

# 蛋白质组学技术鉴定与分析 三七粉诱导海兔神经连索表达的差异蛋白质

冯丽剑<sup>1</sup> 黄琳<sup>1,3</sup> 卓慧钦<sup>1,2</sup> 黄河清<sup>\* 1,2,3</sup>

(<sup>1</sup> 厦门大学生命科学学院细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室,

<sup>2</sup> 化学化工学院固体表面物理化学国家重点实验室, <sup>3</sup> 化学生物学福建省重点实验室, 厦门 361005)

**摘要** RP-HPLC分离三七粉提取液,并鉴定含有 Rb1, Rg1, Rc, R1等皂甙成分。以蓝斑背肛海兔 (*Notarcus leachii cirrosus Stimpson*, NLCS)为分析模型,三七粉提取液为诱导剂,选用蛋白质组技术研究 NLCS神经连索诱导前后所表达的差异蛋白质。通过优化双向凝胶电泳分离 NLCS神经连索全蛋白质组技术,获得 496个蛋白质斑点。采用肽指纹图谱技术和数据库检索比对法,初步鉴定了 NLCS受三七粉提取液诱导前后,其神经连索表达 13个差异蛋白质,其中较高的匹配率蛋白质为肌动蛋白、3-羟酯酰辅酶 A 脱氢酶、ATP 结合转运子和甲基转移酶 12。选用 LOCtree软件对 13个差异蛋白质进行亚细胞定位,认为它们在保护神经系统中发挥重要的调节作用。

**关键词** 三七,皂甙,差异蛋白质,分离,鉴定,蛋白质组技术

## 1 引言

三七 (*panax notoginseng*)属于五加科植物。三七总皂苷 (*panax notoginseng saponins*, PNS)是三七的主要生物活性成分之一,它具有抗氧化、抑制细胞内 Ca<sup>2+</sup>超载、调节神经系统、增加免疫功能等生理功效。三七总皂甙主要皂苷成分与人参较为相似,即人参二醇型皂甙 Rb1、人参三醇型皂甙 Rg1、Rc和三七皂甙 R1等,其总含量高于人参。体内和体外实验表明,三七总皂甙可通过清除体内氧自由基和 NO 含量,减少脂质过氧化<sup>[1~3]</sup>,降低细胞内 Ca<sup>2+</sup>含量<sup>[4,5]</sup>,增加 Ach的合成和 M 型 Ach受体,抑制神经细胞凋亡<sup>[6]</sup>,发挥促智和延缓衰老作用。目前,三七皂甙的生理作用研究主要借助组织免疫学和细胞生物学手段。

海兔神经系统约有 20 000个神经细胞,各神经节分离,由神经连索连通。海兔神经细胞体积较大便于分析。多数海兔品种的中枢神经系统 (CNS)均由口腔神经节 (*buccal ganglion*, BG)、大脑神经节 (*cerebral ganglion*, CG)、胸膜与足部神经节 (*pleura+pedal ganglion*, PLG/PDG)、腹神经节 (*abdominal ganglion*, AG)和神经连索组成。但厦门蓝斑背肛海兔 (*notarcus leachii cirrosus stimpson*, NLCS)却缺少 AG。NLCS的 CNS中的胸膜神经节延伸的神经连索直接与背部肌肉相连,这一现象不同于加洲海兔的腹神经节连接方式。在海兔 CNS中,神经连索起着神经节之间或者神经节和效应器官之间物质运输与传递的作用,并参与神经信号传导作用。一旦海兔受物理化学因素影响后,其神经连索区间存在着差异多肽与蛋白质,这些蛋白质可能是海兔对环境因素变化所产生的应激效应过程中参与了应激反应。研究这些差异多肽与蛋白质,将有助于理解中枢神经系统与它紧贴的周边肌肉组织之间的信号传递和行为可塑性等生理功能。显然,在神经连索中寻找参与信号传导、执行生理功能和应激相关的蛋白质与多肽具有重要的科学意义。

本实验采用双向凝胶电泳技术分离 NLCS胸膜神经节至体后背部肌肉神经连索的蛋白质组,并用 MALD-TOF 质谱和数据库检索技术初步鉴定三七粉提取液诱导下, NLCS神经连索表达的差异蛋白质。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

