

分类号： 单位代码：10114

密 级： 学 号：Dr2009043

**DBDCT 致肝毒性的蛋白质组学及 Trx1 介导的氧化应激机制研究**

唐莉

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 研 |  | 究 |  | 生： |
| 指 | 导 |  | 教 | 师： |

李青ft 教授 申 请 学 位 门 类 级 别： 医学博士 专 业 名 称： 劳动卫生与环境卫生学研 究 方 向： 中药药理与毒理学所 在 学 院： 公共卫生学院

二 O 一三年五月

**A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements**

**for the Degree for Doctor of Medicine**

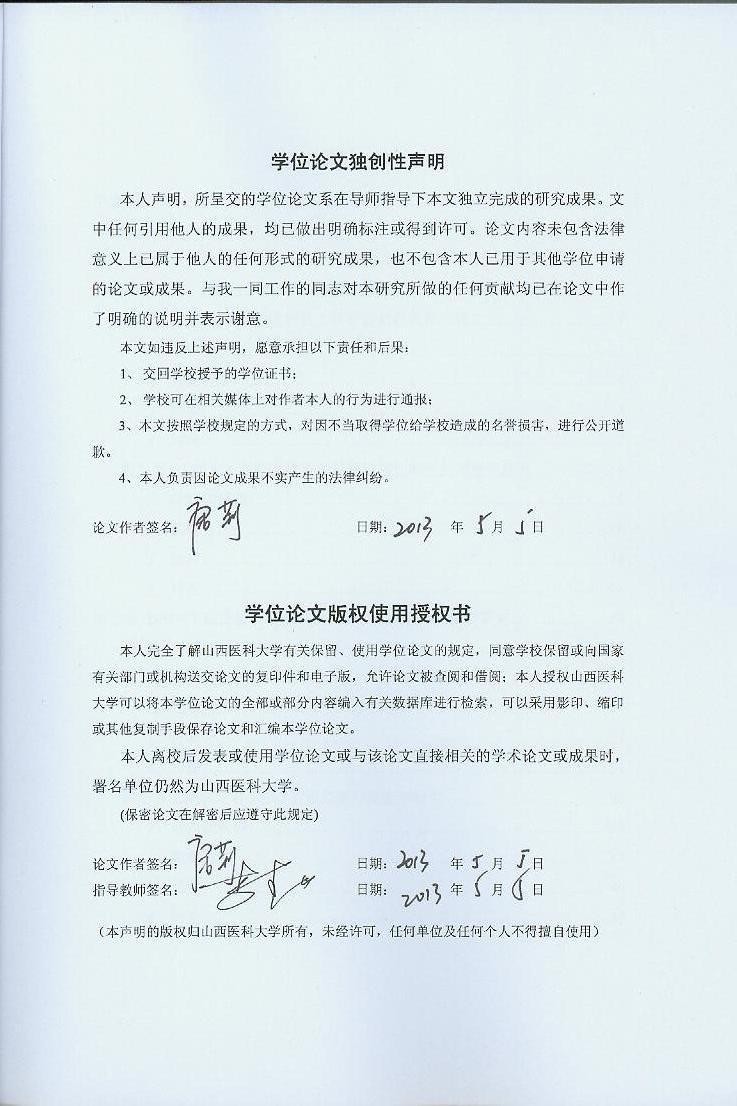
**Investigation on proteomics and Trx1-mediated oxidative stress of DBDCT-induced hepatotoxicity**

**Candidate: Li Tang**

**Major: Occupational and Environmental Health Supervisor: Professor Qingshan Li**

**School of Public Health, Shanxi Medical University Taiyuan 030001，P. R. China**

**May. 2013**



目 录

[中文摘要](#_Toc686504660) 3

**[Abstract](#_Toc686504661)** 4

[前言](#_Toc686504662) 5

[第一章](#_Toc686504663) **[DBDCT](#_Toc686504663)**[腹腔注射致大鼠肝脏毒性研究](#_Toc686504663) 5

[第一节 、](#_Toc686504664)**[DBDCT](#_Toc686504664)**[腹腔注射致大鼠肝脏损伤模型的建立](#_Toc686504664) 5

[1、 材料和仪器：](#_Toc686504665) 5

**[1.1](#_Toc686504666)** [主要试剂：](#_Toc686504666) 5

**[1.2](#_Toc686504667)** [主要仪器：](#_Toc686504667) 5

**[1.3](#_Toc686504668)** [实验动物：](#_Toc686504668) 5

[2、 实验方法：](#_Toc686504669) 6

**[2.1](#_Toc686504670)** [实验设计：](#_Toc686504670) 6

**[2.2](#_Toc686504671)** [一般观察：](#_Toc686504671) 6

**[2.4](#_Toc686504672)** [血浆生化指标检测：](#_Toc686504672) 6

**[2.5](#_Toc686504673)** [肝脏组织病理学检查：](#_Toc686504673) 6

**[2.6](#_Toc686504674)** [原子吸收测定锡在大鼠体内的蓄积：](#_Toc686504674) 6

**[2.7](#_Toc686504675)** [数据处理：](#_Toc686504675) 6

**[3.1](#_Toc686504676)****[DBDCT](#_Toc686504676)**[对大鼠一般状态的影响](#_Toc686504676) 6

**[3.2](#_Toc686504677)****[DBDCT](#_Toc686504677)**[对大鼠血浆生化指标的影响](#_Toc686504677) 7

**[3.3](#_Toc686504678)****[DBDCT](#_Toc686504678)**[对大鼠肝脏组织病理的影响](#_Toc686504678) 7

**[3.4](#_Toc686504679)** [锡（](#_Toc686504679)**[Sn](#_Toc686504679)**[）在大鼠肝脏的蓄积](#_Toc686504679) 8

[4、 讨论：](#_Toc686504680) 8

[一 步证明肝脏的毒性效应，本实验分别测定了各组血浆AST，ALT，AKP和ACP的含量，结果显示DBDCT组各项指标均发生了一定程度的变化，其中3.2 mg/kg和4.5 mg/kg组与对照组均有显著性差异。该结果进一步证明当DBDCT浓度为](#_Toc686504681) 8

[第二节 、](#_Toc686504682)**[DBDCT](#_Toc686504682)**[腹腔注射致大鼠肝脏损伤的](#_Toc686504682) 8

**[1.1](#_Toc686504683)** [主要试剂：](#_Toc686504683) 8

**[1.2](#_Toc686504684)** [主要仪器：](#_Toc686504684) 8

**[2.1](#_Toc686504685)** [主要溶液的配制[37, 38]：](#_Toc686504685) 9

**[2.2](#_Toc686504686)** [蛋白提取与定量：](#_Toc686504686) 11

**[2.4](#_Toc686504687)** [凝胶的扫描与酶切：](#_Toc686504687) 12

**[2.5](#_Toc686504688)** [差异蛋白的](#_Toc686504688)**[MALDI-TOF-TOF-MS](#_Toc686504688)**[鉴定：](#_Toc686504688) 12

**[2.6](#_Toc686504689)** [数据库检索差异蛋白：](#_Toc686504689) 12

**[2.7](#_Toc686504690)** [差异蛋白验证：谷胱甘肽](#_Toc686504690)**[S](#_Toc686504690)**[转移酶活性测定](#_Toc686504690) 12

**[3.1](#_Toc686504691)** [肝组织细胞膜蛋白的双向电泳图谱分析：](#_Toc686504691) 13

**[3.2](#_Toc686504692)** [肝脏组织细胞膜差异蛋白的质谱鉴定结果：](#_Toc686504692) 14

**[3.3](#_Toc686504693)** [差异蛋白的质谱鉴定图谱](#_Toc686504693) 14

**[3.4](#_Toc686504694)** [肝组织核蛋白双向电泳图谱分析：](#_Toc686504694) 15

**[3.5](#_Toc686504695)** [肝脏组织细胞核差异蛋白的质谱鉴定结果：](#_Toc686504695) 17

**[3.6](#_Toc686504696)** [肝组织谷胱甘肽](#_Toc686504696)**[S](#_Toc686504696)**[转移酶的活性](#_Toc686504696) 17

[第二章](#_Toc686504697) **[DBDCT](#_Toc686504697)**[致正常肝细胞](#_Toc686504697)**[HL02](#_Toc686504697)**[细胞毒性的](#_Toc686504697) 18

[作用机制研究](#_Toc686504698) 18

**[第一节 DBDCT](#_Toc686504699)**[对](#_Toc686504699)**[HL02](#_Toc686504699)**[细胞的毒性作用研究](#_Toc686504699) 18

[1、 材料和仪器：](#_Toc686504700) 18

**[1.1](#_Toc686504701)** [主要试剂：](#_Toc686504701) 18

**[1.2](#_Toc686504702)** [主要仪器](#_Toc686504702) 18

[2、 实验方法：](#_Toc686504703) 18

**[2.1](#_Toc686504704)** [细胞培养](#_Toc686504704) 18

**[2.2](#_Toc686504705)****[MTT](#_Toc686504705)**[实验](#_Toc686504705) 18

**[2.3](#_Toc686504706)** [透射电镜观察细胞形态](#_Toc686504706) 18

**[2.4](#_Toc686504707)** [细胞外液乳酸脱氢酶（](#_Toc686504707)**[LDH](#_Toc686504707)**[）的测定](#_Toc686504707) 18

**[2.5](#_Toc686504708)****[Annexin V-FITC/PI](#_Toc686504708)**[双染法测定细胞凋亡](#_Toc686504708) 18

**[2.6](#_Toc686504709)****[PI](#_Toc686504709)**[单染法测定细胞周期：](#_Toc686504709) 18

**[2.7](#_Toc686504710)** [细胞内](#_Toc686504710)**[ROS](#_Toc686504710)**[的检测](#_Toc686504710) 19

**[3.1](#_Toc686504711)** [不同剂量](#_Toc686504711)**[DBDCT](#_Toc686504711)**[作用于](#_Toc686504711)**[HL02](#_Toc686504711)**[细胞](#_Toc686504711)**[24 h](#_Toc686504711)**[细胞形态的变化](#_Toc686504711) 19

**[3.2](#_Toc686504712)****[MTT](#_Toc686504712)**[实验结果：](#_Toc686504712) 19

**[3.3](#_Toc686504713)** [透射电镜观察细胞形态](#_Toc686504713) 19

**[3.4](#_Toc686504714)** [乳酸脱氢酶的释放](#_Toc686504714) 19

**[3.5](#_Toc686504715)** [细胞凋亡结果](#_Toc686504715) 21

[1.5 μΜ，作用48 h后，早期凋亡率从22.50%上升至33.58 %，且与对照组有显](#_Toc686504716) 21

**[3.6](#_Toc686504717)** [细胞周期结果](#_Toc686504717) 21

**[第二节 DBDCT](#_Toc686504718)**[对](#_Toc686504718)**[HL02](#_Toc686504718)**[细胞的蛋白质组学研究](#_Toc686504718) 22

[1、 材料和仪器：](#_Toc686504719) 22

**[1.1](#_Toc686504720)** [主要试剂：](#_Toc686504720) 22

**[1.2](#_Toc686504721)** [主要仪器：](#_Toc686504721) 22

[2、 实验方法：](#_Toc686504722) 23

**[2.1](#_Toc686504723)** [主要溶液的配制：](#_Toc686504723) 23

**[2.2](#_Toc686504724)** [细胞蛋白抽提与定量：](#_Toc686504724) 23

**[2.4](#_Toc686504725)** [差异蛋白的验证：](#_Toc686504725) 23

[3、 结果：](#_Toc686504726) 25

**[3.1](#_Toc686504727)****[HL02](#_Toc686504727)**[细胞双向电泳图谱分析：](#_Toc686504727) 25

**[3.2](#_Toc686504728)****[HL02](#_Toc686504728)**[细胞差异蛋白的鉴定结果：](#_Toc686504728) 26

**[3.3](#_Toc686504729)** [差异蛋白的质谱鉴定图谱](#_Toc686504729) 26

**[3.4](#_Toc686504730)** [差异蛋白的验证](#_Toc686504730) 28

[4、 讨论：](#_Toc686504731) 28

[第三章](#_Toc686504732) **[DBDCT](#_Toc686504732)**[对硫氧还蛋白](#_Toc686504732)**[1](#_Toc686504732)**[（](#_Toc686504732)**[Trx1](#_Toc686504732)**[）介导的氧化应激作](#_Toc686504732) 28

[第一节 硫氧还蛋白](#_Toc686504733)**[1](#_Toc686504733)**[（](#_Toc686504733)**[Trx1](#_Toc686504733)**[）介导的信号通路研究](#_Toc686504733) 28

[1、 材料和仪器：](#_Toc686504734) 29

**[1.1](#_Toc686504735)** [主要试剂：](#_Toc686504735) 29

**[1.2](#_Toc686504736)** [主要仪器](#_Toc686504736) 29

[2、 实验方法：](#_Toc686504737) 29

**[2.1](#_Toc686504738)** [主要溶液的配制：](#_Toc686504738) 29

**[2.2](#_Toc686504739)** [细胞蛋白抽提：](#_Toc686504739) 29

**[2.3](#_Toc686504740)** [蛋白定量：](#_Toc686504740) 29

**[2.5](#_Toc686504741)****[RT-PCR](#_Toc686504741)**[法检测](#_Toc686504741)**[Trx1](#_Toc686504741)**[，](#_Toc686504741)**[DJ1](#_Toc686504741)**[，和](#_Toc686504741)**[ASK1 mRNA](#_Toc686504741)**[的表达](#_Toc686504741) 29

[3、 结果：](#_Toc686504742) 29

**[3.2](#_Toc686504743)****[Trx1](#_Toc686504743)**[，](#_Toc686504743)**[DJ1](#_Toc686504743)**[和](#_Toc686504743)**[ASK1](#_Toc686504743)**[的](#_Toc686504743)**[mRNA](#_Toc686504743)**[表达](#_Toc686504743) 30

[4、 讨论：](#_Toc686504744) 30

**[第二节 N-](#_Toc686504745)**[乙酰半胱氨酸（](#_Toc686504745)**[NAC](#_Toc686504745)**[）对氧化应激通路的影响](#_Toc686504745) 31

[1、 材料和仪器：](#_Toc686504746) 31

**[1.1](#_Toc686504747)** [主要试剂：](#_Toc686504747) 31

**[1.2](#_Toc686504748)** [主要仪器](#_Toc686504748) 31

[2、 实验方法：](#_Toc686504749) 31

**[2.1](#_Toc686504750)** [主要溶液的配制：](#_Toc686504750) 31

**[2.2](#_Toc686504751)** [细胞处理：](#_Toc686504751) 31

**[2.3](#_Toc686504752)****[MTT](#_Toc686504752)**[检测细胞存活率：](#_Toc686504752) 31

**[2.4](#_Toc686504753)** [流式细胞术测定细胞内](#_Toc686504753)**[ROS](#_Toc686504753)** 31

[3 结果](#_Toc686504754) 31

**[3.1](#_Toc686504755)****[NAC](#_Toc686504755)**[和](#_Toc686504755)**[DBDCT](#_Toc686504755)**[对细胞存活率的影响：](#_Toc686504755) 31

**[3.2](#_Toc686504756)****[NAC](#_Toc686504756)**[对](#_Toc686504756)**[DBDCT](#_Toc686504756)**[诱导细胞氧化损伤（](#_Toc686504756)**[ROS](#_Toc686504756)**[）的影响](#_Toc686504756) 32

**[3.3](#_Toc686504757)****[NAC](#_Toc686504757)**[对](#_Toc686504757)**[DB DCT](#_Toc686504757)**[诱导的](#_Toc686504757)**[Trx1](#_Toc686504757)**[氧化应激通路的影响](#_Toc686504757) 32

[4、 讨论：](#_Toc686504758) 33

[参考文献](#_Toc686504759) 33

[英文缩略词](#_Toc686504760) 37

[参考文献](#_Toc686504761) 39

[攻读学位期间发表论文情况](#_Toc686504762) 42

[个人简介](#_Toc686504763) 42

**DBDCT致肝毒性的蛋白质组学及Trx1介导的氧化应激机制研究**

# 中文摘要

**目的**：建立[二-(4-氯苯甲酰异羟肟酸)二正丁基合锡] (DBDCT)体内与体外的肝毒性模型，采用蛋白质组学技术分别对其作用前后蛋白质表达谱的改变进行分

析及鉴定，通过对差异蛋白的验证及其功能分析，推测DBDCT引起肝毒性的主要作用机制。通过对由差异蛋白Trx1 介导的氧化应激信号通路的研究，探讨

DBDCT引起肝毒性的氧化应激作用机制及其毒性靶蛋白。

**方法：**（1）SD 大鼠腹腔注射DBDCT，并记录动物体重变化及其肝脏系数，分别检测血浆肝功生化指标，肝组织病理学变化以及锡的肝脏蓄积，以确定其对

大鼠的肝脏毒性。（2）采用2-DE-TOF-TOF-MS分别对正常组和DBDCT染毒组大鼠肝脏膜蛋白和核蛋白表达谱进行分析，鉴定及其验证。（3）分别采用MTT法，透射电镜，比色法以及流式细胞术检测DBDCT对HL02肝细胞的抑制活性，细胞形态变化，胞外LDH含量，细胞凋亡、周期以及胞内ROS含量，初步探讨DBDCT对HL02细胞的毒性作用及其机制。（4）采用2-DE-TOF-TOF-MS 对

DBDCT处理前后HL02细胞总蛋白表达谱进行分析，鉴定，并采用比色法、Western blot和RT-PCR方法对差异蛋白的功能及其表达进行验证。（5）采用Western blot 和RT-PCR方法对差异蛋白Trx1, PARK7介导的氧化应激通路下游因子ASK1, JNK和P38进行检测；同时采用抗氧化剂乙酰-L-半胱氨酸(NAC)与DBDCT体外共同孵育，检测细胞存活率，ROS含量及其上述因子的蛋白变化水平。

**结果：**（1）大鼠腹腔注射DBDCT 2.3、3.2、4.5 mg/kg后，动物体重逐渐增加，

且随着给药次数的增加，动物出现不同程度的腹水现象，自发活动减少，嗜睡，高剂量组部分动物死亡；肝脏系数随着给药浓度的增加逐渐减少；DBDCT中高剂量染毒组AST, AKP和ACP水平明显升高，而ALT水平随着给药剂量的增

加逐渐降低；病理切片可见DBDCT中剂量组有散发肝细胞嗜酸性变，核固缩，高剂量组被膜增生，部分肝细胞嗜酸性变，核固缩；原子吸收结果显示锡在大鼠肝脏形成一定的蓄积，且呈现明显的量效关系。（2）采用2-DE-TOF-TOF-MS共分析并鉴定出6 个膜蛋白和10 个核蛋白，包括甘油醛-3-磷酸脱氢酶

（RGD1565368），磷脂酰乙醇胺凝结蛋白(Pebp1)，醋酸盐水解酶1(Iah1)，S-腺苷甲硫氨酸合酶(Mat1a)，谷氨酸脱氢酶1(Glud1)，翻译起始因子5A-1(Eif5a)，腺苷酸激酶2(KAD2)，蛋白质二硫化物异构酶A3(PDIA3)，丁二酸脱氢酶(DHSA)，乙醛脱氢酶(ALDH2)，谷胱甘肽S-转移酶(GSTM2)，热休克蛋白(HS90B)，二甲基甘氨酸脱氢酶(M2GD)，4-羟苯（基）丙酮酸双（加）氧酶(HPPD)，鸟氨酸转氨酶

（OAT）。上述差异蛋白主要参与氧化还原/氧化应激，线粒体呼吸链电子传递，酶代谢以及氨基酸合成等生命过程。（3）体外肝毒性研究结果显示DBDCT对HL02细胞的IC50值为5.77μM，且细胞固缩变圆，结构模糊，核膜破裂，胞外LDH水平明显升高。流式细胞术检测结果显示DBDCT染毒组细胞出现不同程度的凋亡与坏死，G2/M期发生阻滞，且胞内ROS含量逐渐升高。根据上述结果初步推测DBDCT的细胞肝毒性与细胞凋亡，周期阻滞及其氧化应激有关。（4）通过2-DE-TOF-TOF-MS对DBDCT作用前后HL02肝细胞总蛋白分析鉴定共得到9个差异蛋白，硫氧还蛋白(Trx1)，核苷酸结合蛋白(HINT1)，蛋白DJ1(PARK7)，细胞色素C 氧化酶亚型5A(COX5A)，半乳糖凝集素-1(Gal-1)，过氧化物酶

2(PRDX2)，过氧化物歧化酶(SODM)，3-羟酰辅酶A脱氢酶2(HCD2), NADH脱氢酶(NDUS8)，且Western blot和RT-PCR对差异蛋白Trx1和PARK7的验证结果与2-DE结果一致。鉴定的差异蛋白主要参与细胞的氧化还原/氧化应激，线粒体相关功能，细胞凋亡、增殖与分化以及微管的调节等过程，其中氧化应激反应占据重要地位。（5）由Trx1介导的氧化应激通路研究显示DBDCT干预细胞后，Trx1、DJ1、ASK1的蛋白表达和mRNA表达水平均升高，JNK和P38发生了蛋白磷酸化修饰，且呈现明显的时效与量效关系。N-乙酰-L-半胱氨酸

（NAC）与DBDCT共同孵育细胞后，ROS表达水平明显下降，而细胞存活率上升，

Trx1, DJ1蛋白的表达较DBDCT组降低，且JNK和P38的磷酸化水平也明显

下降。其可能的作用机制为DBDCT诱导细胞自由基水平升高，使得Trx1蛋白表达升高以抵抗氧化应激作用，此时的Trx1逐渐失去了与ASK1的结合能力，使得ASK1游离；同时作为氧化应激的伴侣蛋白，DJ1也被激活并与死亡蛋白

Daxx结合，进而抑制Daxx与ASK1的结合，使得游离的ASK1表达升高，激活MAPK通路中的JNK和P38，最终导致细胞凋亡与坏死。

**结论：**（1）体内外研究证明，DBDCT可引起明显的肝毒性。（2）氧化应激反应

在毒性作用中占据重要地位，且主要通过升高胞内自由基水平，激活由Trx1介导的氧化应激通路来实现的。（3）抗氧化剂NAC可通过降低胞内ROS水平，进而影响Trx1介导的氧化应激通路以抵抗DBDCT引起的肝毒性。（4）Trx1蛋白可作为DBDCT引发肝毒性的早期监测指标。

**关键词：**二-(4-氯苯甲酰异羟肟酸) 二正丁基合锡（DBDCT）；蛋白质组学；氧化应激；活性氧 （ROS）；硫氧还蛋白； 1(Trx1)； N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)

**Investigation on proteomics and Trx1-mediated oxidative stress of DBDCT-induced hepatotoxicity**

**Abstract**

**Objective:** To investigate di-*n*-butyl-di-(4-chlorobenzohydroxamato) tin (IV) (DBDCT) induced hepatotoxic mechanism using proteomics methods. To study the differentially expressed protein-Trx1 mediated oxidative stress signaling pathway. To search the potential biomarkers for the early diagnosis of hepatotoxicity.

