

# 采用 iTRAQ 技术研究柚皮苷对烟熏所致小鼠急性肺部炎症相关蛋白表达的影响\*

李泮霖, 廖弈秋, 刘宏, 云莎, 李沛波, 苏薇薇

(中山大学生命科学学院//广东省中药上市后质量与药效再评价工程技术研究中心//广东省热带亚热带植物资源与利用重点实验室, 广东 广州 510275)

**摘要:** 采用 iTRAQ 技术, 分析柚皮苷对烟熏诱导急性肺部炎症小鼠肺组织中蛋白表达的影响。20 只 Balb/c 小鼠随机分为模型组和柚皮苷组, 每组 10 只, 烟熏诱导急性肺部炎症。柚皮苷组每天于烟熏前按 60 mg/kg 灌胃给药, 模型组给予等量生理盐水。最后一次烟熏 16 h 后处死小鼠, 取肺组织进行 iTRAQ 蛋白质组学检测, 通过定性定量分析筛选差异表达蛋白。共鉴定小鼠肺组织蛋白 3 528 个, 从中找出与柚皮苷作用相关的差异表达蛋白 64 个, 其中表达上调的蛋白 29 个, 下调蛋白 35 个。经生物信息学分析发现, 这些蛋白主要与炎症介质一氧化氮释放和促氧化因子同型半胱氨酸代谢相关, 可能是柚皮苷发挥减轻肺部炎症及肺组织损伤、促进炎症消退作用的重要环节; 钙调蛋白介导的信号转导途径、表观遗传调控及核糖体蛋白功能调节也与柚皮苷的抗炎作用有密切联系。实验结果显示 Arg1、Bhmt、Gnmt 等蛋白有可能为柚皮苷抗肺部炎症作用的重要分子靶点, 并为阐明柚皮苷的抗炎作用机制提供了基础。

**关键词:** 柚皮苷; iTRAQ; 肺部炎症; 蛋白表达

**中图分类号:** R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579(2017)04-0102-09

## Naringin's influence on the protein expressions in the lung tissues of cigarette smoke induced acute lung inflammation in mice by iTRAQ technology

LI Panlin, LIAO Yiqiu, LIU Hong, YUN Sha, LI Peibo, SU Weiwei

(School of Life Sciences, Sun Yat-sen University//Guangdong Engineering and Technology Research Center for Quality and Efficacy Re-Evaluation of Post-Marketed TCM//Guangdong Key Laboratory of Plant Resources, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** The naringin's influence on the protein expressions in the lung tissues of cigarette smoke induced acute lung inflammation in mice was examined by iTRAQ technology. Twenty Balb/c mice were randomly divided into the model group and the naringin group with ten mice in each group. Naringin was administered by gavage at a dose of 60 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup> before smoke treatment, while mice in model group were given normal saline. All mice were sacrificed 16 h after the last smoke treatment. The lung tissues were collected and analyzed by iTRAQ technology. Differentially expressed proteins were screened through identification and quantification analysis. As a result, a total of 3 528 proteins were identified, of which 64 proteins were differentially expressed after administration of naringin, including 29 up-regulated

\* 收稿日期: 2016-09-18

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81374041)

作者简介: 李泮霖(1989年生), 女; 研究方向: 中药学; E-mail: lipanlin@gmail.com

通信作者: 苏薇薇(1959年生), 女; 研究方向: 创新药物的研究开发、中药上市后质量与药效再评价; E-mail: lssww@126.com

and 35 down-regulated proteins. Bioinformatics analysis indicated that these differentially expressed proteins were mainly associated with the release of inflammatory mediator nitric oxide and the metabolism of pro-oxidant agent homocysteine. These may provide an important contribution to naringin's effects on the protection of lung tissue injury caused by inflammation and promotion of inflammation resolution. Arg1, Bhmt and Dnmt may play important roles in the therapeutic effects of naringin on the lung inflammation diseases. The present study could provide a useful basis for the mechanism study of naringin.

**Key words:** naringin; iTRAQ; lung inflammation; protein expressions

柚皮苷为一种二氢黄酮类化合物，是岭南道地药材化橘红的主要活性成分。本课题组前期对柚皮苷的药理活性进行了深入研究，结果表明，柚皮苷除了具有显著的止咳、祛痰作用外<sup>[1-10]</sup>；还对急慢性呼吸系统炎症有明显的抑制作用，同时还能促进炎症的消退<sup>[11-14]</sup>。同位素标记相对和绝对定量 (Isobaric Tags For Relative And Absolute Quantitation, iTRAQ) 技术是近年来发展的一种新的蛋白质定性定量检测技术<sup>[15]</sup>，通过同位素标记精确地测量蛋白表达量的变化，具有蛋白覆盖广、重复性好、灵敏度高优点，为发现和验证药物靶标及分子作用机制提供了重要手段；iTRAQ 技术在中药研究的应用尚处于发轫阶段<sup>[16-18]</sup>。本研究利用 iTRAQ 蛋白质组学技术，通过分析柚皮苷对急性肺部炎症小鼠肺组织蛋白表达的影响，探讨柚皮苷抗肺部炎症的作用机制，为后续研究提供基础。

## 1 实验材料

### 1.1 实验动物

雄性 Balb/c 小鼠 20 只，SPF 级，体质量 17 ~ 19 g，购自广东省医学实验动物中心，许可证号：SCXK (粤) 2014 - 0002。

### 1.2 仪器

烟熏箱 (实验室自制不锈钢箱，0.8 m × 0.8 m × 1 m)，手持式激光粒子计数器 (3016IAQ, 美国 Lighthouse 公司)，电子分析天平 (MS205 Du, 瑞士梅特勒 - 托利多公司)，-80 °C 超低温冰箱 (DW - 86L338, 青岛海尔特种电器有限公司)。

