

清肝利湿汤干预慢性乙肝肝胆湿热证的蛋白质组学分析

戴 姣, 戴幸平, 邢之华, 李 萃, 李家邦, 蒋荣鑫

■背景资料

目前, 蛋白质组学在疾病的诊断和治疗、疾病相关的生物标记分子的鉴定、药物开发以及致病机制研究等方面得到广泛的应用。

戴姣, 戴幸平, 邢之华, 李家邦, 蒋荣鑫, 中南大学湘雅医院 中西医结合研究所 湖南省长沙市 410008

李萃, 中南大学湘雅医院 卫生部肿瘤蛋白质组学重点实验室 湖南省长沙市 410008

戴姣, 在读硕士生, 主要从事中西医结合治疗肝脏疾病研究。

湖南省科技计划基金资助项目, No. 06SK3028

中南大学理科发展基金资助项目, No. 07SDF008

作者贡献分布: 戴姣与戴幸平对此文所作贡献均等; 此课题由戴幸平, 李家邦及蒋荣鑫设计; 研究过程由戴姣与戴幸平操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由戴幸平及邢之华提供; 数据分析由戴姣与戴幸平完成; 本论文写作由戴姣, 戴幸平及李萃完成。

通讯作者: 戴幸平, 410008, 湖南省长沙市, 中南大学湘雅医院 中西医结合研究所, dai_xingping@yahoo.com.cn

电话: 0731-4327031

收稿日期: 2008-11-13 修回日期: 2008-12-26

接受日期: 2009-01-05 在线出版日期: 2009-02-08

Proteomic analysis on chronic hepatitis B of liver-gallbladder dampness-heat type treated with Qinggan Lishi decoction

Jiao Dai, Xing-Ping Dai, Zhi-Hua Xing, Cui Li, Jia-Bang Li, Rong-Xin Jiang

Jiao Dai, Xing-Ping Dai, Zhi-Hua Xing, Jia-Bang Li, Rong-Xin Jiang, Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Xiangya Hospital, Central-South University, Changsha 410008, Hunan Province, China
Cui Li, Key Laboratory Of Cancer Proteomics of Ministry of Public Health, Xiangya Hospital, Central-South University, Changsha 410078, Hunan Province, China

Supported by: the Foundation Project for Science and technology of Hunan, No. 06SK3028; and the Central South University Science Development Foundation, No. 07SDF008

Correspondence to: Xing-Ping Dai, Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Xiangya Hospital, Central-South University, Changsha 410008, Hunan Province, China. dai_xingping@yahoo.com.cn

Received: 2008-11-13 Revised: 2008-12-26

Accepted: 2009-01-05 Published online: 2009-02-08

Abstract

AIM: To investigate the pharmacological mechanisms of qingganlishi decoction on patients with chronic hepatitis B (CHB) of liver dampness heat type using proteomic methods.

METHODS: The total proteins of peripheral blood mononuclear cells from 20 cases before and after treatment of the qingganlishi decoction were separated by two-dimensional electrophoresis (2-DE) individually, and the differentially

expressed protein spots between the two groups were identified by both matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) so as to measure peptide mass fingerprinting. MSDB and Swiss-Prot protein database were retrieved to identify differentially expressed protein.

RESULTS: Thirty eight spots were found to have marked changes on the quality and/or quantity. Among them, 9 proteins had been proved to be significantly up-regulated in the untreated CHB group but down-regulated after qingganlishi decoction treatment. They were listed as follows: Rho GDP-dissociation inhibitor 2, heat-shock 70 kDa protein, fibrinogen gamma-A chain precursor, F-actin capping protein alpha-1 subunit, fibrinogen beta chain precursor, XTP3TPA-transactivated protein 1, hypothetical protein, pyruvate kinase isozymes M1/M2, hypothetical protein fragment.

CONCLUSION: These differentially expressed proteins of the CHB can help people understand the pathomechanism of hepatitis B of liver dampness heat type and the working mechanism of qingganlishi decoction.