**Methods:** (1) SD rats were treated with DBDCT intraperitoneally, and the body weight, liver weight ratio, plasma biochemistry, liver histopathology and total Sn were recorded and determined. (2) 2-DE-TOF-TOF-MS was performed to analyze and identify the differentially expressed proteins between control and DBDCT-treated groups *in vivo*. (3) Cytotoxicities of DBDCT to HL-02 cells were assessed using MTT method. The morphology was examined under transmission electron microscope. The extracellular level of LDH was determined using colorimetric method. The cell apoptosis, cell circles and the intracellular level of ROS were detected by flow cytometrye. (4) The total protein of HL02 cell line was separated by 2-DE, and the differentially expressed proteins between DBDCT-treated and untreated groups were identified by MALDI-TOF-TOF-MS. Meanwhile, the expression and function of two identified proteins were verified by Western blot and RT-PCR methods. (5) The expression of ASK1, JNK and P38, the downstream factors of Trx1-medited oxidative stress signaling pathway, were determined in DBDCT-treated group using Western blot and RT-PCR methods. The cell viability, the level of ROS and the expression of above factors were detected after the treatment of antioxidant NAC and DBDCT. **Results:** (1) The body weight was increased followed with ascites, lethargy and decreased spontaneous activity in DBDCT treated groups, and several animals were died in high-dose group. The liver weight ratio was decreased in DBDCT-treated

Groups with an obvious does-effect relationship. The levels of AST, AKP and ACP

Were increased significantly in middle and high-dose treated groups. However, the

ALT level was decreased. The liver cells eosinophilic change and karyopyknosis were observed in middle and high-dose treated groups. The atomic absorption results showed that there was a certain accumulation of tin in rat liver and observed in a dose dependent manner. (2) Sixteen proteins were indentified according to the 2-DE-TOF-TOF-MS, including glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (RGD1565368). Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 (Pebp1), Isoamyl acetate-hydrolyzing esterase 1 homolog (Iah1), S-adenosylmethionine synthase isoform type-1 (Mat1a), Glutamate dehydrogenase 1 (Glud1), Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 (Eif5a), Isoform 2 of Adenylate kinase 2 (KAD2), Protein disulfide-isomerase A3 (PDIA3), Succinate dehydrogenase (DHSA), Aldehyde dehydrogenase (ALDH2), Glutathione S-transferase Mu 2 (GSTM2), Heat shock protein HSP 90-beta (HS90B), Dimethylglycine dehydrogenase (M2GD), 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD), Ornithine aminotransferase (OAT). The identified proteins were participated in the process of oxidoreduction/oxidative stress, electronical transmission of mitochondrial respiratory chain, enzymatic metabolism and synthesis of amino acid. (3) The IC50 value of DBDCT to HL-7702 cells was 5.77μM at 24h. The morphology showed that the cell contour became blurred gradually, the nuclear membrane was fractured followed with the high expression of extracellular LDH in DBDCT-treated group. Compared with the control group, DBDCT could obvious increase the cell apoptosis, the release of ROS and could induce the cycle arrest. The results indicated that cell apoptosis, oxidative stress and cycle arrest might be the major hepatotoxic mechanism. (4) Nine proteins were indentified according to the 2-DE-TOF-TOF-MS *in vitro*, including Thioredoxin 1 (Trx1), Histidine triad nucleotide-binding protein 1 (HINT1), Protein DJ-1 (PARK7), Cytochrome c oxidase subunit 5A (COX5A), Galectin-1 (Gal-1), Peroxiredoxin-2 (PRDX2), Superoxide di (SODM), Isoform 1 of 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2 (HCD2), and NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8 (NDUS8). The expression of Trx1 and PARK7 were checked by Western blot and RT-PCR methods to gain the identical results with 2-DE. The identified proteins were participated in the process of oxidoreduction/oxidative stress, electronical

Transmission of mitochondrial respiratory chain, regulation of microtubule, cell apoptosis, proliferation and differentiation. (5) The study on Trx1-mediated oxidative stress pathway showed that the expression of Trx1, DJ1, ASK1, JNK and P38 were increased significantly with an obvious dose and time dependent manner on both protein and mRNA levels. However, after the co-treated with NAC, the cell viability was increased followed with the decreased expression of ROS. Meanwhile, the levels of Trx1, DJ1, JNK and P38 were decreased significantly. According to the results, we presumed that oxidative stress was the major hepatotoxic mechanism. DBDCT could induce the high expression of free radical, then Trx1 was dissociated from ASK1 to resist the redundant free radical, regulated the JNK/P38 signaling pathway resulting in cell apoptosis. Meanwhile, as a chaperonin of oxidative stress, DJ1 was also high expressed to bind with Daxx which was integrated with ASK1 in normal cells. Therefore, ASK1 was liberated to activate the JNK/P38 signaling pathway.

**Conclusions:** (1) DBDCT presented obvious hepatotoxicity *in vivo* and *in vitro*. (2) DBDCT could evoke the high expression of ROS to activate Trx1-mediated oxidative stress signaling pathway to result in the cell apoptosis and necrosis. Therefore, oxidative stress played an important role in DBDCT-induced hepatotoxicity. (3) Antioxidant NAC could decrease the ROS level to intercept Trx1-mediated oxidative stress signaling pathway to resist DBDCT-induced hepatotoxiciy. (4) Trx1 might be a potential biomarker for the early diagnosis of hepatotoxicity induced by DBDCT.

**Keywords:** di-*n*-butyl-di-(4-chlorobenzohydroxamato) tin (IV) (DBDCT); Proteomics; Oxidative stress; Active oxygen(ROS); Thioredoxin 1(Trx1); N-acetyl-L-cysteine(NAC)

前**言**

有机锡类化合物广泛存在于环境中，且应用于工业、农业、化工、交通、卫生等领域中[1,2,3]，如二氯二丁基锡可用作聚氯乙烯(PVP)塑料稳定剂和聚氨酯泡沫塑料的催化剂，三烷基锡具有杀菌作用，三丁基锡常用作船只的防污材料[4]，氟化三丁基锡、三苯基醋酸锡在农业上用作杀真菌剂，氯化三乙基锡在工业上用作电缆、油漆、造纸、木材等的防腐剂。然而该类化合物可引起机体严重的毒性作用[5-8]。有机锡化合物可通过呼吸道、消化道和皮肤粘膜进入机体并分布到血液、肝脏，肾、脾、心、脑，造成机体一系列肝胆系统、神经系统的损害。有些有机锡化合物还会可引起细胞免疫、体液免疫及非特异性宿主防御反应缺陷。已有研究报道称二烷基锡主要损害肝胆系统，并对神经系统有不良影响[9]；三丁基锡可降低细胞色素P450 芳香酶的活性而对人体性激素的代谢产生影响

[10-13]。因此，肝脏已成为有机锡毒理学研究领域的一个重要毒性靶器官，研究

该类化合物的肝毒性作用机制及其毒性靶蛋白为检测和预防有机锡中毒具有重要意义。

传统的肝毒性研究主要采用体内与体外的评价体系，即血清酶学指标的测定，肝功能的检测以及组织病理学检验等方法来评价化合物对动物水平和细胞水平的毒性强度，并研究其毒性机理[14-16]。但其无法系统的说明化合物肝毒性引起的体内与体外的整体变化，且对于毒性作用机制完全未知的化合物，传统的研究方法无法系统的说明。

随着人类基因组计划的完成，生命科学研究从揭示生命的全套遗传信息转移到分子整体水平对功能的研究上，生命科学已进入了后基因组时代。蛋白质组学研究成为目前后基因组时代的热点领域之一，其核心是对组织或细胞内蛋白质进行大规模的分离和分析，系统识别一个细胞或组织中表达的每一个蛋白质及其相互作用[17-19]。蛋白质组学已应用到许多领域，并为揭示生命活动规律、探讨重大疾病发病机制、疾病的诊断和防治、环境与健康的关系、新药开发等

提供了重要的理论基础[20-23]。该方法通过双向凝胶电泳-质谱(2-DE-MS)、液相色谱-串联质谱(LC-MS-MS)和蛋白质阵列(protein arrays)等技术[24-27]比较特定的细胞、组织或器官在化合物作用前后的蛋白质表达谱的变化，可在短时间内筛选出与化合物产生毒性相关的特征性表达蛋白。蛋白质组学技术还可以初步确定毒物与蛋白质之间，蛋白质与蛋白质之间的相互作用以预测同类型毒物的毒性作用以及作用机制。将蛋白质组学技术结合其他研究方法可确定毒性靶蛋白及其毒性作用机制，同时构建的毒理蛋白质组数据库为鉴定、区分和早期预测化合物的潜在肝脏毒性具有重要意义。

化合物[二-(4-氯苯甲酰异羟肟酸)二正丁基合锡] (DBDCT)是由课题组自主创新设计合成的新型有机锡化合物。经体内、体外实验证明，DBDCT在具有较好生物活性的同时，表现出明显的肝脏毒性作用。小鼠尾静脉注射DBDCT，可见肝脏有细小黄色/灰白色斑点。病理组织学检查发现多发灶状/片状肝细胞坏死，坏死区域内有时可见黄绿色物质沉积。目前尚没有对有机锡类化合物肝毒性作用的系统研究报道，因此研究DBDCT的肝毒性作用机制将为有机锡类化合物的肝毒性研究提供重要研究价值。



DBDCT的分子结构式

DBDCT的基本性质

•分子式：C22H28N2O4Cl2Sn

•分子量：575.4(M+l)

•外观：白色固体

•熔点：178-180℃

因此，本课题分别选择SD大鼠和HL-02正常肝细胞，在体内和体外水平对

DBDCT的肝毒性进行研究，继而通过蛋白质组学的研究方法，比较DBDCT作用前后，肝脏和肝细胞的蛋白质表达差异，并根据蛋白质组学研究所获得的信息，对DBDCT可能的毒性作用机制进行验证，从蛋白质水平上了解其肝毒性的作用机制，为该类化合物的毒性预防与检测提供一定的参考价值。

# **第一章** **DBDCT**腹腔注射致大鼠肝脏毒性研究

## 第一节 、**DBDCT**腹腔注射致大鼠肝脏损伤模型的建立

血液生化指标检测和组织病理学观察是传统的毒理学研究中常用的毒性检测方法[14-16]。本课题选择成年SD大鼠，雌雄各半，多次腹腔注射给药，观察并记录动物的进食情况、外观体征、行为活动及死亡情况等，并检测大鼠的血浆肝功能生化指标及肝脏组织病理学的变化，以确证DBDCT对大鼠肝脏的毒性作用。

### 1、 材料和仪器：

### **1.1** 主要试剂：

DBDCT由本实验室合成，且结构经过确证，临用前用丙二醇（90%）/乙二胺（2%）/生理盐水（8%）配置成不同浓度，过滤。谷丙转氨酶（ALT）、谷草转氨酶（AST）、酸性磷酸酶（ACP）和碱性磷酸酶（AKP）检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

### **1.2** 主要仪器：

BS124S精密电子天平：德国Sartorius公司

双光束紫外分光光度计TU­1901：北京通用仪器有限责任公司原子荧光分析检测仪AF-610A：北京瑞利分析仪器有限公司超低温冰箱：Forma -86℃ULT Freezer, Thermo scientific公司低温离心机：上海安亭仪器有限公司

### **1.3** 实验动物：

SD大鼠，雌雄各半，SPF级，体重180g-220g，购自北京维通利华实验动物技术有限公司，动物合格证号：SCXX（京）2002-0003. GLP动物房饲养，自由进食水，饲养室温度21-25℃，相对湿度30%-70%, 12h光照/12h黑暗周

期。

### 2、 实验方法：

### **2.1** 实验设计：

SD大鼠24只，雌雄各半，体重180-220 g。按体重随机分为4组，对照组、低剂量组、中剂量组和高剂量组各6只。分别腹腔注射给予空白溶剂、DBDCT注射液2.3 mg/kg、3.2 mg/kg和4.5 mg/kg，隔两日给药一次，共计给药十次。给药结束后次日分别取血和肝脏用于血浆生化指标分析，部分肝脏组织做病理学检查和原子吸收测定，另一部分肝脏标本于-80℃保存，用于蛋白质提取以备蛋白质组学的研究。

### **2.2** 一般观察：

给药期间每日称量动物体重，观察动物的进食情况、外观体征、行为活动

及死亡情况等。

**2.3取材：**

末次给药结束后次日取材，取材前动物禁食12 h。经戊巴比妥钠（50 mg/kg）腹腔注射麻醉，腹主动脉取血，置于1 %肝素抗凝管中，充分混合。3000 rpm/min离心20 min，收集血清，用于生化指标的检测[28]。采血后，立即摘取肝脏，称重。

### **2.4** 血浆生化指标检测：

分别用AST、ALT、ACP和AKP检测试剂盒，采用紫外分光光度法测定各

组血浆中的含量[29]。

### **2.5** 肝脏组织病理学检查：

肝脏称重后，取部分肝组织，于10 %中性福尔马林缓冲液固定，固定后进行组织块修切、石蜡包埋、常规切片、HE染色、酒精梯度脱透明、封片，光学显微镜下观察[30]。

### **2.6** 原子吸收测定锡在大鼠体内的蓄积：

采用硝酸高氯酸法，将肝组织消化过夜。采用还原剂硼氢化钾，用原子荧光光度计测定锡在大鼠肝脏中的含量[31,32]。测定条件：负高压：275V；HCl主阴极电流：80mA；HCl辅助阴极电流：0 mA；载气流量：800 mL/min；原子化器高度：7 mm；原子化器温度：室温；采样泵速：100 r/min；采样时间：8 Sec；注入泵速：100 r/min；注入时间：19 Sec；分析信号：峰面积；读数时间：15.0 Sec；延时时间：2.0 Sec。

### **2.7** 数据处理：

数据以χ±s表示，并进行T检验分析，*P*<0.05具有显著性差异。

3、结果：

### **3.1** **DBDCT**对大鼠一般状态的影响

给药期间，对照组大鼠状态良好，生长正常，动物体重逐渐增加。DBDCT各剂量组动物体重也随着给药次数的增加而增加，且与对照组相比无显著性差异。给药4次后，DBDCT组动物出现不同程度的腹水现象，且自发活动逐渐减少，嗜睡。随着给药次数的继续增加，动物逐渐出现腹部深呼吸，尿粪失禁等现象，在给药第7次时，高剂量组部分动物死亡。肝脏系数随着给药浓度的增加逐渐减少。体重变化见表1-1。

表1-1 DBDCT对大鼠体重及肝脏系数的影响（χ±s，n=6）

| 剂量 | 第 1 次 | 第 3 次 | 第 5 次 | 第 7 次 | 第 9 次 | 肝脏系数 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| （mg/kg） | (g) | (g) | (g) | (g) | (g) |  |
| 溶 剂 | 201.5±10.4 | 220.1±10.0 | 242.9±8.9 | 268.5±12.4 | 286.6±12.7 | 38.5±2.17 |
| 2.3 mg/kg | 210.5±12.7 | 241.5±16.7 | 267.5±19.1 | 297.6±5.6 | 302.0±6.85 | 39.2±2.21 |
| 3.2 mg/kg | 209.5±8.7 | 229.5±12.5 | 250.5±10.3 | 286.5±16.3 | 304.1±18.9 | 37.4±1.62 |
| 4.5 mg/kg | 209.3±8.2 | 224.1±12.3 | 247.5±7.15 | 277.1±13.3 | 290.7±16.4 | 35.9±3.34 |

### **3.2** **DBDCT**对大鼠血浆生化指标的影响

与对照组相比，给药组AST, AKP和ACP表达水平明显升高，且DBDCT 3.2

mg/kg和4.5 mg/kg组与对照组相比具有显著性差异（*P*<0.05），而ALT水平则

随着给药剂量的增加逐渐降低。研究结果表明，DBDCT可引起血浆生化学指标的变化，且当DBDCT浓度为3.2 mg/kg时即可引起肝脏的明显毒性效应。血浆生化指标变化见表1-2。

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 2.3 mg/kg | 179.9±3.0 | 127.6±3.0 | 3.970±0.5 | 77.6±1.7 |
| 3.2 mg/kg | 204.5±7.3\* | 117.5±4.1 | 10.75±2.7\*\* | 123.8±13.9\* |
| 4.5 mg/kg | 212.4±10.3\* | 111.7±5.0\* | 5.250±1.1\* | 88.9±7.1 |

表1-2 DBDCT对大鼠血浆生化指标的影响（χ±s，n=6）

剂量（mg/kg）AST(U/L) ALT(U/L) AKP(U/gpro) ACP(U/gpro)

溶剂 162.4±7.2 128.9±3.0 2.371±0.8 70.5±5.0

注：AST为谷草转氨酶；ALT为谷丙转氨酶；AKP为碱性磷酸酶；ACP为酸性磷酸酶。

与对照组相比\**P*<0.05; \* \**P*<0.01

### **3.3** **DBDCT**对大鼠肝脏组织病理的影响

对照组大鼠肝脏各叶大小，位置均正常，且肝脏色泽均一。DBDCT 2.3 mg/kg

组肝脏外观未见明显的改变。3.2 mg/kg组大鼠肝脏组织缩小，且肝叶边缘变钝。

4.5 mg/kg组大鼠肝脏组织边缘变钝，肝脏各叶之间有不同程度的粘连。肝脏组织切片HE染色后，光镜观察可见DBDCT 2.3 mg/kg组肝组织无明显病理学改变(图1-1A), 3.2 mg/kg组有散发肝细胞嗜酸性变，核固缩（见图1-1B），4.5 mg/kg组肝组织被膜增生，部分肝细胞嗜酸性变，核固缩（见图1-1C）。



图1-1 DBDCT对大鼠肝脏组织病理的影响。（A）2.3 mg/kg DBDCT组：无明显病理学改变。

（B）3.2 mg/kg DBDCT组：散发肝细胞嗜酸性变，核固缩。（C）4.5 mg/kg DBDCT组：被

膜增生，部分肝细胞嗜酸性变，核固缩。

### **3.4** 锡（**Sn**）在大鼠肝脏的蓄积

在上述原子吸收检测条件下，标准品线性关系良好，故样本可在该条件下

进行检测。样本检测结果（见图1-2）显示对照组未检测出锡含量，DBDCT组则随着给药剂量的增加，大鼠肝脏锡的含量逐渐上升，DBDCT各组与对照组相比具有显著性差异（*P*<0.01）。该结果说明多次给药后，锡在大鼠肝脏形成一定的蓄积，且呈现明显的量效关系。



图1-2 原子吸收检测锡在大鼠肝脏的蓄积。与对照组相比\* *P*<0.05，\* \**P*<0.01。

### 4、 讨论：

肝脏是人体内以代谢功能为主的一个重要器官，参与外来物质的代谢与解毒等过程，是机体内多种酶与信息调控分子发挥调控作用的场所。大多数药物在肝脏发生氧化、还原、水解与聚合等多种代谢过程，从而在全身发挥各种效应。因此，肝脏是最容易发生毒性损伤的器官[33-36]。

本实验分别选择2.3 mg/kg, 3.2 mg/kg和4.5 mg/kg DBDCT注射液大鼠腹腔注射给药，共计给药10次，观察DBDCT对大鼠肝脏的毒性效应。结果显示，

2.3mg/kg组肝脏毒性效应不明显，病理组织切片显示肝脏无明显变化；当DBDCT

浓度上升至3.2 mg/kg时，动物呈现出明显的肝脏毒性效应，即肝脏体积缩小，

肝叶边缘变钝；当给药浓度提高至4.5 mg/kg时，有部分动物死亡，且肝脏各叶

出现严重的粘连，病理组织切片显示其被膜增生，肝细胞嗜酸性变，核固缩。

肝脏酶能反映出肝脏的功能状况，是目前临床最常用的检测方法。为了进

## 一 步证明肝脏的毒性效应，本实验分别测定了各组血浆AST，ALT，AKP和ACP的含量，结果显示DBDCT组各项指标均发生了一定程度的变化，其中3.2 mg/kg和4.5 mg/kg组与对照组均有显著性差异。该结果进一步证明当DBDCT浓度为

3.2 mg/kg时，即可引起大鼠明显的肝脏毒性。

为了进一步确证引起肝脏毒性的来源，本实验中设计了原子吸收测定大鼠肝脏锡含量的实验，结果显示对照组检测不到锡，DBDCT组锡含量随着染毒浓度的升高而明显升高，该结果进一步证明大鼠的肝毒性是由化合物DBDCT引起的，而非其自身的个体差异。

综上所述，当DBDCT浓度为3.2 mg/kg时，锡在体内产生一定的蓄积，即

可引起大鼠明显的肝毒性，即肝脏组织缩小，且肝叶边缘变钝，并伴随着血浆

AST，ALT，AKP和ACP各项指标的明显变化。其肝毒性的病理学特征为肝细胞嗜酸性变，核固缩。

## 第二节 、**DBDCT**腹腔注射致大鼠肝脏损伤的

##### 蛋白质组学研究

随着后基因组时代的逐步形成，蛋白质组学也得到了迅速发展。该技术通过系统的研究蛋白质的表达，寻找疾病、药物干预下蛋白质的变化，进而寻找差异蛋白，通过研究蛋白质的功能、蛋白与蛋白之间、蛋白与生物大分子之间的相互作用等，揭示疾病发生的原因与药物作用机制，并为疾病早期诊断与治疗，新药研究以及毒理学研究提供靶点依据[20-23]。前一节研究已证明DBDCT可引起大鼠肝脏的毒性效应，且呈现一定的量效关系。本节将采用双向凝胶电泳-质谱(2-DE-MS)技术，对染毒（对照组）和未染毒组（DBDCT组）大鼠肝脏的膜蛋白与核蛋白进行分离与鉴定，以阐明DBDCT引起机体肝毒性的整体变化水平。

