生物体暴露于外源化合物后，在不同生物学水平上发生异常化的信号指标，不仅可以为认识其毒性机制提供线索，而且可以作为临床诊断和治疗的潜在标记，甚至是作为治疗和药物开发的靶点^[44]。常规方法已不能满足需要，因此蛋白质组学已被应用于药物安全性评价中^[43]。蛋白质组学技术应用于药源性疾病的研究，是药物安全性评价的需要，是保证广大患者合理安全用药的需求。

近几年来逐渐有采用蛋白质组学技术研究药源性疾病的报道，主要应用在药源性肾脏疾病和肝脏疾病，本文将其综述如下。

1 蛋白质组学与药源性肝损伤

肝脏是人体的主要代谢器官，主要负责处置包括药物在内的外源性化

学物质，因此肝脏是机体最易受药物损伤的器官之一。据报道，每一百万例患者中就有 1 万例患者发生药源性肝损伤^[45]。在美国，药源性肝损伤是急性肝衰竭的重要原因，是肝移植患者发生急性肝衰竭的直接原因和药物未获得 FDA 批准的最常见原因，药源性肝损伤在急性肝功能衰竭病例中所占的比例不少于 13%^[46]。根据世界卫生组织对 1968-2003 年报道的药源性肝损伤例数所作的统计，仅扑热息痛引发的肝损伤就达 300 余例；其次为曲格列酮，达 200 余例^[47]。

蛋白质组学技术在药源性肝脏疾病研究中的应用相对于其它系统器官的较早，发展也较快。Andringa KK^[48] 等应用蛋白质组学技术对扑热息痛过量引起的肝疾病机制作了研究，结果发现肝线粒体中生酮调控的关键酶 3-羟基-3 甲基辅酶合成酶 2 (HMG-CoA 合成酶) 巯基化水平和活性明显减少，过氧化氢酶被巯基化修饰，表明蛋白质的巯基化和蛋白质表达差异可能与扑热息痛过量引起的肝疾病有关。

有关采用蛋白质组学技术研究药源性肝损害的报道见表 1。

2 蛋白质组学在药源性肾损害中的应用

肾脏不仅是主要的排泄器官，也是重要的内分泌器官，肾脏对维持体内、外环境的平衡起着非常重要的作用。肾脏本身具有很强的自我保护和修复能力以及去毒性机制^[54]。但在临床治疗疾病过程中，如果药物浓度过大，或肾脏接触肾毒性药物时间过长等，可导致药源性肾疾病，使肾功能减退甚至衰竭，严重者可引起死亡。近年来，蛋白质组学应用于药源性肾疾病的研究也日益增多。

Mischak H^[55] 等采用毛细管电泳耦合质谱技术筛选顺铂引起 SD 大鼠肾损害的生物标志物。大鼠给予顺铂单剂量腹腔注射 3 或 6mg/kg，收集用药前后大鼠尿液样本，并与对照组比较；结果初步确定 34 个低分子蛋白质

(<20 kDa) 在对照组和处理组动物中具有显著性差异, 可作为顺铂引起肾毒性的潜在生物标志物。

有关采用蛋白质组学技术研究药源性肾损害的报道见表 2。

3 蛋白质组学在其他药源性疾病中的应用

除了主要在药源性肝脏疾病和肾脏疾病以外, 蛋白质组学技术在药源性疾病方面的应用也有极少数的报道, 见表 3。

综上所述, 有关蛋白质组学技术在药源性疾病上的应用于近几年来开始出现报道, 而且逐年增多; 主要集中在药源性肝脏疾病和肾脏疾病, 其它系统的药源性疾病的研究极少; 而且只局限于药源性疾病的发病机制研究, 在药源性疾病防治方面的应用极少见报道。

虽然蛋白质组学技术在药源性疾病上的应用尚属于初级阶段, 但这些例子均说明, 采用蛋白质组学技术研究药源性疾病非常有意义, 而且具有可行性。随着蛋白质组学相关技术的发展及其在药源性疾病研究中的深入, 可以预见蛋白质组学在药源性疾病方面有广阔的应用前景。蛋白质组学技术平台在药源性疾病研究中的应用越来越成熟, 将为探讨药源性疾病的发生发展机制, 以及寻找防治药源性疾病途径提供重要的基础。

