

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 21620060153333

UDC _____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

蛋白质组学及相关分析技术研究曲马多诱导
斑马鱼脑氧化应激和依赖性潜力的关键蛋白质

Key Proteins of Oxidative Stress and Addiction Potential
Induced with Tramadol by Proteomics and Related
Analytical Technologies in Zebrafish Brain

卓 慧 钦

指导教师姓名: 黄河清 教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2009 年 月 日

论文答辩时间: 2009 年 月 日

学位授予日期: 2009 年 月 日

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2009 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

中文摘要.....	1
Abstract.....	4
1 前言.....	8
1.1 药物滥用和药物依赖的现状与发展趋势	8
1.2 曲马多药理机制	12
1.2.1 曲马多药理学特性.....	12
1.2.2 曲马多药物代谢.....	13
1.2.3 曲马多作用机制.....	14
1.2.3.1 阿片类作用机制.....	14
1.2.3.2 非阿片类作用机制.....	15
1.2.3.3 其他作用机制.....	17
1.2.4 曲马多引起的不良反应.....	18
1.3 曲马多滥用和依赖性潜力研究	18
1.3.1 曲马多依赖性潜力分析.....	18
1.3.2 药物依赖产生机理及其治疗策略探索.....	22
1.3.3 药物滥用引发的神经损伤和神经功能障碍.....	26
1.3.3.1 药物滥用导致的氧化应激.....	27
1.3.3.2 药物滥用引起的细胞凋亡.....	31
1.3.3.3 药物滥用对神经发生的抑制作用.....	33
1.4 蛋白质组学技术在药物滥用研究中的应用	33
1.4.1 蛋白质组学质谱鉴定技术优化策略.....	33
1.4.2 药物滥用的蛋白质组学研究及其进展.....	35
1.4.3 斑马鱼——药物依赖研究新模型.....	37
1.5 本论文研究意义和目的	38
2 材料与方法.....	40
2.1 材料	40
2.2 仪器与试剂	40

2.2.1 主要仪器设备.....	40
2.2.3 主要试剂.....	41
2.3 实验方法	42
2.3.1 斑马鱼行为学观察.....	42
2.3.2 曲马多原药及去甲基曲马多代谢物的质谱分析.....	43
2.3.2.1 曲马多原药的 GC/MS 和 ESI-Q-TOF/MS 法分析	43
2.3.2.2 脑组织中去甲基曲马多代谢物的分析.....	44
2.3.2.3 ESI-Q-TOF/MS 分析条件.....	45
2.3.2.4 GC/MS 分析条件	45
2.3.3 脂质过氧化物含量和 SOD 酶活性的分析.....	46
2.3.3.1 鱼脑组织匀浆样品制备.....	46
2.3.3.2 MDA 含量测定	46
2.3.3.3 SOD 酶活性测定.....	47
2.3.4 蛋白质组学技术研究曲马多慢性诱导下斑马鱼脑差异表达的关键 蛋白质.....	49
2.3.4.1 差异蛋白质组学实验步骤.....	49
2.3.4.1.1 脑组织总蛋白样品制备.....	49
2.3.4.1.2 2D-PAGE	50
2.3.4.1.3 蛋白质染色.....	52
2.3.4.1.4 图像采集与分析.....	52
2.3.4.1.5 肽质量指纹图谱分析.....	53
2.3.4.1.6 肽质量指纹谱鉴定和数据库检索.....	54
2.3.4.1.6.1 多肽质谱检测条件优化.....	54
2.3.4.1.6.2 质谱鉴定和数据库检索条件.....	57
2.3.4.2 差异蛋白质的免疫印迹验证.....	58
2.3.4.3 果糖二磷酸醛缩酶和肌酸激酶活性测定.....	61
2.3.4.3.1 果糖二磷酸醛缩酶活性测定.....	61
2.3.4.3.2 肌酸激酶活性测定.....	62
2.3.5 线粒体超微结构观察.....	62