Key Words: Proteomic; Qingganlishi decoction; Chronic hepatitis B; Liver damp-heat; Peripheral blood mononuclear cells; Two-dimensional electrophoresis

Dai J, Dai XP, Xing ZH, Li C, Li JB, Jiang RX. Proteomic analysis on chronic hepatitis B of liver-gallbladder dampness-heat type treated with Qinggan Lishi decoction. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(4): 362-367

摘要

目的: 分析清肝利湿汤治疗慢性乙肝(CHB)肝胆湿热证外周血单个核细胞的蛋白质表达谱的差异, 为探讨清肝利湿汤的作用机制奠定基础。

方法: 利用双向凝胶电泳技术(2-DE)分离来源20例CHB肝胆湿热证患者用清肝利湿汤治疗前后的外周静脉血单个核细胞(peripheral

■同行评议者

张声生, 教授, 首都医科大学附属北京中医医院消化中心

blood mononuclear cells, PBMC). 用基质辅助激光解吸飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)对用清肝利湿汤治疗前后的差异蛋白质进行测定肽质量指纹谱. 检索MSDB和Swiss-Prot蛋白质数据库鉴定差异蛋白.

结果: 经过对比分析及质谱鉴定, 找到质和/或量有明显改变的38个点. 本研究鉴定了9个清肝利湿汤治疗前后的CHB患者的差异表达蛋白: Rho鸟苷酸解离抑制因子, 热休克蛋白70, 纤维蛋白gamma链前体, F肌动蛋白alpha链亚单位, 纤维蛋白beta链前体, XTP3TPA反式激活蛋白, 假想蛋白, 丙酮酸激酶同工酶M1/M2, 假想蛋白片段.

结论: 这些差异蛋白有助于了解CHB肝胆湿热证患者病理机制过程及清肝利湿汤的作用机制.

关键词: 蛋白质组学; 清肝利湿汤; 慢性乙型肝炎; 肝胆湿热证; 单个核细胞; 双向凝胶电泳技术

戴姣, 戴幸平, 邢之华, 李萃, 李家邦, 蒋荣鑫. 清肝利湿汤干预慢性乙型肝炎胆湿热证的蛋白质组学分析. 世界华人消化杂志 2009; 17(4): 362-367
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/362.asp>

0 引言

慢性乙型病毒性肝炎(chronic hepatitis B, CHB)是一种严重危害人类健康的常见病. 慢性乙型肝炎是我国发病率很高的疾病, 我国现有1.3亿乙肝病毒携带者, 慢性乙肝病毒感染的自然病程很长, 一般可持续30-50年, 并且部分患者发展为肝硬化, 终末期肝病和肝细胞癌^[1]. 且多在青壮年时期发病, 对人们身体健康和生命安全构成巨大的威胁. 肝胆湿热证是慢性乙型肝炎常见的证型之一, 病机为疏泄功能失常, 治疗上必须疏利肝胆与清利湿热之品相互为用^[2], 临床经验方清肝利湿汤疗效显著^[2]. 蛋白质组学是从整体、动态的角度, 对发病机制有关因素高通量的综合研究. 近年来, 蛋白质组学被广泛应用于人类疾病发病机制、治疗和药物筛选研究之中, 并取得了大量有意义的结果^[3-5]. 因此本研究从蛋白质组学这一全新技术入手, 从整体、动态水平这一角度来研究清肝利湿汤治疗CHB的作用机制, 以期发现抑制HBV病毒复制及病毒清除机制的有关线索.