### 1.3 试剂

柚皮苷 (本实验室提取，HPLC 纯度为 98.8%)，软装椰树牌香烟 (焦油量 11 mg，烟气烟碱量 1.0 mg，烟气一氧化碳量 13 mg，广东中烟工业有限责任公司)，*w* = 0.9% 氯化钠注射液 (广东利泰制药股份有限公司)，PBS 缓冲液 (上海 GOYBIO 生物公司)。

### 1.4 实验环境

经过中山大学生命科学学院动物伦理委员会的

批准，实验动物饲养于中山大学生命科学学院中药与海洋实验室 SPF 级动物房，实验单位使用许可证编号：SYXK (粤) 2014 - 0200。购买实验动物后，先在新环境下适应 1 周再开始实验，实验过程中采取适当的方法减轻动物所受的伤害。

## 2 实验方法

### 2.1 受试药物的配制

称取适量的柚皮苷，加生理盐水配制成 6 mg/mL 的混悬液。

### 2.2 动物分组及给药

20 只 Balb/c 小鼠随机分为 2 组，每组 10 只，分别为模型组柚皮苷组。每天第一次烟熏前 1 h 灌胃给药，灌胃体积为每 10 g 体质量 0.1 mL，模型组给予等量生理盐水。柚皮苷给药剂量为 60 mg/kg。

### 2.3 烟熏造模方法<sup>[19]</sup>

动物先于新环境适应饲养 7 d 后开始烟熏造模。每天烟熏 2 次，间隔 4 h，每次采用 8 支香烟熏 1 h，连续 5 d。烟熏时除正常组外，将动物同时放入烟熏箱中，全身暴露于烟雾环境中，期间动物可在笼内自由活动。烟熏时，将香烟插于插孔上并点燃，迅速关闭箱门。同位于烟熏箱内的香烟插孔和出气口由通气管路连接，部分通气管路延伸至箱外，中间连接一个脚踏式打气筒，用以产生单向气流。通过踩踏打气筒，单向气流由香烟插孔进入，同时带出香烟烟气，再由出气口鼓入箱内，产生烟熏环境。烟熏箱外围有一层水冷夹层，可维持箱内温度于 26 °C 左右；同时采用手持激光粒子计数器监测箱内空气颗粒物浓度。

### 2.4 iTRAQ 蛋白质组学检测

2.4.1 组织采集 最后一次烟熏 16 h 后，脱颈椎处死小鼠，剪开胸腔，取出左右肺组织，迅速置于冰上，并用冰 PBS 缓冲液洗净残血，放入封口袋内保存于 -80 °C 冰箱，用于蛋白质组学测定。

2.4.2 蛋白提取 小鼠肺组织加入含蛋白酶抑制剂的裂解液后，利用 TissueLyser 组织匀浆机进行

裂解。裂解液  $25\ 000 \times g$  离心 20 min, 小心移取上清液, 加入 5 倍体积的冷丙酮, 混匀, 于  $-20\ ^\circ\text{C}$  放置过夜。混合液再次离心, 取沉淀用裂解液溶解, 加入  $10\ \text{mmol/L}$  DDT 溶液, 于  $56\ ^\circ\text{C}$  放置 1 h, 以减少多肽间的二硫键。再加入  $55\ \text{mmol/L}$  的 IAM 溶液, 避光放置 45 min 后, 加入 5 倍体积的冷丙酮, 于  $-20\ ^\circ\text{C}$  放置 2 h。离心, 取沉淀加入裂解液溶解, 即得样品的蛋白溶液。

2.4.3 蛋白消化 从每个样品中分别精确取出  $100\ \mu\text{g}$  蛋白, 按照蛋白和酶的质量比为 20:1 的比例加入胰蛋白酶, 于  $37\ ^\circ\text{C}$  消化 4 h; 再次按相同比例加入胰蛋白酶, 继续消化 8 h。

2.4.4 iTRAQ 标记 根据 iTRAQ Reagent 8-plex Kit 提供的操作方法进行 iTRAQ 标记。将胰蛋白酶消化后的样品真空离心干燥, 残渣加  $0.5\ \text{mol/L}$  的 TEAB 溶液复溶, 加入不同的同位素标签, 孵育 2 h。标记后的样品随后进行反相色谱分级。

2.4.5 反相色谱样品分级 在质谱分析之前, 对胰蛋白酶处理后的复杂混合物进行分段, 以提高全蛋白质组的覆盖率。采用 Shimadzu LC-20AB 高效液相色谱系统, Phenomenex Gemini  $\text{C}_{18}$  色谱柱 ( $4.6\ \text{mm} \times 250\ \text{mm}$ ,  $5\ \mu\text{m}$ ), 以 5% 乙腈 - 95%  $\text{H}_2\text{O}$  (体积比, pH 9.8) 为流动相 A, 以 5%  $\text{H}_2\text{O}$  - 95% 乙腈 (体积比, pH 9.8) 为流动相 B。孵育后的样品加流动相 A 至 2 mL, 洗脱梯度为: 0 ~ 10 min,  $\varphi = 5\%$  流动相 B; 10 ~ 50 min,  $\varphi = 5\% \sim 35\%$  流动相 B; 50 ~ 51 min,  $\varphi = 35\% \sim 95\%$  流动相 B; 51 ~ 54 min,  $\varphi = 95\%$  流动相 B; 54 ~ 55 min,  $\varphi = 95\% \sim 5\%$  流动相 B; 55 ~ 65 min,  $\varphi = 5\%$  流动相 B, 流速  $1\ \text{mL/min}$ 。通过监测 214 nm 下的吸光度进行组分收集, 每 1 min 收集 1 个组分。将收集到的组分合并为 20 个, 真空干燥。

