

# 慢性乙型肝炎肝肾阴虚证血浆蛋白质组学

刘友平, 王磊琼, 郭芳宏, 王小栋, 魏 岷

## ■背景资料

中医学以证候为基础、辨证论治为核心, 对于慢性乙型肝炎患者的临床个体化诊疗具有积极意义。然而, 目前中医药诊治慢性乙型肝炎尚缺乏严格的客观化、规范化辨证分型标准, 而辨证的准确与否, 是论治的关键, 是实现正确辨证和治疗的重要保证。因此, 对慢性乙型肝炎中医证候客观化研究已成为当务之急。

刘友平, 泸州医学院生物化学教研室 四川省泸州市 646000  
王磊琼, 郭芳宏, 魏岷, 泸州医学院中西医结合学院 四川省泸州市 646000  
王小栋, 泸州医学院附属中医院肝胆内科 四川省泸州市 646000  
四川省中医药管理局基金资助项目, No. 2007XS29  
四川省教育厅科技基金资助项目, No. 2006C085  
作者贡献分布: 刘友平、王磊琼及魏岷对此论文作贡献均等; 此课题设计由魏岷与刘友平完成; 样本收集由王磊琼、郭芳宏及王小栋完成; 研究过程由刘友平、王磊琼及郭芳宏操作完成; 本论文写作由刘友平与魏岷共同完成。  
通讯作者: 魏岷, 教授, 646000, 四川省泸州市, 泸州医学院中西医结合学院. weimei62@126.com  
收稿日期: 2010-12-08 修回日期: 2011-02-22  
接受日期: 2011-02-26 在线出版日期: 2011-03-08

## Proteomic analysis of plasma from chronic hepatitis B patients with Yin deficiency of the liver and kidneys

You-Ping Liu, Lei-Qiong Wang, Fang-Hong Guo, Xiao-Dong Wang, Mei Wei

You-Ping Liu, Department of Biochemistry, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China  
Lei-Qiong Wang, Fang-Hong Guo, Mei Wei, College of Integrated Traditional Chinese Medicine and Western Medicine, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China  
Xiao-Dong Wang, Department of Liver Diseases, the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China  
Supported by: the Foundation of Sichuan Administration of Traditional Chinese Medicine, No. 2007XS29; and the Scientific Research Foundation of the Education Department of Sichuan Province, No. 2006C085  
Correspondence to: Professor Mei Wei, College of Integrated Traditional Chinese Medicine and Western Medicine, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China. weimei62@126.com  
Received: 2010-12-08 Revised: 2011-02-22  
Accepted: 2011-02-26 Published online: 2011-03-08

## Abstract

**AIM:** To explore the molecular mechanism underlying the development of Yin deficiency of the liver and kidneys in patients with chronic hepatitis B by comparing plasma protein expression between chronic hepatitis B patients with Yin deficiency of the liver and kidneys and normal controls.

**METHODS:** Plasma proteins from all experimen-

tal subjects were separated by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE). The proteomic expression profiles were analyzed by comparative proteomic technique to discover differentially expressed protein spots, which were then identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS).

**RESULTS:** Six protein spots which showed at least two-fold differential expression between patients and normal controls were detected, of them Apo AI, Apo AII, haptoglobin, and retinol-binding protein were identified by MALDI-TOF-MS. All the four proteins showed lower expression in chronic hepatitis B patients with Yin deficiency of the liver and kidneys than in normal controls.

**CONCLUSION:** The proteins identified in this study may be related to the development of Yin deficiency of the liver and kidneys in patients with chronic hepatitis B and represent useful molecular targets for diagnosis and treatment of the syndrome.

**Key Words:** Chronic hepatitis B; Yin deficiency of the liver and kidneys; Serum protein; Proteomics

Liu YP, Wang LQ, Guo FH, Wang XD, Wei M. Proteomic analysis of plasma from chronic hepatitis B patients with Yin deficiency of the liver and kidneys. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(7): 718-722

## 摘要

**目的:** 初步探讨参与慢性乙型肝炎肝肾阴虚证病理生理过程的分子机制。

**方法:** 采用双向电泳技术结合质谱分析等生物信息学分析方法对慢性乙型肝炎肝肾阴虚证及正常健康对照组的血浆全蛋白进行比较分析。

**结果:** 获得组间标准化总灰度值(%Vol)都相差2倍及以上的蛋白斑点共6个, 通过基质辅助激光解析电离-飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)分析, 鉴定出慢性乙型肝炎肝肾阴虚证血浆蛋