2007-07-12收稿; 2007-11-07接受

本文系国家自然科学基金 (No. 20776060)和福建省创新团队培养计划资助项目

\* E-mail: hqhuang@xmu.edu.cn

双向电泳仪和 DYCZ-24B 型垂直电泳槽 (北京六一仪器厂); REFLEX 型 MALDI-TOF 质谱仪 (德国 BRUKER 公司); 真空浓缩离心机 (Labconco); 载体两性电解质 (Amersham) pH 5~8 胰蛋白酶 (Promega 公司);  $\alpha$ -氰-4-羟肉桂酸 (HCCA, 美国 ICN 生物医学公司); 碘乙酰胺 (Sigma 公司); 丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 等试剂均购自上海生工。

## 2.2 双向电泳样品制备

实验分为处理组和对照组海兔各 15 只, 向处理组海水中加入三七粉提取液, 对照组海水不加任何试剂。4 d 后, 迅速解剖海兔, 分离出神经连索, 并用丙酮-TCA 方法提取蛋白质。蛋白质含量按常规的 Bradford 法分析, 上样量为 80~150  $\mu$ g。

## 2.3 三七提取液皂甙成分的鉴定

用超纯水制成每毫升含人参皂甙 Rg1, Rb1, Re 各 0.4 mg, 0.1 mg 三七皂甙 R1 混合溶液, 作为标准品。取三七粉末 0.6 g 加入 50 mL 乙醇, 放置过夜, 置 80  $^{\circ}$ C 水浴上保持微沸至乙醇挥发干净, 再加入 50 mL 超纯水溶解样品。按照文献 [7] 的 HPLC 方法鉴定三七提取液成分。

## 2.4 双向电泳

具体操作参见 Amersham 电泳操作手册, 并根据实验要求稍加改进。灌制 150 mm  $\times$  0.7 mm 的柱状胶条 (1.10 g 超纯尿素, 394  $\mu$ L 双蒸水, 400  $\mu$ L 10% NP-40, 266  $\mu$ L 单体储液, 100  $\mu$ L 载体两性电解质, 2  $\mu$ L TEMED, 2  $\mu$ L 10% APS)。预电泳电压遵循: (1) 200 V, 15 min; (2) 300 V, 30 min; (3) 400 V, 60 min。预电泳结束后, 加入样品, 整个过程达到 10 000 V  $\cdot$  h 后, 结束电泳。平衡第一向胶条 15 min (平衡液: 50 mmol/L Tris-HCl (pH = 8.8), 6 mol/L 尿素, 30% 甘油, 2% SDS, 1% DTT)。第二向 SDS-PAGE (T = 12%), 先以 10 mA/板 电泳 30 min, 再以 25 mA 板的稳流进行, 待溴酚蓝前沿到达凝胶底端时, 停止电泳。

## 2.5 银染和胶的保存

按照文献 [8] 的方法进行银染, 利用图像扫描仪采集图像, Investigator HTDatabase 软件进行图像分析, 之后用保鲜膜将 SDS 胶封好, 4  $^{\circ}$ C 冰箱保存, 用于肽指纹分析。

## 2.6 蛋白质的原位酶解和肽指纹鉴定

使用无污染的解剖刀挖取蛋白差异点胶块, 置于 500  $\mu$ L 离心管中, 参照文献 [9] 的方法进行酶解和肽片段的提取。样品使用质谱仪 ( $N_2$  激光波长 337 nm) 进行分析, 采用反射模式, 离子源加速电压 1 为 20 kV, 加速电压 2 为 23 kV, 脉冲 3 ns, 离子延迟 2000 ns, 真空度 0.0015 Pa 获得肽质量指纹图谱。

## 2.7 数据库检索肽指纹和亚细胞定位

通过 Matrix science Ltd 网站提供的 MASCOT 软件 ([http://www.matrixscience.com/cgi/search\\_form.pl](http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl) FORMVER = 2 & SEARCH = PMF) 进行数据库分析。检索到的差异蛋白借助 Loctree server 的网站 (<http://cubic.bioc.columbia.edu/cgi-bin/var/nair/loctree/query>) 进行亚细胞定位。