2.4.6 LC-Triple TOF 5600-MS/MS 检测 采用 LC-20AD nanoHPLC 纳升级高效液相色谱 (Shimadzu, Kyoto, Japan),  $\text{C}_{18}$  富集柱 (2 cm),  $\text{C}_{18}$  分析柱 (长 18 cm, 内径  $75\ \mu\text{m}$ , 自制)。每个组分用含  $\varphi = 2\%$  乙腈和  $\varphi = 0.1\%$  甲酸的水溶液重新混悬,  $20\ 000 \times g$  离心 10 min, 多肽终质量浓度约为  $0.5\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 取上清液进样分析。以  $\varphi = 0.1\%$  甲酸水溶液为流动相 A, 以含  $\varphi = 0.1\%$  甲酸的乙腈为流动相 B。样品以  $8\ \mu\text{L/min}$  上样 4 min, 分析洗脱梯度为: 0 ~ 0.1 min,  $\varphi$  为  $5\% \sim 10\%$  流动相 B; 0.1 ~ 40 min,  $\varphi$  为  $10\% \sim 32\%$  流动相 B; 40 ~ 44 min,  $\varphi$  为  $32\% \sim 55\%$  流动相 B; 44 ~ 45 min,  $\varphi$  为  $55\%$

~  $80\%$  流动相 B; 41 ~ 50 min,  $\varphi = 80\%$  流动相 B; 50 ~ 50.1 min,  $\varphi$  为  $80\% \sim 5\%$  流动相 B; 50.1 ~ 60 min,  $\varphi = 5\%$  流动相 B。流速  $300\ \text{nL/min}$ 。

质谱数据由 Triple TOF 5600 系统 (AB SCIEX, Concord, ON) 采集, 配有 Nanospray III 纳升流速离子源 (AB SCIEX, Concord, ON) 和石英发射器 (New Objectives, Woburn, MA)。操作控制软件为 Analyst 1.6 (AB SCIEX, Concord, ON)。质谱参数为: 离子喷雾电压  $2.4\ \text{kV}$ , 气帘气  $35\ \text{psi}$ , 雾化气  $18\ \text{psi}$ , 加热温度  $150\ ^\circ\text{C}$ , 分辨率约为 30 000。全扫时间为 250 ms, 当离子强度超过  $150\ \text{counts/s}$  且带 2 ~ 5 个正电荷时触发 IDA 采集, 每次最多可进行 30 个子离子扫描。总采集周期为 3.3 s, Q2 传输窗口为 100 (100%)。采用波动的碰撞能量对所有母离子进行碰撞诱导解离。

## 2.5 数据分析

质谱检测源文件首先用 ProteoWizard 软件中的 msConvert 工具转换为 MGF 格式, 然后使用 Mascot (version 2.3.02) 软件进行数据库搜索。根据 QC 控制结果的可靠性, 判断是否要重新分析。蛋白鉴定至少要有 1 个特异肽段。采用结合 Mascot Percolator 和高级统计算法的 IQuant 软件<sup>[20]</sup> 对不同同位素标记的肽段的 MS/MS 信号进行定量分析, 以差异倍数  $\geq 1.2$  (上调) 或  $\leq 0.8$  (下调), 且  $P < 0.05$  为标准筛选差异表达蛋白。进一步对差异表达蛋白进行 GO (Gene Ontology) 富集分析, 并利用 STRING10.0 数据库对差异表达蛋白进行相互作用分析。

## 3 实验结果

### 3.1 蛋白质定性鉴定及定量分析

通过 iTRAQ 标记结合 LC-Triple TOF-MS/MS 技术, 共鉴定到 3 528 种肺组织蛋白。按照上述差异蛋白筛选标准, 与模型组相比, 柚皮苷组共检测到 64 个差异表达蛋白, 其中表达上调的蛋白 29 个, 下调蛋白 35 个 (表 1)。

### 3.2 差异表达蛋白的生物信息学分析结果

对差异表达蛋白进行 GO 富集分析, 结果表明, 差异蛋白的分子功能主要富集于转移酶活性、乙醛脱氢酶活性、钙依赖蛋白结合活性、激酶调节活性等 (表 2), 提示其可能具有调节细胞氧化应激、信号传导等功能; 差异蛋白参与的生物过程主要与基因转录调节的表观遗传修饰、对外界刺激的应答及氧化应激相关 (表 3)。