1、材料和仪器：

### **1.1** 主要试剂：

尿素，硫脲，CHAPS，DTT，TEMED，SDS，丙烯酰胺，甲叉双丙烯酰胺，

Tris，甘氨酸，过硫酸铵，碘乙酰胺，考马斯亮蓝R250，矿物油，PMSF均购自北京索来宝试剂公司。IPG(pH3-10NL, 17cm)，Bio-lyte 两性电解质，低熔点琼脂糖封胶液均购自美国Bio-Rad公司。Prestained Protein Marker购自Bio-labs.2-D Quant kit购自Bio-Rad公司。

### **1.2** 主要仪器：

低温离心机：上海安亭仪器有限公司超声波细胞破碎仪：美国索尼电子公司

Protean IEF Cell型等点聚焦仪及其附件：美国Bio-Rad公司

ProteanⅡCell型垂直电泳槽及其附件：美国Bio-Rad公司

恒温循环泵：德国

低温超高速离心机：HITACHI 70P-72，日本

漩涡混悬器QL-901 Vortex：海门市其林贝尔仪器制造有限公司Heal Force HF super pw超纯水仪：力康生物医疗科技集团

2、实验方法：

### **2.1** 主要溶液的配制[37, 38]：

1）细胞与组织裂解液配方：

试剂 终浓度 质量或体积

Urea 7 M 4.24 g

Thiourea 2 M 1.52 g

CHAPS 4 % 0.4 g

DTT 65 mM 0.098 g

PMSF 1 %

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| DDW  2) 水化上样液的配方：  试剂 | 终浓度 | 定容至 10 mL  质量或体积 |
| Urea | 7 M | 4.24 g |
| Thiourea | 2 M | 1.52 g |
| CHAPS | 4 % | 0.4 g |
| DTT | 65 mM | 0.098 g |
| Bio-lyte (3-10) | 1 % | 100 μL |
| DDW |  | 定容至 10 mL |
| 3) 胶条平衡液母液： |  |  |
| 试剂 | 终浓度 | 质量或体积 |
| Urea | 6 M | 36 g |
| SDS | 2 % | 2 g |
| Tris-HCl (8.8) | 0.375 M | 25 mL |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 甘油 20 % |  | 20 mL |
| DDW |  | 定容至 100 mL |
| 4) 胶条平衡液Ⅰ：母液 | 10 mL |  |
| DTT  5) 胶条平衡液Ⅱ： 母液 | 0.2 g  10 mL |  |
| 碘乙酰胺 | 0.25 g |  |
| 6) 30%丙烯酰胺溶液： |  |  |
| 丙烯酰胺 | 29.2 g |  |
| Bis-丙烯酰胺 | 0.8 g |  |
| DDW | 100 mL |  |

滤纸过滤后，棕色瓶4℃保存。

7) 5×Tris-Gly电泳缓冲液：

Tris 15.15 g

Gly 72.05 g

SDS 5 g

DDW 至 1 L

8）考马斯亮蓝染液：

CBB-R250 2.5 g

乙醇 500 mL

乙酸 50 mL

DDW 450 mL

9）考马斯亮蓝脱色液：

乙酸70 mL

乙醇250 mL

DDW 680 mL

10）12%聚丙烯酰胺凝胶（分离胶）：

DDW 13.2 ml

30%丙烯酰胺溶液16 ml

1.5 mol/L Tris(pH8.8) 10 ml

10% SDS 0.4 ml

10% APS 0.4 ml

TEMED 0.016 ml

### **2.2** 蛋白提取与定量：

2.2.1组织蛋白的分步提取：

1）大鼠肝脏组织样本收集：SD大鼠12只，雌雄各半，体重180 g-220 g。按体重随机分为2组，对照组和DBDCT组各6只。分别腹腔注射给予空白溶剂和4.5 mg/kg DBDCT注射液，隔两日给药一次，共计给药十次。给药结束后，次日取材，肝脏标本用于蛋白质组学研究。

2）肝脏膜蛋白提取：取1g肝脏组织，加入1 mL EDTA buffer，冰浴匀浆，于12000 rpm 4℃离心20 min，取上清液于65000 rpm 4℃离心60 min，收集上清，加入4倍量体积的丙酮，于-20℃蛋白沉淀2 h, 13000 rpm 4℃离心5 min，弃去上清，沉淀溶于组织裂解液中（Urea: 7 M; Thiourea: 2 M; CHAPS; 4 %; DTT: 65 mM; PMSF: 1 %），冰浴超声破碎，超声10s，冰浴放置10s，共计6个循环，于12000 rpm，4℃离心10 min，收集上清，分装后置-80℃冰箱储存。

3）肝脏核蛋白提取：取1g肝脏组织，加入1 mL EDTA buffer，冰浴匀浆，于12000 rpm 4℃离心20 min，收集沉淀，超声10s，冰浴放置10s，共计6个循环，于12000 rpm 4 ℃离心20 min，收集上清液，加入4倍量体积的丙酮，于

-20℃蛋白沉淀2 h, 13000 rpm 4℃离心5 min，弃去上清，沉淀溶于组织裂解液中（Urea: 7 M; Thiourea: 2 M; CHAPS; 4 %; DTT: 65 mM; PMSF: 1 %）中，冰浴超声破碎60s（超声10s，冰浴放置10s），10000 rpm，4℃离心10 min，收集上清，分装后置-80℃冰箱储存。

2.2.2蛋白定量：

采用2D-Quant kit试剂盒，以牛血清白蛋白BSA为标准品，按照试剂盒操作

说明书，在480 nm处读取吸光度值，绘制标准曲线，计算样品蛋白浓度。

**2.3 双向凝胶电泳**[39-41]**：**

2.3.1第一向等电聚焦电泳：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 步骤 | 电压（V） | 升压类型 | 时间/伏小时 |
| 水化 | 50 | Rapid | 14h |
| S1 | 250 | Rapid | 30min |
| S2 | 500 | liner | 30min |
| S3 | 1000 | liner | 1h |
| S4 | 10000 | liner | 5h |
| S5 | 10000 | Rapid | 80000Vh |
| S6 | 500 | Rapid | 任意 |

取新鲜配制的水化上样液240μL，加入正常组/DBDCT组蛋白样品1.5 mg，用DDW去离子水调整上样体积至350μL，充分混匀，室温放置1h。取出冻存的IPG胶条（pH3-10NL, 17 cm），室温放置10 min后，将350μL样品溶液沿聚焦盘自左而右线性加入上述样品，用镊子剥去IPG胶条的保护层，将胶面向下置于聚焦盘中的样品溶液上，注意避免在胶条与样品之间产生气泡，将胶条的正极放于聚焦盘的正极位置。室温放置30 min后，在每根胶条上加入3 mL矿物油。将聚焦盘置于Protean IEF Cell内开始等电聚焦。设置IEF程序，极限电流为50μA/gel。

2.3.2胶条的平衡：

聚焦结束后取出胶条，用滤纸吸去胶条上的矿物油，将胶条转移至水化盘内，

先加入5 mL胶条平衡液Ⅰ，于摇床缓慢摇动15 min。待第一次平衡后，取出胶

条，用滤纸吸去多余的平衡液，将胶条转移至新的水化盘槽内，加入5 mL胶条

平衡液Ⅱ，于摇床缓慢摇动15 min。待平衡结束后，用滤纸吸去多余的平衡液，

将胶条浸于1×电泳缓冲液中，准备进行第二向SDS-PAGE。

2.3.3第二向SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳：

配制12 %的SDS-PAGE分离胶，待凝胶凝固后，将平衡好的IPG胶条沿着玻璃板方向放至SDS-PAGE凝胶上方，并使其与凝胶完全接触，在上方加入低熔点琼脂糖凝胶/溴酚蓝溶液，并赶走胶条与胶面之间的气泡。待琼脂糖凝固后，

将凝胶转移至ProteanⅡCell型垂直电泳槽内，进行电泳。先以15 mA/gel进行电泳，待样品浓缩为一条线时，将电流调至25 mA/gel，待溴酚蓝指示剂到达边缘时结束电泳。

2.3.4凝胶的染色与脱色：

待电泳结束后，将凝胶取出置于考马斯亮蓝CBB染色液中，于水平摇床染色40 min，弃去染色液，加入考马斯亮蓝CBB脱色液，置于水平摇床脱色，直至蛋白点清晰可见。

### **2.4** 凝胶的扫描与酶切：

脱色后的凝胶进行图像扫描，并保存图像。将凝胶用透明塑料纸包好，加入

冻胶保存液，置于4℃保存。

经过对照组（Control）与染毒组（DBDCT）对比，选择差异蛋白明显的点从胶上切下，用解剖刀将凝胶蛋白点切成1-2 mm2大小的胶片放入EP管中，加入脱色液100μL浸泡，振荡20 min，弃去溶液，重复1-2次直至蓝色褪尽，冰

冻干燥20 min后，再加入15-20μL酶液，置于4℃放置30 min，待酶液完全被吸收后，补充酶解缓冲液(25 mM NH4HCO3) 15-20μL，将胶浸没，37℃保温15-16

h. 加5 %TFA 100μL，40℃水浴加热30 min，超声3 min，水浴30 min. 将上述

提取液吸到另一干净的管中，冰冻干燥，向胶块中加入50 %乙腈/2.5 %TFA 100

μL，30℃保温30 min，超声3 min，再保温30 min。合并提取液，氮气吹干乙腈，冰冻干燥。向冻干肽段中加入2~10μL0.1 %TFA溶液混匀。取0.5μL ~0.8μL样品点靶。待干，再点0.5μL基质，待质谱鉴定。

### **2.5** 差异蛋白的**MALDI-TOF-TOF-MS**鉴定：

将制备好的点样板放入MALDI-TOF-TOF-MS质谱仪中进行分析。采用反射模式，正离子谱测定，离子源加速电压为20000 V，反射电压比为1.12，N2激光波长337 nm，脉冲宽度为3 ns，离子延迟抽提100 nsec，质谱信号单次扫描累加，质谱使用胰蛋白质酶自切降解峰，作为内部标准校正，获得肽质量指纹图。

### **2.6** 数据库检索差异蛋白：

MS和MS/MS结果联合搜库。在本地Mascot上，用北京蛋白质组中心发

展的自动搜索软件进行检索。peptide tolerance为0.2 Da, MS/MS tolerance为0.2

Da，可变修饰为甲酰化（carbamidomthylation, C），氧化（oxidation, M），最大

允许有1 个胰酶酶切位点未被切开。蛋白得分置信区间（Confidence interval,

C. I. %）大于95%作为判断依据。

### **2.7** 差异蛋白验证：谷胱甘肽**S**转移酶活性测定

依据谷胱甘肽S转移酶活性测定试剂盒说明书处理肝脏组织样本，并测定对

照组和给药组肝组织GST酶活力大小。

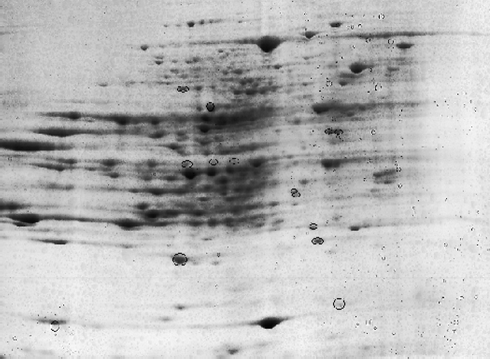
3、结果：

### **3.1** 肝组织细胞膜蛋白的双向电泳图谱分析：

本实验中提取了染毒（对照组）与未染毒（DBDCT）大鼠肝脏组织膜蛋白，采用双向凝胶电泳技术对各组蛋白进行了分离，且每个样本分别重复了2次。图1-3A、图1-3B分别为对照组（Control）和给药组(DBDCT)的蛋白表达图谱。通过两组图像对比，共找到13个差异蛋白，其中7个蛋白在DBDCT处理组表达下调，6个蛋白在DBDCT处理组表达表达上调。

pH10 pH3

MW



28

17

21

22

18

19 20

29

23

24

25

26

27

170kDa

（A）

5kDa



28

17

18

19

20

29

23

24

26

25

pH10 pH3

MW

170kD a

（B）

5kD a

图1-3 肝组织细胞膜蛋白的双向凝胶电泳图谱。（A）Control组（B）DBDCT 组

### **3.2** 肝脏组织细胞膜差异蛋白的质谱鉴定结果：

对上述比对得到的13个差异蛋白，采用MALDI-TOF-TOF-MS进行了质谱鉴定，以Mascot为搜索引擎，并结合2-DE相应蛋白的等电点、分子量、匹配片段的多少以及氨基酸序列的覆盖率进行蛋白鉴定，共鉴定出12个差异蛋白，包括DBDCT干预后的上调蛋白：甘油醛-3-磷酸脱氢酶类似物（RGD1565368），磷脂酰乙醇胺凝结蛋白（Pebp1），醋酸盐水解酶1(Iah1)；DBDCT干预后的下调蛋白：S-腺苷甲硫氨酸合酶（Mat1a），谷氨酸脱氢酶1（Glud1），翻译起始因子5A-1 (Eif5a)，谷胱甘肽S转移酶（GSTa）结果见表1-3。

表 1-3 大鼠肝脏组织细胞膜差异蛋白的表达信息

No.a

Acc.no b

Molecular

PI c

Sequence

Scroed

Protein name

Protein description

mass c

coverage

(%)c

29

17

IPI00191737

Alb albumin

Serum

68 686

6.09

285

Alb Serum albumin

18

IPI00554039

RGD1565368

35 760

8.44

21

138

glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like

19

IPI00554039

RGD1565368

35 760

8.44

20

280

glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like

20

IPI00554039

RGD1565368

35 760

8.44

30

137

glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like

21

IPI00201436

Mat1a

43 670

5.61

22

212

S-adenosylmethionine synthase isoform type-1

22

IPI00201436

Mat1a

43 670

5.61

23

101

S-adenosylmethionine synthase I soform

23

IPI00948363

Psme1 RCG23530

28 617

5.63

50

243

Psme1 RCG23530

25

IPI00230937

Pebp1

20 788

5.48

77

257

Phosphatidylethanolamine-binding protein 1

26

IPI00231150

Gsta3;Gsta2;Gsta1

25 972

8.98

26

107

Glutathione S-transferase

27

IPI00211216

Eif5a

16 821

5.08

59

85

Eukaryotic translation initiation factor 5A-1

28

IPI00324633

Glud1

61 377

8.05

30

97

Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial

29

IPI00421610

Iah1

27 986

5.63

20

77

Isoamyl acetate-hydrolyzing esterase 1 homolog

a Spot no. was defined according to its positions in 2-DE gels.

b Swiss-Prot accession number

c MW, molecular weight of the matched protein in kDa. pI, isoelectric point of the matched protein.

d For MALDI-TOF-MS, protein scores greater than 61 are signiﬁcant (p < 0.05).

### **3.3** 差异蛋白的质谱鉴定图谱

3.3.1蛋白点26谷胱甘肽S转移酶（GSTa）的质谱结果与检索结果：

（1）、蛋白点26的MALDI-TOF-MS肽指纹图谱（PMF），见图1-4。



图1-4 蛋白点26的MALDI-TOF-MS肽指纹图谱

（2）、蛋白点26的MASCOT检索结果，见表1-4，1-5：

表1-4 MASCOT检索参数

Database NCBInr

Enzyme Trypsin

Species HOMO

Peptide tol±0.2 Da

MS/MS tol±0.3 Da

表1-5 MASCOT检索结果

| Accession | Mass | Score | Description |
| --- | --- | --- | --- |
| IPI00231150 | 25972 | 107 | Glutathione S-transferase (Fragment) |
| IPI00211897 | 25331 | 79 | Glutathione S-transferase alpha-5 |
| IPI00231638 | 25591 | 75 | Glutathione S-transferase alpha-1 |
| IPI00395251 | 12431 | 74 | Glutathione transferase class alpha chain 10 (Fragment) |

结果显示，Glutathione S-transferase (Fragment)的分子量和pI值与2-DE胶上的位置相匹配，且得分远高于第二位的蛋白结果，故认为蛋白点26为Glutathione S-transferase (Fragment)。

3.3.2蛋白点25磷脂酰乙醇胺凝结蛋白（Pebp1）的质谱结果与检索结果：

（1）、蛋白点25的MALDI-TOF-MS肽指纹图谱（PMF），见图1-5。



图1-5 蛋白点25的MALDI-TOF-MS肽指纹图谱

（2）、蛋白点25的MASCOT检索结果，见表1-6，1-7：

表1-6 MASCOT检索参数

Database NCBInr

Enzyme Trypsin

Species HOMO

Peptide tol±0.2 Da

MS/MS tol±0.3 Da

表1-7 MASCOT检索结果

| Accession | Mass | Score | Description |
| --- | --- | --- | --- |
| IPI00230937 | 20788 | 257 | Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 |
| IPI00394636 | 15578 | 45 | Uncharacterized protein |
| IPI00213641 | 57270 | 43 | Cytochrome P450 3A18 |

结果显示，Phosphatidylethanolamine-binding protein 1的分子量和pI值与2-DE胶上的位置相匹配，且得分远高于第二位的蛋白结果，故认为蛋白点25为Phosphatidylethanolamine-binding protein 1.

### **3.4** 肝组织核蛋白双向电泳图谱分析：

采用双向电泳技术对染毒（对照组）与未染毒组（DBDCT组）大鼠肝脏核蛋白进行了分离，且每个样本分别重复了2次。图1-6A、图1-6B分别为对照组和给药组蛋白表达图谱。通过两组图像对比，共找到17个差异蛋白，其中10个蛋白在DBDCT处理组表达下调，7个蛋白在DBDCT处理组表达上调。

pH3 pH10

MW



31

32

34

33

35

41

42

43

36

37

38 40

39

170kDa

（A）

5kDa

pH3 pH10

MW



31

32

33

34

35

42

41

43

44

45

46

47

36

37

40

38

39

170kDa

（B）

5kDa

图1-6 肝组织细胞核蛋白的双向电泳图谱。（A）Control组（B）DBDCT 组

### **3.5** 肝脏组织细胞核差异蛋白的质谱鉴定结果：

对上述比对得到的17个差异蛋白，采用MALDI-TOF-TOF-MS进行了质谱鉴定，以Mascot为搜索引擎，并结合2-DE相应蛋白的等电点、分子量、匹配片段的多少以及氨基酸序列的覆盖率进行蛋白鉴定，共鉴定出10个差异蛋白，

DBDCT 干预后的上调蛋白：腺苷酸激酶2（KAD2），蛋白质二硫化物异构酶

A3（PDIA3），丁二酸脱氢酶（DHSA），乙醛脱氢酶（ALDH2）；DBDCT 干预后的下调蛋白：谷胱甘肽S-转移酶（GSTM2），热休克蛋白（HS90B），二甲基甘氨酸脱氢酶（M2GD），脂酰辅酶A脱氢酶（LOC100362392），4-羟苯（基）丙酮酸双（加）氧酶（HPPD），鸟氨酸转氨酶（OAT）。结果见表1-8。

表 1-8 大鼠肝脏组织细胞核差异蛋白的表达信息

No.a

Acc.no b

Molecular mass c

PI c

Sequence

Scroed

Protein name

Protein description

coverage

(%)c

32

IPI00411230

GSTM2

25 686

6.90

77

219

Glutathione S-transferase Mu 2

33

IPI00923141

KAD2

25 514

6.33

57

144

Isoform 2 of Adenylate kinase 2

36

IPI00324741

PDIA3

56 588

5.88

48

222

Protein disulfide-isomerase A3

37

IPI00471584

HS90B

83 229

4.97

28

98

Heat shock protein HSP 90-beta

38

IPI00207941

M2GD

95 987

6.91

25

136

Dimethylglycine dehydrogenase

39

IPI00957343

LOC1003623

92788

7.02

25

153

2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component

40

IPI00200659

DHSA

71 570

6.75

35

135

Succinate dehydrogenase

42

IPI00211507

HPPD

45 084

6.29

26

69

4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase

43

IPI00193279

OAT

48 302

6.53

26%

111

Ornithine aminotransferase

45

IPI00197770

ALDH2

56 453

6.63

26

132

Aldehyde dehydrogenase

a Spot no. was defined according to its positions in 2-DE gels.

b Swiss-Prot accession number

c MW, molecular weight of the matched protein in kDa. pI, isoelectric point of the matched protein.

d For MALDI-TOF-MS, protein scores greater than 61 are signiﬁcant (p < 0.05).

