

四物汤对环磷酰胺致血虚证小鼠骨髓蛋白质组的影响

刘丽丽, 马增春, 王宇光, 秦红霖, 谭洪玲, 肖成荣, 高月*
(北京放射与辐射医学研究所, 北京 100850)

[摘要] 目的:研究四物汤对环磷酰胺(CTX)损伤致血虚证小鼠骨髓蛋白质组的影响,旨在分子水平上探讨四物汤促进骨髓造血的作用机制。方法:采用 CTX 250 mg·kg⁻¹腹腔注射制成化学损伤型血虚证小鼠模型,利用蛋白质组学技术研究四物汤治疗后的差异蛋白质组。结果:研究发现 CTX 使小鼠骨髓中 12 个蛋白表达上调,3 个蛋白表达下调,四物汤可使 CTX 造模后这些表达改变的蛋白有不同程度恢复。结论:四物汤可能通过影响与细胞凋亡、造血干祖细胞增殖分化有关的蛋白质而促进骨髓造血。

[关键词] 四物汤;CTX;骨髓;蛋白质组学

[中图分类号] R 285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5302(2006)14-1172-04

中医传统补血方剂四物汤对于由放射损伤、化学损伤和综合放血等方法所致的血虚证模型动物具有补血作用。对环磷酰胺(CTX)致血虚证补血机制而言,一般认为是四物汤通过增加 CTX 致血虚证小鼠骨髓造血细胞培养的集落数,抑制 CTX 引起的细胞凋亡,升高小鼠骨髓细胞中 CD34⁺细胞的比例,进而升高外周血象^[1]。然而,对于四物汤促进骨髓造血的分子机制仍不十分清楚。本实验应用蛋白质组学技术在蛋白质水平上研究四物汤促进化学药物 CTX 损伤致血虚证小鼠骨髓造血的作用靶点及作用机制。

1 材料

1.1 药物 四物汤的 4 味药材熟地黄、当归、白芍、川芎均购自北京同仁堂,由本所马百平教授鉴定,按照《太平惠民合剂局方》规定的质量比(15:10:10:6)称取,经过水煎、过滤、浓缩、配制成 100%药液(即每 1 mL 药液含生药 1 g),4℃保存备用。CTX(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号 H32020857)。

1.2 试剂与仪器 尿素、CHAPS、丙烯酰胺、N,N'-甲叉双丙烯酰胺、Tise-base、十二烷基磺酸钠(SDS)、过硫酸铵、Pharmalyte 3-10、固定干胶条(IPG)、IPG 缓冲液、低相对分子质量蛋白质 Marker、甘氨酸(Amer-

sham Biosciences 公司)、琼脂糖(Promega 公司)、考马斯亮蓝 R-250、G-250(Amresco 公司)、三氟乙酸(TFA, Merck 公司)、乙腈(Fisher 公司)、核酸酶(Sigma 公司)、蛋白酶抑制剂、胰酶(Roche 公司)、蛋白质定量标准(Pierce 公司),其他试剂均为国产分析纯。

DU640 核酸蛋白分析仪(美国 Beckmen 公司),蛋白质组学研究配套仪器(Amersham Bioscience 公司),质谱仪(Bruker 公司,REFLEX III 基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱, MALDI-TOF MS)。

1.3 动物及分组处理 C57BL/6J 小鼠,雌性,6~8 周龄,体重(20±2)g,24 只,由中国医学科学院实验动物研究所提供,许可证号 SCXK 京 2004-0001。常规饲养数天后适应环境,按体重随机分为 3 组:正常组、模型组和四物汤组。四物汤组按临床剂量计算小鼠用药剂量为 10 g·kg⁻¹·d⁻¹^[2]。给与灌胃 3 d,正常组和模型组给予等体积蒸馏水,第 4 天模型组和四物汤组按 250 mg·kg⁻¹一次腹腔注射 CTX 造模,继续灌胃 10 d,最后一次给药后 24 h 颈椎脱臼处死小鼠,取股骨骨髓。