表1 64个差异表达蛋白

Table 1 Sixty-four differentially expressed proteins

UniprotID	蛋白名称	蛋白缩写	相对分子质量/10 <sup>3</sup>	唯一肽段数	比值 <sup>1)</sup>
Q6RHR9	Membrane-associated guanylate kinase, WW and PDZ domain-containing protein 1	Magi1	54.7	1	4.927
O35071	Kinesin-like protein KIF1C	Kif1c	123.2	1	2.842
P02088	Beta-globin	Hbbt1	15.8	1	2.006
P61314	Ribosomal protein L15	Rpl15	12.7	1	1.734
Q3TIR3	Synembryn-A	Ric8a	60.4	1	1.638
P62329	Thymosin, beta 4, X chromosome	Tmsb4x	5.0	2	1.602
P11725	Ornithine carbamoyltransferase	Otc	39.5	2	1.582
P16015	Carbonic anhydrase 3	Ca3	29.6	6	1.432
Q71RI9	Kynurenine-oxoglutarate transaminase 3	Ccbl2	21.8	2	1.396
P43276	Hist1h1b protein	Hist1h1b	22.4	5	1.393
Q91Z61	GTP-binding protein Di-Ras1	Diras1	12.1	1	1.372
P62890	Rpl30 protein	Rpl30	12.8	1	1.369
P16402	Histone H1.3	Hist1h1d	22.1	2	1.360
Q28DR4	Histone H4	Hist2h4	11.3	8	1.352
Q5RAZ9	60S ribosomal protein L36	Rpl36	12.3	2	1.351
P62836	Rap1A-retro2	Rap1a	21.3	1	1.337
P08082	Cltb protein	Cltb	10.5	1	1.309
P19157	Glutathione S-transferase P 1	Gstp1	23.7	1	1.293
P62752	Rpl23a protein	Rpl23a	16.9	4	1.278
P11589	Major urinary protein 8	Mup10	20.9	6	1.266
P55854	Small ubiquitin-related modifier 3	Sumo3	5.5	1	1.254
Q9D892	Inosine triphosphate pyrophosphatase	Itpa	22.2	1	1.242
Q9QZQ8	Core histone macro-H2A.1	H2afy	39.9	7	1.242
P43274	Histone H1.4	Hist1h1e	21.9	2	1.235
O08997	Copper transport protein ATOX1	Atox1	7.5	2	1.235
P62155	Calmodulin	Calm1	16.8	6	1.233
P0CC09	Histone H2A	Hist2h2aal	13.6	3	1.229
P62262	14-3-3 protein epsilon	Ywhae	29.3	7	1.216
P09671	Superoxide dismutase	Sod2	24.8	4	1.207
P08426	Cationic trypsin - 3	Try3	27.1	1	0.799
P06801	Me1 protein	Me1	64.4	5	0.798
Q9CQ19	Myosin regulatory light polypeptide 9	Myl9	19.9	1	0.793
Q9CZS1	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial	Aldh1b1	58.1	3	0.792
P70335	Rho-associated protein kinase 1	Rock1	159.0	6	0.783
Q9CY57	Chromatin target of PRMT1 protein	Chtop	13.4	2	0.78
P49429	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	Hpd	45.2	6	0.778
Q8R0Y6	Cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	Aldh1l1	99.5	11	0.774
P50136	Branched chain ketoacid dehydrogenase E1, alpha polypeptide	Bckdha	50.6	2	0.773
P10649	Glutathione S-transferase Mu 1	Gstm1	26.0	3	0.755
P50543	Protein S100 - A11	S100a11	11.2	2	0.743
Q8VC30	Trikinase/FMN cyclase	Tkfc	59.9	5	0.741
Q5FW53	Myosin-binding protein H-like	Mybphl	39.4	1	0.738
P25688	Uricase	Uox	26.5	8	0.709
P61458	Pterin - 4 - alpha - carbinolamine dehydratase	Pcbd1	12.0	2	0.703
Q8VDQ8	Putative uncharacterized protein	Sirt2	40.0	1	0.703
P84104	MCG21131, isoform CRA_ a	Srsf3	14.4	3	0.697

续表 1

UniprotID	蛋白名称	蛋白缩写	相对分子质量/10 <sup>3</sup>	唯一肽段数	比值 <sup>1)</sup>
Q61176	Arginase - 1	Arg1	34.9	6	0.694
Q91Y97	Fructose - bisphosphate aldolase	Aldob	39.9	7	0.691
Q7TNB2	Putative uncharacterized protein	Tnnt1	16.6	1	0.686
P97298	Pigment epithelium - derived factor	Serpinf1	46.2	2	0.685
Q8CAA7	Glucose 1, 6 - bisphosphate synthase	Pgm211	29.4	1	0.683
P43030	Chemokine (C - X - C motif) ligand 7, isoform CRA_ b	Ppbb	12.6	2	0.677
Q64735	X/Y protein	Cr11	37.7	1	0.676
Q8C196	Carbamoyl - phosphate synthase [ ammonia ]	Cps1	165.7	29	0.659
P54869	Hydroxymethylglutaryl - CoA synthase, mitochondrial	Hmgcs2	57.3	5	0.634
Q9QXF8	Glycine N - methyltransferase	Gnmt	33.1	3	0.597
P16460	Argininosuccinate synthase	Ass1	46.8	1	0.585
P14246	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 2	Slc2a2	57.5	1	0.577
Q9DBT9	Dimethylglycine dehydrogenase	Dmgdh	97.4	4	0.547
Q91WK1	SPRY domain - containing protein 4	Spryd4	23.4	1	0.444
Q14BK3	Testis - expressed sequence 35 protein	Tex35	21.9	1	0.398
Q60766	Immunity - related GTPase family M protein 1	Irgm1	32.5	1	0.377
O35490	Betaine - homocysteine S - methyltransferase 1	Bhmt	45.4	7	0.349
Q3MJ13	Protein Wdr72	Wdr72	126.7	1	0.162

1) 为柚皮苷组蛋白表达量与模型组蛋白表达量之比

表 2 差异表达蛋白的分子功能分析

Table 2 Molecular function enrichment analysis results of differentially expressed proteins

分子功能注释	蛋白数	蛋白名称	P 值
transferase activity, transferring one - carbon groups	3	Bhmt, Aldh111, Cps1	0.003
modified amino acid binding	3	Gstp1, Dmgdh, Cps1	0.003
aldehyde dehydrogenase (NAD) activity	2	Aldh111, Aldh1b1	0.020
glutathione transferase activity	2	Gstp1, Gstm1	0.028
chromatin DNA binding	2	H2afy, Hist1h1d	0.028
carbohydrate derivative binding	2	Cps1, Kif1c	0.029
calcium - dependent protein binding	2	Calm1, S100a11	0.041
kinase regulator activity	2	Gstp1, H2afy	0.046
nucleotide binding	3	Dmgdh, Cps1, Kif1c	0.046