1 材料和方法

1.1 材料 清肝利湿汤由柴胡10 g, 枳实10 g, 白芍

20 g, 茵陈20 g, 大黄5 g, 甘草5 g等六味中草药组成, 由中南大学湘雅医院中药房提供, 经专家鉴定为地道药材; 清肝利湿汤由湘雅医院制剂室煎制, 300 mL/剂. 2-D Quant Kit蛋白质定量试剂盒、固相PH梯度干胶条(IPGstrip ph3-10, 24 cm)、IPG缓冲液(ph3-10)、覆盖液均由Amersham Biosciences公司提供; 人淋巴细胞分离液购自北京鼎国生物公司; 二硫苏糖醇、碘乙酰胺、丙乙酰胺、甲叉双丙烯酰胺、尿素、甘氨酸、Tris、CHAPS、SDS、考马斯亮兰、琼脂糖、NP-40、PMSF、TritonX-100、EDTA均由Sigma公司提供; 低分子质量单向Marker由上海伯奥生物制品公司提供; 硫代硫酸钠、无水乙醇、甘油、冰醋酸、甲醛、琼脂糖、溴酚兰、TEMED为国产分析纯; 双蒸水、超纯水由湘雅医院医学中心实验室制备. 深低温冰箱(so-lou environment公司, USA)高速低温离心机(Beckman公司, USA); 小型离心机, Imagescanner扫描仪(Sigma公司); Ettan IPGphor II 等电聚焦仪, Ettan DALT II System垂直电泳槽(Amersham Pharmacia公司, USA); Applied Biosystems Voyager-DE STR Biospectrometry™ work station System 4307 MALDI-TOF-MS质谱仪(ABI公司提供). PDQuest7.0分析软件(Bio-Rad公司), Imagescanner扫描仪、Labscan扫描控制和分析前处理软件为Amersham Biosciences公司产品; Bio-Tek ELX800型自动酶标(Bio-Tek Instruments, Inc); WD-9405B型水平摇床(沃德生物医学仪器公司). YKH-III液体快速混合器(江西医疗器械厂). ML-902型定时恒温磁力搅拌器(上海浦江分析仪器厂); Typhoon9400多功能荧光扫描成像系统为Amersham Biosciences公司产品.

1.2 方法

1.2.1 临床资料: (1)一般资料: 20例慢性乙型肝炎患者标本来源于2007-04/2007-09湘雅医院中西医结合科门诊及病房, 并简要记录病史, 患者年龄18-64(中位年龄44)岁. (2)诊断标准: 西医诊断标准参照2000年西安全国病毒性肝炎会议的标准^[6]: 血清HBsAg、HBcAg、HBeAg阳性6 mo以上, 血清HBV DNA定量 1×10^8 copies/L, 血清ALT大于正常上限2倍而低于正常上限10倍. 中医肝胆湿热证参照中药新药临床研究指导原则^[7]的诊断标准: (主症)身目俱黄, 黄色鲜明, 胁肋疼痛, 脘闷腹胀, 烦热, 口干而苦, 小便黄赤, 舌质红, 苔黄腻. (次症)纳呆, 恶心呕吐, 困倦乏力, 皮肤瘙痒, 大便秘结或稀溏, 脉弦滑数. (3)排除标准: 均排除甲、丙、丁和戊型肝炎等

■ 研发前沿

证候是有规律的病理表现, 就必然有其物质基础支配机制. 目前认为所有疾病均存在基因表达的变化, 基因的表达式-蛋白质才是生理功能的执行者和体现者. 其为应用蛋白质组学研究技术进行中医辨证论治研究提供平台.

■相关报道

CHB之所以缠绵难愈,有学者认为免疫病理在其发病机制上起着重要的作用,宿主的免疫功能或免疫网络的异常、是CHB发病的根本原因。

病毒重叠感染以及其他原因(酒精、药物、自身免疫性肝病及肝癌等)引起的肝脏损害^[7]。(4)治疗方法:予以清肝利湿汤每日一剂(由湘雅医院制剂室提供),每次150 mL,2次/d,早晚空腹服用;2 wk为一疗程,直至症状消失,前后对照。前后时间以60 d内为限。服药期间停用其他药物。依从性差,中途退出的病例仍补足观察例数^[2]。

1.2.2 证候疗效判定标准 and 安全性观测:参照中药新药临床研究指导原则^[6]。包括治疗前后每2 wk观察并记录临床主要症状和体征的变化及一般体检项目检查。血、尿、便常规检查。心、肾功能检查。可能出现的不良反应及其相关检测指标。

1.2.3 样品制备和分离:清晨空腹取肘静脉血10 mL,加1支肝素(2 mL, 12 500 U)抗凝,常温下静置0.5-6 h,抽上层悬液(血浆),加入淋巴分离液(相对密度1.077,淋巴分离液:血浆=1:1-1:3),水平离心(1800 r/20 min),液体分4层由上至下分别为血浆,淋巴细胞,淋巴分离液,红细胞。抽取淋巴细胞转移至另一试管,加满生理盐水摇匀,水平离心(800 r/10 min),弃上清液,加满生理盐水摇匀,水平离心(1000 r/10 min),弃上清液,加约1 mL生理盐水混匀移至大EP管,低温水平高速离心(4℃, 12 000 r/10 min),弃上清液,清肝利湿汤治疗前后的单个核细胞标本分别标记分组,于-70℃冰箱干冻保存。