### **3.6** 肝组织谷胱甘肽**S**转移酶的活性

为了进一步验证双向凝胶电泳-质谱方法的可靠性与数据的真实性，本实验

选择差异蛋白谷胱甘肽S-转移酶（GSTM2, GSTa）为验证对象，测定肝组织

GST酶的活力。由2-DE图谱可见，GSTM2蛋白在对照组表达较高，而DBDCT给药组表达明显下调。同样，差异蛋白GSTa在DBDCT组表达较对照组表达低。活性测定结果同样显示给药组GST活力下降，且具有明显的量效关系，其结果与2-DE实验结果一致。结果见图1-7。该结果证明了2-DE研究方法用于DBDCT致肝组织毒性研究的可靠性。

40

30

(U /m gp ro t)

20

10

0

C L M H

（A）



（B）（C）

图1-7 谷胱甘肽S转移酶的活性与差异蛋白GST蛋白2DE局部放大图谱。（A）谷胱甘肽 S

转移酶的活性。C: 对照组；L: 2.3 mg/kg DBDCT；M: 3.2 mg/kg DBDCT；H: 4.5 mg/kg

DBDCT。（B）GSTM2蛋白2DE局部放大图谱。（C）GSTa蛋白2DE局部放大图谱。

4、讨论：

本研究结果显示，肝脏样本在上述蛋白提取与分离条件下，蛋白提取物分离效果较好，且样本重现性较好。经2-DE图像分析与质谱鉴定出共计22个差异蛋白，其中分布在细胞膜的差异蛋白共12个，分布在细胞核的差异蛋白共计

10个，且差异蛋白主要参与以下功能：①氧化还原/氧化应激：GSTA (谷胱甘肽转移酶)；GSTM2 (谷胱甘肽S-转移酶Mu 2)；Eif5a(翻译起始因子5A-1)；②线粒体呼吸链电子传递：；DHSA（丁二酸脱氢酶）；③酶代谢：KAD2 (腺苷酸激酶2)；ALDH2（乙醛脱氢酶）；④氨基酸合成：OAT (鸟氨酸转氨酶)；PDIA3 (蛋白质二硫化物异构酶A3)。

GSTA，GSTM2：谷胱甘肽S-转移酶，广泛分布于生物体内的各组织细胞，并具有解毒和抗氧化等生物功能，是一组参与外源物质代谢的重要的蛋白酶，同时也参与部分内源性物质，如胆红素和血红素的转运过程。该类酶主要包括

GSTM，GSTα，β，σ等多种亚型[42-44]。

Eif5a：细胞翻译起始因子，是一个在动植物体内普遍存在的蛋白质翻译起始因子，在部分蛋白质翻译起始过程中发挥着重要作用，同时该因子还参与人体疾病的发生过程，具有促进动植物细胞增殖、衰老、死亡以及环境胁迫应答等的调控作用[45, 46]。

Mat1a: S腺苷甲硫氨酸合酶，其反应产物S腺苷-L-甲硫氨酸可通过增强抑制剂IκB-α的表达来调控NF-κB的活性[47]。

OAT：鸟氨酸转氨酶，参与体内氨基酸的合成和物质代谢过程，如体内脯氨

酸的合成过程，细胞内含氮化合物和小分子物质的代谢过程等。

为进一步确证2-DE方法的准确性，本课题设计检测体内GST酶活性。GST酶是广泛分布于各组织中的一类具有解毒和抗氧化作用的酶，具有重要的生物学意义。2-DE检测结果显示分布于细胞膜蛋白的GSTa在DBDCT染毒组表达明显下降，而分布于细胞核蛋白的GSTM2在DBDCT染毒组表达也明显下降。采用紫外分光光度法检测肝组织样本GST酶活性结果显示DBDCT组GST酶的

活性较对照组表达低，且随着DBDCT浓度的增加，其活性逐渐下降。GST酶活性测定结果与2DE-TOF-TOF-MS结果一致。该结果证明采用蛋白质组学技术研究DBDCT肝毒性的方法可行且准确，研究结果证明DBDCT致大鼠肝毒性与其氧化应激水平，体内酶活的代谢，氨基酸合成等过程有关，其中大多数差异蛋白参与了细胞的氧化应激调控过程。因此，我们初步推测DBDCT可引起大鼠肝组织氧化应激损伤，使得体内参与抵抗氧化应激损伤的蛋白，如GST活性降低，进而导致肝脏组织的损伤。

# **第二章** **DBDCT**致正常肝细胞**HL02**细胞毒性的

### 作用机制研究

## **第一节 DBDCT**对**HL02**细胞的毒性作用研究

传统的药物肝毒性作用机制研究主要集中在以下几个方面：①细胞内钙离子的动态平衡失调导致的细胞破裂与细胞膜的囊泡状结构变化；②由TNF-α受体和Fas途径激活的细胞内级联反应，导致细胞核破裂和细胞的程序性死亡；③产生过多的自由基（如超氧阴离子、过氧化氢、羟自由基、单线态氧）导致的脂质过氧化损伤，酶活性的丧失和肝脏解毒功能的降低等；④阻断线粒体的β-氧化和呼吸链功能，导致线粒体DNA的破坏等[48-50]。上一章节，我们对DBDCT体内肝毒性进行了系统的研究，那么其体外的毒性机制又是什么？是否与体内的毒性作用机制相同呢？为了证明DBDCT对肝细胞的体外毒性效应，本节采用

MTT，酶活测试，流式细胞术等常规的细胞毒性检测手段对DBDCT的肝毒性

效应进行研究，并为蛋白质组学研究提供研究基础及其依据。

### 1、 材料和仪器：

### **1.1** 主要试剂：

正常肝细胞HL02购自武汉博士德。DBDCT由本实验室合成。1640细胞培养液、新生胎牛血清、胰蛋白酶、噻唑蓝（MTT），青链霉素均购自北京索来宝试剂公司。LDH测定试剂盒购自南京建成。

### **1.2** 主要仪器

二氧化碳培养箱：上海力申科学仪器有限公司

全自动酶标仪：美国Molecular Device公司

流式细胞仪：FACSCalibur, 美国BD公司

超声波细胞破碎仪：美国索尼电子公司

Protean IEF Cell型等点聚焦仪及其附件：美国Bio-Rad公司ProteanⅡCell型垂直电泳槽及其附件：美国Bio-Rad公司恒温循环泵：德国

低温超高速离心机：HITACHI 70P-72，日本

QL-901 Vortex漩涡混悬器：海门市其林贝尔仪器制造有限公司Heal Force HF super pw超纯水系统：力康生物医疗科技集团

### 2、 实验方法：

### **2.1** 细胞培养

HL02细胞培养在含10 %胎牛血清、100 U/ml青霉素、100μg/ml链霉素的

1640培养液，于5 % CO2, 37℃培养箱中培养。0.25%胰蛋白酶消化传代。根据细胞生长状态，2-3天传代培养，取对数生长期细胞进行下述实验。

### **2.2** **MTT**实验

取对数生长期的HL02细胞，调整细胞密度至1×105 mL-1接种于96孔板，于

37℃、5％CO2的培养箱中培养过夜；分别设对照组，不同浓度药物组（1μM, 2μM, 4μM, 6μM, 8μM, 10μM, 12μM, 24μM）与细胞作用24 h，48 h, 72h后，各剂量组置于倒置显微镜观察并拍照；每孔加入20μLMTT染液(5mg·mL-1溶于PBS中)，37℃、5％CO2培养箱中继续培养4 h；弃去上清，每孔加100μL的DMSO溶液，振荡5 min，置于全自动酶标仪570 nm处测定其吸光度值并计算其抑制率。

抑制率（%）=（对照组OD值—实验组OD值）×100% /对照组OD值

### **2.3** 透射电镜观察细胞形态

细胞经0μM、2.5μM和5μM DBDCT处理24 h后，0.25 %胰酶消化，离心，PBS洗两次，弃上清，加入戊二醛固定液固定，取出细胞团于固定液中继续固定，饿酸后固定，梯度乙醇和丙酮脱水，树脂包埋，超薄切片机切片，醋

酸铀和柠檬酸铅双重染色，透射电镜下观察细胞的超微结构特征。

### **2.4** 细胞外液乳酸脱氢酶（**LDH**）的测定

将HL02细胞按1×106／mL接种于六孔板中，待细胞贴壁后，加入不同浓度的DBDCT（3μM、6μM、9μM），分别培养6 h、12 h和24 h后，收集细胞液，2000 rpm离心5 min，取上清，按照LDH测定试剂盒，采用紫外分光光度法测定吸光度，按下述公式分别计算LDH含量。

LDH(U/L) = (ODu - ODc) /(ODs - ODb)×Cs×N×1000 (Cs = 0.5 mmol/L N = 1, ODs - ODb = 0.2707)

### **2.5** **Annexin V-FITC/PI**双染法测定细胞凋亡

采用Annexin V- FITC /PI双荧光标记，流式细胞术（flow cytometry, FCM）检测细胞凋亡率。取对数生长期的细胞，0.25 %胰蛋白酶消化，按1×106 cell/孔接种于6孔板，待细胞贴壁后，加入不同浓度的DBDCT，分别作用12 h，24 h，48 h后，吸除培养液，加入0.25 %胰蛋白酶消化细胞并收集细胞置流式管中，1500 rpm离心5 min，弃上清，冷PBS洗2次，每管加入200μL Binding Buffer 和10μL Annexin V，在4℃避光染色30 min。检测前每管加入PI 5μL, Binding Buffer 300μL，用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

### **2.6** **PI**单染法测定细胞周期：

取对数生长期的细胞，0.25 %胰蛋白酶消化，按1×106 cell/孔接种于6孔板，待细胞贴壁后，加入不同浓度的DBDCT，分别作用12 h，24 h，48 h，吸除培养液，加入0.25 %胰蛋白酶消化细胞并收集细胞置流式管中，1000 rpm离心 5

min，弃上清，冷PBS洗2次，离心，每管1 mL冰乙醇固定液，4℃固定过夜。次日每管加PBS洗两次，加入450μL PI/RNAase混合液，37℃避光染色45 min。用流式细胞仪检测各时相细胞所占的比例。

### **2.7** 细胞内**ROS**的检测

取对数生长期的细胞，0.25 %胰蛋白酶消化，按1×106 cell/孔接种于6孔板，待细胞贴壁后，加入不同浓度的DBDCT（0μM、1.5μM、3μM、5μM），分别作用24 h和48 h，吸除培养液，加入0.25 %胰蛋白酶消化细胞并收集细胞置流

式管中，1000 rpm离心5 min，弃上清，冷PBS洗2次，离心，加人稀释于PBS

的DCFH-DA应用液200μL，37℃避光染色30 min，流式细胞仪检测ROS含量。

3、结果：

### **3.1** 不同剂量**DBDCT**作用于**HL02**细胞**24 h**细胞形态的变化

如图2-1所示，对照组细胞生长良好，细胞边缘清楚，胞浆丰富，细胞边缘折光性强，表面光滑。当DBDCT浓度为1μM时可见细胞数量减少，少许细胞固缩，细胞形态模糊，细胞分界不清，当浓度上升至5μM时可见大量细胞固缩变圆，贴壁能力明显减弱。



图 2-1 不同剂量DBDCT处理HL02细胞24 h后，细胞形态的光镜图，×160 (A:对照组; B: 1μM DBDCT; C: 5μM DBDCT )

### **3.2** **MTT**实验结果：

如图2-2所示，随着DBDCT浓度以及作用时间的增加，DBDCT对HL02

细胞的抑制率明显增加，且呈现明显的时效与量效关系，其回归方程如下：

Y = 25.408 Ln (X) + 5.4564; r = 0.9987; n> 10; t = 24 h; IC50 = 5.77μM Y = 31.473 Ln (X) + 14.687; r = 0.9953; n> 10; t = 48 h; IC50 = 3.07μM Y = 20.634 Ln (X) + 46.690; r = 0.9530; n> 10; t = 72 h; IC50 = 1.17μM



图2-2 MTT测定DBDCT对HL02细胞的抑制作用

### **3.3** 透射电镜观察细胞形态

如图2-3所示，正常细胞形态规则，细胞膜完整且界线清晰，细胞核完整，线粒体呈圆形或椭圆形结构，且结构清晰可见；当2.5μM DBDCT作用24 h后，细胞结构逐渐模糊，线粒体肿胀；当浓度升高至5μM时，细胞结构不再完整规则，核膜破裂，线粒体肿胀，细胞呈现空泡化。

A B C







图 2-3 不同剂量DBDCT处理HL02细胞24h后，透射电镜观察细胞形态，×10000 (A: 对

照组; B: 2.5μM DBDCT; C: 5μM DBDCT)

### **3.4** 乳酸脱氢酶的释放

乳酸脱氢酶（LDH）广泛存在于生物体内，其释放程度是细胞膜损伤的敏感指标。正常情况下，LDH不能透过细胞膜，当细胞受损伤时，细胞膜通透性发生改变，LDH可泄漏至细胞外液中。由表2-1，图2-4可见，细胞外液LDH含量随着DBDCT的浓度和作用时间的升高而明显升高；除DBDCT浓度为3μM，作用时间为6 h组外，其余各组与对照组相比，均具有显著性差异（*P*<0.01）。

结合电镜检测结果提示DBDCT致HL02肝细胞损伤可能与细胞膜通透性的改变

有关。

表2-1 不同浓度、不同时间DBDCT作用HL02细胞后LDH的释放

| Time | Dose μM | ODu | (ODu-ODc)±SD | U/L |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 0 μM | 0.332 |  |  |
| 6h | 3 μM  6 μM | 0.364 P>0.05  0.387\*\* P<0.01 | 0.032±0.036  0.055±0.009 | 59.11±0.036  101.59±0.009 |
|  | 9 μM | 0.506\*\* P<0.01 | 0.174±0.007 | 321.39±0.007 |
|  | 0 μM | 0.349 |  |  |
| 12h | 3 μM | 0.541\*\* P<0.01 | 0.180±0.018 | 332.47±0.018 |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 6 μM | 0.561\*\* *P*<0.01 | 0.206±0.009 | 380.50±0.009 |
| 9 μM | 0.609\*\* *P*<0.01 | 0.260±0.045 | 480.24±0.045 |
| 0 μM | 0.481 |  |  |
| 24h 3 μM | 0.693\*\* *P*<0.01 | 0.212±0.030 | 391.58±0.030 |
| 6 μM | 0.806\*\* *P*<0.01 | 0.325±0.011 | 600.30±0.011 |
| 9 μM | 0.952\*\* *P*<0.01 | 0.471±0.026 | 869.97±0.026 |

\**P*<0.05; \*\* *P*<0.01

1000

800

L D H (U /L )

600

400

200

0



3μM 6μM

9μM

6H 12H 24H

Time(h)

图2-4 不同浓度、不同时间DBDCT作用HL02细胞后LDH的释放量

### **3.5** 细胞凋亡结果

细胞凋亡检测结果显示，正常细胞早期凋亡率为19.04 %, DBDCT浓度为

1.5μΜ、3.0μΜ和5.0μΜ，作用24h时，细胞早期凋亡率分别上升至22.50 %，

21.62 %, 32.13 %，与对照组相比具有显著性差异（*P*<0.05）；当DBDCT浓度为

### 1.5 μΜ，作用48 h后，早期凋亡率从22.50%上升至33.58 %，且与对照组有显

著性差异（*P*<0.05）；正常细胞晚期凋亡率仅为9.31%, DBDCT浓度为1.5μΜ、

3.0μΜ和5.0μΜ，作用24h时，细胞晚期凋亡率分别上升至为11.10%，45.93%，

45.55%，与对照组比较具有显著性差异；且当DBDCT浓度为1.5μΜ，作用48h后，晚期凋亡率从11.10 %上升至18.57 %。上述结果显示DBDCT作用于HL02细胞后可引起细胞凋亡，且具有明显的时效与量效关系。结果分别见图2-5，图2-6和表2-2。



图2-5 不同浓度、不同时间DBDCT作用HL02细胞后的细胞凋亡率

(The lower right represented early apoptotic cells; the upper right represented late apoptotic cells)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Dose (μΜ) | Time (h) | Apoptotic Rate (%)  Early apoptotic Late apoptotic Total apoptotic |
| Control | -- | 19.04±0.76 9.31±2.43 28.35±3.19 |
| 5.0 μΜ | 12 h | 28.00±0.76\* 30.20±2.05\* 58.21±1.29\* |
| 1.5 μΜ | 24 h | 22.50±0.21\* 11.10±1.78 33.60±1.99\* |
| 3.0 μΜ | 24 h | 21.62±1.23 45.93±1.09\*\* 67.55±2.32\*\* |
| 5.0 μΜ | 24 h | 31.13±1.24\* 45.55±0.16\*\* 76.67±1.39\*\* |
| 1.5 μΜ | 48 h | 33.58±0.17\*\* 18.57±0.24 52.15±0.08\* |

表2-2 DBDCT不同浓度作用于HL02细胞不同时间后的细胞凋亡率

\**P*<0.05; \*\* *P*<0.01



图2-6 DBDCT不同浓度作用于HL02细胞不同时间后的细胞凋亡率（\**P*<0.05; \*\* *P*<0.01）

### **3.6** 细胞周期结果

由图可见，正常细胞大部分处于G0-G1期，DBDCT作用后，细胞周期发生明显变化，DBDCT各剂量与时间组G0-G1期细胞明显下降，S期与G2-M期细胞明显升高，细胞周期阻滞在S期与G2-M期。结果见表图2-7。



（A）



（B）

图2-7 DBDCT不同浓度作用于HL02细胞不同时间后细胞周期的变化

**3.7细胞ROS含量**

ROS测定结果显示，随着DBDCT浓度与作用时间的增加，细胞内ROS 的

含量逐渐增加，当DBDCT浓度为3.0μΜ时，ROS含量较对照组有显著性差异。

结果见表2-3，图2-8。

表2-3 DBDCT不同浓度作用于HL02细胞不同时间后ROS的含量

| Dose (μΜ) | Time (h) | ROS |
| --- | --- | --- |
| Control | -- | 17.16±8.85 |
| 1.5 μΜ | 24 h | 28.85±4.93 |
| 3.0 μΜ | 24 h | 58.67±5.60\*\* |
| 5.0 μΜ | 24 h | 191.62±9.85\*\* |
| 3.0 μΜ | 48 h | 99.31±17.25\*\* |



图2-8 DBDCT不同浓度作用于HL02细胞不同时间后ROS的含量变化（\**P*<0.05; \*\* *P*<0.01）

4、讨论：

DBDCT作为一个新型有机锡化合物，具有明显的肝毒性，并制约着该化合物的应用，研究其肝毒性作用机制将为有机锡类化合物的毒理学研究提供重要依据。本节采用传统的细胞毒性研究方法，分别对细胞的形态、细胞凋亡与周期、细胞内ROS的水平进行了检测。结果显示DBDCT浓度为5.77μM，作用时间24 h时，可导致50%的肝细胞死亡，且呈现明显的时效与量效关系。随着

DBDCT浓度的增加与作用时间的延长，细胞结构变得不再规则，核膜出现破裂，此时胞外LDH明显升高，细胞周期G2/M期发生阻滞，细胞出现不同程度的凋亡与坏死，且胞内ROS含量逐渐升高。以上检测指标均呈现出明显的时效与量效关系。

细胞凋亡是指为维持内环境稳定，由基因控制的一种细胞自主的有序的死亡。近几年，由于其与临床研究，如HIV病毒感染，肿瘤的发生，自身免疫性疾病以及神经退行性疾病等的密切关系，细胞凋亡及其机制研究已成为科学研究的热点[51-53]。课题组前期研究证明DBDCT引起癌细胞死亡的主要作用机制就是诱导细胞的凋亡，本研究结果同样显示DBDCT可引起肝细胞凋亡进而引起肝毒性损伤。

氧化应激是指机体在遭受有害刺激时，体内高活性分子如活性氧ROS和活性氮RNS产生过多，氧化程度超出其自身对氧化物的清除程度，氧化系统和抗氧化系统失衡，从而导致细胞损伤。低水平的氧化应激会诱导自身保护性反应的发生，而高水平的氧化应激则会导致细胞的损伤[54,55]。本研究结果显示DBDCT可诱导体内ROS的升高，且呈现明显的时效与量效关系。当DBDCT浓度为5.0μΜ，作用24 h时，胞内ROS含量明显升高，此时细胞发生严重的损伤，其早期凋亡率与晚期凋亡率均明显升高。

细胞周期是细胞完成自我复制与增殖的有序进行的一个过程。细胞在细胞周期中经过G1期（DNA合成前期），S期（DNA合成期），G2期（DNA合成后期）和M期（有丝分裂期）来完成其增殖过程[56-59]. DBDCT作用于HL02细胞，G0/G1期细胞比例迅速下降，S期与G2/M期细胞比例明显升高，细胞周期发生G2/M 期阻滞。G2/M 期是细胞DNA损伤修复的过程，如果受损细胞的

DNA得以修复则进入下一个细胞周期，否则就发生凋亡退出细胞周期。DBDCT作用于细胞后可能引起细胞DNA的损伤，导致G2/M期阻滞，且许多证据表明，细胞凋亡和细胞周期是通过内在的分子机制联系在一起的，细胞周期的异常通常会导致细胞凋亡，此结果与前述细胞凋亡结果相符。

本节的研究初步证明DBDCT可引起明显的体外肝细胞毒性，且毒性与其诱导细胞凋亡，引起细胞周期紊乱以及诱导细胞氧化应激反应有关。该研究结果为第二节的蛋白质组学研究提供了可靠的研究基础与依据。

## **第二节 DBDCT**对**HL02**细胞的蛋白质组学研究

前一节我们采用常规的技术手段已经证明了DBDCT对体外正常肝细胞的毒性作用主要表现在DBDCT可引起细胞凋亡，细胞周期的改变以及细胞的氧化损伤等。本节我们将继续采用蛋白质组学的研究方法，系统的说明DBDCT引起肝细胞毒性的主要作用机制，并发现毒性作用的靶蛋白，为进一步的毒性作用机制研究提供新线索。

### 1、 材料和仪器：

### **1.1** 主要试剂：

尿素，硫脲，CHAPS，DTT，TEMED，SDS，丙烯酰胺，甲叉双丙烯酰胺，

Tris，甘氨酸，过硫酸铵，碘乙酰胺，考马斯亮蓝R250，矿物油，PMSF均购自北京索来宝试剂公司。IPG(pH3-10NL, 17cm)，Bio-lyte 两性电解质，低熔点琼脂糖封胶液均购自美国Bio-Rad公司。Prestained Protein Marker购自Bio-labs.2-D Quant kit购自Bio-Rad公司。

### **1.2** 主要仪器：

低温离心机：上海安亭仪器有限公司超声波细胞破碎仪：美国索尼电子公司

Protean IEF Cell型等点聚焦仪及其附件：美国Bio-Rad公司ProteanⅡCell型垂直电泳槽及其附件：美国Bio-Rad公司恒温循环泵：德国

低温超高速离心机：HITACHI 70P-72，日本

QL-901 Vortex漩涡混悬器：海门市其林贝尔仪器制造有限公司Heal Force HF super pw超纯水系统：力康生物医疗科技集团RT-PCR仪：LineGene 9600，杭州博日科技有限公司

半干转膜槽：Bio-Rad公司

### 2、 实验方法：

### **2.1** 主要溶液的配制：

细胞与组织裂解液，水化上样液，胶条平衡液，30%丙烯酰胺溶液，5×Tris-Gly电泳缓冲液，考马斯亮蓝染液和脱色液的配制方法同第一章第二节。

1）12%聚丙烯酰胺分离胶

双蒸水 6.4 mL

2M Tris-HCl (pH 8.8) 5.2 mL

30%丙烯酰胺8.0 mL

10 %SDS 0.2 mL

TEMED 0.008 mL

10%APS 0.2 mL

2）5%聚丙烯酰胺积层胶

双蒸水 6.8 mL

1M Tris-HCl (pH 6.8) 1.26 mL

30%丙烯酰胺1.66 mL

10%SDS 0.1 mL

TEMED 0.01 mL

10%APS 0.1 mL

3）转膜缓冲液

甘氨酸 2.0 g

Tris 5.8g

SDS 0.37g

CH3OH 200 mL

双蒸水 定容至 1L

4）5×TBST

NaCl 44g

1M Tris-HCl (pH 8.0) 100 mL

Tween 20 2.5 mL

双蒸水定容至1L

5）5%脱脂奶粉

脱脂奶粉5g

1×TBST定容至1L

### **2.2** 细胞蛋白抽提与定量：

将HL02细胞分别给予培养液与DBDCT（3μM）干预细胞24 h，分别收集对照组和给药组细胞，离心去上清，冷PBS溶液洗三次，弃上清，收集细胞，加入200μL细胞裂解液（7 M Urea, 2 M Thiourea，4 %CHAPS, 65 mM DTT, 1 %