# 3 结果与讨论

## 3.1 三七提取液的有效成分

三七含有多种活性成分, 其中 PNS 为主要有效成分, 而 Rg1, Re, Rb1 及 R1 又分别是 PNS 的主要成分之一。通过 RP-HPLC 技术对标准品和三七提取液进行分离和比对, 发现三七提取液部分色谱峰的保留时间与标准样品 Rg1, Re, Rb1 及 R1 相同 (图 1), 表明该提取液中含有 Rg1, Re, Rb1 和 R1 等皂甙组分。Rb1 和 Rg1 不仅能提高原代培养细胞存活率、促进神经突的生长、调节神经递质释放, 还具有改善中枢胆碱能功能和治疗记忆力下降等生理功能<sup>[10]</sup>。另外, 皂甙组分既能提高突触效能的可塑性, 又能提高突触结构的可塑性, 并对 MPTP 诱致帕金森病小鼠黑质多巴胺能神经元具有明显的保护作用。为了研究三七提取液皂甙组分是否能诱导 NLCS 神经节表达差异蛋白组, 并执行新的生理功能, 实验选用 NLCS 神经连索为研究素材, 选用蛋白质组技术筛选与鉴定 NLCS 受三七提取液诱导前后的差异蛋白质, 以阐明皂甙组分参与信号传导和改善生理功能的重要作用。

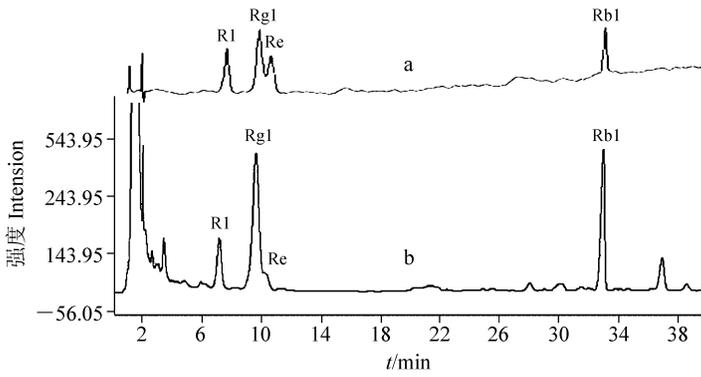


图 1 皂甙标准品 (a) 和三七提取液 (b) 的色谱图

Fig 1 Chromatograms of standard saponins (a) and panax notoginseng powder extract (b)

### 3.2 双向电泳分离 NLCS 的神经连素蛋白质组

NLCS 经三七提取液皂甙组分诱导后, 迅速分离神经连素。神经连素全蛋白质组的双向电泳图如图 2 所示。从图 2 可看出, 神经连素蛋白质组分布主要集中在 pH 5.0~8.0 范围之间。从整个图谱来看, 经过软件分析有 496 个蛋白质斑点, 且斑点之间清晰可分, 适合于选用蛋白质组分析软件对图 2A 和图 2B 之间的差异蛋白质进行比较和筛选。经分析和比对, 发现有 13 个差异表达的蛋白质斑点。图 3 显示了对照组和实验样品组之间的 13 个差异斑点放大图, 其中 2、7、8、11 斑点为表达上调蛋白质, 而 1、3、4、5、6、9、10、12 和 13 斑点为表达下调蛋白质。

### 3.3 差异蛋白质鉴定

选用肽指纹图谱和数据库比对技术对图 3 中所显示的 13 个差异蛋白进行鉴定, 其检索结果如表 1 所示。从检索匹配率分析, 其中有 4 个蛋白质斑点具有较高的匹配率 (分数超过 66) 的蛋白质, 5 个蛋白质斑点匹配率较为理想 (分数 50~65) 的蛋白质, 其余归属于较低匹配率。较高