## ■同行评议者

王富春, 教授, 长春中医药大学针灸推拿学院

白中有明显规律性变化的差异表达蛋白质有4个: 载脂蛋白A I (Apo A I)、载脂蛋白A II (Apo A II)、结合珠蛋白(HPT)、视黄醇结合蛋白(RBP), 相对于正常健康对照组, 这4个差异表达蛋白质都表现为明显下调趋势。

**结论:** 以上差异表达蛋白质的组合性变化可能是慢性乙型肝炎肝肾阴虚证的物质基础, 具有潜在的慢性乙型肝炎肝肾阴虚证诊断、预后标志物或治疗靶点的意义。

**关键词:** 慢性乙型肝炎; 肝肾阴虚证; 血浆蛋白; 蛋白质组学

刘友平, 王磊琼, 郭芳宏, 王小栋, 魏崛. 慢性乙型肝炎肝肾阴虚证血浆蛋白质组学. 世界华人消化杂志 2011; 19(7): 718-722

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/718.asp>

## 0 引言

中医证候是疾病发生发展过程中某一阶段的病理概括, 是中医辨证论治的基础和核心, 它具有整体性、动态性、时相性。中医认为慢性乙型肝炎是由湿热疫毒病邪侵入人体, 留恋日久, 伤及肝、脾、肾等脏腑, 扰乱气血, 隐伏血分, 导致机体出现各种衰退性变化而表现不同的证候类型。中国中医药学会内科肝病专委会1991年天津会议制定了“慢性肝炎中医辨证标准”, 将慢性乙型肝炎分成肝郁脾虚、湿热中阻、肝肾阴虚、脾肾阳虚、瘀血阻络五种证型<sup>[1]</sup>。中医学以证(证候)为基础、辨证论治为核心, 对于慢性乙型肝炎患者的临床个体化诊疗具有积极意义。然而, 目前中医药治疗慢性乙型肝炎尚缺乏严格的客观化、规范化辨证分型标准, 而辨证的准确与否, 是论治的关键, 是实现正确辨证和治疗的重要保证。因此, 对慢性乙型肝炎中医证候客观化研究已成为当务之急。蛋白质组学是继基因组学后提出的新学科, 他以组织或细胞的全部蛋白质为研究对象, 以蛋白质表达整体水平的研究为特点, 为生命科学的研究提供了新的视角。近年来提出的证候蛋白质组学是从不同层次“整体”的蛋白质活动的角度来揭示和阐明证候形成与发展的规律, 国内不少学者已经对一些疾病的中医证候的蛋白质组基础展开了初步的实验研究, 初步发现了一些证候的生物分子标志及其动态演化特征<sup>[2-4]</sup>。迄今为止, 国内鲜有利用蛋白质组学技术研究慢性乙型肝炎辩证关系的研究报道。本实验选择慢性乙型肝炎

炎肝肾阴虚证为研究对象, 从蛋白质组学的角度初步探讨慢性乙型肝炎中医证候的本质内涵, 从而为临床的辨证论治提供客观的参考数据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 20例慢性乙型肝炎肝肾阴虚证血浆样品取自泸州医学院附属中医院肝胆科2009-02/2010-01住院患者为实验组, 其中男17例, 女3例, 患者均签署知情同意书。慢性乙型肝炎西医诊断标准采用中华医学会病毒性肝炎防治方案<sup>[5]</sup>, 排除慢性重型肝炎和其他肝炎病毒重复感染。所有病例均符合以下标准: 年龄 $\geq 18$ 岁, 血清HBsAg阳性, 丙氨酸转氨酶2-10倍于正常值。同时, 按照行标《中医病证诊断疗效标准》及国标《中医病证分类与代码》, 由两位副高以上专家对患者进行辨证。对照组为健康志愿献血者5例, 乙型肝炎表面抗体阳性。丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺(N, N-methylenebisacrylamide)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、超纯尿素、二硫苏糖醇(DTT)、尿素(Urea)、3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸(CHAPS)、甘氨酸、N, N, N, N, -四甲基乙二胺(TEMED)、过硫酸铵(APS)、十二烷基磺酸钠(SDS)、固相pH梯度干胶条(pH4-7, 17 cm)和矿物油购自Bio-Rad公司; 蛋白分子量Marker和苯甲基磺酰氟(PMSF)购自碧云天生物技术研究; 其他常规试剂均购自GE Healthcare公司。低温台式离心机(TDZ4.WS)购自长沙湘仪离心机仪器有限公司; 双向电泳系统、ChemiDoc XRS蛋白凝胶成像系统购自Bio-Rad公司; 高速冷冻离心机购自Sigma公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 样品处理:** 取慢性乙型肝炎肝肾阴虚证患者及正常健康人晨空腹肘静脉血2 mL, 医用血常规管(EDTA抗凝), 立即置4℃保存, 静置30 min后于普通离心机2 500 g $\times$ 20 min, 提取血浆, 分装, 冻存于超低温冰箱-80℃备用。实验前取出冻存血浆, 放于4℃解冻, 于13 000 g、4℃离心1 h, 以去除血浆中将干扰双向电泳的核酸、脂类、多糖等杂质<sup>[6]</sup>。

