

· 论 著 ·

远志等中药对脑淀粉样血管病相关蛋白胱抑素聚集的影响*

何剑为¹, 马婧思¹, 于东润¹, 张 朔¹, 邹志远¹, 宋有涛^{1,2△}

(辽宁大学:1. 生命科学院;2. 环境学院, 沈阳 110036)

摘要:目的 研究多种中药对于脑淀粉样血管病相关蛋白胱抑素聚集的影响。方法 通过在胱抑素酵母表达系统的诱导培养基中添加亚适量浓度中药成分的方式,应用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)技术结合蛋白质免疫印迹(Western blotting)技术,在胞外和胞内检测中药对鸡胱抑素蛋白聚集的影响。结果 胞外的药物筛选实验表明远志对于胱抑素的聚集有明显的抑制作用,而且远志的浓度在 500 μg/mL 以下时,药物剂量与抑制胱抑素聚集效果呈现较好的正相关性;胞内实验表明远志对细胞内胱抑素聚集没有影响。结论 远志对于分泌至胞外的胱抑素聚集有明显的抑制作用。

关键词:脑淀粉样血管病;远志;胱抑素;蛋白聚集

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.20.001

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)20-2009-03

Effect of Polygala on the aggregation of cerebral amyloid disease-related protein cystatin*

He Jianwei¹, Ma Jingsi¹, Yu Dongrun¹, Zhang Shuo¹, Zou Zhiyuan¹, Song Youtao^{1,2△}

(1. College of Life Science; 2. School of Environmental Science, Liaoning University, Shenyang, Liaoning 110036, China)

Abstract: Objective The primary aim of this study is to investigate the effect of traditional Chinese medicine on the aggregation of Human cystatin C, a kind of cerebral amyloid disease-related protein. **Methods** With the addition of suboptimal concentrations of Chinese medicine to the induction medium of cystatin yeast expression system, the effects of traditional Chinese medicine on cystatin is determined both *in vitro* and *in vivo* using SDS-PAGE and western blotting. **Results** Extracellular experiments demonstrated that Polygala significantly represses the aggregation of cystatin. The concentration of Polygala has a positive relationship to its inhibitory effect on cystatin aggregation at the concentration below 500 μg/mL. Intracellular experiments showed that Polygala has no effect on cystatin aggregation *in vivo*. **Conclusion** Polygala has an obvious inhibitory effect on the aggregation of secreted cystatin.

Key words: cerebral amyloid angiopathy; polygala tenuifolia; cystatin; protein aggregation

脑淀粉样血管病(cerebral amyloid angiopathy, CAA)是一种常发生于老年人的微血管疾病,临床以血管壁弹力下降,最终引起颅内反复出血为主要表现,病理特征为在脑小血管的内壁出现严重的淀粉样蛋白沉积^[1]。引发 CAA 的重要原因之一就是编码人胱抑素 C(human cystatin C, HCC)的基因发生突变(L68Q),改变了蛋白的稳定结构,进一步形成类淀粉样纤维沉淀而导致疾病。HCC 突变体 L68Q 在致病机制上与引发疯牛病、老年痴呆症等神经退行性疾病的病原蛋白相似,即通过蛋白质的构象改变,发生分子间交联形成二聚体,进一步形成类淀粉样纤维沉淀而导致疾病^[2]。目前对于这些蛋白质淀粉样沉积疾病尚无有效的治疗手段。

近年来,国外研究团队在多种淀粉样疾病的研究中筛选到一些具有抑制病原蛋白聚集的天然药物化学成分,如芳香性生物碱非啶和非啶类衍生物具有明显的抗朊病毒聚集作用^[3],多酚类物质没食子儿茶素和没食子酸酯具有一定的抗朊病毒和阿尔茨海默病的治疗效果^[4]。另一方面,国内王学美^[5]也报道了补肾类中药对早发性老年痴呆症具有一定的功效。迄今为止,发现的可以治疗这两种淀粉样蛋白病的中药配方包括菖蒲、远志、人参、甘草、黄芪、柑桔、半夏、天麻、日本芍药、红牡丹、枣、地黄、枸杞果实、当归、肉苁蓉、巴戟天、乌头、薯蓣、茯苓、银杏、川芎、绞股蓝、五味子、烟草、蛇床、芍药、吴茱萸、姜黄、首乌、三七、大黄等^[6-7]。然而,有关中药对由胱抑素蛋白聚