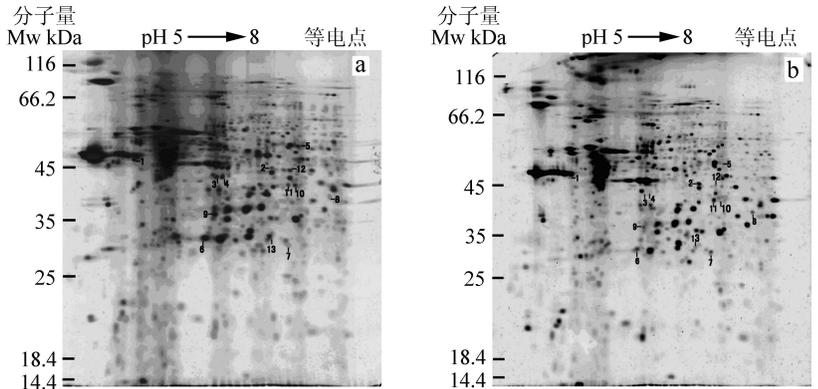


图 2 神经连素蛋白质组的双向电泳图谱

Fig 2 2D-PAGE maps of nervous connective proteome

a 对照组 (control); b 三七组 (Panax notoginseng)。

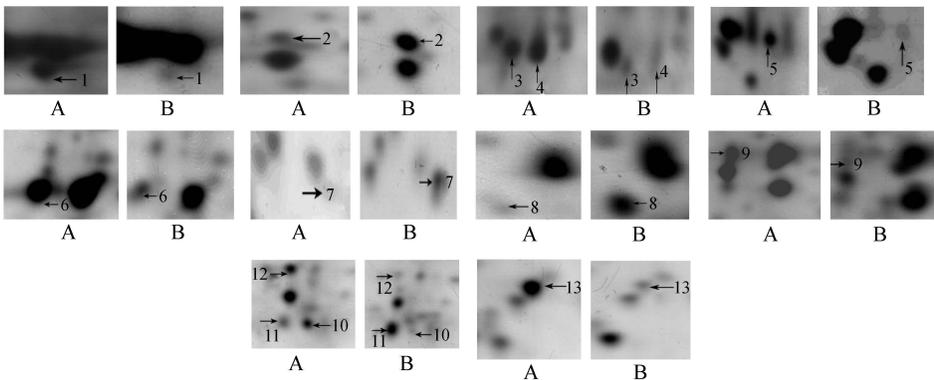


图 3 13 个差异表达的蛋白放大图

Fig 3 Enlarged images of 13 differential expression proteins

A 对照组 (control); B. 三七组 (Panax notoginseng)。

匹配率的蛋白质分别鉴定为肌动蛋白 (NO. 2 Actin), 3-羟酯酰辅酶 A 脱氢酶 (NO. 13 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase)、ATP结合转运子 (NO. 5 ABC transporter related)和甲基转移酶 12 (NO. 10 Methyltransferase type 12)。

表 1 差异表达蛋白数据库检索结果

Table 1 Differential expression proteins identification with database search

斑点 Spot	蛋白质名称 Protein name	分数 Score	分子量 MW	等电点 PI	覆盖率 Coverage(%)	序列号 Accession No
1	N-Acetylglutamate synthase	44	42723	5.22	25	gil26988080
2	Actin	66	35392	5.26	48	gil20564812
3	Putative twitching motility-like protein	62	45955	6.87	33	Q5F5L4_NEIG1
4	Phosphate butyryltransferase	42	35313	6.16	20	Q3B3Z5_PELLD
5	ABC transporter related	68	61845	7.68	27	gil89205044
6	Predicted Adenosine triphosphate (NAD)-dependent formate dehydrogenase	53	44314	5.03	41	gil45644622
7	Probable adenosine triphosphate (ATP)-dependent DNA helicase	53	68270	8.50	21	C71367
8	Methyltransferase	50	35980	6.21	25	gil59711628
9	Nicotinate phosphoribosyltransferase	55	45392	6.84	33	gil15837699
10	Methyltransferase type 12	78	29393	4.67	46	gil119880039
11	Actin-like ATPase	43	36493	8.38	31	gil147679134
12	Putative acetyltransferase	48	32470	10.51	52	Q5YU_67_NOCFA
13	3-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	79	25511	6.33	56	Q1XS01_CYTJO

肌动蛋白是构成微丝的主要成分,通过遗传学分析发现,存在  $\beta$ -肌动蛋白基因突变,就会导致大脑出现像肌张力异常等与遗传性神经性疾病有关的神经组织的损害,  $\beta$ -肌动蛋白变异是神经系统疾病的共同的原因。神经再生是一个相当复杂的过程,与生长因子、肽类和细胞骨架蛋白的上调等有关。生长锥 (growth cone) 是神经唯一的生长点,它运动的形态学基础是各种细胞骨架蛋白<sup>[11]</sup>,而且在神经突的发生过程中,肌动蛋白会在生长锥内富集<sup>[12]</sup>。在神经退行性疾病如帕金森病、亨氏舞蹈症中都发现了神经突萎缩症状<sup>[13]</sup>。实验发现,人参皂甙可以促进小鼠大脑皮质神经元细胞的神经突生长<sup>[14]</sup>。在本研究中,三七提取液处理后 NLCS 神经连索的肌动蛋白表达量上调。