**1.2.2 蛋白质组双向电泳分离:** 各样本取血浆2  $\mu$ L, 加水化液(8 mol/L Urea, 4% CHAPS, DTT 0.01 kg/L, Bio-lyte 3-10 5 mL/L, 0.1%溴酚蓝痕量)至总量350  $\mu$ L/胶条, 混匀后加入水化槽, 放上pH4-7的IPG胶条, 1 h后加入矿物油覆盖胶条过夜。将水化后的胶条转移至等电聚焦电泳系统(Bio-Rad), 于17℃进行聚焦, 程序设置为250

## ■创新盘点

本研究通过双向电泳结合质谱技术, 检测出慢性乙型肝炎肝肾阴虚证血浆蛋白共4个差异表达蛋白质: Apo A I、Apo A II、HPT和RBP。这4个差异表达蛋白质的表达量相对正常组都明显降低。

## ■应用要点

Apo A I、Apo A II、HPT、RBP, 这些差异表达蛋白质的组合性变化可能是慢性乙型肝炎肝肾阴虚证的物质基础, 具有潜在的作为慢性乙型肝炎肝肾阴虚证诊断、预后标志物或治疗靶点的意义。

表 1 差异表达蛋白点质谱分析信息

蛋白编号	蛋白名称	Swiss-Prot 注册号	蛋白匹配分值	肽段匹配数	理论相对分子质量(Da)/等电点(PI)	实验相对分子质量(Da)/等电点(PI)	功能
1	载脂蛋白A II (Apo A II)	P02652	118	5	7 250/4.71	10 300/4.64	脂类代谢
2	结合珠蛋白(HPT)	P00738	91	8	17 070/5.68	22 800/5.93	肝脏分泌功能
3	结合珠蛋白(HPT)	P00738	142	9	16 880/6.07	22 800/6.30	肝脏分泌功能
4	载脂蛋白A I (Apo A I)	P02647	98	8	23 000/5.22	25 100/5.14	脂类代谢
5	血浆视黄醇结合蛋白(RBP)	P02753	86	5	19 800/5.24	21 300/5.20	转运VitA的特异运载蛋白
6	载脂蛋白A I (Apo A I)	P02647	103	7	23 453/5.48	24 200/5.64	脂类代谢

V, 2 h→500 V, 1 h→1 000 V, 1 h→5 000 V, 2 h→10 000 V, 总伏时数6 000 V时结束IEF电泳. 平衡两次后采用浓度为10%的SDS聚丙烯酰胺凝胶按照Bio-Rad公司说明书进行第二项电泳分离. 最后采用银染法进行染色获得2-DE图谱. 各样本重复双向电泳3次.

1.2.3 凝胶成像及双向电泳图谱分析: 将染色后的凝胶置ChemiDoc XRS凝胶成像系统中照相成像. 采用ImageMaster 2D Platinum v5.0 (Amersham)双向电泳图谱分析软件进行斑点自动识别、半定量检测及配对分析. 获得各蛋白斑点的实验等电点(isoelectric point, PI)和MW, 筛选组间标准化总灰度值都相差2倍及以上的蛋白斑点, 采用MALDI-TOF-MS进行质谱检测. 质谱检测和蛋白斑点的匹配鉴定由北京肿瘤防治研究所分析完成.