PMSF），冰浴超声破碎，超声5s，冰浴放置10s，共计8次循环后，10000 rpm，4℃离心10 min，收集上清，分装后置-80℃冰箱储存。

蛋白定量方法同第一章第二节内容。

**2.3细胞总蛋白的双向凝胶电泳-质谱：**

实验方法同第一章第二节内容。

### **2.4** 差异蛋白的验证：

2.4.1 Western blot验证分析

1）配制12 %的聚丙烯酰胺凝胶和5 %聚丙烯酰胺积层胶。

2）按照蛋白定量结果取40μg蛋白样本与适量5×上样缓冲液混合，混匀后加入

梳孔中。

3）电泳。电泳开始时电压设置为80 V，待溴酚蓝电泳致分离胶界面时将电压调

整至120 V，待溴酚蓝电泳致胶底部时停止电泳。

4）将凝胶取出，浸泡至转膜缓冲液中。切取与凝胶大小相同面积的NC膜和滤

纸，与凝胶一同浸泡至转膜缓冲液中，平衡20 min。

5）将滤纸平铺至转膜槽中，NC膜平铺于滤纸上方，胶平铺于膜上方，再覆盖滤

纸，排尽胶与膜之间的气泡。于15 V转印45 min。

6）转印结束后，取出NC膜，于5 %脱脂奶粉中封闭1.5 h。加入一抗（按1׃1000

比例用TBST稀释抗体），4℃过夜。TBST漂洗3次，每次10 min。加入二抗（按

1׃3000比例用TBST稀释抗体），室温振摇1 h. TBST漂洗3次，每次10 min。

7）ECL化学发光试剂检测：按照试剂盒说明，混合发光试剂A液与B液，与

NC膜共同孵育。将膜置于透明袋中，正面朝上放于X光片曝光盒中，X光片压

片1-3 min。将X光片置于显影液40-60 s后，放于定影液中定影30 s，清水漂洗。

8）条带分析：胶片用扫描仪在300 dpi分辨率进行图像扫描后，以Photoshop图像分析软件定量条带的灰度值。其中Trx1与DJ1蛋白均以β-actin作为内参，并分别计算其与β-actin的比值；以对照组的比值作为1，分别计算实验组相对于对照组的表达量，并以统计软件进行显著性差异分析。

2.4.2 PCR验证分析

1）RNA的提取：不同组别的细胞分别用PBS清洗一次，加入1 mL RNAiso Plus，水平放置片刻后，用移液器吹打细胞使其脱落。将含细胞的裂解液转移至离心管中，反复吹打至无明显沉淀，室温静置5 min后，加入1/5体积的氯仿，剧烈震荡15 s，待溶液充分乳化后，室温静置5 min，于12000 g，4℃离心15 min。吸取上清，并加入等体积异丙醇，混匀，静置10 min后于12000 g，4℃离心10

min。弃上清，加入1 mL 75%乙醇洗涤管壁，12000 g，4℃离心5 min后，弃去乙醇。沉淀于室温干燥2-5 min, 加入适量RNase-free水溶解沉淀。提取的RNA于-80℃保存。

2）反转录：按照反转录试剂盒（TaKaRa: PrimeScript RT regent Kit with gDNA

Eraser）操作说明进行反转录反应。所得的cDNA于-20℃保存。

3）PCR反应：按照PCR试剂盒（TaKaRa: SYBR Premix Ex Taq Ⅱ）操作说明

进行PCR反应。

①引物序列：GAPDH-F: GCACCGTCAAGGCTGAGAAC GAPDH-R: TGGTGAAGACGCCAGTGGA Trx1-F: TTGGACGCTGCAGGTGATAAAC Trx1-R: GGCATGCATTTGACTTCACACTC

Protein PARK7-F: GAGCTCTGGTCATCCTGGCTAAAG

Protein PARK7-R: GACAAATGACCACATCACGGCTAC

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| ②扩增体系： |  | |
| 试剂 | 使用量 | 终浓度 |
| SYBR Premix Ex Taq Ⅱ（2×） | 10 μL | 1× |
| PCR Forward Primer(10 μM) | 0.8 μL | 0.4 μM |
| PCR Reverse Primer(10 μM) | 0.8 μL | 0.4 μM |
| DNA 模板 | 2.0 μL |  |
| dH2O  Total | 6.0 μL  20 μL |  |

③扩增条件

Step1: 95℃30s

Step2: 95℃5s；60℃34s; 40循环

Step3: Dissociation Stage

### 3、 结果：

### **3.1** **HL02**细胞双向电泳图谱分析：

本实验利用细胞裂解液分别提取了正常细胞和DBDCT染毒细胞组全蛋白，并使用2D-Quant kit试剂盒进行蛋白定量，采用双向电泳技术对细胞总蛋白进行了分离，且每个样本分别重复了2次。图2-9A、图2-9B分别为细胞总蛋白表达图谱。通过两组图像对比，共找到15个差异蛋白，其中12个蛋白在DBDCT处理组表达下调，3个蛋白在DBDCT处理组表达上调。

6

13

14

6

13

14

6

13

14

6

13

14

pH3 pH10



6

14

13

1

8

11

7

10

9

15 12

4

2

3

5

175kDa

(A)

1 8

11 7

10 9 15 12

4

2

3

5

1 8

11 7

10 9 15 12

4

2

3

5

5kDa

pH3 pH10

MW



6

13

14

1

11

8

10

7 12

9

4

15

2

5

3

175kD a

(B)

1

11 8

10 7 12

9 4 15

2

5 3

1

11 8

10 7 12

9 4 15

2

5 3

5kD a

图2-9 HL02肝细胞双向电泳图谱。（A）Control组（B）DBDCT 组

### **3.2** **HL02**细胞差异蛋白的鉴定结果：

对上述比对得到的15个差异蛋白，采用MALDI-TOF-TOF-MS进行了质谱鉴定，以Mascot为搜索引擎，并结合2-DE相应蛋白的等电点、分子量、匹配片段的多少以及氨基酸序列的覆盖率进行蛋白鉴定，共鉴定出9个差异蛋白，即DBDCT干预后的上调蛋白：硫氧还蛋白1（Trx1），核苷酸结合蛋白（HINT1），Protein DJ-1（PARK7）, 半乳糖凝集素-1(Gal-1)；DBDCT干预后的下调蛋白：细胞色素C氧化酶亚型5A（COX5A），过氧化物酶2（PRDX2），过氧化物歧化酶（SODM），3 -羟酰辅酶A脱氢酶2(HCD2)，NADH脱氢酶（NDUS8）等，结果见表2-4。

### **3.3** 差异蛋白的质谱鉴定图谱

3.3.1蛋白点5（Thioredoxin 1）的质谱结果与检索结果：

（1）、蛋白点5的MALDI-TOF-MS肽指纹图谱（PMF），见图2-10。



图2-10 蛋白点5的MALDI-TOF-MS肽指纹图谱

（2）、蛋白点5的MASCOT检索结果，见表2-5，2-6：

表 2-4 HL-02 肝细胞差异蛋白的表达信息

No.a

Acc.no b

PI c

Scroed

Protein name

Molecular

Sequence coverage (%)c

11

Protein description

c

mass

3

IPI00239077

HINT1

13 793

6.43

86

Histidine triad nucleotide-binding protein 1

4

IPI00219219

Gal-1

14 706

5.34

71

258

Galectin-1

5

IPI00216298

TRX1

11 730

4.82

78

131

TXN Thioredoxin 1

8

IPI00298547

PARK7

19 878

6.33

66

199

Protein DJ-1

2

IPI00025086

COX5A

16 752

6.30

21

125

Cytochrome c oxidase subunit 5A,

6

IPI00010845

NDUS8

23 690

6.00

25

79

NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mitochondrial

Peroxiredoxin-2

9

IPI00027350

PRDX2

21 878

5.66

37

166

12

IPI00896370

SODM

19 718

7.81

48

117

cDNA FLJ40076 fis, highly similar to Superoxide di

13

IPI00017726

HCD2

26 906

7.66

65

412

Isoform 1 of 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase

a Spot no. was defined according to its positions in 2-DE gels.

b Swiss-Prot accession number

c MW, molecular weight of the matched protein in kDa. pI, isoelectric point of the matched protein.

d For MALDI-TOF-MS, protein scores greater than 61 are signiﬁcant (p < 0.05).

表2-5 MASCOT检索参数

Database NCBInr

Enzyme Trypsin

Species HOMO

Peptide tol±0.2 Da

MS/MS tol±0.3 Da

表2-6 MASCOT检索结果

| Accession | Mass | Score | Queries matched | Description |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| IPI00216298 | 11730 | 131 | 12 | TXN Thioredoxin1 |
| IPI00552768 | 9446 | 72 | 7 | TXN Thioredoxin, isoform CRA\_b |
| IPI00894414 | 7284 | 46 | 1.9 | E2F6 7 kDa protein |

结果显示，Thioredoxin 1的分子量和pI值与2-DE胶上的位置相匹配，且匹

配肽段为12个，得分远高于第二位的蛋白结果，故认为蛋白点5为Thioredoxin1。

3.3.2蛋白点4（Galectin-1）的质谱结果与检索结果：

（1）、蛋白点4的MALDI-TOF-MS肽指纹图谱（PMF），见图2-11。



图2-11 蛋白点4的MALDI-TOF-MS肽指纹图谱

（2）、蛋白点4的MASCOT检索结果，见表2-7，2-8：

表2-7 MASCOT检索参数

Database NCBInr

Enzyme Trypsin

Species HOMO

Peptide tol±0.2 Da

MS/MS tol±0.3 Da

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Accession | Mass | Score | Queries matched | Description |
| IPI00219219 | 14706 | 258 | 13 | LGALS1 Galectin-1 |
| IPI00793187 | 50164 | 46 | 10 | ZNF586 Zinc finger protein 586 |
| IPI00719690 | 184415 | 42 | 17 | SAMD9L Isoform 1 of Sterile alpha  motif domain-containing protein 9-like |

表2-8 MASCOT检索结果

结果显示，Galectin-1的分子量和pI值与2-DE胶上的位置相匹配，且匹配

肽段为13个，得分远高于第二位的蛋白结果，故认为蛋白点4为Galectin-1。

### **3.4** 差异蛋白的验证

运用Western blot和RT-PCR方法，对差异蛋白5（Trx1）和8（PARK7，也称为DJ1）分别在蛋白和mRNA水平进行了验证。如图2-12A所示，以β-actin为内参，Trx1和DJ1蛋白的表达随着DBDCT浓度和作用时间的增加而增加，且当DBDCT浓度为2μM，作用时间为24 h时，与对照组比较具有显著性差异。RT-PCR实验得到了相同的研究结果，即以GAPDH为内参，Trx1和DJ1的mRNA表达水平随着DBDCT浓度和作用时间的增加而升高，结果见图2-12B。





图2-12 差异蛋白Trx1和PARK7的验证结果。(A) Western blot检测结果及其量化结果。a: Control; b: DBDCT 2μM, 12h; c: DBDCT 1μM, 24h; d: DBDCT 2μM, 24h. \**P*<0.05; \*\* *P*<0.01. (B) RT-PCR结果. \**P*<0.05; \*\* *P*<0.01.

### 4、 讨论：

本实验比较研究了对照组与DBDCT染毒组的HL02肝细胞总蛋白的2DE差异图，并对15个表达差异蛋白进行了MALDI-TOF-TOF-MS鉴定。鉴定的差异蛋白主要参与以下功能：①氧化还原/氧化应激：过氧化物酶2(PRDX2)、过氧化物歧化酶（SODM）、硫氧还蛋白1(Trx1)、Protein DJ-1（PARK7）；②线粒体功能相关酶：细胞色素C氧化酶亚型5A(COX5A)、NADH脱氢酶[辅酶]

铁硫蛋白8（NDUS8**）**；③细胞凋亡、增殖、分化：半乳糖凝集素-1（Gal-1）；

核苷二磷酸激酶A（NDKA）。

Ⅰ、氧化还原/氧化应激：

PRDX2：过氧化物酶2，参与细胞的氧化还原调节过程。其氧化还原功能的

完成主要依赖于硫氧还蛋白系统，在生命过程中发挥着清除代谢过程中产生的过氧化物的重要作用。PRDX2可通过调节体内H2O2的浓度来参与由生长因子和肿瘤坏死因子介导的信号通路[59-62]。研究报道显示PRDX2低表达，会增加细胞对于氧化应激的敏感性，进而提高细胞发生凋亡的几率。本实验中PRDX2 在

DBDCT作用组表达明显降低，且前期研究结果显示DBDCT作用组细胞活性氧与凋亡率明显升高，这一结果证实了PRDX2与细胞氧化应激与凋亡之间的关系，且与已知报道相符。

SODM：过氧化物歧化酶，其主要功能为破坏细胞内产生的自由基以保护细胞[65]。Andrade等报道了锰超氧化物歧化酶（SOD2）功能位点的多态性与特异质性药物性肝损伤相关。大量的研究报道显示糖尿病患者胰腺组织、红细胞、肾脏组织SODM表达均下调[63]。本研究结果显示与对照组相比，DBDCT组SODM的蛋白表达水平明显下降，与其体内活性氧升高有密切关系。

TRX1：硫氧还蛋白1，其通过二硫键和巯基的可逆性转化来实现体内的氧化还原反应。TRX1主要分布于细胞核和细胞浆中，可以通过清除体内活性氧来抵抗细胞内氧化应激。同时，TRX1可调控核转录因子AP-1和NF-κB，且与细胞增殖与免疫相关。体外和体内实验证明TRX1能抑制由药物等诱导的细胞调亡[64-66]。本研究结果显示DBDCT组TRX1表达明显升高，与氧化应激反应与细胞凋亡有关。其作用机制将于第三章具体阐述。

PARK7：蛋白DJ-1，雄激素受体正向调节蛋白。同时，作为一个氧化还原敏感的伴侣蛋白和氧化应激感受器，参与细胞的氧化应激反应，具有保护细胞抵抗氧化应激与凋亡的作用。在氧化应激刺激下，DJ1蛋白被诱导表达上调，进而通过自身被氧化的形式以及结合Daxx蛋白的形式来清除细胞内的氧自由基来抵抗氧化应激与细胞凋亡过程[67, 68]。本研究中DJ1蛋白在DBDCT组表达升高，其可能参与到细胞的氧化应激调控中，其具体的作用机制将在第三章具体阐述。

Ⅱ、线粒体功能：

COX5A：线粒体呼吸链末端转移酶，是COX家族的亚型。其主要功能为连

接细胞色素C和分子氧之间的电子转移，以及线粒体内膜的质子转移[69, 70]。

NDUS8: NADH脱氢酶[辅酶]铁硫蛋白8，是线粒体膜呼吸链NADH复合

物的重要亚单元。其在NADH和呼吸链之间的电子传递中发挥重要作用。

Ⅲ、细胞凋亡、增殖、分化：

NDKA：核苷二磷酸激酶A，参与三磷酸核苷的合成，细胞的生长，分化与

信号转导，同时参与G-蛋白受体的吞噬作用。

Gal-1：半乳糖凝集素-1，参与细胞的生长，分化与凋亡。与CD2, CD3, CD4，

CD7, CD43 and CD45蛋白有相互作用，可抑制CD45蛋白的磷酸化。

本章建立了HL02肝细胞的2-DE-MS方法，并对DBDCT作用前后的蛋白表达谱进行了系统的分析，发现并鉴定了9个差异蛋白，并对部分差异蛋白进行了Western和RT-PCR验证。通过对差异蛋白的功能分析，我们发现氧化应激与细胞凋亡是DBDCT引起肝细胞毒性重要的两条重要途径。此结果与上一章节

DBDCT体内毒性的研究结果相符。课题组前期已经对DBDCT诱导肿瘤细胞凋亡的作用机制进行了系统研究，故本研究选择氧化应激通路作为研究方向对氧化应激作用机制进行研究。在第三章中以Trx1和DJ1两个差异蛋白为核心，对

DBDCT引起肝细胞毒性的氧化应激作用机制进行了研究。

# **第三章** **DBDCT**对硫氧还蛋白**1**（**Trx1**）介导的氧化应激作

**用机制的研究**

## 第一节 硫氧还蛋白**1**（**Trx1**）介导的信号通路研究

前两章内容通过蛋白质组学的研究方法，发现DBDCT引起肝脏与肝细胞毒性的差异蛋白主要参与了氧化还原/氧化应激调控，线粒体呼吸链的调控，细胞的增殖，分化与凋亡等过程。其中，大多数差异蛋白均参与了氧化应激调控的过程，如差异蛋白PRDX2, SODM，Trx1, PARK7等。2-DE，Western Blot 和

PCR研究结果显示，Trx1的表达随DBDCT的浓度和作用时间的增加而逐渐增加，且呈现明显的时效与量效关系。考虑到Trx1含有巯基结构，因此可能会与金属类化合物发生相互作用，故在本章节以Trx1为靶蛋白，通过Western Blot和RT-PCR手段研究由Trx1介导的氧化应激信号通路，以阐明DBDCT引起肝细胞毒性的作用机制。

### 1、 材料和仪器：

### **1.1** 主要试剂：

免疫印迹发光试剂ECL购自康为世纪。兔抗人Trx1抗体、兔抗人DJ-1抗体、兔抗人Phospho-SAPK/JNK抗体、兔抗人SAPK/JNK抗体、兔抗人Phospho-p38 MAP Kinase抗体、兔抗人p38 MAP Kinase抗体均购自Cell Signaling

Technology公司。兔抗人β-actin抗体购自北京博奥森生物技术有限公司。HRP标记羊抗兔二抗购自北京博奥森生物技术有限公司。蛋白Marker购自Fermentas。脱脂奶粉购自伊利乳业股份有限公司。蛋白裂解液购自碧云天生物技术研究所，PMFS购自北京索来宝科技有限公司，磷酸酶抑制剂购自北京普利莱基因技术有限公司。

### **1.2** 主要仪器

低温台式高速离心机：上海安亭仪器有限公司

垂直电泳仪：美国Bio-Rad

蛋白半干转印仪：美国Bio-Rad

超声波细胞破碎仪：美国索尼电子公司

Heal Force HF super pw超纯水系统：力康生物医疗科技集团QL-901 Vortex漩涡混悬器：海门市其林贝尔仪器制造有限公司RT-PCR仪：LineGene 9600，杭州博日科技有限公司

### 2、 实验方法：

### **2.1** 主要溶液的配制：

同第二章第二节。

### **2.2** 细胞蛋白抽提：

将HL02细胞分别给予培养液与DBDCT 0.5μM，1μM，2μM，干预细胞6 h，12 h和24 h，分别收集对照组和给药组细胞，离心去上清，冷PBS溶液洗三次，弃上清，收集细胞，加入100μL细胞裂解液（现用时加入1 %PMSF和1 %磷酸酶抑制剂），冰浴超声破碎，超声5s，冰浴放置10s，共计8次循环后，10000

rpm，4℃离心10 min，收集上清，分装后置-80℃冰箱储存。

### **2.3** 蛋白定量：

按照BCA蛋白定量试剂盒说明操作，每个样本重复三次，于570 nm处测定

其吸光度值，绘制标准曲线，计算各样本蛋白含量。

**2.4 Western blot 法检测Trx1，DJ1，ASK1，p-JNK和p-P38蛋白的表达**

实验过程同第二章第二节2.4.1。

### **2.5** **RT-PCR**法检测**Trx1**，**DJ1**，和**ASK1 mRNA**的表达

实验过程同第二章第二节2.4.2

引物序列：GAPDH-F: GCACCGTCAAGGCTGAGAAC

GAPDH-R: TGGTGAAGACGCCAGTGGA

Trx1 (TXN) -F: TTGGACGCTGCAGGTGATAAAC

Trx1 (TXN) -R: GGCATGCATTTGACTTCACACTC

Protein DJ1 (PARK7) -F: GAGCTCTGGTCATCCTGGCTAAAG Protein DJ1 (PARK7) -R: GACAAATGACCACATCACGGCTAC ASK1 (MAP3K5) -F: GAAGGCGGTACAGACAGCCATTA ASK1 (MAP3K5) -R: TCACTCTCAGATGCAAGGCTGAA

### 3、 结果：

**3.1 Trx1, DJ1，ASK1, p-JNK和p-P38蛋白的表达**

采用Western blot的实验方法，分别检测了DBDCT 0.5μM，1.0μM，2.0μM干预细胞24 h, DBDCT 2.0μM干预细胞6 h，12 h和24 h，Trx1，DJ1, ASK1，p-JNK，p-P38等蛋白的表达，结果见图3-1。实验结果显示：随着DBDCT浓度的增加，Trx1和DJ1蛋白的表达逐渐升高，当DBDCT浓度为2.0μM，作用24 h时，其表达与对照组相比具有显著性差异（*P*<0.05），且呈现明显的时效与量效关系；

ASK1为细胞凋亡信号调节激酶，正常细胞中该蛋白不表达，当DBDCT作用后，激活其表达；而JNK和P38蛋白，在DBDCT的作用下均发生了磷酸化修饰，即分别以JNK和P38为内参，p-JNK和p-P38的表达均随DBDCT的浓度和作用时间的增加而升高，当DBDCT浓度为1.0μM，作用24h时，其表达与对照组相比具有显著性差异（*P*<0.05）。

**β-actin TRX1**



**C 0.5μM 1.0μM 2.0μM 2.0μM 2.0μM**

**24 h** 24h 24h  **12h** **6h**



**JNK p-JNK**

C 0.5μM 1.0μM 2.0μM 2.0μM 2.0μM

24 h 24h 24h 12h 6h



**DJ1**

**P38**

**ASK1**

**p-P38**

（A）









（B）

图3-1 Western blot检测结果。（A）Western blot（B）Trx1，DJ1，ASK1，JNK和P38

蛋白表达的量化结果。\**P*<0.05

### **3.2** **Trx1**，**DJ1**和**ASK1**的**mRNA**表达

采用RT-PCR技术，对DBDCT 0.5μM, 1.0μM, 2.0μM干预细胞24 h, DBDCT

2.0μM干预细胞6 h，12 h和24 h后，Trx1，DJ1，ASK1的mRNA水平进行了检测。由图3-2可见，各项检测指标的熔解曲线良好，无非特异性杂带。Trx1，DJ1，



TXN (Trx1) 熔解曲线

ASK1的mRNA表达水平均随DBDCT浓度和作用时间的增加而增加，具有良好的时效与量效关系。当DBDCT浓度为1.0μM，作用24 h，各指标的表达与对照组相比即具有显著性差异，*P*<0.05。