集引起的脑淀粉样血管病影响的研究目前国内、外尚无报道。此外,以上研究主要局限在临床的治疗效果上,中药对于淀粉样蛋白聚集的影响迄今也鲜有报道,这也成为中药临床使用的相关药理学研究方面的一大缺陷。

因此,本研究利用分子生物学结合生物化学的方法,用毕赤酵母中表达的重组鸡胱抑素(chicken cystatin, cC)突变体 I66Q 作为模型,选取银杏叶、大黄、烟草、五味子、当归、甘草、川穹、茯苓、绞股蓝、吴茱萸、蛇床、姜黄、首乌、芍药、远志和三七等 18 种中药材作为研究材料,采取向毕赤酵母培养基中直接添加中药生药并灭菌处理的方式(该处理方法与中药的清蒸炮制方法相似),通过研究中药对胱抑素聚集特性的影响,以期筛选出具有抑制胱抑素淀粉样聚集的药物。这对于寻找由 HCC 引起的 CAA 的治疗药物及为中药治疗蛋白淀粉样聚集疾病的药理学研究具有重要的推动作用。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 菌株 转入 pPICZαA-cC-I66Q 质粒的酵母菌株 *Pichia pastoris* X-33; 毕赤酵母购自 Invitroge 公司,胱抑素酵母表达菌株为本实验室构建。

1.1.2 培养基 YPD(yeast extract peptone dextrose medium):蛋白胨 2%,酵母浸粉 1%,葡萄糖 2%,YPD 固体培养基加入 2%的琼脂粉,在 115 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。液体培养

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30970152);辽宁省教育厅优秀人才项目(2009R26);教育部留学回国人员科研启动基金资助项目(教外司留[2010]1561号)。△ 通讯作者, Tel: (024)62204818; E-mail: ysong@lnu.edu.cn。

基室温保存,蛋白胨、酵母浸粉,葡萄糖均购自上海奥博星生物科技有限公司。YPM(buffered yeast extract peptone medium):蛋白胨 2%,酵母浸粉 1%,在 121 °C 高压蒸汽灭菌 25 min。加入 0.5% 甲醇诱导表达。

1.1.3 中药生药 银杏、川芎、甘草、当归、绞股蓝、五味子、烟草、蛇床、芍药、吴茱萸、姜黄、远志、茯苓、首乌、三七、大黄等均购于沈阳市东北大药房,两面针购于安徽省亳州市真源堂药业有限公司。

1.2 方法

1.2.1 胱抑素的诱导表达及收集 毕赤酵母在 5 mL YPD 培养基中小量培养 12 h,200 mL YPD 培养基中 30 °C 扩大培养 24 h 至 OD 为 3.8~4.2,4 °C 5 000 g 离心 10 min 收集菌体,转入加有浓度为 500 μg/mL 的不同中药原料的 100 mL YPM 培养基中^[8],调整各培养液 OD 值在 1.6~1.8 之间,诱导表达 3 d,每 24 h 补加 1 次甲醇。中药按 500 μg/mL 直接加到 YPM 培养基中,灭菌。诱导表达结束,4 °C 5 000 g 离心 10 min 除去菌体,实验方法参照文献^[9]。

1.2.2 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测 SDS 电泳实验方法参照文献^[9]。结果用全自动图像分析系统 DolpHin-DOC 进行扫描、分析。电泳仪购自 BIO-RAD 公司,DolpHin-DOC 凝胶成像系统购自 Wealtec 公司。

1.2.3 微生物血细胞计数板直接计数法 把菌体在加有浓度为 500 μg/mL 不同中药的 YPD 培养基中培养 24 h。取稀释到 100 倍的菌液,从盖片边缘滴一小滴,使菌液自行渗入,本实验用的是 25×16 计数板,计数 4 个角上中方格的菌数和中央中格的菌数,之后用公式计算。

1.2.4 破碎细胞 将 24、48、72 h 诱导表达后的菌体 4 °C 4 000 g 离心 10 min 收集,试验方法参照文献^[13]。

1.2.5 Western blotting^[9] 将提取细胞内总蛋白进行 12% SDS-PAGE 电泳后转膜(PVDF 膜),恒压 100V,50 min。5% 脱脂奶粉液封膜 1 h,一抗兔抗 cC(实验室自制)采用 1:2 000 稀释,缓和震荡 1 h,二抗羊抗兔 IgG 采用 1:5 000 稀释,缓和震荡 1 h,显影。显影用增强化学发光法试剂购自碧云天生物技术有限公司,兔抗 IgG 抗体及兔抗绵羊 IgG 二抗购自金斯特生物科技有限公司。