表 3 差异表达蛋白的生物过程分析

Table 3 Biological process enrichment analysis results of differentially expressed proteins

生物过程注释	蛋白数	蛋白名称	P 值
protein - DNA complex subunit organization	4	H2afy, Hist1h4a, Hist1h1d, Hist1h1e	0.001
cellular modified amino acid metabolic process	4	Gstp1, Dmgdh, Aldh11, Gstm1	0.005
histone methylation	2	Hist1h1d, Hist1h1e	0.007
alpha - amino acid metabolic process	4	Bhmt, Dmgdh, Arg1, Cps1	0.008
tetrahydrofolate metabolic process	2	Dmgdh, Aldh111	0.010
regulation of gene expression, epigenetic	2	H2afy, Hist1h2al	0.027
negative regulation of protein serine/threonine kinase activity	2	Gstp1, H2afy	0.038
response to stimulus	8	Cah3, Aldob, Gstp1, Myl9, Ppbb, Ric8a, Cps1, Gstm1	0.042
glutathione metabolic process	2	Gstp1, Gstm1	0.047

利用 STRING10.0 数据库对差异蛋白间的相互作用进行分析, 结果如图 1 所示。相互作用网络中关键的节点蛋白包括上调蛋白: 鸟氨酸氨基甲酰基转移酶 (Otc), 核糖体蛋白 L15 (Rpl15), 核糖体蛋白 L30 (Rpl30), 钙调蛋白 (Calm1), 组蛋白 H1.3 (Hist1h1d), 组蛋白 H1.4 (Hist1h1e), 组蛋白 H1.5 (Hist1h1b), 组蛋白 H2A (Hist2h2aa1), 核心组蛋白 H2A.1 (H2afy), 组蛋白 H4 (Hist2h4); 以及下调蛋白: 二甲基甘氨酸

脱氢酶 (Dmgdh), 甜菜碱同型半胱氨酸甲基转移酶 (Bhmt), 精氨酸酶 1 (Arg1), 甘氨酸-N-甲基转移酶 (Gnmt), 氨基甲酰磷酸合成酶 (Cps1), 肌球蛋白调节轻链 9 (My19)。这些蛋白间的相互作用网络与炎症介质一氧化氮 (NO) 的生成、促氧化因子同型半胱氨酸 (Hcy) 代谢途径、钙调蛋白介导的信号转导途径、表观遗传调控及核糖体蛋白功能关联密切, 提示可能为柚皮苷抗肺部炎症的重要作用环节。

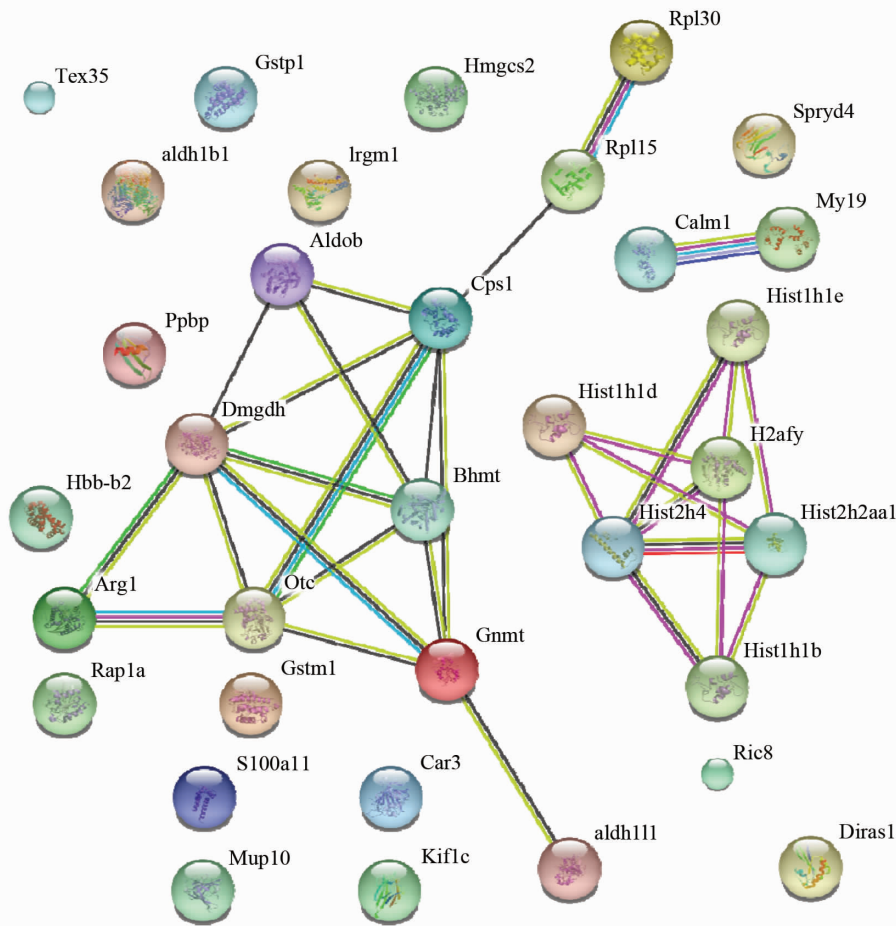


图 1 差异表达蛋白的相互作用分析

Fig. 1 The results of protein-protein interactions of differentially expressed proteins

## 4 讨论

药物作用于人体时必然会引起分子、细胞、器官等多个层面状态和功能的改变, 而这些变化的直接作用者主要就是蛋白质, 其表达水平、存在方式以及相互作用等直接与生物功能相关。蛋白质组学即是以一种基因组所表达的全部蛋白质为研究对象, 从整体角度研究蛋白质表达差异与其功能关联性的技术手段。其中, 定量蛋白质组学, 尤其是基