**统计学处理** 所有数据的统计分析在Excel及SPSS11.0软件上进行.

## 2 结果

2.1 人血浆总蛋白2-DE图谱 慢性乙型肝炎肝肾阴虚证患者及正常健康人各血浆样本2 μL/胶条经PH为4-7的IPG进行双向凝胶电泳分离、银染法染色获得背景较清晰、分辨率高、重复性好的2-DE图谱见图1. 大多数蛋白质斑点分布在PI 5-6.5和相对分子质量35 000-90 000 Da, 同样本胶的蛋白质点在对应位置上有较好的重复性, 不同胶间蛋白质点在PI和分子量方向上有一定偏差, 但不影响结果的分析.

2.2 肝肾阴虚证、正常对照组2-DE图谱差异蛋白点的分析 正常对照组共有可稳定重复的蛋白斑点456±53个, 实验组共有可稳定重复的蛋白斑点439±74个, 对照组与实验组自动匹配配对361±29对, 匹配率约73%. 实验组相对正常对

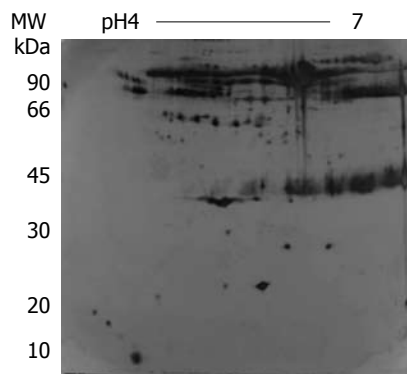


图 1 人血浆总蛋白2-DE图谱(正常对照组).

照组的蛋白质表达谱在3次双向电泳图谱中均出现总灰度差达2倍以上的蛋白点视为差异表达蛋白点, 共有6个蛋白点, 见图2所示的蛋白点1-6. 将各差异蛋白的表达量进行柱状分析: 肝肾阴虚证组各差异表达蛋白点都表现为明显下调趋势(图3).

2.3 差异蛋白点质谱分析 选取以上差异表达明显、分辨较清楚的6个点蛋白点作进一步质谱鉴定. 质谱采用MALDI-TOF-MS分析, 测得各自的肽质量指纹图谱. 通过Mascot软件搜索SWISS-PROT数据库, 将查询结果结合双向凝胶图谱上相应点的表观等电点, 分子量等进行综合分析. 以此确定待测蛋白质点的性质, 寻找相关蛋白质. 差异蛋白点数据库查询结果见表1.

## 3 讨论

近年来, 国内众多中西医结合学者运用现代科技手段, 对慢性乙型肝炎进行多项指标的检测, 以求寻找出中医各证型的特异性辨证指标, 实现慢性乙型肝炎中医辨证分型的客观化<sup>[7-9]</sup>. 但这些特异性指标比较分散, 还未形成统一的体系. 这就要求众多学者进一步探索, 找到辨病与辨证, 以全面认识慢性乙型肝炎中医证的本质.