2 结果

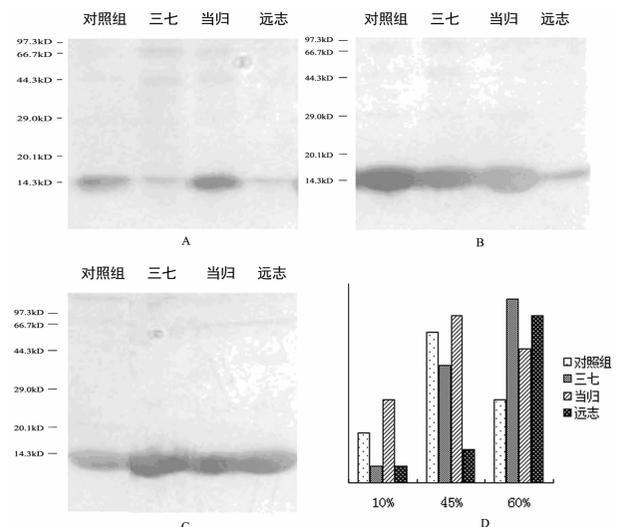
2.1 初筛 18 种中药对胱抑素聚集的影响 本实验用盐析结合 SDS-PAGE 的方法检测中药对于胞外分泌 cC 蛋白聚集情况的作用效果。10% 硫酸铵盐析所得为胱抑素不溶物及多聚体部分,45% 盐析为寡聚体部分,60% 盐析为单倍体部分^[9]。药物筛选的结果大致分为 3 种情况:(1)蛋白多聚体和寡聚体的含量较未加中药的胱抑素突变体 I66Q 样品(以下简称对照组)明显减少的:远志、芍药、姜黄、吴茱萸、大黄;(2)实验组和对照组的寡聚体和单倍体的蛋白含量相差不显著的:蛇床、甘草、三七、茯苓、银杏、绞股蓝、首乌、五味子、川芎、烟草;(3)实验组多聚体和寡聚体的蛋白含量明显较对照组多的:两面针、当归。图 1 具体显示了其中代表性的中药(如远志、三七和当归)的作用效果,结果表明远志对于胱抑素生成多聚体和寡聚体有明显的抑制作用。此外,对于加药后的菌液用微生物血细胞计数板直接计数法统计培养基中的细胞数,结果表明除了烟草和芍药对细胞生长有一定的抑制作用之外,其他中药对细胞数没有显著的影响,见表 1。

2.2 远志对胱抑素聚集影响的剂量效应 为了研究不同浓度

远志对胱抑素聚集的影响,笔者检测了 100、250、500、1 000、5 000 μg/mL 的远志对胱抑素单倍体、寡聚体和多聚体形成的影响。如图 2 所示,远志的浓度在 500 μg/mL 以下时,药物剂量与抑制胱抑素聚集效果呈现较好的正相关性;而远志的浓度大于 500 μg/mL 时,虽然单倍体含量有一定程度的下降,但寡聚体含量呈逐渐上升的趋势,表明药物剂量与抑制胱抑素聚集效果呈现负相关性。这说明远志抑制胱抑素聚集的最佳浓度为 500 μg/mL。

表 1 初筛 18 种中药对胱抑素聚集的影响

组别	10%盐析蛋白 占总蛋白百分比	45%盐析蛋白 占总蛋白百分比	60%盐析蛋白 占总蛋白百分比	酵母细胞数 /mL(×10 ⁶)
对照组	14.7%	55.7%	29.6%	8.320
芍药	7.3%	57.4%	35.3%	4.368
姜黄	8.9%	45.6%	45.4%	9.048
吴茱萸	12.8%	47.7%	39.5%	7.072
大黄	11.5%	39.1%	49.4%	7.592
远志	13.4%	15.5%	71.0%	7.332
蛇床	9.7%	47.7%	42.6%	7.280
甘草	10.7%	41.0%	48.2%	9.360
三七	11.3%	43.7%	45.0%	7.800
茯苓	10.9%	46.5%	42.6%	7.592
银杏	14.4%	43.6%	42.0%	8.580
绞股蓝	14.0%	40.9%	45.1%	7.800
首乌	8.1%	55.7%	36.2%	9.620
五味子	19.9%	40.2%	39.9%	7.540
川芎	4.5%	49.8%	45.7%	7.852
烟草	5.1%	57.4%	37.5%	4.992
两面针	12.5%	46.5%	41.0%	7.592
当归	17.7%	49.2%	33.1%	7.852