于质谱的定量蛋白质组学技术, 可以精确测量样品中所有蛋白质在不同状态下表达水平的动态变化, 对于疾病生物标志物及药物靶标的发现等研究具有十分重要的意义, 已成为蛋白质组学研究的一个重要方向。目前基于质谱的定量蛋白质组学技术主要包括标记法和非标记法两大类, 非标记法样品前处理及数据采集方法较简单, 对变化倍数较高的蛋白质定量准确度较好<sup>[21]</sup>, 但对质谱仪器的重现性要求很高; 而标记法需要使用价格较高的标记试剂,

但受仪器重现性的影响小, 定量精密度较好, 例如 iTRAQ 技术可以在一针内比较至多 8 个样品的信息, 更适合于多个处理间及样品随时间变化情况的比较。因此本研究利用 iTRAQ 技术, 从蛋白水平上发现与柚皮苷抗炎作用相关的分子网络及其功能。经生物信息学分析发现, 相互作用网络中关键的节点蛋白 Arg1、Otc、Bhmt、Gnmt 等可能在柚皮苷抗肺部炎症的作用的发挥中扮演重要角色。

Arg1 为一种精氨酸酶亚型, 可催化水解精氨酸生成鸟氨酸与尿素, 在气道炎症和气道重塑中发挥着重要作用。当给予气道高反应和炎性因子分泌的始动因子 IL-13, 可导致小鼠肺组织中 Arg1 水平明显增高<sup>[22]</sup>。而当肺泡上皮细胞中 Arg1 过度表达时, 可导致 NO 生成减少、NF- $\kappa$ B 活性增强, 从而促进气道炎症反应的发生<sup>[23]</sup>。说明炎症发生时伴随 Arg1 表达上调, Arg1 表达的变化又与肺部 NO 释放密切相关。本实验柚皮苷给药后, 小鼠肺组织中 Arg1 表达下调, 表明柚皮苷可能通过抑制 Arg1 表达, 提高体内 NO 浓度、抑制 NF- $\kappa$ B 活化, 从而抑制香烟烟雾引起的促炎因子分泌, 发挥抗炎作用。这也与本课题组前期药理实验结果一致<sup>[14,24]</sup>。此外, Arg1 水解精氨酸产生的鸟氨酸, 可进一步水解为腐胺等聚肽类及脯氨酸<sup>[25]</sup>, 这两类物质分别可通过促进细胞增殖和胶原蛋白生成而导致气道重塑<sup>[26]</sup>。本实验中, 柚皮苷给药后一方面 Arg1 表达下调, 使得聚肽及脯氨酸等促进气道重塑的代谢产物生成减少; 另一方面 Otc 表达上调, Otc 可催化鸟氨酸向瓜氨酸转化, 从而使鸟氨酸向聚肽及脯氨酸水解减少。因此柚皮苷可能通过 Arg1 与 Otc 共同作用, 减轻气道重塑。

在氧化应激的调节方面, 柚皮苷同时影响了 Hcy 代谢通路中关键的代谢酶和甲基化酶 Bhmt 和 Gnmt。在常见的呼吸系统疾病中, Hcy 可通过氧化应激、妨碍内皮损伤的修复、改变基因组甲基化水平等机制影响疾病的发生和发展<sup>[27]</sup>。例如, 在 COPD 患者中, Hcy 因代谢途径受损而在体内积聚, 同时肺部氧化应激增强<sup>[28]</sup>。Hcy 还可干扰抗氧化剂谷胱甘肽的合成<sup>[29]</sup>, 促进促炎细胞因子 IL-6 的分泌和表达<sup>[30]</sup>, 进一步加重组织损伤和炎症反应。柚皮苷给药后, 小鼠肺组织中 Bhmt、Gnmt 表达水平均下调, 已知 Bhmt、Gnmt 表达水平与小鼠组织 Hcy 水平呈正相关<sup>[31]</sup>, 由此推测小鼠肺组织中 Hcy 水平也相应下降, 氧化应激和炎症反应减弱。因此, 柚皮苷可能通过调节 Hcy 代谢途径, 降低小鼠肺组织氧化应激水平, 起到减轻组织

损伤及促进损伤修复的作用。

其他关键的差异表达蛋白还包括 Calm1、组蛋白 H1.3、H1.4、H1.5、H2A、H2A.1、H4 以及核糖体蛋白 Rpl15、Rpl30。Calm1 为一种钙调蛋白, 可与多种蛋白质结合, 参与介导很多生物过程, 包括炎症反应、物质代谢、细胞凋亡、细胞骨架调节、神经传导及免疫反应等。组蛋白表达水平的变化一方面说明柚皮苷可能抑制了组蛋白降解和细胞凋亡, 对肺组织损伤具有保护作用; 另一方面也表明柚皮苷的作用可能与表观遗传调控相关。核糖体蛋白除组成核糖体、参与蛋白质的生物合成之外, 还参与 DNA 修复、细胞发育调控和细胞分化等核糖体外功能。例如已有研究表明核糖体蛋白质 Rpl15 的甲基化及缺失与非小细胞肺癌有密切联系<sup>[32]</sup>。因此, 钙调蛋白介导的信号转导途径、表观遗传调控及核糖体蛋白功能的调节也可能是柚皮苷的抗炎作用的重要环节。

iTRAQ 定量分析结果仍需要进一步的验证, 通常采用传统的免疫学定量检测方法如 Western 和 ELISA 等, 但由于对抗体的依赖, 无法进行大规模的目标蛋白验证。而利用多重反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 技术可以更好地对定量蛋白质组学结果进行靶向验证。MRM 是近年来发展起来的针对靶标分子进行质谱分析的技术, 通过质谱检测靶标蛋白的母离子和子离子的响应, 从而获取灵敏度高、重现性好的定性定量信息<sup>[33]</sup>。与 iTRAQ 等全谱型的蛋白质组学方法相比, MRM 更偏重于对有限的目标蛋白质进行较准确的定量测定, 因此很适合用于对 iTRAQ 结果进行验证。下一步我们也将利用 MRM, 对分析得到的关键蛋白进行靶向验证, 更深入地探讨柚皮苷抗肺部炎症的分子机制。