表 1 蛋白质组学技术在药源性肝脏疾病中的应用情况

致病药物	检测样本	蛋白质组学技术	研究结果	参考文献
对乙酰氨基酚	肝线粒体	MALDI-TOF-MS	肝线粒体中生酮调控的关键酶 3-羟基-3 甲基辅酶合成酶 2 巯基化水平和活性明显减少, 过氧化氢酶被巯基化修饰, 表明蛋白质的巯基化和蛋白质表达差异可能与扑热息痛过量引起的肝疾病有关。	Andringa KK 等 ^[48] . 2008 年
乙醇	大鼠肝细胞	2-DE 分离技术为基础的蛋白质组学	研究雄性 Wistar 大鼠给予乙醇后肝脏蛋白表达差异。研究发现乙醇诱导大鼠肝细胞中具有抗氧化应激功能的碳酸酐酶-III 蛋白水平显著下降, 碳酸酐酶-III 消耗引起氧化应激, 这可能与乙醇诱导的肝疾病有关	Kharbanda KK 等 ^[49] . 2008 年
碘胺酮, 环孢素和对乙酰氨基酚	肝 HepG2 细胞	定量 2-DE、MALDI-TOF/TOF 质谱和液相色谱串联	在 254 个表达差异蛋白质位点中, 有 86 个蛋白被鉴定出来。多级聚类分析显示, 环孢素诱导蛋白表达改变, 引起内质网应激和干扰内质网高尔基体的转运, 结果小泡介导的转运和蛋白质分泌发生改变, 可能与胆汁淤积机制引起的肝毒性有关联。	Van Summeren A 等 ^[50] . 2011 年
顺铂	大鼠原代肝细胞	非标记定量蛋白质组学	在 325 种不同的蛋白质中顺铂诱导 19 种蛋白上调和 76 种蛋白下调, 这些蛋白质中包括脂肪酸合成酶、过氧化氢酶、过氧化物酶-1、热休克蛋白 60 等。这项研究对药源性肝疾病的发病机制提供了新的见解。	Cho YE 等 ^[51] . 2012 年
六溴环十二烷 (HBCD)、四溴双酚 A (TBBPA)	斑马鱼肝细胞	2-DE 联合 MALDI-TOF 与 FT-ICR	糖异生增加、蛋白表达异常、NADPH 产物增加可能与 HBCD、TBBPA 等诱导的药源性肝疾病机制有关。	Kling P 等 ^[52] . 2009 年
铜	斑马鱼肝细胞	2-DE 联合 MALDI-TOF-MS	筛选并鉴定出多种差异表达蛋白质, 认为与细胞活性氧效应、线粒体运输氧和应激效应相关的许多蛋白质的表达差异可能与铜诱导肝毒性的机制有关。	Chen DS 等 ^[53] . 2011 年

表 2 蛋白质组学技术在药源性肾损害的应用情况

致病药物	样本	蛋白质组学技术	研究结果	参考文献
顺铂	病人尿液	MALDI-TOF-MS	使用核磁共振代谢组学技术分析测定尿液中的代谢产物,并结合蛋白质组学的研究结果,发现能更有效地筛选顺铂肾毒性的生物标志物。	Portilla D 等 ^[56] . 2007 年
顺铂	大鼠尿液	毛细管电泳耦合质谱技术	初步确定 34 个低分子蛋白质 在对照组和处理组动物中具有显著性差异,可作为顺铂引起肾毒性的一个潜在的生物标志物。	Mischak H 等 ^[55] . 2009 年
硝酸铀酰 (uranyl nitrate)	大鼠尿液	2-DE 联合半定量 SDS-PAGE-LC-MS /MS 技术	检测到 14 种调控蛋白,一些调控蛋白与肾小球通透性损伤有关,一些蛋白可引起肾小管损伤。还有在尿液中从未报道的一些蛋白如血浆铜蓝蛋白,与金属胁迫有关。	Malard V 等 ^[57] . 2009 年
马兜铃酸	大鼠肾组 织	2-DE 蛋白质组学	蛋白质组学测定肾组织的差异蛋白,其中鉴定的几个蛋白质标志物已被发现有生物学和医学意义。	Wu HZ 等 ^[58] . 2011 年
庆大霉素	大鼠肾组 织	转录芯片和蛋白质 组的 2-DE 分析	转录组学和蛋白质组学的联合应用,使药物引起的近端肾小管损伤的生物标志物筛选更具体更有效。	Matheis KA 等 ^[59] . 2011 年
阿霉素	大鼠血清	SELDI-TOF-MS 技 术联合 CM10 蛋白质 芯片	在各组动物之间成功捕获到多种差异表达蛋白质。认为 SELDI-TOF-MS 能有效分析阿霉素肾病大鼠血清蛋白质质谱,中药肾康灵干预治疗后蛋白质质谱表达差异有统计学意义。	郑健等 ^[60] . 2011 年