1.2.4 总蛋白的抽提:取出PBMC,每管加入改良细胞裂解液(8 mol/L urea, 2 mol/L thiourea, 1% NP240, 1% Triton X2100, 80 mmol/L DTT, 5 mmol/L PMSF, 4% CHAPS, 40 mmol/L Tris, 2% pharmalyte)200-300 μ L。室温下放置30min,间断漩涡震荡,1 mL注射器抽吸数次以剪切核酸,并采用超声波处理(冰浴间歇处理,即超声处理15 s,再放置15 s,如此反复进行约6次)。待细胞完全溶解成流动液体时,15 000 r/min, 4℃离心30 min取上清即为细胞总蛋白质。

1.2.5 总蛋白浓度测定:采用Amersham Biosciences公司专门针对蛋白质组学研究的蛋白质抽提设计的2-DE Quant Kit定量试剂盒,提取PBMC总蛋白抽提后,测定所抽提蛋白的浓度;测定各标准管及标本在波长490 nm处的吸光值,并求出标本浓度。

1.2.6 双向凝胶电泳:用双向凝胶电泳(2-DE)方法进行细胞蛋白质的分离,利用考马斯亮蓝染色方法进行电泳凝胶染色^[5]。

1.2.7 凝胶图像采集与分析:凝胶通过Imagescanner

表 1 总蛋白浓度及吸光度值 (490 nm)

编号	浓度(mg/L)	吸光度值
标准管1	0	0.381
标准管2	10	0.333
标准管3	20	0.302
标准管4	30	0.298
标准管5	40	0.227
标准管6	50	0.209
待测管1	42.97059	0.230
待测管2	33.26471	0.263

扫描仪, LabScan扫描软件, PDQuest软件进行背景消减、匹配、量化比较等分析。在相同的实验条件和参数设置条件下,当HBV患者治疗前的PBMC凝胶中的蛋白点表达较治疗后PBMC凝胶明显增强或降低(校正后蛋白质点的表达量相差2倍以上),并在不少于50%的该组PBMC凝胶图谱中表达,视其为差异蛋白质点。

1.2.8 差异表达蛋白点的质谱鉴定:选取分辨率较好的蛋白质点,参照李茂玉 *et al*^[8]的方法进行蛋白质的原位酶解参照Li *et al*^[5]的方法利用MALDI-TOF-MS质谱仪进行质谱分析,获得肽质量指纹图谱。

1.2.9 差异点的标示:相应的鉴定出来的差异蛋白点标示在相应的分析胶上(考染2-DE图上),在CHB治疗前中高表达或特异性表达的蛋白点上标记。各差异点的顺序号为本工作发现的先后顺序。

统计学处理 实验数据以mean \pm SD表示,所有数据统计分析在Excel及SPSS11.0软件上进行。

2 结果

2.1 疗效观察 肝胆湿热型慢性乙肝患者的证候疗效以前述的判定标准为依据,临床痊愈、显效和有效视为有效。参加实验的患者,依从性差,中途退出的病例仍补足观察例数,本研究选取20位患者治疗有效的进入结果分析。治疗过程中患者均无不良反应。

2.2 总蛋白浓度 6个标准管的浓度分别为0, 10, 20, 30, 40及50 mg/L时,在波长490 nm处的吸光度值随浓度的增高而降低(表1),根据标准管的浓度和吸光度值绘出总蛋白定量标准曲线,求得直线回归方程 $y = -0.0034x + 0.3761$ (图1),将待测标本吸光度值代入方程,计算出其浓度(表1)。

2.3 标本2-DE图谱分析 本论文所研究的CHB患者的PBMC总蛋白质经双向凝胶电泳,考马斯亮

表 2 Mascot软件在MSDB和SWISS-PROT数据库中搜索到的差异表达蛋白质

蛋白斑点	匹配的肽段	数据库ID	蛋白质名称	等电点/分子质量	覆盖率(%)
P1	7/20	GDIS	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	5.10/22900	61
P2	12/21	1HJOA	Heat-shock 70 kDa protein	6.69/41973	42
P3	9/23	Q96DE1	Hypothetical protein	5.20/17998	55
P4	12/66	FGHUG	Fibrinogen gamma-A chain precursor	5.7/50092	36
P5	11/20	Q8WVV5	Hypothetical protein (Fragment)	5.78/40477	40
P6	19/38	FGHUB	Fibrinogen beta chain precursor	8.54/56577	49
P7	12/47	KPYM	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	7.95/58339	23
P8	7/42	Q1KSF8	XTP3TPA-transactivated protein 1	6.42/23896	19
P9	10/19	G0263	F-actin capping protein α -1 subunit	5.45/33073	58