3 结果	63
3.1 曲马多导致斑马鱼行为学异常和体重、脑重下降	63
3.2 曲马多在斑马鱼体内的分布和代谢	67
3.2.1 组织中曲马多原药 ESI-Q-TOF/MS 法的检出和结构解析.....	67
3.2.2 组织中曲马多原药的分布情况.....	71
3.2.3 脑组织中曲马多含量与处理时间的对应趋势.....	76
3.2.4 脑组织代谢产生 O-和 N-去甲基两种主要代谢产物.....	77
3.3 曲马多诱导的脂质过氧化物含量和 SOD 酶活性改变	80
3.4 曲马多慢性诱导下斑马鱼脑差异表达的关键蛋白质的鉴定和分析	84
3.4.1 双向凝胶电泳技术的优化.....	84
3.4.1.1 第二向胶交联度的选择.....	84
3.4.1.2. 样品中核酸的去除.....	86
3.4.1.3. 第二向胶蛋白斑点扭曲现象的避免.....	87
3.4.1.4. 第二向胶银染色差的消除.....	88
3.4.2 优化质谱分析技术.....	90
3.4.2.1 多肽质谱分析中蛋白增强剂的发现.....	90
3.4.2.1.1. 蛋白质提高多肽绝对信号强度.....	90
3.4.2.1.2. 蛋白增强剂对共结晶质量的改善.....	92
3.4.2.1.3. 不同蛋白质增强酸性多肽的离子化效率.....	93
3.4.2.1.4. 提高肽质量指纹谱鉴定蛋白质的可信度.....	94
3.4.2.2 提高多肽质谱分析效果的黏合剂涂层的筛选.....	95
3.4.2.2.1. 寻找合适的黏合剂作为 MALDI 金属靶涂层.....	95
3.4.2.2.2 MCP、GCP 和 VCP 在多肽分析中的运用.....	96
3.4.2.2.3 MCP、GCP 和 VCP 在血清多肽检测中的运用.....	99
3.4.2.2.4 高盐浓度的多肽样品检测.....	100
3.4.2.2.5 两种靶上脱盐方法的比较.....	100
3.4.2.2.6 结晶形态显微观察.....	100
3.4.3 基于双向凝胶电泳和质谱技术的蛋白质分离和鉴定.....	104
3.4.4 曲马多诱导的 14-3-3 epsilon 蛋白表达量上调的免疫印迹验证 ..	112

3.4.5 曲马多对 ALD 酶活性的影响	113
3.4.6 曲马多对 CK 酶活性的影响	115
3.5 曲马多慢性诱导下的线粒体超微结构变化	116
4 讨论.....	122
4.1 氧化应激相关的斑马鱼行为学改变	122
4.2 曲马多在斑马鱼体内的吸收和代谢规律	123
4.3 曲马多诱导的氧化应激相关的 SOD 酶活性抑制和脂质过氧化物含量增加.....	124
4.4 曲马多诱导的斑马鱼脑氧化应激和依赖性潜力分析	126
4.4.1 差异蛋白质组学技术优化.....	126
4.4.2 曲马多相关的差异蛋白鉴定结果分析.....	129
4.4.2.1 曲马多诱导表达的差异蛋白的特性及功能分类.....	129
4.4.2.2 曲马多慢性诱导导致中枢神经系统的氧化应激损伤.....	132
4.4.2.3 曲马多依赖性潜力分析.....	136
4.5 曲马多慢性诱导下的线粒体损伤	139
5 结论.....	143
参考文献.....	146
附录一：图表索引	168
附录二：缩略语及中英文对照	172
在学期间发表论文与获奖情况	175
致谢.....	176

Contents

Chinese abstract	1
Abstract.....	4
1 Introduction	8
1.1 Drug abuse and drug addiction	8
1.2 Pharmacological mechanism of tramadol	12
1.2.1 Pharmacological characteristics of tramadol	12
1.2.2 Metabolism properties of tramadol.....	13
1.2.3 Mechanism of action of tramadol	14
1.2.3.1 Opioid mechanism	14
1.2.3.2 Non-opioid mechanism.....	15
1.2.3.3 Other mechanisms.....	17
1.2.4 Adverse reations of tramadol.....	18
1.3 Research in tramadol abuse and addiction optential	18
1.3.1 Screening tramadol addiction potential	18
1.3.2 Molecular mechanism and treatment strategies for drug addiction	22
1.3.3 Neurological impairments and dysfunction induced by drugs of abuse.....	26
1.3.3.1 Oxidative stress caused by drugs of abuse.....	27
1.3.3.2 Cell death caused by drugs of abuse	31
1.3.3.3 Inhibition of neurogenesis by drugs of abuse	33
1.4 Research of drugs of abuse by proteomics technologies.....	33
1.4.1 Optimistic strategies for mass spectrometry techniques in proteomics..	33
1.4.2 Research and recent advanced of drugs of abuse by proteomics.....	35
1.4.3 Zebrafish——new model for drug addiction research	37
1.5 Significance and purpose of this paper	38
2 Materials and methods	40
2.1 Materials	40
2.2 Equipment and reagent	40