2 方法

2.1 样品制备 用磷酸缓冲液冲洗小鼠骨髓,加入细胞裂解液及蛋白酶抑制剂,液氮反复冻融 3 次,加入核酸酶,冰浴 20 min,离心,取上清。用 Bradford^[3]法测蛋白质含量。正常组、模型组、四物汤组小鼠骨髓蛋白的含量分别是 42.20、46.92、44.89 mg·mL⁻¹。

2.2 双向电泳 采用胶内泡涨法上样。将含有 1.5

[收稿日期] 2005-08-12

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30371725)

[通讯作者] *高月, Tel: (010) 66931312, Fax: (010) 66931312, E-mail: gaoyue@nic.bmi.ac.cn

mg 蛋白质的各组骨髓提取液分别与 IPG 胶条再水化液混匀后加入电泳槽内 , 进行一向等电聚焦。电泳参数 : 30 V 再水化 12 h ; 300 V , 1 h ; 500 V , 1 h ; 1 000 V , 1 h ; 8 000 V , 1 h ; 8 000 V , 12 h 。一向等电聚焦结束后 IPG 胶条先后在含有二硫苏糖醇 (DTT) 和碘乙酰胺的平衡液中各平衡 15 min 。然后将 IPG 胶条置于预先制备的 12.5 % 的 SDS-PAGE , 进行第二向电泳。电泳参数 : 120 mA , 40 min ; 150 mA , 至溴酚蓝迁移至 SDS-PAGE 凝胶的底部边缘结束电泳 , 将凝胶转移至考马斯亮蓝 R-250 染色液中过夜 , 考马斯亮蓝脱色液脱色 3 h 。

2.3 凝胶图像分析及肽质量指纹鉴定 脱色后凝胶进行扫描 , 扫描图像应用 Image Master™2D Platinum

软件分析系统分析。将凝胶上差异的蛋白质点沿其边缘切下 , 进行脱色 , 采用胰酶进行胶内酶切 , 应用 MALDI-TOF-MS 检测肽质量指纹谱 (PMF) , 然后在蛋白质数据库 <http://www.matrixscience.com> 输入拟查询的物种、PMF 数据及其他限定参数 , 查询与待查询肽段较匹配的蛋白质。

3 结果

3.1 凝胶电泳结果扫描图像 图 1 为小鼠骨髓蛋白二向电泳结果图谱 , 其一向等点聚焦 pH 梯度为 3~10 , 胶条长度为 24 cm , 3 次电泳结果图谱中均能分辨出 800 个蛋白点以上 , 图像重复性好 , 可以做图像分析。对图像分析结果中找到的差异蛋白点进行标记 (图 1) 。

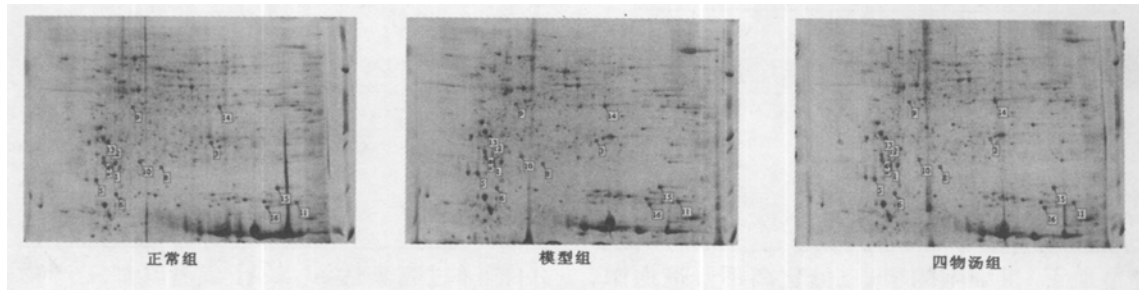


图 1 小鼠骨髓蛋白电泳结果图谱 ($n=3$)