中药化痰橘红用于治疗呼吸系统疾病历史悠久, 柚皮苷为其最主要的活性成分, 具有显著的止咳、祛痰和抗炎作用。本研究采用 iTRAQ 蛋白质组学技术, 通过分析柚皮苷对急性肺部炎症小鼠肺组织蛋白表达的影响, 找出 64 个与柚皮苷作用相关的蛋白, 这些蛋白参与调节氧化应激、信号传导、基因转录调节的表观遗传修饰等多个环节, 可能与柚皮苷减轻炎症造成的肺组织损伤、促进炎症消退加快康复进程的作用相关; Arg1、Bhmt、Gnmt 等蛋白有可能为柚皮苷抗肺部炎症作用的重要分子靶点。本研究为柚皮苷抗肺部炎症的分子机制研究提供了重要的依据和线索。应用 iTRAQ 蛋白质组学技术可以全面、快速地了解药物多途径的作用机

制, 可进一步尝试用于中药复方多成分多靶点作用机制的研究, 为科学解释中药的复杂作用机制提供依据。

### 参考文献:

- [1] 李沛波, 王永刚, 吴忠, 等. 以化橘红为基源的一类新药柚皮苷的临床前研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2015, 54(6): 1-5.  
LI P B, WANG Y G, WU Z, et al. The pre-clinical studies of naringin, an innovative drug, derived from *Citri Grandis Exocarpium* (Huajuhong)[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2015, 54(6): 1-5.
- [2] 李沛波, 王永刚, 彭维, 等. 化州柚提取物对小鼠中枢神经系统影响的安全性药理学研究[J]. 中药材, 2007, 30(11): 1434-1436.  
LI P B, WANG Y G, PENG W, et al. Safety pharmacology study of the effects of *Citrus grandis* "Tomentosa" extract on the mouse central nervous system[J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2007, 30(11): 1434-1436.
- [3] 李沛波, 田珩, 王永刚, 等. 化州柚提取物对 Beagle 犬心血管系统和呼吸系统的影响[J]. 南方医科大学学报, 2006, 26(12): 1767-1768.  
LI P B, TIAN H, WANG Y G, et al. Effects of *Citrus grandis* "Tomentosa" extract on the cardiovascular system and respiratory system of Beagle dog [J]. *Journal of Southern Medical University*, 2006, 26(12): 1767-1768.
- [4] LUO Y L, ZHANG C C, LI P B, et al. Naringin attenuates enhanced cough, airway hyperresponsiveness and airway inflammation in a guinea pig model of chronic bronchitis induced by cigarette smoke[J]. *International Immunopharmacology*, 2012, 13(3): 301-307.
- [5] LUO Y L, LI P B, ZHANG C C, et al. Effects of four antitussives on airway neurogenic inflammation in a guinea pig model of chronic cough induced by cigarette smoke exposure[J]. *Inflammation Research*, 2013, 62(12): 1053-1061.
- [6] 李沛波, 苏畅, 毕福均, 等. 化州柚提取物止咳作用及其机制的研究[J]. 中草药, 2008, 39(2): 247-250.  
LI P B, SU C, BI F J, et al. Study of the antitussive effect of *Citrus grandis* "Tomentosa" extract and its mechanism of action[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2008, 39(2): 247-250.
- [7] LIN B Q, LI P B, WANG Y G, et al. The expectorant activity of naringenin [J]. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 2008, 21(2): 259-263.
- [8] 苏薇薇, 王永刚, 方铁铮, 等. 柚皮素及其盐用于制备止咳化痰药物[P]. 中国专利: CN1555793, 2004-12-22.  
SU W W, WANG Y G, FANG T Z, et al. Naringenin and its salt used in preparation of antitussives and expectorants[P]. *Chinese Patent*: CN1555793, 2004-12-22.
- [9] CHEN Y, WU H, NIE Y C, et al. Mucoactive effects of naringin in lipopolysaccharide-induced acute lung injury mice and beagle dogs[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2014, 38(1): 279-287.
- [10] NIE Y C, WU H, LI P B, et al. Naringin attenuates EGF-induced MUC5AC secretion in A549 cells by suppressing the cooperative activities of MAPKs-AP-1 and IKKs-I kappa B-NF-kappa B signaling pathways [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2012, 690(1/2/3): 207-213.
- [11] LIU Y, WU H, NIE Y C, et al. Naringin attenuates acute lung injury in LPS-treated mice by inhibiting NF-kappa B pathway[J]. *International Immunopharmacology*, 2011, 11(10): 1606-1612.
- [12] CHEN Y, NIE Y C, LUO Y L, et al. Protective effects of naringin against paraquat-induced acute lung injury and pulmonary fibrosis in mice[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2013, 58: 133-140.
- [13] NIE Y C, WU H, LI P B, et al. Anti-inflammatory effects of naringin in chronic pulmonary neutrophilic inflammation in cigarette smoke-exposed rats[J]. *Journal of Medicinal Food*, 2012, 15(10): 894-900.
- [14] LIU Y, SU W W, WANG S, et al. Naringin inhibits chemokine production in an LPS-induced RAW 264.7 macrophage cell line[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2012, 6(6): 1343-1350.
- [15] ROSS P L, HUANG Y L N, MARCHESE J N, et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents [J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2004, 3(12): 1154-1169.
- [16] RAMACHANDRAN U, MANAVALAN A, SUNDARAMURTHI H, et al. Tianma modulates proteins with various neuro-regenerative modalities in differentiated human neuronal SH-SY5Y cells [J]. *Neurochemistry International*, 2012, 60(8): 827-836.
- [17] FRANCIOSI L, GOVORUKHINA N, FUSETTI F, et al. Proteomic analysis of human epithelial lining fluid by microfluidics-based nanoLC-MS/MS: A feasibility study [J]. *Electrophoresis*, 2013, 34(18): 2683-2694.
- [18] CAO W, ZHOU Y, LI Y, et al. iTRAQ-based proteomic analysis of combination therapy with taurine, epi-