2.2.1 Main equipments.....	40
2.2.3 Main reagent	41
2.3 Methods.....	42
2.3.1 Behavior observation	42
2.3.2 Tramadol and its desmethyl metabolites analysis by MS	43
2.3.2.1 Detection of parent compound by GC/MS and ESI Q-TOF/MS	43
2.3.2.2 Detection of desmethyl metabolites in brain tissue	44
2.3.2.3 Analytical conditions of ESI-Q-TOF/MS	45
2.3.2.4 Analytical conditions of GC/MS.....	45
2.3.3 Lipoperoxide content and SOD enzyme activity assay	46
2.3.3.1 Preparation of fish brain tissue homogenates	46
2.3.3.2 MDA content assay	46
2.3.3.3 SOD enzyme activity assay	47
2.3.4 Identification of differentially expressed key proteins induced by chronic tramadol treatment in zebrafish brain by proteomics technologies	50
2.3.4.1 Main process of proteomics	50
2.3.4.1.1 Preparation of total brain protein extracts.....	50
2.3.4.1.2 2D-PAGE	51
2.3.4.1.3 Protein staining	52
2.3.4.1.4 Gel scanning and image analysis	52
2.3.4.1.5 Protein in-gel digestion	53
2.3.4.1.6 PMF identification and database searching	54
2.3.4.1.6.1 Conditions optimization for peptide MALDI TOF MS analysis ...	54
2.3.4.1.6.2 Parameters for mass analysis and database searching	57
2.3.4.2 Western blotting analysis of differentially expressed proteins	58
2.3.4.3 Aldolase and creatine kinase enzyme activity assay.....	61
2.3.4.3.1 ALD enzyme activity assay	61
2.3.4.3.2 CK enzyme activity assay	62
2.3.5 Ultrastructural observation on mitochondria	62

3 Results	63
3.1 Abnormal behavior and weight loss of zebrafish induced by tramadol	63
3.2 Distribution and metabolism of tramadol in zebrafish	67
3.2.1 Detection and structural analysis of parent compound in tissues by ESI-Q-TOF/MS.....	67
3.2.2 Tissues distribution of parent compound	70
3.2.3 Tramadol content vs. time in the brain tissue	76
3.2.4 Two main metabolites N- and O-desmethyltramadol in brain tissue.....	77
3.3 Changes of lipoperoxide content and SOD enzyme activity induced by tramadol treatment	80
3.4 Identification and analysis of differentially expressed key proteins induced by chronic tramadol treatment in zebrafish brain	84
3.4.1 Optimistic strategies for 2D-PAGE.....	84
3.4.1.1 Optimistic T % for SDS-PAGE.....	84
3.4.1.2. Removal of nucleic acid contamination from samples	86
3.4.1.3. Avoid the problems of spots distortion	87
3.4.1.4. Overcome chromatism of silver staining	88
3.4.2 Optimistic technologies of mass spectrometry analysis	90
3.4.2.1 Discovery of protein intensifiers for peptide mass analysis	90
3.4.2.1.1. Enhancement of absolute intensity of peptide detection by protein addition	90
3.4.2.1.2. Improvement quality of cocrystallization by protein intensifiers	92
3.4.2.1.3. Enhancement of signal intensity of AP detection by different protein addition	93
3.4.2.1.4. Improvement to PMF database searching.....	94
3.4.2.2 Screening of adhesive coats for improvement of peptide mass analysis	95
3.4.2.2.1. Detection of better adhesives for MALDI steel plates.....	95
3.4.2.2.2 Application of MCP, GCP and VCP for peptide mass analysis	96

3.4.2.2.3 Application of MCP, GCP and VCP for serum peptide mass analysis.....	99
3.4.2.2.4 Effect of salts on peptide detection on stainless-steel- and adhesive-treated plates	100
3.4.2.2.5 Comparison between two methods of on-plate desalting	100
3.4.2.2.6 Microscopy of the deposited droplets	101
3.4.3 Protein separation and identification based on combining methods of 2D-PAGE and mass spectrometry.....	104
3.4.4 Western blotting analysis of the differentially expressed 14-3-3 epsilon polypeptide.....	112
3.4.5 Effects of tramadol on ALD enzyme activity	113
3.4.6 Effects of tramadol on CK enzyme activity.....	115
3.5 Ultrastructural changes in mitochondria induced by chronic tramadol treatment	116
4 Discussion.....	122
4.1 Oxidative stress related zebrafish behavior changes.....	122
4.2 The absorption and metabolism of tramadol in zebrafish	123
4.3 Oxidative stress related lipoperoxide content increase and SOD enzyme activity decrease induced by tramadol treatment.....	124
4.4 Analysis of tramadol induced oxidative stress and addiction potential in zebrafish brain	126
4.4.1 Optimization strategies for differential proteomics technologies.....	126
4.4.2 Analysis of differential expressed proteins.....	129
4.4.2.1 Properties and function of differential expressed proteins	129
4.4.2.2 Oxidative stress induced by tramadol treatment.....	132
4.4.2.3 Screening for tramadol addiction potential.....	136
4.5 Mitochondria damage induced by tramadol treatment	139
5 Conclusion	143
References	146