PARK7（DJ1）熔解曲线



MAP3K5（ASK1）熔解曲线

图3-2 Trx1，DJ1，ASK1的RT-PCR检测的熔解曲线与量化结果。\**P*<0.05，\*\**P*<0.01

### 4、 讨论：

DBDCT干预细胞后，Trx1、DJ1、ASK1，JNK和P38的蛋白表达呈现明显的时效与量效关系，即随着DBDCT浓度和作用时间的增加，各项指标的表达逐渐增加，且各项指标之间呈正向调节关系。

硫氧还蛋白1（Trx1）是一类分布广泛的小分子多功能蛋白，具有调节细胞生长、增殖、凋亡等多种功能。在其保守的活化区域内含有具备氧化还原活性的二硫巯基和二硫醇，氧化型的硫氧还蛋白具有二硫键Trx-S2，还原型的硫氧还蛋白含有巯基Trx-(SH)，其参与氧化还原反应就是通过巯基与二硫键只间的转换实现的[71, 72]。在正常的生理条件下，Trx1与ASK1（细胞凋亡信号调节激酶）以结合的形式存在，而在药物或其它外界刺激发生氧化应激反应时，Trx1释放了其对

ASK1的结合，使得ASK1游离出来，从而激活了MAPK通路的JNK与P38，使其

发生磷酸化改变，通过MAPK通路的级联放大导致了细胞凋亡的发生[65, 73]。

DJ1蛋白为氧化还原依赖的分子伴侣，当氧化应激发生时，细胞内的DJ1蛋白被激活，同时DJ1蛋白能够与细胞核中的死亡蛋白Daxx ( Fas death domain2 ass ociated p rotein)结合，从而抑制Daxx出核，使得Daxx不能与胞浆中的ASK1结合，ASK1游离，最终导致凋亡途径的激活[74, 75]。

本课题实验结果显示，DBDCT诱导细胞自由基水平升高，使得Trx1蛋白表

达升高以抵抗氧化应激作用，此时的Trx1逐渐失去了与ASK1的结合能力，使得

ASK1游离；同时作为氧化应激的伴侣蛋白，DJ1蛋白也被激活并与死亡蛋白Daxx

结合，进而抑制Daxx与ASK1的结合，使得游离的ASK1表达升高，最终激活

MAPK通路中的JNK和P38，导致细胞凋亡与坏死。

## **第二节 N-**乙酰半胱氨酸（**NAC**）对氧化应激通路的影响

N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)是体内重要的游离型巯基谷胱甘肽的前体物质，它促进GSH合成，GSH等构成了体内巯基氧化还原循环，具有抗自由基损伤，维护钙稳态，抑制白细胞激活等重要作用[76,77]。NAC作为一种抗氧化剂，可抑制损伤早期ROS的产生，促进ROS的清除。第二章研究结果发现DBDCT可引起HL02细胞明显的氧化损伤，且许多参与氧化应激调控的蛋白均发生了明显的变化，故氧化损伤可能是DBDCT引起肝细胞毒性的重要原因。上一节我们对由Trx1介导的氧化应激信号通路进行了系统研究。那么，如何降低其损伤程度呢？如果将其ROS水平降低，又会带来什么影响呢？因此，本章节设计使用抗氧化剂NAC以阻断氧化损伤，并探讨其对Trx1介导的信号通路的影响。

### 1、 材料和仪器：

### **1.1** 主要试剂：

同本章第一节。

### **1.2** 主要仪器

同本章第一节。

### 2、 实验方法：

### **2.1** 主要溶液的配制：

同第二章第二节。

### **2.2** 细胞处理：

取对数生长期的HL02细胞，分别接种于96孔板或细胞培养瓶中，待细胞贴壁且达到80%融合状态时，分别加入2μM DBDCT, 10 mM NAC, 2μM DBDCT+1 mM NAC, 2μM DBDCT+5 mM NAC，和2μM DBDCT+10 mM NAC，

与细胞共孵育24 h，收集细胞用于MTT, ROS流式检测与Western blot实验。

### **2.3** **MTT**检测细胞存活率：

将上述药物处理的96孔板中，每孔加入20μL MTT染液（5mg·mL-1溶于

PBS 中），于37 ℃、5 ％CO2培养箱中继续培养4 h；弃去上清，每孔加100μL 的

DMSO溶液，振荡15 min，置于全自动酶标仪570 nm处测定其吸光度值并计算其

存活率。

### **2.4** 流式细胞术测定细胞内**ROS**

收集上述药物处理的细胞于流式管中，1000 rpm离心5 min，弃上清，冷PBS洗2次，离心，加入稀释于PBS的DCFH-DA应用液200μL，37℃避光染色30 min，流式细胞仪检测ROS含量。

**2.5 Western blot 法检测Trx1，DJ1，ASK1，p-JNK和p-P38蛋白的表达**

实验方法同第三章第一节。

## 3 结果

### **3.1** **NAC**和**DBDCT**对细胞存活率的影响：

当DBDCT浓度为2μM时，HL02细胞存活率仅为44.8 %，但当5 mM NAC与2μM DBDCT共同作用于HL02细胞时，细胞存活率提高至73.9 %，当NAC的浓度提高至10 mM时，细胞存活率达到91.9 %。与此同时，单独使用10 mM NAC作用于HL02细胞时，其细胞数目与对照组相比无显著性差异。结果提示NAC可明显减轻DBDCT对肝细胞的毒性影响，使得细胞存活率提高，且呈现出明显的量效关系。结果见表3-1，图3-3。

表1 NAC和DBDCT对细胞存活率的影响

Group Control 2μM DBDCT 10 mM NAC

2μM DBDCT

1 mM NAC 5 mM NAC 10 mM NAC

Cell Viability(%) 100%±0.081 44.8%±0.081\* 119.0%±0.18# 45.6%±0.19\* 73.9%±0.16\*# 91.9%±0.16#

与对照组相比，\**P*<0.01；与DBDCT组相比，#*P*<0.01



图3-3 NAC和DBDCT对细胞存活率的影响。

\*与对照组相比，*P*<0.01；# 与DBDCT组相比，*P*<0.01

### **3.2** **NAC**对**DBDCT**诱导细胞氧化损伤（**ROS**）的影响

2μM DBDCT作用于HL02肝细胞时，可引起细胞内ROS的明显升高，导致细胞的氧化损伤；当DBDCT与NAC共同作用于细胞，ROS的表达却明显降低，且随着NAC浓度的升高，ROS的降低愈发明显，呈现明显的量效关系。结果见图3-4，该结果表明NAC可显著抑制DBDCT诱导的细胞内ROS的生成，进而降低其氧化损伤程度。



图3-4 NAC对DBDCT诱导细胞氧化损伤（ROS）的影响

### **3.3** **NAC**对**DB DCT**诱导的**Trx1**氧化应激通路的影响

Western blot检测结果（图3-5）显示DBDCT作用于HL02细胞时，使得Trx1、

DJ1、p-JNK和p-P38的蛋白表达明显升高，但当NAC与DBDCT共同作用时，

使得各项指标的表达有所降低，即抑制了DBDCT诱导的肝细胞毒性，与DBDCT

单独作用相比具有显著性差异，与对照组相比，无显著性差异。但当单独使用

NAC，且浓度为10mM时，p-P38于p-JNK的表达有一定程度升高。其结果表

明，当NAC浓度为5mM时，即可通过参与调控Trx1氧化应激通路，进而抑制

DBDCT诱导的细胞毒性，使得各项指标接近于正常表达值。

**β-actin(40kDa)**

1 2 3 4 5 6



**β-actin(40kDa)**

1 2 3 4 5 6

**TRX1（12kDa）** **DJ1（22kDa）**

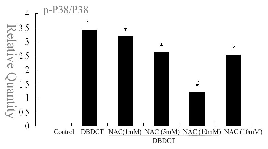


（A） （B）

1 2 3 4 5 6 1 2 3 4 5 6



**JNK p-JNK**



**P38 p-P38**

（C）(D)

图3-5 NAC对DBDCT诱导的Trx1氧化应激通路的影响。(A) Trx1蛋白的Western blot检测结果与量化结果。1-6依次为Control, DBDCT(2μM)，NAC(1 mM) + DBDCT(2μM)，

NAC(5 mM) + DBDCT(2μM); NAC(10 mM) + DBDCT(2μM), NAC(10 mM). (B) DJ1 蛋

白的Western blot 检测结果与量化结果。1-6依次为Control, NAC(1 mM) + DBDCT(2μM)，

NAC(5 mM) + DBDCT(2μM), NAC(10 mM) + DBDCT(2μM), DBDCT(2μM), NAC(10 mM).

（C）JNK蛋白的Western blot检测结果与量化结果。1-6依次为Control, NAC(10 mM), DBDCT(2μM)，NAC(1 mM) + DBDCT(2μM)，NAC(5 mM) + DBDCT(2μM)，NAC(10 mM)

+ DBDCT(2μM). (D) P38蛋白的Western blot检测结果与量化结果。1-6依次为Control，NAC(10mM), DBDCT(2μM)，NAC(1 mM) + DBDCT(2μM)，NAC(5 mM) + DBDCT(2μM)，NAC(10 mM) + DBDCT( 2μM).

## 4、 讨论：

本章第一节研究内容显示DBDCT作用于HL02细胞可引起细胞内ROS的升高，使Trx1蛋白高表达，进而激活由Trx1介导的信号通路，通过Trx1与ASK1之间的相互作用，使得ASK1解离，从而激活ASK1，激活JNK和P38蛋白的磷酸化，引起细胞凋亡。通过上述结果，我们推测DBDCT引起肝细胞毒性的一个重要原因为体内ROS的高表达，那么如果降低ROS的表达水平，是否会降低

DBDCT引起的肝细胞毒性呢？本节采用NAC与DBDCT共同作用于肝细胞以探讨氧化应激在DBDCT的肝毒性作用中发挥的重要作用。

N-乙酰半胱氨酸（NAC）作为一种强有力的抗氧化剂，其自身具有清除自由基的功能，且在进入细胞后去乙酰化生成半胱氨酸，能促进谷胱甘肽（GSH）的合成，进而发挥细胞对抗氧化应激损伤的作用。实验结果显示当DBDCT与一定浓度的NAC作用后，确实使得细胞存活率显著上升，且具有明显的时效与量效关系，同时细胞内的ROS表达水平也明显下降。细胞通路研究结果显示NAC与DBDCT共同作用，可降低Trx1, DJ1蛋白的表达，降低JNK和P38的磷酸化修饰水平。但值得注意的是NAC浓度过高时虽然对细胞的存活率无明显影响，但其在一定程度上仍会影响细胞内部分蛋白表达，如10 mM NAC可使细胞内

ROS一定程度的升高，JNK和P38蛋白发生一定程度的磷酸化修饰。

上述研究结果充分说明DBDCT 引起肝细胞毒性的重要原因为细胞的氧化

应激反应，且是通过由Trx1 蛋白介导的氧化应激通路来实现的，但NAC 与

DBDCT共同作用使得氧化应激水平降低时，会明显降低其毒性。我们推测氧化应激反应是DBDCT引起肝毒性的重要原因，且由于Trx1蛋白含有活性位点巯基，可能与DBDCT结构中的Sn发生相互作用，故Trx1蛋白可能是DBDCT发生肝毒性作用的重要靶蛋白。在后续的研究中，我们将采用RNA干扰技术，CO-IP等技术手段，以证明Trx1在DBDCT肝毒性中发挥的重要作用。

主要结论

（1）大鼠腹腔注射DBDCT，使得锡在体内产生一定的蓄积，即可引起明显的肝毒性，其具体表现为肝脏组织缩小，肝脏系数减小，且肝叶边缘变钝，并伴随着血浆AST，ALT，AKP和ACP各项指标的明显变化。其病理学特征为被膜增生，肝细胞嗜酸性变，核固缩。

（2）肝组织蛋白质组学研究表明DBDCT可引起大鼠体内参与氧化还原/氧化应激，线粒体呼吸链电子传递，酶代谢以及氨基酸合成等生命过程的蛋白发生改变，进而产生肝毒性。

（3）体外研究表明DBDCT可引起正常肝细胞细胞膜破裂，释放LDH，诱导细胞凋亡，周期阻滞以及氧化应激反应，进而引起肝细胞毒性效应。蛋白质组学研究显示众多差异蛋白均参与细胞的氧化应激反应过程，因此氧化应激反应在

DBDCT肝毒性作用中占据重要地位。

（4）DBDCT诱导的肝细胞氧化应激反应主要通过升高胞内自由基水平，激活由Trx1蛋白介导的氧化应激通路，进而导致细胞凋亡与坏死这一作用机制来实现的。抗氧化剂N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)可通过降低胞内ROS表达，影响Trx1介导的氧化应激通路以抵抗DBDCT引起的肝毒性。

（5）Trx1蛋白可用于DBDCT引发肝毒性的早期监测。

参考文献

[1] 、Sotiris K. Hadjikakou, Klaus Jurkschat, Markus Schürmann. Novel organotin(IV) compounds derived from bis(organostannyl) methanes: Synthesis and crystal structuresofbis[diphenyl(pyridin-2-onato) stannyl] methaneand bis[bromophenyl(pyrimidine-2-thionato) stannyl] methane·C7H8. Journal of Organometallic Chemistry. 2006, 691: 1637-1642.

[2] 、吕华东, 林麒. 有机锡污染及其毒性作用研究现状. 海峡预防医学杂志. 2007, 13(3): 27-29.

[3] 、Hideaki IWAI, Motohiro KUROSAWA, Hisao MATSUI, Osamu WADA. Inhibitory Effects of Organotin Compounds on Histamine Release from Rat Serosal Mast Cells. Industrial Health. 1992, 30(2): 77-84

[4] 、Chuan-Ho Tang, Wei-Hsien Wang. Optimization of an analytical method fordetermining organotin compounds in fish tissue by base-hydrolysis pretreatment and simultaneous ethylation–extraction procedures. Analytica Chimica Acta. 2007, 581: 370–376.

[5] 、宋美芳, 李杰. 有机锡的污染及其生殖毒性. 环境与职业医学. 2005, 22(6): 549-551.

[6] 、C. Röhl, M. Grell, E. Maser. The organotin compounds trimethyltin (TMT) and triethyltin (TET) but not tributyltin (TBT) induce activation of microglia co-cultivated with astrocytes. Toxicology in Vitro. 2009, 23: 1541-1547.

[7] 、江桂斌. 国内外有机锡污染研究现状. 卫生研究. 2001, 30(1): 1-3.

[8] 、林春芳, 吕华东. 有机锡的生殖毒性和遗传毒性研究进展. 海峡预防医学杂志. 2008, 14(1): 23-26.

[9] 、陈庆, 张振军, 康维钧, 连靠奇. 三丁基氯化锡对小鼠胸腺细胞凋亡及其Fas蛋白表达的影响. 毒理学杂志. 2007, 21(1): 33-36.

[10] 、段成炬, 侯中林, 许小平. 有机锡T-175的毒性研究. 卫生毒理学杂志. 1991, 5(4): 266-268.

[11] 、王永芳. 有机锡化合物的污染及其毒性. 中国食品卫生杂志. 2003, 15(3):

244-247.

[12] 、Tsuyoshi Nakanishi, Youhei Hiromori, Hideaki Yokoyama, Mihoko Koyanagi, Norio Itoh, Jun-Ichi Nishikawa, Keiichi Tanaka. Organotin compounds enhance 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type I activity in human choriocarcinoma JAr cells: Potential promotion of 17β-estradiol biosynthesis in human placenta. Biochemical pharmacology. 2006, 71: 1349–1357.

[13] 、刘慧刚, 徐立红. 三丁基锡毒性作用生物标记研究进展. 中华预防医学杂志. 2005, 39(4): 288-289.

[14] 、刘红杰, 金若敏, 齐双岩, 梅彩霞, 唐黎明. 薄荷油对大鼠肝组织GSH、ATP酶和原代肝细胞的影响. 中成药. 2008, 30(5): 644-647.

[15] 、 黄静, 任榕娜, 陈新民, 叶礼燕. 抗癫癎药妥泰对幼鼠肝毒性的实验研究. 中国当代儿科杂志. 2007, 9(1): 54-58.

[16] 、熊彦红, 齐双岩, 金若敏, 陈德兴, 黄怡文. 川楝子对大鼠肝毒性的时效和量效关系研究. 江苏中医药. 2008, 40(7): 83-85.

[17] 、Akhilesh Pandey, Matthias Mann. Proteomics to study genes and genomes. Nature. 2000, 405: 837-846.

[18] 、Rosamonde E Banks, Michael J Dunn, Denis F Hochstrasser, Jean-Charles Sanchez, Walter Blackstock, Darryl J Pappin, Peter J Selby. Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities. The Lancet. 2000, 356: 1794-1756.

[19] 、Alan Dove. Proteomics: translating genomics into products NatureBiotechnology. 1999, 17: 233-236.

[20] 、Carlos A. Casiano, Melanie Mediavilla-Varela, Eng M. Tan. Tumor-associated Antigen Arrays for the Serological Diagnosis of Cancer. Molecular & Cellular Proteomics. 2006, 5: 1745-1759.

[21] 、DaoHai Zhang, Lee Kian Tai, Lee Lee Wong, Lily-Lily Chiu, Sunil K. Sethi, Evelyn S. C. Koay. Proteomic Study Reveals That Proteins Involved in Metabolic and Detoxification Pathways Are Highly Expressed in HER-2/neu-positive Breast Cancer. Molecular & Cellular Proteomics. 2005, 4: 1686-1696

[22] 、Xuequn Zhang, Yuanbiao Guo, Yanping Song, Wei Sun, Chaohui Yu,

Xiaohang Zhao, Hongyang Wang, Hongchi Jiang, Youming Li, Xiaohong Qian, Ying Jiang, Fuchu He. Proteomic analysis of individual variation in normal livers of human beings using difference gel electrophoresis. Proteomics. 2006, 6: 5260-5268.

[23] 、Lana A. Cook, Kevin L. Schey, Michael D. Wilcox, Jane Dingus, RebeccaEttling, Troy Nelson, Daniel R. Knapp, John D. Hildebrandt. Proteomic Analysis of Bovine Brain G ProteinγSubunit Processing Heterogeneity. Molecular & Cellular Proteomics. 2006, 5: 671-685.

[24] 、Kun Liu, Lu Qian, Jinglan Wang, Wenrui Li, Xinyu Deng, Xilin Chen, Wei Sun, Handong Wei, Xiaohong Qian, Ying Jiang, Fuchu He. Two-dimensional Blue Native/SDS-PAGE Analysis Reveals Heat Shock Protein Chaperone Machinery Involved in Hepatitis B Virus Production in HepG2.2.15 Cells. Molecular & Cellular Proteomics. 2009, 8(3): 495-505.

[25] 、Robert L. Caldwell, Richard M. Caprioli. Tissue Profiling by MassSpectrometry. Molecular & Cellular Proteomics. 2005, 4: 394-401.

[26] 、Yanping Song, Yunwei Hao, Aihua Sun, Tao Li, Wenrui Li, Lihai Guo, Yujuan Yan, Chao Geng, Ning Chen, Fan Zhong, Handong Wei, Ying Jiang, Fuchu He. Sample preparation project for the subcellular proteome of mouse liver. Proteomics. 2006, 6: 5269-5277.

[27] 、Ning Chen, Wei Sun, Xinyu Deng, Yunwei Hao, Xilin Chen, Baocai Xing, Wei Jia, Jie Ma, Handong Wei, Yunping Zhu, Xiaohong Qian, Ying Jiang, Fuchu He. Quantitative proteome analysis of HCC cell lines with different metastatic potentials by SILAC. Proteomics. 2008, 8: 5108-5118.

[28] 、王莹. 利用蛋白质组学技术研究Z24的肝毒性作用机制. [博士学位论文]. 北京: 军事医学科学院. 2008年.

[29] 、杨保华. 利用基因组学和蛋白质组学技术研究纳米铜的肝、肾毒性及作用机制. [博士学位论文]. 北京: 军事医学科学院. 2010年.

[30] 、徐乃玉. 香烟烟雾与氡染毒致大鼠肺损伤的蛋白质组学研究. [博士学位论文]. 江苏: 苏州大学. 2008年.

[31] 、黄伟华, 朱晨光, 李明. 原子荧光光谱法测定尿中汞. 工业卫生与职业

病. 2007, 33(5): 315-316.

[32] 、袁百利, 陈爱国. 原子荧光光谱法测定人血、尿中锡. 中国卫生检验杂志. 2004, 14(2): 211-212.

[33] 、Yongke Lu, Arthur I. Cederbaum. Cisplatin-Induced Hepatotoxicity Is Enhanced by Elevated Expression of Cytochrome P450 2E1. Toxicological Sciences. 2006, 89(2): 515-523.

[34] 、Mohammad A. Eghbal, Peter S. Pennefather, Peter J. O'Brien. H2Scytotoxicity mechanisminvolvesreactiveoxygenspeciesformationand mitochondrial depolarization. Toxicology. 2004, 203: 69-76.

[35] 、W. G. Nichols, H. M. Steel, T. Bonny, K. Adkison, L. Curtis, J. Millard, K. Kabeya, N. Clumeck. Hepatotoxicity Observed in Clinical Trials of Aplaviroc (GW873140). Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2008, 53(3): 858-865.

[36] 、María Eugenia Letelier, Ana María Lepe, Mario Faúndez, Julia Salazar, Rigoberto Marín, Paula Aracena, Hernán Speisky. Possible mechanisms underlying copper-induced damage in biological membranes leading to cellular toxicity. Chemico-Biological Interactions. 2005, 151: 71-82.

[37] 、王慧香.. 蛋白质组学方法筛选卵巢癌顺铂化疗耐药分子靶标及14-3-3ζ 蛋白的鉴定. [博士学位论文]. 吉林: 吉林大学. 2007 年

[38] 、江晓华. 多烯紫杉醇对人肝癌细胞系HepG2蛋白质组影响的体外实验研究. [博士学位论文]. 湖南: 中南大学. 2006年.

[39] 、米薇. 蛋白质组学相关技术及其在正常人肝组织及肝癌研究中的应用. [博士学位论文]. 北京: 军事医学科学院. 2008年.

[40] 、 Kamelia M. Osman, Mona M. Ali, Moustafa I. Radwan, Hyoung Kyu Kim, Jin Han. Comparative proteomic analysis on Salmonella Gallinarum and Salmonella Enteritidis exploring proteins that may incorporate host adaptation in poultry. Journal of Proteomics. 2009, 72: 815- 821.