- gallicocatechin gallate, and genistein on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats [J]. *Toxicology Letters*, 2015, 232(1): 233–245.
- [19] 罗钰龙. YPG 对吸烟致气道炎症及神经源性炎症的作用及机制研究 [D]. 广州: 中山大学, 2014.  
LUO Y L. The effects and mechanisms of ypg on smoking induced airway inflammation and neurogenic inflammation [D]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 2014.
- [20] WEN B, ZHOU R, FENG Q, et al. IQant: An automated pipeline for quantitative proteomics based upon isobaric tags [J]. *Proteomics*, 2014, 14(20): 2280–2285.
- [21] WANG H, ALVAREZ S, HICKS L M. Comprehensive comparison of iTRAQ and label-free LC-based quantitative proteomics approaches using two *Chlamydomonas reinhardtii* strains of interest for biofuels engineering [J]. *Journal of Proteome Research*, 2012, 11(1): 487–501.
- [22] ZIMMERMANN N, ROTHENBERG M E. The arginine-arginase balance in asthma and lung inflammation [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2006, 533(1/2/3): 253–262.
- [23] CKLESS K, van der VLIET A, JANSSEN-HEININGER Y. Oxidative-nitrosative stress and post-translational protein modifications: implications to lung structure-function relations. Arginase modulates NF-kappaB activity via a nitric oxide-dependent mechanism [J]. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2007, 36(6): 645–653.
- [24] 李泮霖, 贺利利, 李楚源, 等. 金银花和山银花抗急性口腔炎症作用比较 [J]. *中山大学学报 (自然科学版)*, 2016, 55(4): 118–122.  
LI P L, HE L L, LI C Y, et al. Comparison of anti-inflammatory effects between *Lonicerae Japonicae Flos* and *Lonicerae Flos* using an acute stomatitis model [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2016, 55(4): 118–122.
- [25] BENSON R C, HARDY K A, MORRIS C R. Arginase and arginine dysregulation in asthma [J]. *Journal of Allergy (Cairo)*, 2011, 2011: 736319.
- [26] WARNKEN M, HAAG S, MATTHIESEN S, et al. Species differences in expression pattern of arginase isoenzymes and differential effects of arginase inhibition on collagen synthesis in human and rat pulmonary fibroblasts [J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2010, 381(4): 297–304.
- [27] 乔云飞, 李允模. 同型半胱氨酸在呼吸系统疾病中的研究进展 [J]. *医学综述*, 2016, 22(6): 1077–1080.  
QIAO Y F, LI Y M. The research progress of homocysteine in respiratory disease [J]. *Medical Recapitulate*, 2016, 22(6): 1077–1080.
- [28] 赵娟, 毛达勇. 血浆同型半胱氨酸、NO 致 COPD 的发展机制研究 [J]. *临床肺科杂志*, 2014, 19(1): 97–98.  
ZHAO J, MAO D Y. Research on mechanism of COPD caused by plasma homocysteine and NO [J]. *Journal of Clinical Pulmonary Medicine*, 2014, 19(1): 97–98.
- [29] 陈燕, 李桂英. 慢性阻塞性肺病患者氧化应激与肺功能的相关性 [J]. *临床肺科杂志*, 2012, 17(11): 1991–1992.  
CHEN Y, LI G Y. Correlation between oxidative stress and lung function in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Journal of Clinical Pulmonary Medicine*, 2012, 17(11): 1991–1992.
- [30] 朱建华, 张力. 同型半胱氨酸对大鼠血管平滑肌细胞分泌和表达 IL-6 的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2002, 18(9): 1126–1129.  
ZHU J H, ZHANG L. Effect of homocysteine on secretion and expression of interleukin-6 in cultured rat vascular smooth muscle cells [J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2002, 18(9): 1126–1129.
- [31] CHEN N C, YANG F, CAPECCI L M, et al. Regulation of homocysteine metabolism and methylation in human and mouse tissues [J]. *The FASEB Journal*, 2010, 24(8): 2804–2817.
- [32] DMITRIEV A A, KASHUBA V I, HARALDSON K, et al. Genetic and epigenetic analysis of non-small cell lung cancer with NotI-microarrays [J]. *Epigenetics*, 2012, 7(5): 502–513.
- [33] 侯桂雪, 王全会, 刘斯奇. 多重反应监测 (MRM): 靶标蛋白质定量的新方法 [J]. *中国科学 (化学)*, 2014, 44(5): 746–752.  
HOU G X, WANG Q H, LIU S Q. Multiple reaction monitoring (MRM): a quantitative approach to target proteins [J]. *Scientia Sinica (Chimica)*, 2014, 44(5): 746–752.