表 3 蛋白质组学在其他药源性疾病方面的应用情况

药源性 疾病	致病 药物	样本	蛋白质组学技术	研究结果	参考文献
药源性 耳疾病	氨基 糖苷 类	耳蜗细胞	LC-MS/MS	研究首次显示促肾上腺皮质激素释放因子信号在保护耳蜗对抗氧化应激的作用;蛋白质组学数据表明除了诱导自由基清除剂之外,还有新的机制参与其保护作用。	Basappa J 等. [61] 2010 年
药源性 呼吸系 统疾病	铂	人支气管上皮 细胞株 (BEAS-2B)	鸟枪蛋白质组学	对 BEAS-2B 细胞的分泌蛋白进行鉴定,检测到 81 种细胞外蛋白,其中有 24 种细胞外蛋白受铂调控。研究表明蛋白质组学技术在药物毒理学领域的应用有突出贡献。	Malard V 等. [62] 2012 年
药源性 心血管 系统疾 病	地高 辛	人脐静脉内皮 细胞	LC-MS/MS LTQ-ESI-MS/MS	蛋白质组学分析进一步表明,地高辛致细胞凋亡与多种酶的表达有关。HSP60 通过抑制人脐静脉内皮细胞蛋白酶-3 的活性,在地高辛引起的细胞凋亡中发挥一定的保护作用。	Qiu J 等 [63]. 2008 年

参考文献

- [1] Collins JC, Green ED, Guttmacher AE. A vision for the future of genome. *Nature*, 2003 Apr 24;422(6934):835-847
- [2] 郭葆玉. 药物蛋白质组学. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 7.
- [3] Wilkins MR. What do we want from proteomics in the detection and avoidance of adverse drug reactions. *Toxicol Lett.*2002, 127(1-3): 245-249.
- [4] Reynolds T. For proteomics research, a new has begun. *J Natl Cancer*

Inst,2002,94:552-554.

- [5] Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, 2000, 405(6788): 837-846.
- [6] 刘红, 刘艳, 胡又佳. 比较蛋白质组学与疾病研究及药物开发. *世界临床药物*, 2011年, 32(5): 290-294.
- [7] Barrier M, Mirkes PE. Proteomics in developmental toxicology. *Reprod Toxicol*. 2005 Jan-Feb;19(3):291-304.
- [8] Stephen J, Newsholme, Beverly F, et al. Two-dimensional electrophoresis of liver proteins characterization of a drug-induced hepatomegaly in rats[J]. *Electrophoresis*, 2000, 21:2122-2128.
- [9] Adam PJ, Boyd R, Tyson KL, et al. Comprehensive proteomics analysis of breast cancer cell membranes reveals unique proteins with potential in clinical cancer. *J. Biol. Chem.* 2003, 278(8): 6482-6489.
- [10] Macri J, Rapundalo ST. Application of proteomics to the study of cardiovascular biology. *Trends Cardiovasc. Med.* 2001, 11(2):66-75.
- [11] Tsuji T, Shiozaki A, Kohno R, et al. Proteomics profiling and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem. Res.* 2002, 27(10):1245-1253.
- [12] Jin Y, Manabe T. Alkaline extraction of human plasma proteins from nondenaturing micro-2-D gels for protein/polypeptide mass measurement and peptide mass fingerprinting using MALDI-TOF MS. *Electrophoresis*. 2007 Feb;28(3):449-459.
- [13] 李鑫. 比较蛋白质组学研究与应用进展[J]. *Inter J Immunol*, 2006, 29(3): 156-160.
- [14] Pan YZ, Xiao XY, Zhao D, et al. Application of surface-enhanced laser desorption / ionization time-of-flight-based serum proteomic array