A: 10% 盐析后 SDS-PAGE 的结果; B: 45% 盐析后 SDS-PAGE 的结果; C: 60% 盐析后 SDS-PAGE 的结果; D: 基于以上 SDS-PAGE 结果,应用密度梯度检测仪检测培养液中的不同组分含量。

图 1 远志、三七和当归对 cC 蛋白突变体 I66Q 聚集的影响

2.3 远志对胱抑素胞内聚集的影响 为了全面地分析远志对胱抑素聚集的作用效果,笔者利用蛋白质免疫印迹技术(Western blotting)检测了远志对细胞内胱抑素聚集的影响。加有远志的酵母细胞内胱抑素的单倍体、二倍体的比例与对照组相比没有明显区别。这说明远志可能直接作用于分泌到细胞外的胱抑素,而对于胞内的蛋白没有作用。由于相对分子质量大小的原因,中药成分可能较难进入由溶酶体等亚细胞器形成的胞内区间^[10],见图 3。

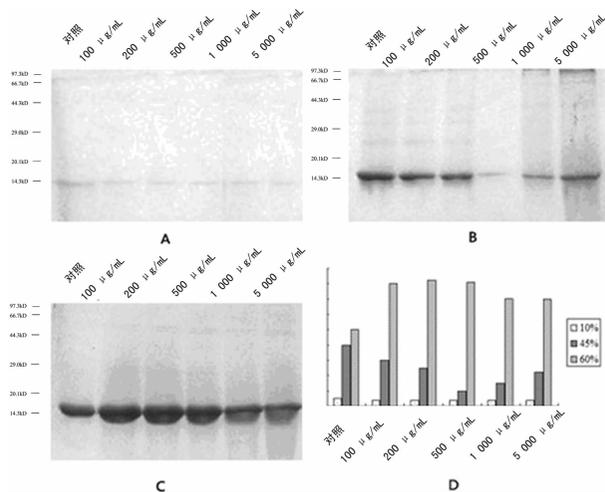


图 2 不同浓度的远志对胱抑素聚集的影响

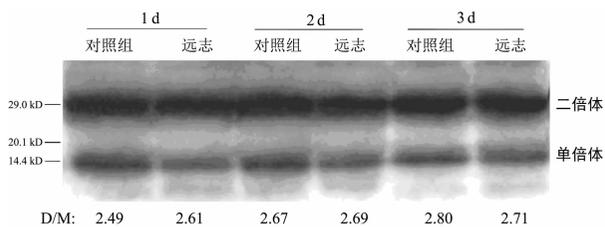


图 3 Western blotting 分析胞内水平远志对 cC 蛋白聚集的影响

3 讨论

HCC 由于在生理条件下也非常容易聚集,且大部分形成二聚体^[11],这为该领域的研究带来了诸多困难。在其替代模型寻找过程中研究者发现,cC 与 HCC 同属于 Cystatin 超家族 II 型,二者具有高度同源性^[12]。cC 与 HCC 相比有更高的热力学稳定性,与 HCC 易于形成二聚体不同,cC 在生理条件下主要以单体形式存在^[13],这为相关蛋白质生化实验提供了便利可操作的优势,也成为本实验构建的药物筛选模型的理论基础。

本研究利用毕赤酵母表达的 cC 的突变体 I66Q 菌株,采用 SDS-PAGE 结合密度梯度蛋白测定技术以及免疫印迹法在胞内和胞外定量分析了多种单方中药对 cC 突变体 I66Q 的聚集的影响。研究结果表明,远志、芍药、姜黄、吴茱萸、大黄在胞外水平上对 cC 突变体 I66Q 的聚集有明显的抑制作用,而远志的作用最为明显,接下来更深一步地研究远志对 cC 突变体 I66Q 的聚集情况的影响,通过剂量效应分析显示,远志对 cC 淀粉样聚集的抑制浓度区间为小于等于 500 μg/mL,在高于此浓度时,远志的剂量与 cC 淀粉样聚集呈负相关。

