

猫爪草提取物对临床分离结核分枝杆菌蛋白质组表达的影响

何 颖¹ 乐 军³ 胡昌华¹ 王洪海² 谢建平^{1,2,*}

(¹西南大学生命科学学院 现代生物医药研究所 重庆 400715)

(²复旦大学生命科学学院 遗传工程国家重点实验室 上海 200433)

(³上海市肺科医院 上海 200433)

摘 要 猫爪草已经临床治疗耐药结核病,但其作用机理和有效成分尚不清楚。为研究其可能的作用靶标,采用双向电泳技术比较分析猫爪草提取物作用前后结核分枝杆菌临床分离株的全细胞蛋白表达差异。发现 22 个蛋白质斑点具有明显差异,对其中 3 个表达明显下调的蛋白质斑点进行基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱分析,获得了肽质量指纹图谱。数据库检索分析确定这 3 个点代表的蛋白质分别为硫代硫酸硫转移酶、延长因子 T_S 和热休克蛋白 X,分别参与厌氧硫代谢、蛋白质翻译和蛋白质折叠分泌、转录调控等过程。这有助于深入研究猫爪草对结核分枝杆菌的作用机理,也为发现新的抗结核病治疗药物靶标提供了线索。

关键词 猫爪草,结核分枝杆菌,蛋白质组,双向电泳,差异表达

中图分类号:Q936 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2005)06-0895-05

结核病是由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*,以下简称 MTB)引起的严重威胁人类健康的重要传染病,其死亡率在全球单一细菌性病原体感染导致疾病中最高。每年世界上有近 300 万人死于结核病,全球约 1/3 人口感染过结核分枝杆菌^[1]。耐多药结核分枝杆菌日益增多,以及与 HIV 病毒共感染更增加了结核病治疗和控制的难度,开发新的结核病治疗药物和诊断工具迫在眉睫。利用功能基因组学尤其是蛋白质组学方法从中药宝库中开发结核病治疗药物是一个重要但尚未引起足够重视的方向。

猫爪草(*Radix Ranuncoli Ternati*)系毛茛科植物小毛茛(*Ranunculus Fernatus Thunb.*)的干燥块根,中医临床上用于治疗肺结核、颈淋巴结结核、咽喉炎、肿瘤等^[2]。由河南固始制药有限公司生产的猫爪草胶囊已经上市。但尚不清楚其作用机理、作用靶标和有效组分。本研究利用双向电泳(2-DE)技术结合基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱技术(MALDI-TOF-MS),应用比较蛋白质组学的方法来研究猫爪草提取物对临床分离的结核分枝杆菌作用前后的蛋白表达差异,为进一步研究猫爪草的作用机理提供线索。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和培养:异烟肼耐药 MTB 由上海市肺科医院检验科分枝杆菌检验室提供,经平板传代表明遗传稳定。细菌在 Middlebrook 7H9(Difco)添加 OADC(0.5% 牛血清白蛋白,0.2% 葡萄糖,0.06% 油酸甘油酯,140mmol/L NaCl)的液体培养基中 37℃ 培养。200mL Middlebrook 7H9 培养基内接种总数为 2×10^8 的耐药结核分枝杆菌,37℃ 培养 6~8d,至细菌密度为 $1 \times 10^8 \sim 2 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ 或光密度(OD_{600})为 0.8~1.0 之间。

1.1.2 主要仪器:PRTEAN IEF Cell 等电聚焦电泳仪,PROTEAN Xi Cell 垂直板电泳仪,Molecular Image Fx 凝胶图像扫描仪,PDQuest6.0 图像分析软件,均为美国 Bio-Rad 公司产品;U3000 分光光度计为 HITACHI 公司产品,质谱分析系统为美国 Applied Biosystems 公司的 ABI 4700 基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱仪(MALDI TOF MS)。

1.2 药物处理

将猫爪草 75% 乙醇浸提物浓缩后,每 mL 相当于 5g 生药,处理终浓度为每 mL 相当于 1g 生药浓

基金项目:国家 973 项目(2002CB512804),国家自然科学基金项目(30270072),教育部科学技术研究重点项目(105146)