- technique for the early diagnosis of prostate cancer. *Asian J Androl*,2006,8(1):45-51.
- [15] Yang SY, Xiao XY, Zhang WG, et al. Application of serum SEL-D I proteomic patterns in diagnosis of lung cancer.*BMC Cancer* ,2005, 20(5):83.
- [16] 王林纤, 戴勇, 涂植光. iTRAQ 标记技术与差异蛋白质组学的生物标志物研究. *生命的化学*, 2010, 30 (1) : 135-140
- [17] Zieske L R .A perspective on the use of iTRAQ reagent technology for protein complex and profiling studies. *J Exp Bot*, 2006, 57(7):1501-1508
- [18] 李伟. iTRAQ 多重化学标记串联质谱技术在比较蛋白质组学中的应用. *生命的化学*, 2006, 26 (5) : 453-456
- [19] Ye H, Sun L, Huang X, et al. A proteomic approach for plasma biomarker discovery with 8-plex iTRAQ labeling and SCX-LC-MS/MS. *Mol Cell Biochem*, 2010, 343(1-2):91-99
- [20] Zhou Y S, Lamrani M, Chan-Park M B, et al. iTRAQ-coupled two-dimensional liquid chromatography/tandem mass spectrometric analysis of protein profile in *Escherichia coli* incubated with human neutrophil peptide 1--potential in antimicrobial strategy. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2010, 24(18):2787-2790
- [21] Figeys D,Pinto D.Proteomics on a chip:promising development. *Electrophoresis*, 2001,22(2):208-216.
- [22] Jenkins RE, Pennington SR. Arrays for protein expression profiling:Towards aviable alternative to two-dimensional gel electrophoresis? *Proteomics*. 2001 Jan;1(1):13-29.
- [23] Chapman K. The Protein Chip Biomarker System from CIPHERGEN Biosystems : a novel proteomics platform for rapid biomarker discovery

- and validation. *Biochem Soc Trans*, 2002, 30(2): 82.
- [24] Goodman N. Biological data becomes computer literate: new advances in bioinformatics[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2002, 13(1): 68-71.
- [25] 陈铭. 后基因组时代的生物信息学. *生物信息学*, 2004, 2(2): 29-34.
- [26] Yu J. Genomics, Proteomics & Bioinformatics (GPB) Has a New Start-Open Access. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2012 Feb;10(1):1-3.
- [27] 陈永对. 生物信息学在基因组和蛋白质研究中的应用[J]. *中国临床康复*, 2006, 10(41): 136-139 .
- [28] 贺光, 孙开来. 生物信息学在蛋白质研究中的应用[J]. *国外医学·遗传学分册*, 2002, 25(3): 156-158.
- [29] Li HZ, Xia M, Han Y, et al. De novo urothelial carcinoma in kidney transplantation patients with end-stage aristolochic acid nephropathy in China. *Urol Int*. 2009;83(2):200-205.
- [30] Arlt VM, Alunni-Perret V, Quatrehomme G, et al. Aristolochic acid (AA)-DNA adduct as marker of AA exposure and risk factor for AA nephropathy-associated cancer. *Int J Cancer*. 2004 Oct 10;111(6):977-980.
- [31] 张丽, 柏立浩. 药源性疾病的认识与防治. *中国社区医师·医学专业* 2011年, 第08期: 48.
- [32] 王怀良. 药源性疾病的易感因素及防治原则[J]. *中国社区医师*, 2004, 第02期: 256.
- [33] 蔡佰玲, 孙世萍, 迟丽萍. 药源性疾病概述. *中国医药导报*, 2009年, 6(31): 133.
- [34] 王艳梅, 李月雄, 李连荣. 药源性疾病的诱发因素及预防. *中国医院药学杂志*, 2007年, 27(8): 1185.
- [35] Makarova SI. Human N-acetyltransferases and drug-induced