Appendix 1 Index of figures and tables	168
Appendix 2 Index of Abbreviations.....	172
Publications and Awards	175
Acknowledgements	176

厦门大学博硕士论文摘要库

中文摘要

盐酸曲马多(Tramadol hydrochloride, TH)作为一种非麻醉性中枢镇痛药, 已经成为世界范围内最广泛使用的处方药。关于曲马多在脊椎动物中的积极作用的报导曾经一直占据主导地位, 包括缓解中度至重度疼痛、抗抑郁、抗炎和免疫刺激作用、排尿控制、降低糖尿病体内血糖浓度等。然而, 近年来曲马多滥用中毒、不良反应和依赖性的市场监测报告和临床案例却日益增多, 而滥用相关的神经毒性、功能障碍和依赖性潜力的细胞和分子水平机理的研究报道却极少。因而, 迫切需要从分子和细胞水平对曲马多滥用可能造成的依赖性潜力和神经毒性等进行微观分析。

本论文选用斑马鱼(*Danio rerio*)为研究对象, 从行为学角度观察和统计发现, 曲马多急性处理增加鱼对氧的需求量和对富氧的水体表层的偏好性, 从而显著增大表层的鱼平均分布密度。与毒麻类强镇痛药—杜冷丁阳性对照组相比同样存在显著差异, 曲马多处理组的这些异常现象不仅出现的更迅速, 且持续时间更长(整个过程长达 6 h), 并伴随着鱼运动活力的下降, 属于斑马鱼对曲马多特有的异常行为和生理反应。含曲马多饲料的长期投喂, 则会造成斑马鱼体重和脑重量平均值的下降。这些独特异常的生理反应, 使斑马鱼成为研究曲马多药物毒性和药物依赖性分子机理理想的动物模型。

与其他阿片类药物类似, 曲马多引起 SOD 酶活力下降和脂质过氧化物含量的增加, 表现出氧化强化剂特性; 而慢性诱导过程中的抗氧化酶活性变化规律表明, 斑马鱼对曲马多的氧化毒性产生一定的适应性和耐受性。气相色谱质谱联用分析技术(GC/MS)跟踪检测, 单剂量肌注给药后的鱼脑、眼、鳃、心、肝、肠、肌等 7 种组织中曲马多分布和清除情况; 而绘制的原药含量随时间变化趋势图则显示出, 曲马多在鱼脑内经历了一个快速分布和缓慢清除的过程。进一步从鱼脑组织中检测出两种主要去甲基代谢物, 即 O-去甲基曲马多(M1)和 N-去甲基曲马多(M2), 其中 M2 的含量明显高于 M1, 为主要去甲基代谢物。因而肌注给药途径和 GC/MS 分析技术, 适合于研究曲马多在鱼体内的分布、清除、代谢和药效, 尤其是神经毒性机理; 进一步结合 SOD 酶活性和 MDA 含量测定结果, 即可以

评估脑组织氧化应激程度,还可以为合适的给药剂量的选择和后续的蛋白质组学技术筛选和鉴定关键蛋白质的实验样品的准备提供科学的参考价值。

蛋白质组学是目前从组织器官中筛选与鉴定差异蛋白质的最佳分析技术之一。作者建立了一套适用于筛选和鉴定斑马鱼脑组织中的差异蛋白质的蛋白质组学研究方案。尤其是半定量双向凝胶电泳技术的建立和质谱鉴定前的样品准备中人血清转铁蛋白、白蛋白、铁蛋白等蛋白添加剂或石蜡油、甘油、凡士林等黏合剂作为肽质量指纹质谱鉴定的辅助增强剂的发现,都有效地提高了差异蛋白鉴定的灵敏度和可信度。曲马多诱导差异表达的 30 个蛋白质斑点经鉴定后,归为 13 种蛋白,其中 14-3-3 蛋白、肌酸激酶(CK BB)、ATP 合成酶(H⁺转运,线粒体 F1 复合体, beta 亚基)和微管蛋白等在不同的凝胶位置,分别检出 3、3、4 和 11 种亚型;按蛋白功能分为六大类:细胞骨架、能量代谢、信号传导、突触功能、蛋白降解和修饰、钙信号调节。多数蛋白是参与氧化应激或氧化应激相关疾病发病机理的重要蛋白,例如:14-3-3 蛋白,CK BB,泛素羧基端水解酶-L1 (UCHL-1), ATP 合成酶,突触体相关蛋白(SNAP),微管蛋白,肌动蛋白等;而蛋白:醛缩酶 C, ATP 合成酶,CK BB,丙酮酸脱氢酶激酶,UCHL-1,14-3-3 蛋白,dynamin 1, SNAP,微管蛋白,肌动蛋白等则属于多种药物依赖相关的共同蛋白。同时也发现了一些尚未报导的新蛋白,例如:钙信号调节相关蛋白 novel protein similar to vertebrate EF hand calcium binding protein 2,结构相关蛋白 novel intermediate filament protein, similar to centrosomal protein 110 kDa。曲马多同已知的依赖性药物一样主要通过三种普遍认可的途径引发神经毒性,即能量代谢、氧化应激和蛋白降解、修饰。