分别将 14 , 15 号蛋白点扫描图像局部放大后进行比较 , 直观的反映出 CTX 造模后该点代表的蛋白质表达量明显上调 , 而在给予四物汤后其表达又有所下调。两蛋白质点的三维立体处理图像 , 同样可以直观的看出蛋白点表达量的变化规律 (图 2 , 3) 。

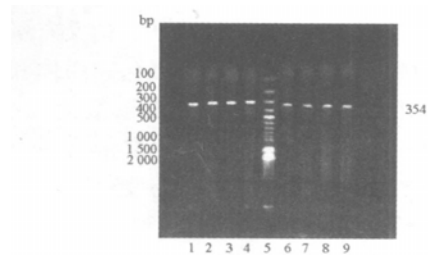


图 2 2 个蛋白点的局部放大图像

3.2 凝胶图像分析结果 分别将正常组和四物汤组图像灰度值与模型组图像灰度值进行比较 , 采用 t 检验进行统计学处理。

四物汤可以使造模后 12 个表达上调和 3 个表达下调的蛋白点有不同程度的恢复。其中 CTX 造模后 , 1 , 2 , 4 , 6 , 14 , 15 , 16 号蛋白质显著升高 , 3 号蛋白点明显降低 ($^{1)} P < 0.05$, $^{2)} P < 0.01$) , 给予四物汤

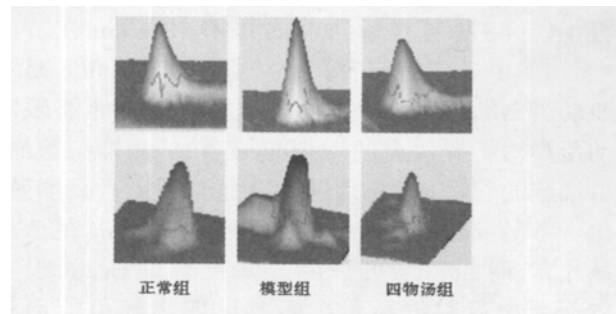


图 3 2 个蛋白质点的三维立体图像

后可以使在造模后表达上调的 11 , 15 号蛋白点表达明显下调 (表 1) 。

3.3 差异蛋白质的质谱鉴定及蛋白质查询结果 经过肽指纹图谱分析结合生物信息学 , 检索到与骨髓造血和细胞凋亡有关的 4 个蛋白分别是 3 号碳酸酐酶 I (carbonic anhydrase I) , 14 号 annexin A1 , 15 号肌动蛋白结合蛋白 (cofilin) , 16 号 peroxidase V (PrX V) (表 2) 。

4 讨论

四物汤是中医临床常用补血方剂 , 四物汤可以影响放射损伤致血虚证小鼠骨髓和血清中蛋白质水

表 1 四物汤对血虚证小鼠骨髓蛋白的影响($\bar{x} \pm s$)				
No.	等电点/ 相对分子 质量($\times 10^3$)	正常组	模型组	四物汤组
1	4.78/30	0.204 \pm 0.048 ¹⁾	0.614 \pm 0.150	0.480 \pm 0.043
2	4.65/31	0.057 \pm 0.003 ¹⁾	0.150 \pm 0.038	0.135 \pm 0.006
3	6.91/36	0.114 \pm 0.018 ²⁾	0.027 \pm 0.011	0.029 \pm 0.008
4	4.65/32	0.032 \pm 0.014 ¹⁾	0.111 \pm 0.028	0.088 \pm 0.003
5	4.50/26	0.211 \pm 0.113	0.417 \pm 0.169	0.375 \pm 0.143
6	4.86/22	0.060 \pm 0.024 ¹⁾	0.117 \pm 0.005	0.110 \pm 0.009
8	5.89/29	0.024 \pm 0.003	0.070 \pm 0.081	0.011 \pm 0.010
9	5.28/52	0.049 \pm 0.013	0.024 \pm 0.011	0.030 \pm 0.029
10	5.42/31	0.028 \pm 0.009	0.012 \pm 0.011	0.024 \pm 0.006
11	8.83/20	0.159 \pm 0.063	0.269 \pm 0.053	0.112 \pm 0.040 ¹⁾
12	4.73/37	0.487 \pm 0.129	0.803 \pm 0.274	0.638 \pm 0.113
13	4.65/39	0.325 \pm 0.091	0.579 \pm 0.145	0.477 \pm 0.145
14	7.05/51	0.232 \pm 0.049 ¹⁾	0.530 \pm 0.177	0.336 \pm 0.139
15	8.39/23	0.240 \pm 0.038 ¹⁾	0.348 \pm 0.039	0.230 \pm 0.040 ¹⁾
16	8.12/19	0.151 \pm 0.032 ²⁾	0.337 \pm 0.041	0.288 \pm 0.049