3-羟酯酰辅酶 A 脱氢酶属于短链脱氢酶/还原酶 (SDR) 家族,遗传性缺失这种酶会有不同的临床表现,如产生智力下降或神经退行性疾病<sup>[15]</sup>。它是少数几类对  $\beta$ -淀粉样多肽有亲和力的酶之一,阿尔茨海默病 (AD) 的线粒体毒性归因于这种酶和  $\beta$ -淀粉样肽<sup>[16]</sup>。发现在 AD 患者的脑内酶含量上升,这种酶促进 AD,有两种可能的解释:升高的酶活性使局部的雌激素缺乏;过多的酶使  $\beta$ -淀粉样多肽转移到线粒体内<sup>[16]</sup>。三七的主要活性成分三七总皂甙在延缓老化和治疗神经系统疾病方面有很大作用,临床实践证明,三七防治阿尔茨海默病有确切疗效,其活性成分人参皂甙具有与雌激素相似的改善记忆和神经保护作用<sup>[17]</sup>。人参皂甙可能是通过降低这种酶的表达,从而降低  $\beta$ -淀粉样肽诱导的神经毒性作用,以此来治疗一些老年性神经功能紊乱性疾病的,但其具体过程和机制有待进一步研究。

ATP-binding cassette (ABC) 转运子是参与物质跨膜转运的膜蛋白,在神经元中的表达可能参与脑内神经递质和其代谢产物的基础分泌过程。大多数 ABC 转运蛋白整合于细胞膜或细胞器膜上,负责不同种类物质的跨膜运输<sup>[18,19]</sup>。目前发现 ABC 转移子超家族中的一个成员出现了缺陷可以引起神经纤维的脱髓鞘,导致神经元的退行性病变和死亡<sup>[20]</sup>。本研究发现,经三七提取液处理后, NLCS 神经连索的一种 ABC 转运子表达下降。

神经元细胞的基因表达和功能均受甲基化的调节。基因启动子 CpG 岛的甲基化情况可影响蛋白表达,继而影响神经元的分化功能。神经元细胞 DNA 和蛋白质的甲基化与多种神经退行性病有关。AD 典型病理表现  $A\beta$  淀粉样蛋白的形成和 tau 蛋白的磷酸化均与神经元细胞 DNA 甲基化相关,并且是由 DNA 甲基转移酶介导的。组蛋白甲基化引起的转录抑制在亨廷顿氏舞蹈病 (HD) 的致病机制上起重要作用。有研究指出诱导 DNA 脱甲基化可能与其降低 DNA 甲基转移酶 mRNA 表达有关。许多文献报道人参皂甙可延缓衰老,对一些神经退行性疾病有保护作用,其机制之一可能是通过降低甲基转移酶

的表达, 进而降低神经元基因和组蛋白的甲基化水平来发挥作用的。

### 3.4 差异蛋白的亚细胞定位

亚细胞定位作为蛋白质的一个基本特征, 与其功能密切相关。通常蛋白质只有在特定的亚细胞位点(如细胞核、线粒体、细胞质等)才能参与正常的生命活动, 因此对差异蛋白质进行亚细胞定位, 对理解和阐明差异蛋白质组的生理功能信息更加科学可信。借助 Loctree server 的网站 (<http://cubic.bic.columbia.edu/cgi-bin/var/nair/bctree/query>)提供的 LOC tree 分析软件, 对已鉴定的 13 个差异蛋白质进行亚细胞定位, 并分为 5 大类, 即细胞质蛋白(6 个)、线粒体蛋白(4 个)、核蛋白、DNA 结合蛋白和其它细胞器蛋白各 1 个, 具体如表 2 所示。经相关文献检索和分析, 这些差异蛋白质中的多数蛋白质属于参与神经生长和信号传导相关的蛋白质, 相关的生理功能还需要通过其它途径给予进一步确认。