* 通讯作者。Tel:86-23-68254062 Fax:86-23-68252365 E-mail:jianpingxie@vip.sina.com

作者简介:何 颖(1980-),女,四川成都人,硕士研究生,主要从事微生物学研究。E-mail:theying8080@sohu.com

其他作者:唐 翠²,魏秀丽²,刘雪梅¹,宋 洁¹

收稿日期:2005-02-09,修回日期:2005-08-02

度。将浓缩提取物加入培养至对数期的结核菌培养基中,处理 30min 后进行后续蛋白质电泳和凋亡等分析。

1.3 细胞蛋白样品的制备

4000r/min 4℃离心 15min,沉淀细菌,用 pH 7.4 的 PBS 缓冲液洗涤沉淀细菌两次。用 1mL MilliQ 水(含 1mmol/L PMSF,10mmol/L EDTA)溶解。超声破碎裂解细菌 15min 振幅 70% 超声 1min,停 10s。缓慢加入尿素到超声裂解物至终浓度 9mol/L,二硫苏糖醇(DTT)至终浓度为 70mmol/L。分别加入 Bio-lyte 和 OG 至终浓度为 2%。样品置于室温中 30min,间隔振荡。10000r/min,20℃离心 30min,收集上清液,-70℃冻存。Bradford 法测蛋白质浓度^[3]。

1.4 双向凝胶电泳

1.4.1 第一向——固定 pH 梯度等电聚焦凝胶电泳 采用低电压胶内泡胀法。将 30μL 细胞蛋白样品 360μL 上样缓冲液(7mol/L 尿素,2mol/L 硫脲,4% CHAPS,65mmol/L DTT,2g/L Bio-lyte,0.001% 溴酚蓝)混合,加入样品水化盘中,放入 17cm pH4~7 的固定 pH 梯度胶条,加盖 1~2mL 石蜡油。水化和等电聚焦按设置的程序进行,即水化 50V 12h,除盐 250V 1h、1000V 1.5h,升压 8000V 5h,聚焦 8000V 60000Vh。等电聚焦后的固定 pH 梯度胶条在平衡缓冲液(6mol/L 尿素,2% SDS,1.5mol/L Tris·HCl pH 8.8,20% 甘油)中平衡 30min,转移至 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶的上端。

1.4.2 第二向——SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 以每一胶条 10mA 恒流电泳 30min,再加大电流至 30mA 直至溴酚蓝达到胶的底线。染色采用高灵敏度的银氨染色。

1.5 凝胶图像的分析

凝胶用 Molecular Image Fx 凝胶图像扫描仪扫描,配比分析采用 PDQuest 6.0 软件完成。比较不同批次处理后凝胶的电泳质量和重复性,选取效果最好的来进行比较。与对照组相比,猫爪草作用后结核分枝杆菌的蛋白质凝胶图像上所有发生了显著性变化($P < 0.05$)的蛋白质点都被筛选出来。筛选出来的所有蛋白质点都经过人工的检验,以确保不是实验中出现的假相。

1.6 肽指纹图谱分析

样品切下放入样品管中,用 25mmol/L 碳酸氢铵溶液配制的 50% 乙腈溶液 100μL 脱色,真空冷冻干燥后加入 0.01g/L 胰蛋白酶 10μL,4℃放置 30min,37℃保温 18h,再加入 5% 三氟乙酸溶液 100μL,40℃

作用 1h,吸出上清,加 2.5% 三氟乙酸溶液和 50% 乙腈溶液各 100μL,30℃保温 1h,吸出上清,合并两次上清,冷冻干燥。用 10μL 0.5% 三氟乙酸溶解冷冻干燥肽段,取 1μL 做肽指纹图谱分析。

1.7 蛋白质序列数据库检索

根据肽指纹图谱,采用 Ms-Fit 和 Mscot 搜索程序搜索 NCBI 的冗余数据库(redundant database)。搜索限定条件为细菌,蛋白质分子质量范围 10~100kD,等电点 pI 值为 4~7,胰蛋白酶消化。

2 结果

2.1 药物作用前后结核分枝杆菌临床分离菌株的 2-DE 图谱比较分析

用 PDQuest 软件对药物作用前后的两张 2-DE 图谱进行对比分析^[5],发现两者的差异斑点有 22 个,蛋白质分子量均处于 10~100kD,pI 值分布于 4~7 之间(图 1)。切割其中差异明显的 3 个斑点进行肽指纹分析。