- hepatotoxicity. *Curr Drug Metab*, 2008. 9(6): 538-545.
- [36] Norris W, Paredes AH, Lewis JH. Drug-induced liver injury in 2007. *Curr Opin Gastroenterol*, 2008. 24(3): 287-297.
- [37] Fanos V, Cataldi L. Drug misadventuring in neonatal nephrology. *Pediatr Med Chir*. 2002;24(2):150-156.
- [38] Sahu BD, Rentam KK, Putchu UK, et al. Carnosic acid attenuates renal injury in an experimental model of rat cisplatin-induced nephrotoxicity. *Food Chem Toxicol*. 2011 Dec;49(12):3090-3097.
- [39] Tseng CS, Chen SM, Chien SC, Hsu KY. Pharmacokinetics of p-Aminohippuric Acid and Inulin in Rabbits with Aristolochic Acid Nephropathy. *Adv Pharmacol Sci*. 2011;2011:204-501.
- [40] Clark JS, Faisal A, Baliga R, et al. Cisplatin induces apoptosis through the ERK-p66shc pathway in renal proximal tubule cells. *Cancer Lett*. 2010;297(2):165-170.
- [41] Zhou L, Fu P, Huang XR, et al. Mechanism of chronic aristolochic acid nephropathy: role of Smad3. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 Apr;298(4):F1006-1017.
- [42] 刘伟. 浅谈滥用药物带来的危害. *中国医药指南*, 2011 年, 9 (17) :335-336.
- [43] Van Summeren A, Renes J, Van Delft JH, et al. Proteomics in the search for mechanisms and biomarkers of drug-induced hepatotoxicity. *Toxicol In Vitro*. 2012 Apr;26(3):373-385.
- [44] 敬海明. 毒理蛋白质组学研究进展. *国外医学卫生学分册*, 2009 年, 36 (6): 364-369.

- [45] Au JS, Navarro VJ, Rossi S. Review article: Drug-induced liver injury--its pathophysiology and evolving diagnostic tools. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011 Jul;34(1):11-20.
- [46] Ostapowicz G, Fontana RJ, Schiodt FV, et al. Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Ann Intern Med.* 2002;137:947-954.
- [47] Björnsson E, Olsson. Suspected drug-induced liver fatalities reported to WHO database[J]. *Dig Liver Dis.* 2006,38(1):33-38.
- [48] Andringa KK, Bajt ML, Jaeschke H, et al. Mitochondrial protein thiol modifications in acetaminophen hepatotoxicity: effect on HMG-CoA synthase. *Toxicol Lett.* 2008 Apr 1;177(3):188-197.
- [49] Kharbanda KK, Vigneswara V, McVicker BL, et al. Proteomics reveal a concerted upregulation of methionine metabolic pathway enzymes, and downregulation of carbonic anhydrase-III, in betaine supplemented ethanol-fed rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Apr 17;381(4):523-527.
- [50] Van Summeren A, Renes J, Bouwman FG, et al. Proteomics investigations of drug-induced hepatotoxicity in HepG2 cells. *Toxicol Sci.* 2011 Mar;120(1):109-122.
- [51] Cho YE, Singh TS, Lee HC, et al. In-depth identification of pathways related to cisplatin-induced hepatotoxicity through an integrative method based on an informatics-assisted label-free protein quantitation and microarray gene expression approach. *Mol Cell Proteomics.* 2012 Jan;11(1):M111.