■ 名词解释

蛋白质组学 (Proteomics): 指从整体上研究和分析特定生理状态下蛋白质组成成分、表达水平和修饰状态, 以及蛋白质与蛋白质的相互作用和联系, 揭示蛋白质整体水平与疾病机制、细胞功能等方面的联系的学科。

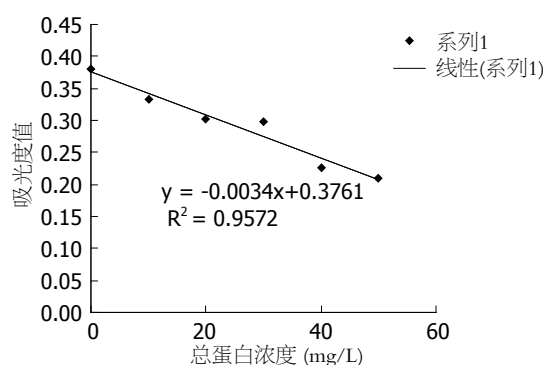


图 1 2-DE总蛋白定量标准曲线。

蓝染色后得到背景清晰、分辨率高、重复性好 2-DE图谱, 总蛋白上样量为0.8 mg时图象最佳。经PDQuest双向凝胶电泳图像分析软件及手工分析, 每块2-DE胶可分离近1100个左右蛋白点。等电点(isoelectric point, PI)4-9和分子质量(M_r)为14-63 kDa范围内; 同组2块胶的蛋白质点在对应有位置上有很好的重复性, 不同胶间蛋白质点在IEF方向及在SDS-PAGE方向上的偏差均较小, 本实验双向电泳3次重复实验的位置偏差在IEF方向的平均偏差为 1.12 ± 0.20 mm, SDS-PAGE方向的平均偏差为 1.18 ± 0.15 mm, 表明本实验获得了图像清晰、分辨率高和重复性好的2-DE电泳图谱(图2)。清肝利湿汤治疗前后的慢性乙型肝炎肝胆湿热型患者的PBMC的2-DE图谱显示了极大的相似形, 其匹配率为82%-91%。同一份标本平行电泳的匹配率在87%以上, 并且各蛋白点的强度变化无显著性差异经比较发现, 清肝利湿汤组与慢性乙型肝炎肝胆湿热型治疗前组之间有38个差异点, 18个在清肝利湿汤组表达上调, 16个在清肝利湿汤组表达下调, 4个蛋白质点只在清肝利湿汤组表达。

2.4 差异表达点的质谱鉴定 对相应的差异表达的蛋白进行质谱鉴定, 结果表明, 大多数蛋白点

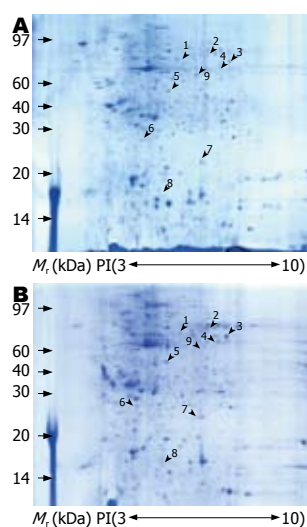


图 2 PBMCs双向电泳图谱(A和B)的差异蛋白质点。第一向固pH3-10NL梯度干胶条等电聚焦, 第二向SDS-PAGE垂直电泳, 凝胶采用考马斯亮蓝染色。A: CHB肝胆湿热证组; B: 清肝利湿汤组。