甲基转移酶 12 是由 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 提供甲基, 把甲基基团转移到底物分子上, 生成多种重要的含甲基生理活性物质, 达到功能调节的目的。它的亚细胞定位在细胞质内, 但也可以经过修饰进入细胞核内<sup>[21]</sup>, 通过与其它蛋白质或脂质的相互作用, 可能在介导细胞质与细胞核之间的信号传导中起到重要作用。

羟酯酰辅酶 A 脱氢酶定位在线粒体内, 催化脂肪酸  $\beta$  氧化。线粒体内的这种酶在神经类固醇代谢<sup>[22, 23]</sup>和维持 GABA 能神经元发挥正常功能<sup>[24]</sup>方面起到重要作用。尽管葡萄糖是神经系统的主要能源物质, 但这个酶在调控脑发育和老化方面的作用不容忽视。通过调节脑中这种酶的活性, 有利于改善 AD 病情和防治帕金森 (PD) 症。

本实验的 ABC 转运蛋白定位在线粒体内, 是一种线粒体的膜蛋白。它可以传递细胞质和线粒体之间的神经信号, 在调节神经元信号的持续时间和大小中起着重要的作用, 这类转运蛋白对于维持神经递质刺激响应至关重要。

肌动蛋白定位在细胞质内, 是神经生长导向分子引起的胞内信号传递通路的最终效应结构。肌动蛋白丝在分子水平上的活动表现在细胞水平上, 即为生长锥的导向与神经突的定向生长, 近年对肌动蛋白丝的研究日益升温。有研究指明在神经元分化过程中肌动蛋白的表达量上升。实验结果表明, 三七提取液有促进神经元细胞分化、再生作用, 肌动蛋白表达量上升与前人的结果一致。

综上所述, 通过蛋白质组学研究的方法, 研究了海兔对照组和三七提取液处理组神经连索的差异蛋白表达情况。采用肽指纹技术并结合数据库鉴定到 13 种差异蛋白, 并发现其中匹配率较高的 4 种蛋白都与一些神经系统疾病有关。蛋白质组学研究能够促进在分子水平认识三七粉抗衰老, 抗神经系统疾病的机理, 并为它的作用机理找到确实的依据。

## References

- 1 Chu Guo-Xiang (储国祥), Chen Xiang (陈 享). *Acta Pharmacologica Sinica* (中国药理学报), **1990**, 11(2): 119~123
- 2 Li Jun-Qing (李君庆), Li Zong-Kai (李宗凯), Duan Hong (段 红), Zhang Jun-Tian (张均田). *Acta Pharmaceutica Sinica* (药理学报), **1997**, 32(4): 251~254
- 3 Chen X C, Zhu Y G, Zhu L A, Huang C, Chen Y, Chen L M, Fang F, Zhou Y C, Zhao C H. *Eur J Pharmacol*, **2003**, 473(1): 1~7
- 4 Liao B, Newmark H, Zhou R. *Experimental Neurology*, **2002**, 173(2): 224~234
- 5 Liu Min (刘 蕊), Zhang Jun-Tian (张均田). *Chinese Medical Journal* (中华医学杂志), **1995**, 108(7): 544~547
- 6 Li Jun-Qing (李君庆), Zhang Xiang-Ge (张香阁), Zhang Jun-Tian (张均田). *Acta Pharmaceutica Sinica* (药理学报), **1997**, 32(6): 406~410
- 7 Huang X D, Kong L, Li X, Chen X G, Guo M, Zou H F. *J Chromatogr B*, **2004**, 812(1/2): 71~84
- 8 Guo Yao-Jun (郭尧君). *Experimental Technique of Protein Electrophoresis* (蛋白质电泳实验技术). Beijing (北京): Science Press (科学出版社), **1999**, 141~142

表 2 差异表达蛋白的亚细胞定位

Table 2 Subcellular localization of differential expression proteins

亚细胞定位 Subcellular localization	蛋白质斑点 Spots
细胞质 Cytoplasmic	2, 6, 8, 9, 10, 11
线粒体 Mitochondrial	1, 3, 5, 13
细胞器 Organellar	4
细胞核 Nuclear	12
DNA 结合 DNA Binding	7