- [52] Kling P, Förlin L. Proteomic studies in zebrafish liver cells exposed to the brominated flame retardants HBCD and TBBPA. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2009 Oct;72(7):1985-1993.
- [53] Chen DS, Chan KM. Differentially expressed proteins in zebrafish liver cells exposed to copper. *Aquat Toxicol.* 2011 Aug;104(3-4):270-277.
- [54] 谭毓治, 唐圣松. 药物毒理学 案例版. 北京: 科学出版社. 2009: 56.
- [55] Mischak H, Espandiari P, Sadrieh N, et al. Profiling of rat urinary proteomic patterns associated with drug-induced nephrotoxicity using CE coupled with MS as a potential model for detection of drug-induced adverse effects. *Proteomics Clin Appl.* 2009 Sep;3(9):1062-1071.
- [56] Portilla D, Schnackenberg L, Beger RD. Metabolomics as an extension of proteomic analysis: study of acute kidney injury. *Semin Nephrol.* 2007 Nov;27(6):609-620.
- [57] Malard V, Gaillard JC, Bérenguer F, et al. Urine proteomic profiling of uranium nephrotoxicity. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Jun;1794(6):882-891.
- [58] Wu HZ, Guo L, Mak YF, et al. Proteomics investigation on aristolochic acid nephropathy: a case study on rat kidney tissues. *Anal Bioanal Chem.* 2011 Apr;399(10):3431-3439.
- [59] Matheis KA, Com E, Gautier JC, et al. Cross-study and cross-omics comparisons of three nephrotoxic compounds reveal mechanistic insights and new candidate biomarkers. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2011 Apr 15;252(2):112-122.
- [60] 郑健, 艾斯, 林青, 等. 肾康灵干预阿霉素肾病大鼠血蛋白质组的实验研究. *福建中医药大学学报.* 2011 Feb;21(1):9-14.
- [61] Basappa J, Turcan S, Vetter DE. Corticotropin-releasing factor-2 activation

prevents gentamicin-induced oxidative stress in cells derived from the inner ear. *J Neurosci Res.* 2010 Oct;88(13):2976-2990.

- [62] Malard V, Chardan L, Roussi S, et al. Analytical constraints for the analysis of human cell line secretomes by shotgun proteomics. *J Proteomics.* 2012 Jan 4;75(3):1043-1054.
- [63] Qiu J, Gao HQ, Liang Y, et al. Comparative proteomics analysis reveals role of heat shock protein 60 in digoxin-induced toxicity in human endothelial cells. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Nov;1784(11):1857-1864.

致 谢

本文是在导师刘华钢教授的悉心指导下完成的。首先，衷心感谢刘华钢教授三年来在学习、思想、生活和工作上给予我的无微不至的关怀和谆谆教诲，导师严谨的学风、实事求是的科学理念、认真负责的工作态度以及热情诚恳的待人风范都给我留下深刻的印象，并将使我终身受益。真心希望在我今后的人生旅途中，能将从导师身上学到的东西发扬光大，以报答启蒙之恩。

感谢广西医科大学药学院的领导和全体老师，是他们为我们学生营造了良好的学习环境和氛围，让我们能顺利而愉快地度过了这三年的难忘时光。

感谢席加喜、苏丽娜同学在动物实验、细胞培养期间给予我的合作与帮助。

感谢广西医科大学科学实验中心的周怡、罗容、李洪涛老师，在差异表达蛋白质的筛选、鉴定实验中给以的指导与帮助。

感谢广西医科大学电镜室的莫肖敏、李卫东老师，在肾脏组织电镜检查方面给以的帮助与指导。

感谢我的家人一直给以我默默的支持和鼓励，他们是我学习的动力和坚强后盾，使我能安心学习，顺利地完成学业。

向所有关心和帮助过我的老师、同学、朋友们致以最诚挚的谢意！

攻读博士学位期间发表的论文目录

- [1] 杨玉芳, 劳山, 罗明, 等. 银杏叶提取物对家兔顺铂肾损害保护作用的动态观察. 时珍国医国药, 2011 年, 22 (196): 2897-2898
- [2] 林春燕, 杨玉芳 (通讯作者), 方菊飞, 等. 骨关节结核与 TNF- α 基因多态性的关系. 中国脊柱脊髓杂志, 2011 年, 21 (5): 427-429
- [3] 林春燕, 杨玉芳 (通讯作者), 杨梅, 等. 骨关节结核患者血清肿瘤坏死因子-A 水平及其意义. 广西医科大学学报, 2011 年, 28 (1): 71-72