Western blotting 和酶活性分析表明,曲马多慢性诱导上调 14-3-3 epsilon 蛋白表达量,和抑制酶缩酶和肌酸激酶(能量系统中的两种重要酶)活性,且此类影响一直维持到撤药后两周仍十分显著。相关结果进一步验证了蛋白质组学技术筛选和鉴定的曲马多诱导的差异蛋白的可信度。曲马多慢性诱导引起多种与氧化应激和能量代谢密切相关的重要蛋白质的表达量下调,而这些蛋白的差异表达都直接或间接的涉及线粒体结构和功能的改变。曲马多慢性处理后的线粒体超微结构观察显示,线粒体分布紊乱,数目显著下降,基质变稀,电子密度下降,出现肿胀、空泡样,线粒体嵴数目减少、断裂甚至是缺失等一系列与结构和功能障碍密

切相关的形态学变化。

基于行为学、药物代谢、免疫印迹、酶学测定和超微结构观察等多种手段辅助下的蛋白质组学及其相关技术筛选和鉴定曲马多诱导的斑马鱼脑组织氧化应激关键蛋白的结果,从细胞和分子水平揭示了曲马多长期滥用导致脑组织氧化应激、线粒体损伤和蛋白修饰或降解相关的神经毒性,以及引起能量系统失衡、细胞骨架破坏等,且很可能存在依赖性潜力;本论文的研究结果也为曲马多在世界范围内广泛使用可能存在的神经毒性和依赖性潜力等药物安全性方面的问题提供了新的富有意义的证据,而建立起来的结合了多种研究手段的蛋白质组学方法、以及鉴定出的多种关键蛋白质,在其他药物的神经毒性和依赖性潜力评估方面同样具有重要的运用价值。

关键词: 曲马多神经毒性; 蛋白质组学; 依赖性潜力

Abstract

Tramadol hydrochloride (TH), an atypical centrally acting opioid analgesic, has become the most prescribed drug worldwide. Previous reports predominantly have focused on the numerous positive response of TH in vertebrates, including analgesia for moderate to severe pain; antidepressant, anti-inflammatory, and immunostimulatory effects, micturition control; an ability to lower glucose in diabetics and so on. However, the data on the increase in TH related fatalities, adverse reactions, and the drug addiction presented in recent years have been obtained from postmarketing surveillance and case reports, unfortunately, cellular and molecular mechanisms involved in neurotoxicity, dysfunction and addiction potential after chronic and abused TH administration are not well documented. These issues highlight the need to assess the addiction potential and neurotoxicity of TH abuse at the cellular and molecular levels.

In this thesis, zebrafish (*Danio rerio*) was chosen as experimental object. The results, from the perspective of behavior observation and statistical, showed that oxygen demand and preference of oxygen-rich surface water layer were heightened in fish, thus significantly increased the mean distribution density of fish in surface layer, by a TH stimulus. Compared with those in pethidine hydrochloride (more effective analgesic) positive control group, the abnormal behavior was even more significant, which was observed to emerge much faster, and last much longer (the whole process up to 6 h). Moreover, it was also accompanied by a significant reduction in activity. The phenomenon was belongs to TH specific abnormal behavior and physiological response in zebrafish. Body and brain mean weight loss in zebrafish, after long-term receiving food containing TH. Specific physiological responses to TH exposure, makes zebrafish a favorable animal model for experimental studies of the mechanisms of TH toxicity and drug addiction.

With the similar prooxidant properties with other opioids, TH was shown to induce a decrease in the activity of SOD, and an increase in lipoperoxide. Based on the

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库