2.2 MALDI-TOF-MS 分析及数据库检索

切割 2-DE 凝胶上药物作用后表达明显下调的 3 个蛋白质斑点,胰蛋白酶消化后,进行 MALDI TOF MS 检测,得到肽质量指纹图谱(图 2)。通过数据库搜索,结合 2-DE 图谱上相应蛋白质的分子质量、pI 值,确定这 3 个蛋白质分别为:Spot1 为硫代硫酸硫转移酶(Thiosulfate sulfurtransferase);Spot2 为延长因子 Ts(Elongation factor EF-Ts);Spot3 为热休克蛋白 X(Heat shock protein X)(表 1)。

表 1 2-DE 分离鉴定的结核分枝杆菌在药物处理后表达下调的蛋白质

Table 1 Differentially expressed *Mycobacterium tuberculosis* protein between untreated and treated with *Radix Ranuncoli Ternati* isolated and identified by 2-DE and MALDI TOF MS analysis

Spot No.	Protein name	MW	pI	Protein score *
1	cysA(thiosulfate sulfurtransferase)	30995.5	5.14	124
2	ts(elongation factor EF-Ts)	28737.2	5.26	272
3	hspX(heat shock protein X)	16217.2	5	250

* After Ms-Fit search ,protein score is calculated by the matching of the amino acid sequence of peptide , similitude between the fragment . When protein score greater than 70 ,the protein is thought to be significant($P < 0.05$).

猫爪草虽然作为结核病,尤其是耐药结核病的治疗药物已经临床使用,但尚不清楚其作用机理。而且因为这是中药制剂,国际上未见相关研究,深入研究其作用机理和有效成分具有特别的意义。国内

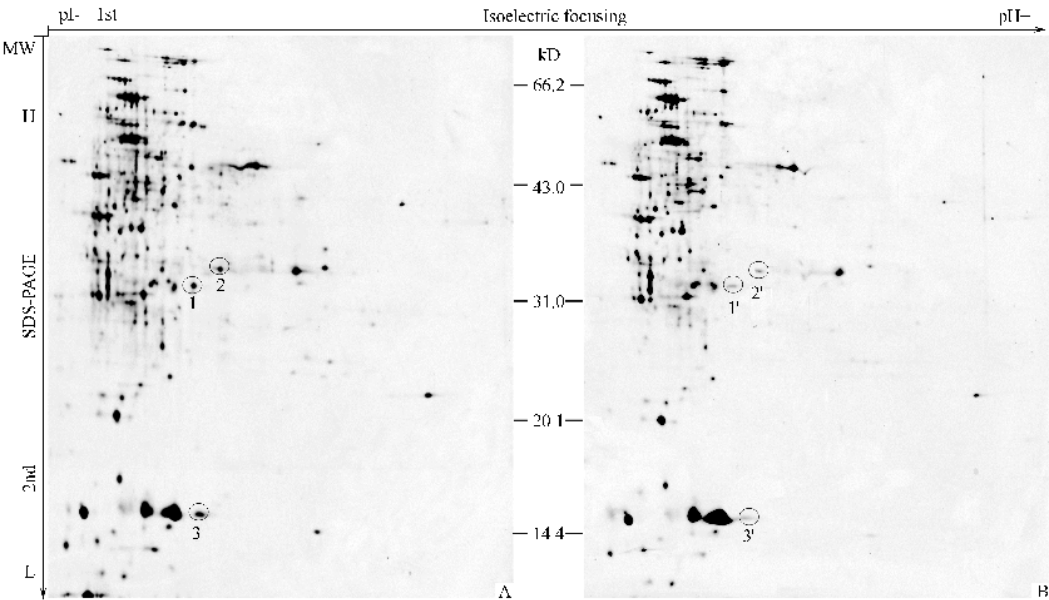


图 1 猫爪草提取物未处理 (A) 和处理 (B) 的结核分枝杆菌蛋白质组双向电泳图谱

Fig.1 Two dimensional electrophoretic (2-DE)maps of *Mycobacterium tuberculosis* untreated (A) and treated (B) with *Radix Ranuncoli Ternati* extracts

Three proteins which remarkably decreased in *Mycobacterium tunerculosis* treated with *Radix Ranuncoli Ternati* were indentified as Spot1 ,cysA(thiosulfate furtransferase) Spot2 ,ts(elongation factor EF-Ts) ; Spot3 ,hspX(heat shock protein X). 1' 2' and 3' are the corresponding area with Spot1 ,Spot2 and Spot3.