[41] 、Zhi Wang, Lu Jiang, Canhua Huang, Zhengyu Li, Lijuan Chen, Lantu Gou, Ping Chen, Aiping Tong, Minghai Tang, Feng Gao, Jun Shen, Yuanyuan Zhang,

Jingping Bai, Min Zhou, Di Miao, Qianming Chen. Comparative Proteomics Approach to Screening of Potential Diagnostic and Therapeutic Targets for Oral Squamous Cell Carcinoma. Molecular & Cellular Proteomics. 2008, 1639-1690.

[42] 、蔡群芳, 邬强. 谷胱甘肽转移酶的研究进展. 海南医学院学报. 2011, 17(12): 1735-1738.

[43] 、Nüvit Gönül, Ela Kadioglu, Neslihan Aygün Kocaba, MesutÖzkaya, Ali Esat Karakaya, Bensu Karahalil. The role of GSTM1, GSTT1, GSTP1, and OGG1 polymorphisms in type 2 diabetes mellitus risk: A case–control study in a Turkish population. Gene. 2012, 505(1): 121-127.

[44] 、Huiru Yan, Fei Meng, Haihong Jia, Xingqi Guo, Baohua Xu. Theidentification and oxidative stress response of a zeta class glutathione S-transferase (GSTZ1) gene from Apis cerana cerana. Journal of Insect Physiology. 2012, 58(6): 782-791.

[45] 、双宝, 韩英鹏, 李明, 李文滨. 真核细胞翻译起始因子5A(elF5A)研究进展. 东北农业大学学报. 2010, 41 (8): 156-160.

[46、Muhammad Ishfaq, Kazuhiro Maeta, Satoko Maeda, Toru Natsume, Akihiro Ito, Minoru Yoshida. Acetylation regulates subcellular localization of eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A). FEBS Letters. 2012, 586(19): 3236-3241.

[47、Maria M. Simile, Gabriella Pagnan, Fabio Pastorino, Chiara Brignole, Maria R. De Miglio, Maria R. Muroni, Giuseppina Asara, Maddalena Frau, Maria A. Seddaiu, Diego F. Calvisi, Francesco Feo, Mirco Ponzoni, Rosa M. Pascale. Chemopreventive *N*-(4-hydroxyphenyl) retinamide (fenretinide) targets deregulated *NF-κB* and *Mat1A* genes in the early stages of rat liver carcinogenesis. Carcinogenesis. 2005, 26(2): 417-427.

[48、Hartmut Jaeschke, Gregory J. Gores, Arthur I. Cederbaum, Jack A. Hinson, Dominique Pessayre, John J. Lemasters. Mechanisms ofHepatotoxicity. Toxicological Science. 2002, 65: 166 -176.

[49、Hossein Niknahad, Peter J. O'Brien. Mechanism of sulfite cytotoxicity inisolated rat hepatocytes. Chemico-Biological Interactions. 2008, 174: 147-154.

[50、D. Truong, W. Hindmarsh, P. J. O'Brien. The molecular mechanisms of diallyl disulfide and diallyl sulfide induced hepatocyte cytotoxicity. Chemico-Biological Interactions. 2009, 180: 79-88.

[51、Ignazio Grattagliano, Leonilde Bonfrate, Catia V Diogo, Helen H Wang, David QH Wang, Piero Portincasa. Biochemical mechanisms in drug-induced liver injury: Certainties and doubts. World Journal of Gastroenterology. 2009, 15(39): 4865-4876.

[52] 、杨惠娟. 锰对心肌细胞钙稳态、活性氧以及细胞凋亡的作用机制研究. [博士学位论文]. 浙江: 浙江大学. 2007年.

[5] 3、G. Feldmann. ApoptosehépatiqueLiverapoptosis. EMC-Hépato-Gastroentérologie. 2005, 2: 35-48.

[54] 、Seda Yalçınkaya, M. D., Yes¸imÜnlüçerçi, M. D., Murat Giris, M. S., Vakur Olga, Ph. D., Semra Dog˘ru-Abbasog˘lu, M. D., Ph. D., Müjdat Uysal, M. D. Oxidative and nitrosative stress and apoptosis in the liver of rats fed on high methionine diet: Protective effect of taurine. Nutrition. 2009, 25: 436-444.

[55] 、Dan Weng, Yan Lu, Yinna Wei, Ying Liu, Pingping Shen. The role of ROS inmicrocystin-LR-induced hepatocyte apoptosis and liver injury in mice. Toxicology. 2007, 232: 15-23.

[56] 、朱克修, 李玢, 于翠革, 曹亚莉, 王佳, 韩晓兵. 顺铂作用于宫颈癌

HeLa 细胞致细胞周期调节因子变化及对细胞周期的阻滞作用. 第四军医大

学学报. 2009, 30(5): 416-419.

[57] 、Lei Guo, Zhi-Song Li, Hong-Ling Wang, Cai-Ying Ye, De-Chang Zhang. Carboxyamido-triazole inhibits proliferation of human breast cancer cells via G2/M cell cycle arrest and apoptosis. European Journal of Pharmacology. 2006, 538: 15-22.

[58] 、Yee-Man Lee, Choi-Man Ting, Yuen-Kit Cheng, Tai-Ping Fan, RickyNgok-Shun Wong, Maria Li Lung, Nai-Ki Mak. Mechanisms of 2-methoxyestradiol-induced apoptosis and G2/M cell-cycle arrest of nasopharyngeal carcinoma cells. Cancer Letters. 2008, 268: 295-307.

[59] 、M. F. Sánchez-Font, J. Sebastià, C. Sanfeliu, R. Cristòfol, G. Marfany, R. Gonzàlez-Duarte. Peroxiredoxin 2 (PRDX2), an antioxidant enzyme, is under-expressed in Down syndrome fetal brains. Cell. Mol. Life Sci. 2003, 60: 1513-1523.

[60] 、Stephanie M. Bozonet, Victoria J. Findlay, Alison M. Day, Jannine Cameron, Elizabeth A. Veal, Brian A. Morgan. Oxidation of a Eukaryotic 2-Cys Peroxiredoxin Is a Molecular Switch Controlling the Transcriptional Response to Increasing Levels of Hydrogen Peroxide. The Journal of Biological Chemistry. 2005, 280(24): 23319-23327.

[61] 、章波, 向渝梅, 白云. 抗氧化蛋白Peroxiredoxin家族研究进展. 生理科学进展. 2004, 35(4): 352-355.

[62] 、Felicia M. Low, Mark B. Hampton, Alexander V. Peskin and Christine C. Winterbourn. Peroxiredoxin 2 functions as a noncatalytic scavenger of low-level hydrogen peroxide in the erythrocyte. Blood. 2007, 109: 2611-2617.

[63] 、Steven Alexander Watt, Verena Tellström, Thomas Patschkowski, KarstenNiehaus. Identification of the bacterial superoxide dismutase (SodM) as plant-inducible elicitor of an oxidative burst reaction in tobacco cell suspension cultures. Journal of Biotechnology. 2006, 126: 78-86.

[64] 、Priscilla L. K. Lim, Jianchao Liu, Mei L. Go, Urs A. Boelsterl. TheMitochondrial Superoxide/Thioredoxin-2/Ask1 Signaling Pathway is Critically Involved in Troglitazone-Induced Cell Injury to Human Hepatocytes. Toxicological Sciences. 2008, 101(2): 341-349.

[65] 、Go Fujino, Takuya Noguchi, Kohsuke Takeda, Hidenori Ichijo. Thioredoxinand protein kinases in redox signaling. Seminars in Cancer Biology. 2006, 16: 427-435.

[66] 、Arne Holmgren, Jun Lu. Thioredoxin and thioredoxin reductase: Currentresearch with special reference to human disease. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2010, 396: 120-124.

[67] 、Walter H. Watson, Xianmei Yang, Young Eun Choi, Dean P. Jones, James P.

Kehrer. Thioredoxin and Its Role in Toxicology. Toxicological Sciences. 2004, 78: 3-14.

[68] 、Masatoshi Inden, Takahiro Taira, Yoshihisa Kitamura, Takashi Yanagida, Daiju Tsuchiya, Kazuyuki Takata, Daijiro Yanagisawa, Kaneyasu Nishimura, Takashi Taniguchi, Yoshiaki Kiso, Kanji Yoshimoto, Tomohiro Agatsuma, Shizuyo Koide-Yoshida, Sanae M. M. Iguchi-Ariga, Shun Shimohama, Hiroyoshi Ariga. PARK7 DJ-1 protects against degeneration of nigral dopaminergic neurons in Parkinson's disease rat model. Neurobiology of Disease. 2006, 24: 144-158.

[69] 、Pablo R. Castello, Dong Kyun Woo, Kerri Ball, Jay Wojcik, Laura Liu, andRobert O. Poyton. Oxygen-regulated isoforms of cytochrome c oxidase have differential effects on its nitric oxide production and on hypoxic signaling. PNAS. 2008, 105(24): 8203-8208.

[70] 、Lukas STIBUREK, Katerina VESELA, Hana HANSIKOVA, Petr PECINA, Marketa TESAROVA, Leona CERNA, Josef HOUSTEK, Jiri ZEMAN. Tissue-specific cytochrome c oxidase assembly defects due to mutations in SCO2 and SURF1. Biochem. J. 2005, 392: 625-632.

[71] 、P. Štefanková, M. Kollárová, I. Barák. Thioredoxin–Structuraland

Functional Complexity. Gen. Physiol. Biophys. 2005, 24: 3-11.

72、PIETRO GHEZZI, VALENTINA BONETTO, MADDALENA FRATELLI.

Thiol–Disulfide Balance: From the Concept of Oxidative Stress to that of Redox Regulation. Antioxidants & Redox signaling. 2005, 7(7): 964-972.

[73] 、Ekambaram Padmini, Munuswamy Usha Rani. Thioredoxin and HSP90 αmodulate ASK1–JNK1/2 signaling in stressed hepatocytes of Mugil cephalus. Comparative Biochemi stry and Physiology, Part C. 2010, 151: 187-193.

[74] 、Philipp J. Kahle, Jens Waak, Thomas Gasser. DJ-1 and prevention ofoxidative stress in Parkinson's disease and other age-related disorders. Free Radical Biology & Medicine. 2009, 47: 1354-1361.

[75] 、Joo-Young Im, Kang-Woo Lee, Eunsung Junn, M. Maral Mouradian. DJ-1protects against oxidative damage by regulating the thioredoxin/ASK1 complex. Neuroscience Research. 2010, 67: 203-208.

[76] 、李彩丽, 魏虎来, 苏海翔. NAC拮抗As2O3对外周血淋巴细胞的毒性作用. 中国药理学通报. 2011, 27(1): 95-98.

77、华政哲, 张子韬, 张宁, 胡志毅, 蔡卫华, 殷国勇. JNK抑制剂及NAC对氧糖剥离后复氧复糖所致脊髓神经元损伤的保护作用. 南京医科大学学报自然科学版. 2011, 31(8): 1106-1109.

## 英文缩略词

**英文缩写 中文全称**

[DB] DCT二-(4-氯苯甲酰异羟肟酸)二正丁基合锡

ALT 谷丙转氨酶

AST 谷草转氨酶

ACP 酸性磷酸酶

AKP 碱性磷酸酶

HE 苏木素伊红

2-DE-MS双向凝胶电泳-质谱

CHAPS 3-[3-（胆酰胺丙基）二甲铵基]丙磺酸内盐

DTT 二硫苏糖醇

TEMED N，N-四甲基二乙胺

SDS十二烷基磺酸钠

Tris三羟甲基氨基甲烷

PMSF苯甲基磺酰氯

IPG 固定 pH 梯度

Gly 甘氨酸

CBB考马斯亮蓝

APS过硫酸胺

EDTA乙二胺四乙酸

SDS-PAGE十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳

TFA三氟乙酸

MALDI-TOF/MS基质辅助激光解析/电离飞行时间质谱

PMF 肽指纹图谱

GST谷胱甘肽S-转移酶

LDH 乳酸脱氢酶

FCM 流式细胞术

ROS 活性氧

WB 蛋白免疫印迹

PCR多聚酶链式反应

GAPDH 3-磷酸甘油醛脱氢酶

Trx1硫氧还蛋白 1

ASK1细胞凋亡信号调节激酶

PARK7蛋白DJ1

NAC N-乙酰半胱氨酸

GSH谷胱甘肽

**综述**

**蛋白质组学的研究进展及其应用**

蛋白质组学(proteomics)是一门以蛋白质组为研究对象，在蛋白质水平上定量、动态、整体性地研究生物体内所有蛋白质及其动态变化规律的科学，是继基因组学和转录组学后迅速发展起来的一门新兴组学方法。其抛弃了传统分割式研究单个蛋白质的初级模式，建立起细胞或组织中全部蛋白质表达情况的高通量、快速的系统分析模式，以其特独的研究角度和技术优势被广泛地应用于生命科学研究的各个领域，成为各科的研究热点，并广泛应用于生命科学的各个领域[1-5]。

**1、蛋白质组学概述：**

生命科学研究的核心问题是研究生命现象的过程及其变化规律，解释疾病发生的原因并用于指导诊断与治疗疾病。基因作为遗传信息的载体，可以视为生命活动的内在因素，推动生命一代一代地稳定且适应环境变化地延续下去。基因的发现是生命科学的伟大里程碑。然而，生物体是一个协调的整体，单个基因不能反映正确的整体信息。因此，系统生物学概念应运而生[6,7]。系统生物学是研究一个生物系统中所有组成成分（基因、mRNA、蛋白质等）的构成，以及在特定条件下这些组成成分之间相互关系的学科，目的是通过对细胞内所有成分间的相互作用进行量化的描述，以达到在系统水平上理解这些相互作用的目的[8,9]。其主要由以下四个板块组成，即基因组学（Genome），转录组学

（Transcriptome），蛋白质组学（Proteome）和代谢组学（Metabolome），分别研究基因，mRNA，蛋白质以及内源性物质的的表达及其相互作用。伴随着人类基因组计划的实施与推进，生命科学研究进入后基因组时代，研究重点从遗传信息转到分子整体水平对功能的研究[10-12]，蛋白质组学随之兴起。

传统的关于蛋白质的研究主要集中在单个蛋白质的结构与功能研究，但由于蛋白质结构多变且各异，分离纯化不易，易失活，技术上存在困难，所以长

期以来发展步子不大。1994年，澳大利亚Macquarie大学Marc Wilkins和Keith

Williams等首次提出蛋白质组(Proteome)这一概念，即一个细胞或组织或体液所表达的所有蛋白质[13]。蛋白质组学则是在大规模水平上研究蛋白质的特征，包括蛋白质的表达水平，翻译后的修饰，蛋白与蛋白相互作用等，由此获得蛋白质水平上的关于疾病发生，细胞代谢等过程的整体而全面的认识。同时蛋白质组学直接定位于蛋白质水平，是对特定时间或特定环境条件下，细胞内完整表达状况的研究，可以从整体，动态，定量的角度去研究基因的功能，是后基因组计划的一个重要组成部分。该技术通过动态描述基因调节、对基因表达的蛋白质水平进行定量的测定、鉴定疾病、药物对生命过程的影响，并解释基因表达调控的机制，阐明生物体内全部蛋白质的表达模式和功能模式，包括蛋白质的表达与存在方式（修饰方式），结构与功能，以及各个蛋白质之间相互作用

[14-17]。

2001年，国际人类蛋白质组组织（HUPO）正式成立.，“人类蛋白质组计划

HPP“正式提出。在中国，中国科学院上海生物化学研究所、中国军事医学科学院、湖南师范大学、中南大学湘雅医学院等单位相继开展了蛋白质组学研究工作，其中以贺福初院士带领的北京蛋白质组学研究中心/蛋白质组学国家重点实验室的研究成果最为突出，在《分子与细胞蛋白质组学（Molecular ＆Cellular

Proteomics）》上发表多篇文章。

**2、蛋白质组学的研究内容及方法：**

蛋白质组学的研究内容主要包括以下内容：①Cataloguing proteomics：旨在寻找存在于细胞、胞器及其组织中的所有蛋白质，即“人类蛋白质组计划”，其中“人类肝脏蛋白质组计划”即由中国牵头的重大国际计划贺福初院士为该计划的执行主席；②Expression proteomics：主要目的为分析蛋白的表达差别，寻找疾病、药物干预下蛋白质的变化，从而寻找差异蛋白；③Functional proteomics：研究蛋白质的翻译后修饰，蛋白与蛋白之间的相互作用以及蛋白序列与功能等内容，通过研究差异蛋白及其功能，可为新药研究提供靶点依据，同时通过蛋白相互作用的研究，揭示疾病发生的原因与药物作用机制等方面的内容。目前，

表达蛋白质组学（Expression proteomics）仍是研究的重点，其对寻找疾病诊断

标志、筛选药物靶点、毒理学研究等具有重要作用。

目前蛋白质组学研究的技术策略主要有两种：一是“Top-Down Proteomics法，即蛋白质组学样品在蛋白水平分离后直接检测，获得样品的蛋白组成信息，该技术主要以2-DE（Two-dimensional Protein Electrophoresis）和质谱技术为核心；二是”Bottom-Up Proteomics“法，是以质谱技术为核心，即蛋白样品首先酶解成肽段混合物后，开发质谱鸟枪法(Shot-gun)、毛细管电泳-质谱联用(CE-MS)等新策略直接鉴定全蛋白质组混合酶解产物[18]。

基于2-DE技术的蛋白质组学的基本研究体系为蛋白质组的样品制备→2-DE样品分离→蛋白凝胶的图像分析→蛋白质点的提取及鉴定→生物信息学分析→蛋白质的功能分析[19, 20]。

蛋白样品制备技术是蛋白质组学中非常关键的技术，直接影响着最终的实验结果。蛋白质样品制备是指应用多种技术，根据不同的物化原理，提取蛋白样品为下游实验和分析做准备。蛋白样本制备过程需遵守以下原则，即所有待分析的蛋白样品全部处于溶解状态、防止样品在聚焦时发生聚集和沉淀、防止样品抽提后的修饰或降解、除去样品中的干扰因子等。常规的制备技术包括组织细胞的破碎、蛋白质溶解裂解、破坏分子间作用力、变性及还原、蛋白质的浓缩和沉淀、去除非蛋白组分、蛋白质的快速定量等内容[21-23]。

Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis（2-DE），即二维聚丙烯酰胺凝胶电泳，是目前应用最为广泛蛋白质组学分离技术，其基本原理是根据蛋白质的等电点和分子质量的差异，分别进行第一向等电聚焦（isoelectric

focusing, IEF）和第二向十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）, 将不同的蛋白质在胶块上分离开来。分离后的蛋白质点经考马斯亮蓝染色、银染、荧光染色或同位素标记等显色后，可用图像扫描仪和荧光测定仪等建立双向凝胶电泳图谱并进行图像分析[24, 25]。近年来，基于传统2-DE技术的荧光差异双向凝胶电泳(fluorescence two-dimensionaldifferential gel electrophoresis, DIGE)技术由于其上样量低、灵敏度高、重复性好的优点已被广泛应用。该技术将不

同的蛋白样品分别用电荷和分子量匹配的荧光标记物予以标记，由于不同荧光标记物具有各自的激发波长，因此，它们所标记的标本可通过不同的滤光片在同一块胶中记录下互不干扰的胶图结果。该技术具有分辨率高，重现性好，动态范围宽等特点，可检测蛋白丰度微小的变化，也可检测蛋白翻译后修饰[26-28].2-DE广泛应用于检测正常和非正常生长分化中，如癌症发生中的蛋白表达的变化，确定诱导剂、药物、激素处理、外界刺激、营养变化引起的特定蛋白的变化，分析人、动物、植物、微生物组织和细胞的性质等。

蛋白质鉴定技术主要有质谱分析、Edman法、C-或N-末端氨基酸序列分析及氨基酸组成分析等。其中，基于2-DE技术的质谱鉴定技术，由于其高灵敏度，快速准确，易实现自动化，已成为蛋白质组学研究中重要的蛋白质鉴定技术。基质辅助激光解析/电离飞行时间质谱（MALDI-TOF-MS）和电喷雾离子串联质谱（ESI-MS-MS）是目前应用最广泛的质谱，分别通过得到酶解肽段的分子量，获得蛋白质的肽质量指纹图谱和进行肽的测序，得到肽段的氨基酸序列，进行数据库检索来实现蛋白质的鉴定[20, 30]。

由于2-DE技术的繁琐、不稳定和低灵敏度，目前发展了许多基于质谱技术的研究方法，如多维液相色谱技术（Multi-dimensional liquid Chromatography），同位素编码亲和标签法（Isotope-coded affinity tag, ICAT），Absolute Quantification (AQUA), Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture（SILAC）技术，蛋白质芯片等[31-34]。

Multi-dimensional liquid Chromatography技术是将蛋白样本消化为肽断后，进行多维的液相色谱分离，进而完成质谱鉴定工作。该技术样品用样量较少，且可检测低丰度蛋白，可检测所有分子量的蛋白，可实现自动化分析，但该技术不能对蛋白进行定量。ICAT技术是一种基于MS的可以同时对蛋白质进行定性与定量研究的技术，用氘代和无氘代的亲和标签与蛋白样品中的胱氨酸结合，经亲和色谱分离标记肽段，直接通过MALDI-TOF MS或LC-MS/MS进行蛋白质的差异定量分析。ICAT技术广泛兼容各种条件下的蛋白质，即使在盐，去垢剂，稳定剂（SDS，尿素）等存在下也可以进行标记胱氨酸，方法简单，且对分

离方法兼容性好，但由于ICAT 是个大修饰物，无法分析不含胱氨酸的蛋白质。

SILAC技术则是用天然同位素（轻型）或稳定同位素（重型）标记的必需氨基酸取代细胞培养基中相应氨基酸，细胞经5-6个倍增周期后，稳定同位素标记的氨基酸完全掺入到细胞新合成的蛋白质中替代了原有氨基酸。不同标记细胞的裂解蛋白按细胞数或蛋白量等比例混合，经分离、纯化后进行质谱鉴定。SILAC为体内标记技术，稳定同位素标记的氨基酸与天然氨基酸化学性质基本相同，对细胞无毒性，活体标记，更接近样品真实状态，因而它所标记的细胞和未标记细胞在生物学行为上几乎没有差异，标记效率可高达100％；与化学标记相比，

SILAC方法蛋白需要量明显减少且不需要化学处理及其纯化等过程[35]；以13C to 12C-Arg-labeled的肽段进行定量；但只局限于细胞以及酵母、细菌等小型有机体。蛋白质芯片（protein chip）是另外一种蛋白质组学常用的鉴定技术，包括抗体芯片和化学表面芯片，检测时无需进行蛋白质分离，只利用芯片上不同类型的亲和探针即可进行检测，可同时检测几千种蛋白质，效率非常高[36]。