本研究所使用的表达体系为基于毕赤酵母的外源蛋白表达体系,由于在构建重组质粒时将 cC 的 cDNA 直接与前端的毕赤酵母自身的分泌信号肽序列连接,因此经翻译、折叠、修饰的外源蛋白直接分泌至胞外,毕赤酵母的自身蛋白分泌量极小,加上毕赤酵母生长培养基中只有少量的蛋白^[14],这意味着分泌的外源蛋白是培养基中蛋白的主要组成成分,可作为蛋白纯化的第一步,因此,在研究中采取的在培养基中直接加入的中药成分应主要作用于外源分泌蛋白,即 cC 的单体及二聚体。由 HCC 引起的 CCA 的致病原因是由于 HCC 的突变体 L68Q 通过结构域交换形成二聚体,二聚体进一步聚集在血管内形成淀粉样纤维沉淀,进而引发 CCA,本实验结果显示,亚适量浓度的远志在一定程度上能有效抑制 cC 的二聚体及多聚体的形成,由此可以推测,有抑制寡聚体形成的中药成分将可作为潜在的 HCC 关联 CCA 的候选治疗药物。

基于 HCC 的一级蛋白质结构,HCC 在哺乳动物细胞中表达的绝大部分为分泌蛋白,少部分存留于细胞区间的溶酶体系统,为深入分析中药成分对胱抑素的聚集影响,进一步通过细胞裂解,应用免疫印迹法检测了远志对胞内 HCC 的影响,结果显示在胞内水平上并没有明显的影响,提示由于相对分子质量大小的原因,中药成分可能较难进入由溶酶体等亚细胞器形成的胞内区间。

对中药成分抑制 HCC 寡聚体形成的深入研究将有助于理解小分子化合物抑制淀粉样聚集的抑制机制,从而有利于开发出潜在的基于中草药物的 HCC 关联 CCA 的新疗法。

参考文献:

- [1] Palsdottir A, Snorraddottir AO, Thorsteinsson L. Hereditary cystatin C amyloid angiopathy [J]. Brain Pathol, 2006,16(1):55-59.
- [2] Jaskolski M. 3D domain swapping, protein oligomerization, and amyloid formation [J]. Acta Biochim Pol, 2001, 48:807-827.
- [3] Bach S, Talarek N, Andrieu T, et al. Isolation of drugs active against mammalian prions using a yeast-based screening assay [J]. Nat Biotechnol, 2003, 21(9):1075-1081.
- [4] Rambold AS, Miesbauer M, Olschewski D, et al. Green tea extract interfere with the stress-protective activity of PrPC and the formation of PrPSc [J]. J Neurochem, 2008, 107(1):218-229.
- [5] 王学美. 补肾中药对早期老年痴呆的治疗功效 [J]. 环球中医药, 2008, 1(3):9-12.
- [6] 张秋娟, 张云云, 黄文燕. 中医药治疗帕金森病的思路与方法 [J]. 中西医结合学报, 2004, 2(1):75-77.
- [7] 赵敬望, 王德生. 中药与中药有效成分治疗阿尔茨海默病的研究进展 [J]. 中国中西医结合杂志, 2008, 28(2):177-181.
- [8] Nasu Y, Iwashita M, Saito M, et al. Inhibitory effects of atractylodis lanceae rhizoma and poria on collagen- or thromboxane A2-induced aggregation in rabbit platelets [J]. Biol Pharm Bull, 2009, 32(5):856-860.
- [9] He J, Song Y, Ueyama N, et al. Prevention of amyloid fibril formation of amyloidogenic chicken cystatin by site-specific glycosylation in yeast [J]. Protein(下转第 2014 页)

性,是个体及家族识别的理想遗传标记;并初步提示这些基因座在新疆维吾尔族人群中具有较高的识别力。本次调查中在一些基因座未观察到相应的等位基因;同时也未发现检测出的等位基因超出了标准等位基因阶梯范围的现象,与汉族群体的研究报道结果明显不同^[7-9],进一步表明 Y-STR 基因座基因频率分布具有明显的地域和种族差异。

Y 染色体 STR 基因座多态性研究可为法医学个体识别和亲权鉴定提供新的手段,在诸如父系家族的亲权鉴定、混合斑男性成分的检测、不同男性个体混合物的分析、无名男尸的身份确定、追溯父系迁移历史及重构同一父系家族等方向都具有独特的应用价值^[10-11]。维吾尔族是新疆的主要民族,研究该少数民族男性 Y-STR 的多态信息,可以对其起源、迁徙、交流、民族基因特点等法医学和遗传学方面的信息有一定的掌握。本调查结果初步获得了新疆昌吉维吾尔族男性群体 17 个 Y-STR 基因座的基因频率及基因变异度值,以及各基因座在该群体中个体识别率的差异,可为新疆维吾尔族群体 17 个 Y-STR 的单倍型频率与累积个体识别率提供基础数据资料^[12]。目前研究显示,不同地域与不同人群之间 Y-STR 单倍型分布的变异度较大^[13-15]。因此,建立新疆地区维吾尔族人群的 Y-STR 等位基因频率、单倍型数据资料必不可少,可为进一步开展法医学亲子鉴定和个体识别、人类起源和进化研究与应用奠定基础。

参考文献:

[1] Leite FP, Callegari-Jacques SM, Carvalho BA, et al. Y-STR analysis in Brazilian and South Amerindian populations[J]. *Am J Hum Biol*, 2008, 20(3): 359-363.