的出峰情况较好, 对同一个蛋白点用MALDI-TOF-MS鉴定, 数据库查询后为同一蛋白质。利用MALDI-TOF-MS成功的鉴定了9个差异表达蛋白点(图3), 在治疗前中特异性表达或治疗后高表达的蛋白的6个为: Rho鸟苷酸解离抑制因子(Rho GDP-dissociation inhibitor 2), 纤维蛋白gamma链前体(fibrinogen gamma-A chain precursor), 假想蛋白(Hypothetical protein), F肌动蛋白alpha链亚单位(F-actin capping protein alpha-1 subunit), 纤维蛋白beta链前体(fibrinogen beta chain precursor), XTP3TPA反式激活蛋白(XTP3TPA-transactivated protein 1); 在治疗后中特异性表达或较治疗前高表达的蛋白为3个: 热休克蛋白70(heat-shock 70 kDa protein), 丙酮酸激酶同工酶(Pyruvate kinase isozymes M1/M2), 假想蛋白片段(Hypothetical protein, Fragment); 相对应9个不同的蛋白质(蛋白点之间的强度差异为3-270倍, 均具有统计学意义, $P < 0.05$, 表2)。其中实验等电点和分子质量是根据蛋白点在双向电泳胶上的位置, 经图像分析软件分析后得到。

■同行评价

本文将蛋白组学引入慢性乙肝肝胆湿热证研究,从学术的角度来看,有一定的意义,但临床实际指导意义有限。

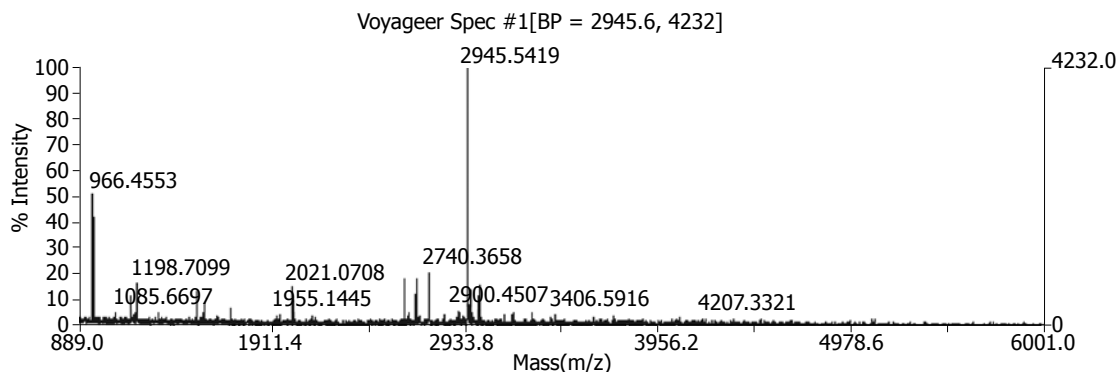


图3 MALDI-TOF-MS对P1点鉴定的PMF图。x轴: 质荷比(m/z), y轴: 相对强度; 峰旁标示的数字代表肽片断的单同位素峰[M+H]⁺的质量数。

3 讨论

CHB之所以缠绵难愈,有学者认为免疫病理在其发病机制上起着重要的作用,宿主的免疫功能或免疫网络的异常、是CHB发病的根本原因^[9]。机体的细胞免疫、体液免疫以及各种免疫因子间的相互促进、相互制约,构成了一个复杂的免疫网络。PBMC是机体质量要的免疫细胞,在多种疾病发生、发展、治疗及预后判断过程中发挥重要作用^[10-12]。对于慢性乙型肝炎的治疗,如何打破感染宿主的免疫耐受、清除细胞内病毒感染是关键所在,也是乙型肝炎特异性免疫治疗研究的重点和难点。随着乙型肝炎病毒免疫生物学和免疫病理学的飞速进展,保护性免疫的观念也发生了深刻变化。最近,对CHB的特异性治疗研究有了重大突破,有研究发现:基于多个表位的组合肽治疗有望打破宿主对表面抗原的免疫耐受^[13]。

通过比较慢性乙型肝炎肝胆湿热证患者用清肝利湿汤治疗前后PBMC之间蛋白质组的异同,可以发现一些与肝胆湿热证相关的特异性蛋白质,为进一步研究了解清肝利湿汤的作用机制提供可能;深入了解这些与CHB相关的特异性蛋白质的结构和功能,将极大地促进CHB发病机制、诊断、治疗和新药开发的研究。《亚太地区慢性乙型肝炎处理共识》中将“中医中药和其他草药在慢性乙型肝炎治疗中有何作用”作为“未解决和需进一步研究的问题”提出,认为需要进一步研究解决作用机制等问题^[14]。