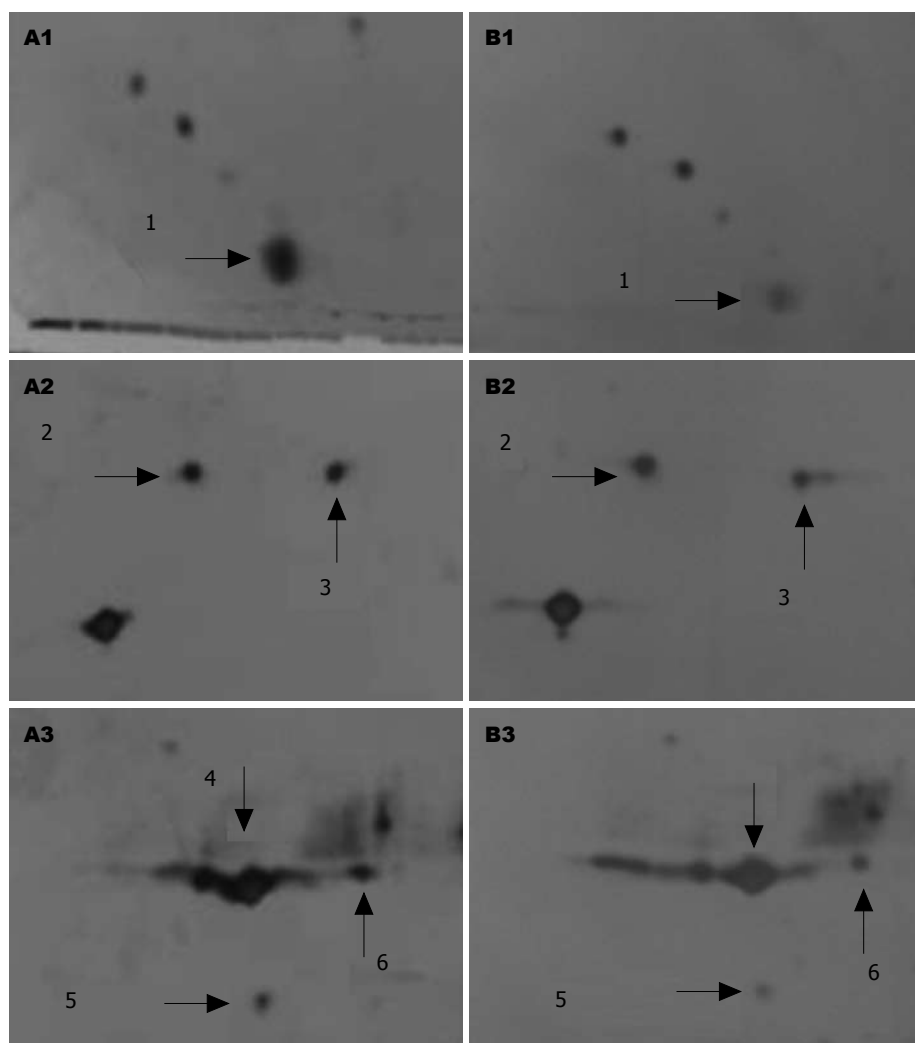


图 2 肝肾阴虚证与正常对照组比较的主要差异表达蛋白斑点. A: 正常对照组; B: 肝肾阴虚证实验组.

■同行评价  
本文方法先进, 为中医证候研究提供了研究思路和技术.

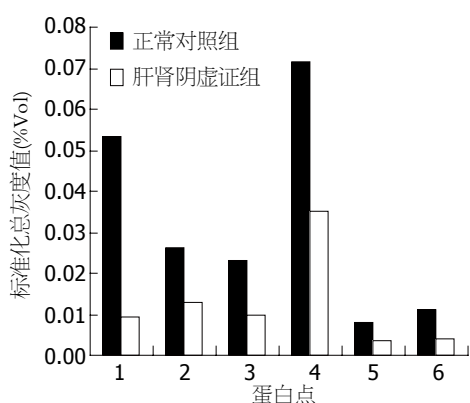


图 3 各差异蛋白点的蛋白表达量比较.

肝肾阴虚证是中医慢性乙型肝炎临床证候之一, 本研究通过双向电泳和质谱技术检测出慢性乙型肝炎肝肾阴虚证血浆蛋白共4个差异表达蛋白质(蛋白点2、3为同一蛋白质, 蛋白点4、6为同一蛋白质): Apo A I、Apo A II、结合珠蛋白(haptoglobin, HPT)和视黄醇结合蛋白(retinol binding protein, RBP). 这4个差异表达蛋白质的表达量相对正常组都明显降低.

HPT又称触珠蛋白, 是血清球蛋白组分中的一种酸性糖蛋白, 在参与宿主抗感染、抗氧化活性、抑制前列腺素合成、抑制细菌、促进血管生、损伤组织的修复以及内环境稳定的过程中起着重要作用<sup>[10]</sup>. 此外, HPT具有免疫抑制作用, 能抑制不同类型的凝集素引起的淋巴细胞转化, 抑制Th2细胞因子的释放, 也可能是免疫系统的受体-配体激活过程中的天然拮抗剂<sup>[11]</sup>. HPT主要在肝脏合成和降解, 当肝实质的广泛受损, 肝脏合成触珠蛋白的功能低下<sup>[10,12,13]</sup>. 可见, 慢性乙型肝炎肝肾阴虚证患者血浆HPT的降低不仅肝脏的合成分泌功能, 也可能反应了机体的免疫功能紊乱状况.