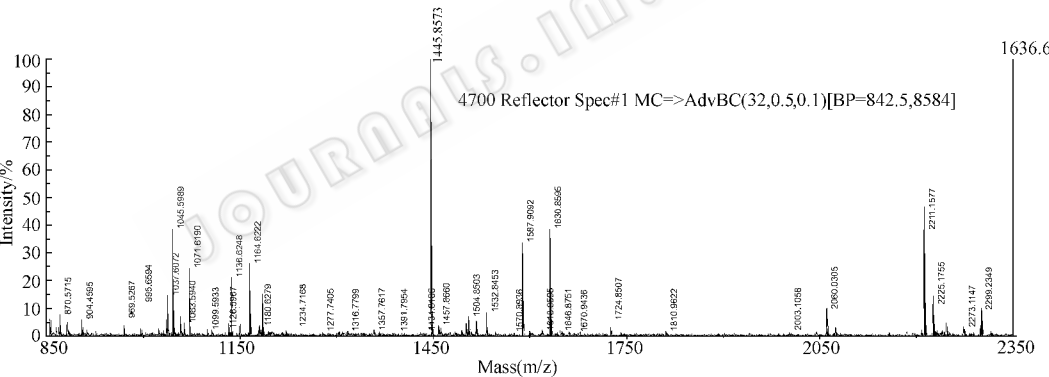


图 2 斑点 1 的肽指纹图谱

Fig.2 Peptide mass finger printing of cysA(thiosulfate sulfurtransferase)(Spot 1)

仅报道其对宿主细胞个别基因表达水平的影响^[6]。我们的研究以临床分离、遗传稳定的中国菌株为对象 ,在蛋白质组水平探索药物的影响 ,有助于进一步深入研究猫爪草抗结核菌的机理。本研究得到的 3 个在药物处理后表达下调的蛋白质具有很重要的生理作用。

硫代硫酸硫转移酶是类似硫氰酸生成酶 (Rhodanese)的一种蛋白^[7] ,广泛存在于各种生物体中 ,包括细菌、植物以及哺乳动物^[8]。其功能是把类似硫代硫酸根的阴离子中的硫转移到其他硫受体分子中 ,通常转移到氰酸根 ,形成硫氰酸根。在哺乳动物中 ,该酶与半胱氨酸、甲硫氨酸的厌氧代谢 ,氰化物的解毒 ,转录后 tRNA 的硫化以及免疫增强都相

关^[9]。而结核分枝杆菌基因组共编码了 4 种硫代硫酸硫转移酶(CysA2[Rv0815c] , CysA3[Rv3117] , SseA[Rv3283] , SseB[Rv2291]) ,说明这类蛋白对分枝杆菌非常重要。目前对结核分枝杆菌硫代硫酸硫转移酶的研究还不多。大肠杆菌硫代硫酸硫转移酶在合成铁-硫簇(4Fe-4S)中起重要作用。铁-硫簇为氧和铁摄取的生物传感器。低氧条件下 ,细菌需要增强细胞内不稳定硫化物和铁-硫簇的代谢^[10]。铁是结核分枝杆菌不可或缺的金属元素。因此推测硫代硫酸硫转移酶也很有可能和 MTB 铁摄取有关。这有待进一步研究。低氧条件下 ,*M. bovis* BCG 的 CysA2 和 CysA3 表达明显上调^[11]。这说明该酶可能在细菌持续感染中也有作用。猫爪草作用后 MTB

硫代硫酸硫转移酶表达下调,说明它可能通过对该酶的抑制,对结核分枝杆菌的氨基酸代谢、转录水平、氰化物的解毒以及硫和铁转移等方面产生影响,这可能是猫爪草提取物治疗结核病的一种机理。

延长因子 EF-Tu 和 EF-Ts 在蛋白质合成时链延伸中起着重要作用^[12~14]。EF-Tu 在胞内将氨酰 tRNA(aa-tRNAs)引导到核糖体 mRNA 延长区的氨酰位点,并调控正反密码子的识别。EF-Tu 形成一个含有 GTP 和 aa-tRNA 的三聚体,它与核糖体结合时 GTP 水解形成 GDP 并释放出来。EF-Ts 则催化 EF-Tu 上 GDP 形成 GTP 的过程,使得 EF-Tu 能重新开始新一轮 aa-tRNA 结合过程^[15]。BCG 感染巨噬细胞后,在胞内生存的 BCG 明显上调其 EF-Tu 表达^[16]。这说明该分子可能与分枝杆菌在宿主胞内的生存、繁殖和致病有关。猫爪草提取物可能抑制 EF-Ts 的表达,从而破坏 MTB 的翻译,影响大量蛋白质的代谢。