- 9 Chen Ping(陈平), Xie Jin-Yun(谢锦云), Liang Song-Ping(梁宋平). *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*(生物化学与生物物理学报), **2000**, 32(4): 387~391
- 10 Radad K, Gille G, Liu L, Rausch W D. *J. Pharmacol Sci*, **2006**, 100(3): 175~186
- 11 Letoumeau P C, Kater S B, Macagno E R. *The Nerve Growth Cone*, New York: Raven Press **1991** 153~171
- 12 Dotti C G, Sullivan C A, Banker G A. *J. Neurosci*, **1988**, 8(4): 1454~1468
- 13 Jackson M, Gentleman S, Lennox G, Ward L, Gray T, Randall K, Morell K, Lowe J. *J. Neuropathol Appl Neurobiol*, **1995**, 21(1): 18~26
- 14 Sugaya A, Yuzurihara M, Tsuda T, Yasuda K, Kajiwara K, Sugaya E. *J. Ethnopharmacol*, **1988**, 22(2): 173~181
- 15 Zschocke J, Ruiter J P, Brand J, Lindner M, Hoffmann G F, Wanders R J M, Ayatepek E. *Pediatric Res*, **2000**, 48(6): 852~855
- 16 Lustbader J W, Cirilli M, Lin C, Xu H W, Takuma K, Wang N, Caspersen C, Chen X, Polak S, Chaney M, Trinchese E, Liu S, Gunn-Moore F, Lue L F, Walker D G, Kuppusamy P, Zewire Z L, Arancio O, Stern D, Yan S S, Wu H. *Science*, **2004**, 304(5669): 448~452
- 17 Ashana S, Baker L D, Craft S, Stanczyk F Z, Veith R C, Raskind M A, Plymate S R. *Neurology*, **2001**, 57(4): 605~612
- 18 Higgins C F. *Annu Rev Cell Biol*, **1992**, 8: 67~113
- 19 Holland IB, Blight M A. *J. Mol Biol*, **1999**, 293(2): 381~399
- 20 Dean M. *Genome Res*, **2001**, 11(7): 1156~1166
- 21 Cardoso M C, Leonhardt H. *The Journal of Cell Biology*, **1999**, 147(1): 25~32
- 22 Yang S Y, He X Y, Schulz H. *Trends Endocrinol Meta*, **1994**, 16(4): 167~175
- 23 He X Y, Wegiel J, Yang Y Z, Pulakat R, Schulz H, Yang S Y. *Mol Cell Endocrinol*, **2005**, 229(1/2): 111~117
- 24 He X Y, Wegiel J, Yang S Y. *Brain Res*, **2005**, 1040(1/2): 29~35

## Differential Proteins of *Panax Notoginseng* Powder Inducement Identified and Analyzed with Proteomic Techniques in Neural Connective of *Aplysia*

FENG Lijian<sup>1</sup>, HUANG Lin<sup>1,3</sup>, ZHUO Hui-Qin<sup>1,2</sup>, HUANG He-Qing<sup>1,2,3\*</sup>

(<sup>1</sup>The Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences

<sup>2</sup>The Key Laboratory of Chemical Biology of Fujian Province, State Key Laboratory of Physical

Chemistry of Solid Surface Collage, <sup>3</sup>Chemistry & Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005)

**Abstract** Extract of *Panax Notoginseng* powder was separated and its saponins component containing Rb<sub>1</sub>, Rg<sub>1</sub>, Rc, R1 etc. was further identified by RP-HPLC approach synchronously. Using an analytical model of *Aplysia* (*Notarcus leachii cirrosus* Stimpson, NLCS) and a revulsant of *Panax notoginseng* powder, differential proteins of neural connective between control *aplysia* and experimental one were revealed by proteomic techniques in NLCS. Whole proteins of neural connective in *aplysia* were optimally separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE), obtaining approximately 496 protein spots. Thirteen differential proteins of the neural connective between control *aplysia* and experimental one induced with *Panax Notoginseng* powder were compared and identified by peptide mass fingerprinting (PMF) and databases searches respectively. These differential proteins with high scores were primarily indicated to be Actin, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, ABC transporter related, and methyltransferase type 12. In addition, these differential proteins were further investigated in its subcellular localization by LOCtree software.

**Keywords** *Panax notoginseng*, saponins, differential protein, separation, identification, proteomics

(Received 12 July 2007; accepted 7 November 2007)