**3、蛋白质组学的应用**

蛋白质组学技术能够系统的研究机体生理与病理条件下的蛋白质表达图谱，从而实现对机体代谢，调控等生物功能的动态监测过程。在分子水平进行疾病的早期诊断、治疗研究，寻找疾病的特异分子标记物，探讨某些重大疾病产生的生理、病理过程和机制，为环境毒理学以及新药开发提与供重要的价值。

蛋白质组学可用于揭示物种的全蛋白表达图谱，研究物种的发生发展过程并对指导实际生产与临床疾病的发生发展具有重要意义[37, 38]。目前已有大量研究集中在植物蛋白质组学与微生物蛋白质组学领域。通过研究具有一定生物活性的药用植物的全蛋白表达，可为新药的开发提供药物靶点依据。对微生物如结核分支杆菌，幽门螺杆菌及伤寒沙门氏菌进行蛋白质组学研究，可为临床诊断，治疗以及新药开发提供重要依据。

蛋白质组学同样广泛应用于毒理学，临床诊断与治疗中。运用蛋白质组的研究手段比较正常状态和病理状态的细胞或组织中蛋白质的表达数量、表达位置和修饰状态上的差异，可发现与病理改变有关的蛋白质和疾病特异性蛋白质，

这些差异蛋白即可作为中毒早期以及疾病诊断的分子标记，还可作为治疗和药物开发的靶点。目前蛋白质组学已广泛应用于肿瘤的早期诊断与监控以及心血管疾病发生的靶标等领域中[39-43]。

目前，蛋白质组学是研究疾病病理学机制的重要手段。通过比较蛋白质组学技术研究健康人群与疾病人群病理组织的蛋白表达差异，进而研究其基因表达水平来检测疾病发生时基因突变和基因的多态性。该研究方法可为疾病的合理治疗提供极为有价值的依据。研究组织与血浆中蛋白的分布与特征，可为临床快速诊断提供研究依据与检测靶点。蛋白质组学技术已广泛应用于肿瘤，心脏疾病，传染性疾病等研究领域。例如利用蛋白质组学技术研究特异性的抗原和肿瘤标志物，用于肿瘤的诊断，治疗和预后等。近年来，蛋白质组学技术也逐渐应用于研究肿瘤发生的分子机制及其肿瘤发生发展的进程研究中。目前，大多数的肿瘤标志物是通过蛋白质组学技术研究发现的。同时，蛋白质组学可通过使用复合性的抗体研究蛋白质的翻译与修饰，如研究蛋白质的磷酸化，糖基化，羰基化等。

与此同时，蛋白质组学已广泛用于药物开发领域。通过对已知药物治疗前后病理组织的蛋白质组进行比较分析，不仅可以评价和确定药物发挥作用的

“可能的靶分子”，加快药物靶点的认定，减少后续工作的盲目性，加速先导化合物的筛选与优化，同时，通过发生损伤的组织器官与正常组织器官之间的蛋白质组比较，还有利于阐明药物的分子药理，构建更为合理的筛选模型[44, 45]。药物发挥药效主要是通过上调或下调特异性的疾病病理机制中的靶蛋白来实现的，前期的药物开发研究主要集中于研究人类疾病的基因，进而开发合理的药物，伴随着蛋白质组学技术的广泛应用，现已将研究重心转移至药物的药效学以及毒理学的作用靶蛋白方面，通过研究疾病发生发展的蛋白变化，通过计算机辅助药物设计软件进行药物合理设计，进而合成，并针对靶蛋白进行活性筛选以选择高活性低毒性的新型化合物。

**4、蛋白质组学在肝毒性研究中的应用**

肝脏是人体内以代谢功能为主的一个重要器官，参与外来物质的代谢与解

毒等过程，是机体内多种酶与信息调控分子发挥调控作用的场所。大多数物质在肝脏发生氧化、还原、水解与聚合等多种代谢过程，从而在全身发挥各种效应。因此，肝脏是最容易发生毒性损伤的器官，因此肝脏成为毒理学研究领域的一个重要毒性靶器官。传统的毒理学研究方法主要通常构建动物染毒模型，以血浆生化指标以及组织病理学检测结果作为毒性检测的终点，来阐明化合物的毒性作用。但毒性检测指标较多，且各项指标均可提示多种毒性机制，不能特异性的肝脏毒性效应，因此其灵敏性和特异性较低。

毒理蛋白质组学可通过比较特定细胞、组织或器官在毒物作用前后的蛋白质表达谱的变化，在短时间内筛选出与毒物作用相关的特征性表达蛋白。蛋白质组学技术采用高通量的分离技术和高效率的鉴定技术，可在整体水平上对蛋白进行大规模的分析，进而筛选出与毒物相关的特征性表达蛋白。蛋白质组学技术比传统肝毒性研究方法使用的毒物剂量更低、时间更短，且发现的候选毒性标志物较多，更能够发现某些毒性损伤后消失或出现的全新结构的蛋白毒性标志物，这些标志物通常更为灵敏、预测性更强。这些差异蛋白则代表着毒物引起毒性损伤的作用分子，进而通过抗体分析技术，如Western blot蛋白免疫印迹，酶联免疫技术，可快速的检测毒性蛋白标志物，利用这些标志物能够早期检测毒性损伤，实现在安全剂量下进行人体作用机制的研究。与此同时，蛋白质组学可为构建合理的毒性研究模型提供依据。目前蛋白质组学技术已广泛应用于肝毒性标志物的筛选，肝脏毒性作用机制，肝脏毒性的预测以及毒性数据库的建立等方面。

综上所述，蛋白质组学克服了基因组学研究的局限性，以其特殊性，多样性和动态性广泛应用于生命科学研究的各个领域，为物种的进化，疾病的发生与发展，毒理学以及新型药物靶分子的设计提供了重要依据与指导价值。

参考文献

[1] 、陈天池. 消痰散结方干预胃癌裸鼠模型的蛋白质组学研究. [博士学位论文]. 上海： 第二军医大学. 2010年.

[2] 、赵改霞. 葡萄子原花青素抗再灌注性心律失常作用的比较蛋白质组学研究. [博士学位论文] 。 ft东： ft东大学. 2010年.

[3] 、Akhilesh Pandey, Matthias Mann. Proteomics to study genes and genomes. Nature. 2000, 405: 837-846.

[4] 、Rosamonde E Banks, Michael J Dunn, Denis F Hochstrasser, Jean-Charles Sanchezc, Walter Blackstock, Darryl J Pappin, Peter J Selby. Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities. The Lancet. 2000, 356: 1794-1756.

[5] 、AlanDove. Proteomics: translatinggenomicsintoproductsatureBiotechnology. 1999, 17: 233-236.

[6] 、Hiroaki Kitano. Systems Biology: A Brief Overview. Science. 2002, 295(5560): 1662-1664.

[7] 、Leroy Hood, James R. Heath, Michael E. Phelps, Biaoyang Lin. Systems Biology and New Technologies Enable Predictive and Preventative Medicine. Science. 2004, 306(5696): 640-643.

[8] 、Andrea D. Weston, Leroy Hood. Systems Biology, Proteomics, and the Future ofHealth Care: Toward Predictive, Preventative, and Personalized Medicine. Journal of Proteome Research. 2004, 3 (2): 179-196.

[9] 、 Kunal Aggarwal, Kelvin H. Lee. Functional genomics and proteomics as afoundationforsystemsbiology. BriefingsinFunctionalGenomicsand Proteomics. 2003, 2 (3): 175-184.

[10] 、张华. 微量元素、抗氧化酶与差异蛋白质组学在吸烟相关早期喉鳞状细胞癌发病机制中的初步研究. [博士学位论文] 。ft东： ft东大学. 2012年.

[11] 、杨树广. 蛋白质组学和代谢组学技术筛选颅脑损伤促进骨折愈合的关键分子. [博士学位论文]. 北京: 军事医学科学院. 2012年.

[12] 、Gregory C. Adam, Benjamin F. Cravatt, Erik J. Sorensen. Profiling the speci¢c reactivity of the proteome with non-directed activity-based probes. Chemistry & Biology. 2001, 8: 81-95.

[13] 、张渊. 非小细胞肺癌患者尿液中潜在生物标志物的研究. [博士学位论文]. 重庆： 重庆医科大学. 2011年.

[14] 、Carlos A. Casiano, Melanie Mediavilla-Varela, Eng M. Tan. Tumor-associated Antigen Arrays for the Serological Diagnosis of Cancer. Molecular & Cellular Proteomics. 2006, 5: 1745-1759.

[15] 、DaoHai Zhang, Lee Kian Tai, Lee Lee Wong, Lily-Lily Chiu, Sunil K. Sethi, Evelyn S. C. Koay. Proteomic Study Reveals That Proteins Involved in Metabolic and Detoxification Pathways Are Highly Expressed in HER-2/neu-positive Breast Cancer. Molecular & Cellular Proteomics. 2005, 4: 1686-1696

[16] 、Xuequn Zhang, Yuanbiao Guo, Yanping Song, Wei Sun1, ChaohuiYu, Xiaohang Zhao, Hongyang Wang, Hongchi Jiang, Youming Li, Xiaohong Qian, Ying Jiang, Fuchu He. Proteomic analysis of individual variation in normal livers of human beings using difference gel electrophoresis. Proteomics. 2006, 6: 5260-5268.

[17] 、Lana A. Cook, Kevin L. Schey, Michael D. Wilcox, Jane Dingus, RebeccaEttling, Troy Nelson, Daniel R. Knapp, John D. Hildebrandt. Proteomic Analysis of Bovine Brain G ProteinγSubunit Processing Heterogeneity. Molecular & Cellular Proteomics. 2006, 5: 671-685.

[18] 、徐乃玉. 香烟烟雾与氡染毒致大鼠肺损伤的蛋白质组学研究. [博士学位

论文]。 江苏：苏州大学. 2008年.

[19] 、Angelika Görg, Walter Weiss, Michael J. Dunn. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. Proteomics. 2004, 4(12): 3665-3685.

[20] 、Thierry Rabilloud, Mireille Chevallet, Sylvie Luche, Cécile Lelong. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. Journal of Proteomics. 2010, 73(11): 2064-2077.

[21] 、 Guillaume Rigaut, Anna Shevchenko, Berthold Rutz, Matthias Wilm, Matthias Mann1, Bertrand Séraphin. A generic protein purification method for

Protein complex characterization and proteome exploration. Nature Biotechnology. 1999, 17: 1030-1032.

[22] 、孙丽翠, 胡家, 郑君芳, 苏雷, 贺俊崎. 几种不同提取方法对Hela细胞总蛋白双向电泳结果的影响. 首都医科大学学报. 2008, 29(4)： 451-454.

[23] 、李红梅, 陈丽, 夏高晓, 赵明哲, 胡水旺, 姜勇. 小鼠肝脏细胞质膜蛋白质组的提取和二维液相色谱分离. 南方医科大学学报. 2008, 28(11): 1947-1953.

[24] 、Xiang-Yuan Wan, Jin-Yuan Liu. Comparative Proteomics Analysis Revealsan Intimate Protein Network Provoked by Hydrogen Peroxide Stress in Rice Seedling Leaves. Molecular & Cellular Proteomics. 2008, 7.8: 1469-1488.

[25] 、Xiaojuan Zheng, Lianlian Hong, Lixue Shi, Junqing Guo, Zhen Sun, Jiyong Zhou. Proteomics Analysis of Host Cells Infected with Infectious Bursal Disease Virus. Molecular & Cellular Proteomics. 2008, 7.3: 612-625.

[26] 、Zhiping Deng, Xin Zhang, Wenqiang Tang, Juan A. Oses-Prieto, NagiSuzuki, Joshua M. Gendron, Huanjing Chen, Shenheng Guan, Robert J. Chalkley, T. Kaye Peterman, Alma L. Burlingame, Zhi-Yong Wang. A Proteomics Study of Brassinosteroid Response in Arabidopsis. Molecular & Cellular Proteomics. 2007, 6.12: 2058-2071.

[27] 、Natasha A. Karp, Renata Feret, Denis V. Rubtsov, Kathryn S. Lilley. Comparison of DIGE and post-stained gel electrophoresis with both traditional and SameSpots analysis for quantitative proteomics. Proteomics. 2008, 8(5): 948-960.

[28] 、XuequnZhang, YuanbiaoGuo, YanpingSong, WeiSun, ChaohuiYu, Xiaohang Zhao, Hongyang Wang, Hongchi Jiang, Youming Li, Xiaohong Qian, Ying Jiang, Fuchu He. Proteomic analysis of individual variation in normal livers of human beings using difference gel electrophoresis. Proteomics. 2006, 6: 5260-5268.

[29] 、袁拥华. 抗肿瘤新药德氮吡格的蛋白质组学研究. [博士学位论文]. 重庆： 重庆医科大学. 2007年.

[30] 、Megan S. Lim, Kojo S. J. Elenitoba-Johnson. Mass Spectrometry-based Proteomic Studies of Human Anaplastic Large Cell Lymphoma. Molecular &

Cellular Proteomics. 2006, 5: 1787-1798.

[31] 、Troels Zakarias Kristiansen, Jakob Bunkenborg, Mads Gronborg, Henrik Molina, Paul J. Thuluvath, Pedram Argani, Michael G. Goggins, Anirban Maitra, Akhilesh Pandey. A Proteomic Analysis of Human Bile. Molecular & Cellular Proteomics. 2006, 3.7: 715-728.

[32] 、Scott A. Gerber, John Rush, Olaf Stemman, Marc W. Kirschner, Steven P. Gygi. Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. PNAS. 2003, 100(12): 6940-6945.

[33] 、Xiang Zhang, Aiqin Fang, Catherine P. Riley, Mu Wang, Fred E. Regnier, Charles Buck. Multi-dimensional liquid chromatography in proteomics. Analytica Chimica Acta. 2010, 664: 101-113.

[34] 、Rowan P. Orme, Monte A. Gates, Rosemary A. Fricker-Gates. A multiplexedquantitative proteomics approach for investigating protein expression in the developing central nervous system. Journal of Neuroscience Methods. 2010, 191: 75-82.

[35] 、Ning Chen, Wei Sun, Xinyu Deng, Yunwei Hao, Xilin Chen, Baocai Xing, Wei Jia, Jie Ma, Handong Wei, Yunping Zhu, Xiaohong Qian, Ying Jiang, Fuchu He. Quantitative proteome analysis of HCC cell lines with different metastatic potentials by SILAC. Proteomics. 2008, 8: 5108-5118.

[36] 、Giles H. W. Sanders, Andreas Manz. Chip-based microsystems for genomicand proteomic analysis. Trends in analytical chemistry. 2000, 19(6): 364-378.

[37] 、Diana Vester, Erdmann Rapp, Sabine Kluge, Yvonne Genzel, Udo Reichl. Virus-host cell interactions in vaccine production cell lines infected with different human influenza A virus variants: A proteomic approach. Journal of Proteomics. 2010, 73: 1656-1669.

[38] 、VéroniqueMalard, LaetitiaChardan, StamatikiRoussi, CarineDarolles, Nicole Sage, Jean-Charles Gaillard, Jean Armengaud. Analytical constraints for the analysis of human cell line secretomes by shotgun proteomics. Journal of Proteomics. 2010, 75: 1043-1054.

[39] 、 Julio E. Celis, Mogens Kruhǿffer, Irina Gromova, Casper Frederiksen, MortenØstergaard, Thomas Thykjaer, Pavel Gromov, Jinsheng Yu, Hildur Pálsdóttir, Nils Magnusson, Torben FØrntoft. Gene expression profiling: monitoring transcription and translation products using DNA microarrays and proteomics. FEBS Letters. 2000, 480: 2-16.

[40] 、Zhen Wang, Jun Han, Larry L. David, Kevin L. Schey. Proteomics andPhosphoproteomics Analysis of Human Lens Fiber Cell Membranes. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2013, 54(2): 1135-1143.

[41] 、Kovacs, A.; Guttman, A. MedicinalChemistryMeetsProteomics: Fractionation of the Human Plasma Proteome. Current Medicinal Chemistry. 2013, 20(4): 483-490.

[42] 、Anne S. Kienhuis, Jos G. M. Bessems, Jeroen L. A. Pennings, Marja

Driessen, Mirjam Luijten, Joost H. M. van Delft, Ad A. C. M. Peijnenburg, Leo

T. M. van der Ven. Application of toxicogenomics in hepatic systems toxicology for risk assessment: Acetaminophen as a case study. Toxicology and Applied Pharmacology. 2011, 250: 96-107.

[43] 、Craig A. Schenck, Vijayanand Nadella, Shannon L. Clay, JessicaLindner, Zachary Abrams, Sarah E. Wyatt. A proteomics approach identifies novel proteins involved in gravitropic signal transduction. Am. J. Bot. 2013, 100 (10): 194-202.

[44] 、Georgina S. Butler, Christopher M. Overall Proteomic identification ofmultitasking proteins in unexpected locations complicates drug targeting. Nature Reviews Drug Discovery. 2009, **8**: 935-948.

[45] 、Urs A. Meyer, Ulrich M. Zanger, Matthias Schwab. Omics and DrugResponse. Pharmacology and Toxicology. 2013, 53: 475-502.

## 攻读学位期间发表论文情况

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 序号 | 论文题目 | 作者 | 刊物名称， 年，卷（期）：  起止页码 | 收录情况 |
| 1 | Oxidative stress in di-n-butyl-di-(4-chlorobenzohydroxam ato)tin (IV)-induced hepatotoxicity  Determined by proteomic profiles. | Li Tang, Yun-lan Li, Rui Ge, Qing-Shan Li | Toxicology Letters. 2012,  213: 167-173. | SCI |

致**谢**

四年的博士生活一晃而过，回首走过的岁月，有苦有乐，又酸又甜，感慨颇多。首先非常感谢我的导师李青ft教授，从课题的设计、实验方案的制定及论文的发表等过程，处处给与我极大的帮助与指导。导师严谨的科学作风，一丝不苟的工作态度为我树立了学习的典范，工作学习中的点点滴滴让我终生铭记。正是在导师的指导与培养下，锻炼了我的办事能力与科学实践技能，培养了我独立思考问题与总结问题的能力，同时培养了科学的思维方式，激励我不断开拓进取，潜心于科学研究工作。在此我表示深深的敬意和衷心的感谢。

感谢ft西医科大学药学院李云兰老师，班树荣老师，梁泰刚老师，冯秀娥老师，葛睿老师，李建宽老师和张立峰老师的帮助。感谢张云霞，郑娟，王子伟，郭璞，牛琳，杜雪和所有师弟师妹们给予的帮助与鼓励。

感谢ft西省医药与生命科学研究院柴秋彦老师在实验中给予的帮助。感谢中国辐射与防护研究院李建国老师给予的帮助。本课题的完成同样受到了北京蛋白质组研究中心，ft西医科大学中心实验室的帮助，在此感谢各位老师。

感谢我的家人长期以来对我的理解，支持与鼓励，给予了我无限前进的力量和信心。

本论文的完成受到了国家“重大新药创制”科技重大专 项

（2009ZX09103-104）、国家自然科学基金资助项目（No. 30973603）等基金的

大力支持，在此表示感谢。

## 个人简介

姓名：唐莉性别：女

出生日期：1984年4月20日政治面貌：中共党员

**工作学习经历：**

2002年9月～2006年7月：ft西医科大学药学院攻读学士学位

2006年9月～2009年7月：ft西医科大学药学院攻读硕士学位

2009年9月～2013年7月：ft西医科大学公共卫生学院攻读博士学位

**在读期间承担或参与的科研项目：**

1、参与国家“重大新药创制”科技重大专项“新型结构抗癌化合物DBDCT结构优

化、主要药效学、药代动力学及安全性研究“（No. 2009ZX09103-104）。

2、参与国家自然科学基金资助项目“有机锡抗癌化合物DBDCT致肝脏毒性作用

机制研究“（No. 30973603）。

3、参与ft西省科技攻关项目“MBB临床前药学及药理学的初步研究”(20110321076-01)

**在读期间发表的主要论文：**

1、Li Tang, Shu Rong Ban, Xiu E Feng, Wen Han Lin, Qing Shan Li. Synthesis and activities of new 4-hydroxybenzoxazolone derivatives. Chinese Chemical Letter. 2010, 21:36-66.

2、Li Tang, Yun-lan Li, Rui Ge, Qing-Shan Li. Oxidative stress in

Di-n-butyl-di-(4-chlorobenzohydroxamato) tin (IV) -induced hepatotoxicity determined by proteomic profiles. Toxicology Letters. 2012, 213: 167-173.

3、Li Tang, Wen-Hua Ma, Yun-Long Ma, Shu-Rong Ban, Xiu-E Feng, Qing-Shan Li.

Synthesis and biological activity of 4-substituted benzoxazolone derivatives as a new class of sEH inhibitors with high anti-inflammatory activity in vivo. Bioorganic &

Medicinal Chemistry Letters. 2013, 23: 2380-2383.

4、马云龙，唐莉，梁泰刚，李青ft. 气相色谱法测定4-邻甲苯磺酰氧基苯并唑酮

原料药中有机溶剂残留的研究. 中国药物与临床, 2012, 12(7)：894-895.

5、马云龙，唐莉，梁泰刚，李青ft. HPLC测定4-邻甲苯磺酰氧基苯并噁唑酮原

料药的含量及有关物质. 中国现代应用药学, 2012, 29(9)：833-835.

**在读期间申请的专利：**

1、苯并噁唑酮类衍生物及其制备方法. 专利号：ZL 200810055219.6. 发明人：李青ft，唐莉，班树荣，冯秀娥. （已授权）

2、苯并噁唑酮糖苷类化合物及其制备方法. 专利号：ZL 200810055220.9. 发明人：

李青ft，班树荣，唐莉，冯秀娥. （已授权）

3、芳香异羟肟酸有机锡类抗肿瘤化合物注射剂的制备方法. 申请号：

201110024881.7 发明人： 李青ft、李云兰、高竹妍、郑娟、唐莉、赵承孝.（已

受权）

4、化合物4-邻甲苯磺酰氧基苯并噁唑酮及其可药用盐在制备非甾体抗炎镇痛药物中的应用. 申请号：201110296855. X. 发明人：李青ft；唐莉；马云龙；梁泰刚；韩玲革。（已受理）

**在读期间申请的学术交流：**

1、2009年11月于杭州参加第29期“基因组科学”研习班并获得培训证书。

2、2010年5月于北京参加第一届世界药物化学大会并做现场报告。