RBP是体内一类将视黄醇(维生素A)从肝中转运至靶组织以实现维生素A的细胞内转运代谢的特异的运载蛋白, 在协助维生素A发挥生理功能中起着不可替代的作用<sup>[14]</sup>. RBP主要由肝实质细胞合成的, 因此, 当肝细胞病变时, 该结合蛋白合成减少. 本研究发现慢性乙型肝炎肝肾阴虚证患者的RBP血浆含量相对正常健康人明显降

低,进一步证实慢性乙型肝炎肾阴虚证肝功受到一定的损害。

Apo A I 和Apo A II 大部分分布在高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)中,是HDL的主要载脂蛋白,都主要由肝和小肠合成。慢性乙型肝炎肾阴虚证患者中血浆Apo A I 和Apo A II 同时下降,一是反应了肝细胞合成功能的下降<sup>[15,16]</sup>,同时也反应慢性乙型肝炎肾阴虚证的分子机制可能与HDL的代谢存在一定的相关性。

从中西医结合医学的角度,中医证本质的含义可以认为是引起证发生发展的物质基础,这些物质决定着证的发生发展的动态变化过程,是在证的发生发展过程中产生的特殊物质。由此可见,以上差异表达的蛋白质不仅反应了慢性乙型肝炎肾阴虚证肝脏功能受损程度;同时,这些差异表达蛋白质的组合变化很可能是慢性乙型肝炎肝肾阴虚证的物质基础。因此,对以上差异表达蛋白质的进一步研究将为揭示慢性乙型肝炎肝肾阴虚证的发病分子机制及寻找治疗诊断靶标提供可靠的实验依据。

#### 4 参考文献

- 1 中国中医药学会内科肝病专业委员会. 病毒性肝炎中医辨证标准(试行). 中医杂志 1992; 3: 39-40
- 2 曾武雄, 秦鉴. 冠心病寒凝证的蛋白组学分析. 现代保健: 医学创新研究 2007; 4: 122-124
- 3 孙晓敏, 李晓勇, 靳文, 王云丹, 魏敏, 赵晓山, 罗仁. 亚健康肾阴虚证的血浆蛋白质组学初步研究. 四川中医 2008; 26: 7-9
- 4 刘希成, 梁恒, 田真, 刘颖, 陈阳, 张霖. 肾阳虚证候的人血清比较蛋白质组学分析. 中国生物化学与分子生物学报 2007; 23: 592-599
- 5 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 324-329
- 6 理查德 J. 辛普森, 何大澄. 蛋白质与蛋白质组学实验指南. 第1版. 北京: 化学工业出版社, 2006: 134-138
- 7 张国良, 吴其恺, 林巧, 邓欣, 乐晓华, 聂广. 260例慢性乙型肝炎中医证型与肝组织病理改变的相关性研究. 中国中西医结合杂志 2007; 27: 613-615
- 8 张晓刚, 吕志平, 钟小兰, 谭秦湘, 贺松其. 129例隐证型慢性乙型肝炎患者肝组织病理及病毒学分析. 上海中医药杂志 2006; 40: 19-20
- 9 黄建良. 慢性乙型肝炎中医辨证分型与肝功能、乙肝三系关系的探讨. 医学信息 2010; 23: 146-146
- 10 罗新华, 程明亮, 杨勤, 张权. 肝纤维化患者血清差异蛋白质的筛选. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1672-1675
- 11 Arredouani M, Matthijs P, Van Hoeyveld E, Kasran A, Baumann H, Ceuppens JL, Stevens E. Haptoglobin directly affects T cells and suppresses T helper cell type 2 cytokine release. *Immunology* 2003; 108: 144-151
- 12 Carter K, Worwood M. Haptoglobin: a review of the major allele frequencies worldwide and their association with diseases. *Int J Lab Hematol* 2007; 29: 92-110
- 13 Qin X, Xie L, Chen XY, Dai Z, Cui JF, Kang XN, Peng K, Shu H, Li S, Liu YK. [Proteomic analysis of hepatitis B virus-infected human liver tissues]. *Zhonghua Shiyan He Linchuang Bingduxue Zazhi* 2007; 21: 349-351
- 14 Blomhoff R, Green MH, Berg T, Norum KR. Transport and storage of vitamin A. *Science* 1990; 250: 399-404
- 15 Yang F, Yin Y, Wang F, Zhang L, Wang Y, Sun S. An altered pattern of liver apolipoprotein A-I isoforms is implicated in male chronic hepatitis B progression. *J Proteome Res* 2010; 9: 134-143
- 16 White IR, Patel K, Symonds WT, Dev A, Griffin P, Tsokanas N, Skehel M, Liu C, Zekry A, Cutler P, Gattu M, Rockey DC, Berrey MM, McHutchison JG. Serum proteomic analysis focused on fibrosis in patients with hepatitis C virus infection. *J Transl Med* 2007; 5: 33

编辑 曹丽鸥 电编 何基才