hspX 或称为 α -晶体蛋白同族体)是结核分枝杆菌中的一种 16kD 的蛋白,具有分子伴侣和转录因子特性,由 hspX 基因(Rv2031c)编码,是小型热休克蛋白家族中的一员。它在结核分枝杆菌由对数期转为稳定期时表达上调,且为稳定期丰度最高的蛋白之一。这种蛋白在低氧环境下被诱导表达^[17],而且在低氧或缺氧条件下与细胞壁结合,从而稳定结核分枝杆菌自身的结构^[18]。结核分枝杆菌的 hspX 突变株在体外生长没有变化,但在骨髓巨噬细胞和 THP-1 细胞中的生长明显受损^[19]。另外在巨噬细胞中生长的 BCG 和结核分枝杆菌 H37Rv 株的 hspX 显著上调^[16,20]。稳定期被认为是 MTB 持续感染时的状态。因此 hspX 对结核分枝杆菌持续感染作用至关重要。本研究中猫爪草作用后 hspX 显著下调,说明该药物可能通过减少结核分枝杆菌 hspX 的表达,影响菌的转录和蛋白表达,破坏其细胞壁结构,影响细菌的正常代谢。

一般认为,中药治疗包括结核病在内的多种疾病的优势在于它的多靶点作用。本研究的结果可推测部分这种效应。猫爪草作用导致表达明显下调的三种蛋白也相互影响,延长因子与翻译有关,其表达下调必定影响其他蛋白的合成,热休克蛋白是广泛存在的分子伴侣,与蛋白质的合成、折叠、运输和分泌有关,多种蛋白质都以其作为伴侣,硫代硫酸硫转移酶表达下调使氨基酸代谢和解毒作用受影响,但是对其他蛋白质的影响如何有待研究。

本研究表明,猫爪草对结核分枝杆菌有明显抑

制作用,这种作用可能与硫代谢和其他持续感染有关的蛋白质相关。对这些蛋白质与猫爪草有效成分的相互作用研究将有助于阐明是否确为靶标,并将为基于靶标的抗结核病药物开发提供基础。同时,蛋白质组技术是研究药物对致病菌的作用和发现新的靶标的非常有前景的方法。

参 考 文 献

- [1] Dye C, Scheele S, Dolin P, et al. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO. global surveillance and monitoring project. JAMA, 1999, 282(7): 677-686.
- [2] 中华人民共和国卫生部药典委员会编. 中华人民共和国药典一部(2005年版). 北京: 化学工业出版社, 2005, 223.
- [3] Kruger N J. The Bradford method for protein quantitation. Methods Mol Biol, 1994, 32(1): 9-15.
- [4] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术. 北京: 科学出版社, 2001, 142-144.
- [5] 贾宇峰, 林秋霞, 郭尧君, 等. 蛋白质双向电泳图像分析. 生物化学与生物物理进展, 2001, 28(2): 246-250.
- [6] 詹莉, 戴华成, 杨治平, 等. 小毛茛内酯影响耐药结核患者外周血淋巴细胞 SHSP 和 GLS 表达的研究. 中国中药杂志, 2002, 27(9): 677-679.
- [7] Cole S T, Brosch R, Parkhill J, et al. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. Nature, 1998, 393(6685): 537-544.
- [8] Rouse D A, DeVito J A, Li Z, et al. Site-directed mutagenesis of the katG gene of Mycobacterium tuberculosis: effects on catalaseperoxidase activities and isoniazid resistance. Mol Microbiol, 1996, 22(3): 583-592.
- [9] Iciek M, Wlodek L. Biosynthesis and biological properties of compounds containing highly reactive, reduced sulfane sulfur. Pol J Pharmacol, 2001, 53(3): 215-225.
- [10] Uden G, Becker S, Bongaerts J, et al. O₂-sensing and O₂-dependent gene regulation in facultatively anaerobic bacteria. Arch Microbiol, 1995, 164(2): 81-90.
- [11] Florczyk M A, McCue L A, Stack R F, et al. Identification and characterization of mycobacterial proteins differentially expressed under standing and shaking culture conditions, including Rv2623 from a novel class of putative ATP-Binding proteins. Infect Immun, 2001, 69(9): 5777-5785.
- [12] Valle M, Zavialov A, Li W, et al. Incorporation of aminoacyl-tRNA into the ribosome as seen by cryo-electron microscopy. Nat Struct Biol, 2003, 10(11): 899-906.
- [13] Ohtsuki T, Sato A, Watanabe Y, et al. A unique serine-specific elongation factor Tu found in nematode mitochondria. Nat Struct Biol, 2002, 9(9): 669-673.
- [14] Gromadski K B, Rodnina M V. Streptomycin interferes with conformational coupling between codon recognition and GTPase activation on the ribosome. Nat Struct and Mol Biol, 2004, 11(4): 318-322.