[2] 刘超,陈玲,陈晓辉,等. 广州汉族人群 12 个 Y-STR 基因座多态性及法医学应用研究[J]. *南方医科大学学报*, 2007, 27(5): 599-600.

[3] 续西发. 维吾尔族人口规模与分布[J]. *西北人口*, 2003, 23(4): 46-48.

[4] 聂爱文. 试论昌吉地区汉族人的来源及其民俗文化特点[J]. *西北人口*, 2003, 23(1): 50-52.

[5] Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medi-

um for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material[J]. *Biotechniques*, 1991, 10(4): 506-513.

[6] Nei M. *Molecular evolutionary genetics*[M]. New York: Columbia University Press, 1987: 34-35.

[7] 王永在,王勇,黄太宇,等. 内蒙古汉族人群 17 个 Y-STR 基因座遗传多态性[J]. *中国法医学杂志*, 2009, 24(2): 117-118

[8] 吴微微,郑小婷,潘立鹏,等. 浙江汉族人群 16 个 Y-STR 基因座遗传多态性调查[J]. *刑事技术*, 2005, 29(5): 11-17.

[9] 鲁涤,袁丽,杨雪. 北京汉族群体 17 个 Y-STR 基因座遗传多态性[J]. *中国法医学杂志*, 2010, 25(6): 432-433

[10] Butler JM. *法医 DNA 分型: STR 遗传标记的生物学、法学及遗传学*[M]. 侯一平,刘雅诚,译. 北京: 科学出版社, 2007: 9, 105.

[11] Guo H, Yan J, Jiao Z, et al. Genetic polymorphisms for 17 Y-chromosomal STRs haplotypes in Chinese Hui population[J]. *Leg Med*, 2008, 10(3): 163-169.

[12] 邓世雄,陈伟. 重庆汉族、土家族人群 3 个 Y-STR 基因座遗传多态性[J]. *重庆医科大学学报*, 2009, 34(10): 1326-1329.

[13] Park MJ, Lee HY, Chung U, et al. Y-STR analysis of degraded DNA using reduced-size amplicons[J]. *Int J Legal Med*, 2007, 121(2): 152-157.

[14] Zhang YL, Xue YL, Huang XY, et al. Genetic diversity of Y-chromosome microsatellites in the Fujian Han and the Sichuan Han populations of China[J]. *Anthropol Anz*, 2007, 65(1): 1-14.

[15] Mendes-Junior CT, Ferreira LB, Canas Mdo C, et al. Y-chromosome STR haplotypes in a sample from Sao Paulo State, southeastern Brazil[J]. *J Forensic Sci*, 2007, 52(2): 495-497.

(收稿日期: 2011-10-23 修回日期: 2012-02-13)

(上接第 2011 页)

Sci, 2006, 15(2): 213-222.

[10] Gauthier S, Kaur G, Mi W, et al. Protective mechanisms by cystatin C in neurodegenerative diseases[J]. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2012, 3: 541-554.

[11] Bjarnadottir M, Nilsson C, Lindstrom V, et al. The cerebral hemorrhage-producing cystatin C variant (L68Q) in extracellular fluids[J]. *Amyloid*, 2001, 8(1): 1-10.

[12] Staniforth RA, Giannini S, Higgins LD, et al. Three-dimensional domain swapping in the folded and molten-globule states of cystatins, an amyloid-forming structural

superfamily[J]. *EMBO J*, 2001, 20(17): 4774-4781.

[13] Sanders A, Jeremy Craven C, Higgins LD, et al. Cystatin forms a tetramer through structural rearrangement of domain-swapped dimers prior to amyloidogenesis[J]. *J Mol Biol*, 2004, 336(1): 165-178.

[14] He J, Song Y, Ueyama N, et al. Characterization of recombinant amyloidogenic chicken cystatin mutant I66Q expressed in yeast[J]. *J Biochem*, 2005, 137(4): 477-485.

(收稿日期: 2011-12-23 修回日期: 2012-04-06)