中药新方清肝利湿汤,临床实验证明具有良好的抗炎、镇痛、抗氧自由基损伤的作用,清热利湿方中柴胡疏肝解郁,茵陈清利湿热,枳实破气消积,泻热除湿,大黄泻热化瘀,白芍柔肝止痛,主治肝胆湿热之证^[15]。

我们对CHB患者与正常人的血清单个核细胞的蛋白质表达谱进行了分析,鉴定了9个与HBV相关的蛋白质点,对于这些在2-DE图谱上经图像软件分析后有明显量变的蛋白斑点,MALDI-TOF-MS鉴定可作为一种较为灵敏的手段,为差异蛋白的鉴定提供了有价值的指标。

在本研究中,我们鉴定的9个差异蛋白质中包括细胞凋亡信号分子、凝血相关蛋白及能量代谢相关酶等,他们均与细胞信号传导、细胞周期等有关,对促进细胞分裂增殖起着重要作用。

热休克蛋白具有多种生物学功能,他不但在细胞内作为分子伴侣参与细胞内的多种蛋白转位组装,调节细胞的自我平衡和细胞凋亡等,是细胞凋亡的决定因子。HSP70在正常细胞中表达水平较低,而在应激状态下可显著性升高。彭明利等发现体外构建HSP70-HbsAg(戊)、HSP70-HbsAg(ADP)复合物和HSP70-HbsAg(戊)、HSP70-HbsAg(ADP)蛋白复合物均能够引起BALB/C小鼠的体液免疫和细胞免疫应答,诱导脾细胞的HbsAg特异性CTL效应,能够增强DC细胞的抗原呈递能力,促使其分泌大量细胞因子IL-6和TNF- α ,在体外激活产生HbsAg特异性CTL效应^[16]。肝炎肝胆湿热型患者经清肝利湿汤治疗后,Rho-GDI及F-肌动蛋白表达上调,HSP70表达下调,表明清肝利湿汤可能通过信号转导通路影响肝胆湿热证的应激状态,提高患者细胞免疫应答。

纤维蛋白原是由肝脏产生的一种黏附蛋白,可以被血小板 α 颗粒摄取并储存^[17]。纤维蛋白原通过其在血小板上的配体GPIIb/IIIa使血小板聚集及血小板与单核细胞的黏附,促进炎症和血栓形成。纤维蛋白原的另一重要功能是通过其r3序列结合到ICAM1并调整ICAM1依赖性黏附,作为内皮细胞和单核细胞间必需的桥连子而在免

疫炎症反应中起重要作用^[18]。乙型肝炎病毒所致各类型肝病在肝功能受损的同时, 出现Fbg含量与功能的下调, 但两者之间不成正比, 且当Fbg的功能异常时, 虽其含量达到正常水平, 仍可因纤维蛋白单体聚合反应减弱而导致止血功能的缺陷^[19]。纤维蛋白原在经清肝利湿汤治疗后表达上调, 这说明清肝利湿汤有促纤维蛋白单体聚合, 改善凝血功能, 并且可能存在抑制炎症反应的作用。

XTP3TPA-transactivated protein 1是乙型肝炎病毒(HBV)基因组中最小的开放读码框架(ORF)编码的x蛋白(HBxAg), 是一种具有反式激活作用的病毒蛋白, 在HBV感染肝细胞的恶性转化中具有十分重要的作用。HBxAg蛋白不仅可以上调HBV基因的复制能力, 还可以影响细胞转录、生长以及细胞凋亡^[20]。目前认为HBxAg蛋白广泛的激活作用是由于其具有双重作用途径。HBxAg蛋白在细胞内定位于细胞质和核内^[21], 对HBxAg反式激活途径目前研究认为存在两种方式, 即: 在胞质中通过信号传导途径, 在核内与TATA结合蛋白等相互作用而影响基因的表达。经清肝利湿汤治疗后表达下调, 这说明清肝利湿汤可能有抑制X蛋白反式激活作用, 达到下调HBV的复制作用。

总之, 我们通过比较蛋白质组学分析, 可以推测上述蛋白质可能参与了肝胆湿热证的形成发展; 清热利湿汤治疗肝胆湿热证的疗效机制可能包括对细胞凋亡信号分子、凝血相关蛋白、细胞免疫及能量代谢相关酶的影响等; 这些蛋白质可能是清热利湿汤治疗肝胆湿热证的作用靶点, 而这些蛋白质的具体作用机制还需进一步证实。