- [15] Ohtsuki T , Sakurai M , Sato A , *et al.* . Characterization of the interaction between the nucleotide exchange factor EF-Ts from nematode mitochondria and elongation factor Tu. *Nucleic Acids Res* , 2002 , **30** (24) : 5444 – 5451 .
- [16] Monahan I M , Betts J , Banerjee DK , *et al.* . Differential expression of mycobacterial proteins following phagocytosis by macrophages. *Microbiol* 2001 , **147** Pt 2) : 459 – 471 .
- [17] Tabira Y , Ohara N , Kitaura H , *et al.* . The 16-kDa alpha-crystallin-like protein of *Mycobacterium bovis* BCG is produced under conditions of oxygen deficiency and is associated with ribosomes. *Res Microbiol* , 1998 , **149** (4) : 255 – 264 .
- [18] Cunningham A F , Spreadbury C L. Mycobacterial stationary phase induced by low oxygen tension : cell wall thickening and localization of the 16-kilodalton alpha-crystallin homolog. *J Bacteriol* , 1998 , **180** (4) : 801 – 808 .
- [19] Yuan Y , Crane D D , Simpson R M , *et al.* . The 16-kDa alpha crystallin (Acr) protein of *Mycobacterium tuberculosis* is required for growth in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1998 , **95** (16) : 9578 – 9583 .
- [20] Rosenkrands I , Slayden R A , Crawford J , *et al.* . Hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis* studied by metabolic labeling and proteome analysis of cellular and extracellular proteins. *J Bacteriol* , 2002 , **184** (13) : 3485 – 3491 .

Effects of the *Radix Ranuncoli Ternati* extracts on *Mycobacterium tuberculosis* proteome profiling revealed by 2D electrophoresis

HE Ying¹ YUE Jun³ HU Chang-hua¹ WANG Hong-hai² XIE Jian-ping^{1 2*}

(¹ Institute of Modern Biopharmaceuticals , School of Life Sciences , Southwest China University , Chongqing 400715 , China)

(² State Key Laboratory of Genetic Engineering , Institute of Genetics , Section of Pathogen Biology , School of Life Sciences , Fudan University , Shanghai 200433 , China)

(³ Shanghai Pulmonary Hospital , Shanghai 200433 , China)

Abstract : *Radix Ranuncoli Ternati* is clinically effective traditional Chinese medicine for multidrug resistant tuberculosis. Its active components and mechanism of action remain unsolved. Two dimensional gel electrophoresis (2-DE) was employed to address this problem. Global proteome of *Mycobacterium tuberculosis* untreated and treated with *Radix Ranuncoli Ternati* were compared , and 22 protein spots were found to be expressed differentially. 3 protein spots which remarkably decreased in *Mycobacterium tuberculosis* treated with *Radix Ranuncoli Ternati* were subjected to matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) analysis. The data obtained from peptide mass finger printing were used for database search. The 3 protein spots in gel were identified as cysA (thiosulfate sulfurtransferase) , tsf (elongation factor EF-Ts) and hspX (heat shock protein X). These data provide insights into the changed global protein patterns of *Mycobacterium tuberculosis* treated with *Radix Ranuncoli Ternati* and may prove useful for further study in the mechanism in how *Radix Ranuncoli Ternati* influence the life of *Mycobacterium tuberculosis* . The differentially expressed proteins may be potential novel antituberculosis drug targets .

Key words : *Radix Ranuncoli Ternati* , *Mycobacterium tuberculosis* , Proteome , Two dimensional gel electrophoresis (2-DE) , Differential expression

Foundation item : Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2002CB512804) ; National Natural Science Foundation of China (30270072) ; Key Project of Science and Technology Research of Ministry of Education (105146)

* Corresponding author. Tel 86-23-68254062 ; Fax 86-23-68252365 ; E-mail : jianpingxie@vip.sina.com

Other authors : TANG Cui² , WEI Xiu-li² , LIU Xue-mei¹ , SONG Jie¹

Received date : 02-09-2005