致谢: 感谢中南大学湘雅医院卫生部肿瘤蛋白质组学重点实验室对本文实验提供的支持和帮助。

4 参考文献

- 1 斯崇文. 慢性乙型肝炎的现状和问题. 临床药物治疗杂志 2006; 4: 1-2
- 2 戴幸平, 戴姣, 傅蕾, 李家邦. 清肝利湿汤治疗肝胆湿热型慢性乙肝的疗效观察. 实用预防医学 2007; 14: 1661-1662
- 3 Tyers M, Mann M. From genomics to proteomics.

- 4 Hanash S. Disease proteomics. *Nature* 2003; 422: 226-232
- 5 Li C, Zhan X, Li M, Wu X, Li F, Li J, Xiao Z, Chen Z, Feng X, Chen P, Xie J, Liang S. Proteomic comparison of two-dimensional gel electrophoresis profiles from human lung squamous carcinoma and normal bronchial epithelial tissues. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2003; 1: 58-67
- 6 中华医学会感染病学与寄生虫学分会和肝病学会. 病毒性肝炎防治方案. 中华传染病学杂志 2001; 19: 56-62
- 7 郑晓冀. 中药新药临床研究指导原则. 第1版. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 147
- 8 李茂玉, 肖志强, 李萃, 吴晓英, 冯雪萍, 易红, 李建玲, 陈主初, 陈平, 梁宋平. 小细胞肺癌细胞系NCI-H446蛋白质表达谱的建立. 癌症 2004; 23: 1116-1121
- 9 张宜俊, 章谷生. 乙型肝炎生物治疗. 上海: 上海科学技术出版社, 2001: 65
- 10 邓平, 赵水平, 黄红光, 吴洁, 李江, 周宏年. 环氧化酶2在急性冠脉综合征患者外周血单核细胞中的表达及意义. 中南大学学报(医学版) 2005; 30: 403-406
- 11 Peng BG, Liang LJ, He Q, Huang JF, Lu MD. Expansion and activation of natural killer cells from PBMC for immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2119-2123
- 12 李宁, 范学工, 黄燕, 刘征波, 全俊, 汤参娥, 朱才. CpG-ODN对慢性乙型肝炎患者外周血单个核细胞T-bet表达的影响. 免疫学杂志 2005; 21: 216-218
- 13 Sette AD, Oseroff C, Sidney J, Alexander J, Chesnut RW, Kakimi K, Guidotti LG, Chisari FV. Overcoming T cell tolerance to the hepatitis B virus surface antigen in hepatitis B virus-transgenic mice. *J Immunol* 2001; 166: 1389-1397
- 14 于乐成, 陈成伟, 姚光弼. 慢性乙型肝炎亚太地区专家共识(2006年6月更新). 肝脏 2007; 12: 78-82
- 15 夏苏英, 李家邦. 清肝利湿汤治疗肝胆湿热证的临床研究. 湖南中医学院学报 2000; 20: 56-58
- 16 Peng M, Chen M, Ling N, Xu H, Qing Y, Ren H. Novel vaccines for the treatment of chronic HBV infection based on mycobacterial heat shock protein 70. *Vaccine* 2006; 24: 887-896
- 17 Hoffmeister HM, Heller W, Seipel L. [Blood coagulation and fibrinolysis in arteriosclerosis] *Z Kardiol* 1999; 88: 315-323
- 18 Seeger FH, Blessing E, Gu L, Bornhold R, Denger S, Kreuzer J. Fibrinogen induces chemotactic activity in endothelial cells. *Acta Physiol Scand* 2002; 176: 109-115
- 19 Naito M. [Effects of fibrinogen, fibrin and their degradation products on the behaviour of vascular smooth muscle cells] *Nippon Ronen Igakkai Zasshi* 2000; 37: 458-463
- 20 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 段惠娟, 张玲霞. 乙型肝炎病毒X基因酵母表达载体构建及表达. 世界华人消化杂志 2002; 10: 15-18
- 21 Henkler F, Hoare J, Waseem N, Goldin RD, McGarvey MJ, Koshy R, King IA. Intracellular localization of the hepatitis B virus HBx protein. *J Gen Virol* 2001; 82: 871-882

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