注 : 与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

表 2 四物汤作用于化学损伤致血虚证小鼠骨髓差异蛋白质鉴定

No.	蛋白序列号	分值	覆盖序列	匹配率	等电点/ 相对分子质量($\times 10^3$)	蛋白质名称
3	CAHI	103	47 %	7/12	6.91/36	carbonic anhydrase 1
14	ANXA1- MOUSE	94	33 %	8/16	7.05/51	annexin A1
15	COF1- MOUSE	60	36 %	6/21	8.39/23	cofilin
16	AAF04855	139	69 %	11/31	8.12/19	Prx V

骨髓造血干/ 祖细胞的增殖、分化离不开造血微环境。Konakahara^[7]等对造血干/ 祖细胞迁移机制进行了研究,发现 Rho GTPase/ LIMK1 / cofilin 在造血干/ 祖细胞的迁移中起着关键作用,其中 cofilin 是一种肌动蛋白结合蛋白,它与肌动蛋白结合能够限制肌动蛋白对特异位点的识别与结合,从而抑制造血干/ 祖细胞的移动,影响其进入造血微环境进行增殖、分化。本研究发现,CTX 造模后第 10 d cofilin 的表达明显升高,而四物汤可以明显降低其表达,如表 1 中 15 号蛋白点数据所示。由此见四物汤可能通过抑制 cofilin 的表达而促进骨髓造血干/ 祖细胞进入造血微环境进行增殖、分化,从而改善骨髓造血。

Annexin 1 (lipocortin 1 , ANX A1) 是钙离子依赖的磷脂结合蛋白,属于 annexin 家族成员,在转染含有 ANX A1 质粒的人髓性白血病细胞株 U937 中,细胞的凋亡加速。ANX A1 N 端表达产物在 TNF 或鬼臼亚乙苷的诱导下,通过升高胱冬肽酶-3 和磷脂酶-2 的活性使细胞更易发生凋亡^[8,9]。此外,在神经酰胺诱导的凋亡中,内源性的 ANX A1 N 端的加工产物促进了神经酰胺诱导的凋亡^[10]。表 1 中 14 号蛋白点数据所示,CTX 造模后,ANX A1 表达升高,而应用四物汤后其表达有下降的趋势,推测 CTX 造模后

平,通过促进造血细胞的生长和分化来促进骨髓造血,从而降低辐射引起的损伤^[4,5],作者的研究同样提示四物汤可以减轻化学损伤(CTX)引起的小鼠骨髓的损伤。

在红细胞分化早期有一些特异性标志物,其中血红蛋白和血浆糖蛋白是已被公认的红细胞分化早期标志物。Villeva^[6]等研究表明碳酸酐酶 I (CA I) 在红细胞分化早期特异性出现,同时也在类红细胞祖细胞中表达。如表 1 中 3 号数据所示,在 CTX 造模后第 10 天小鼠骨髓中 CA I 的表达显著降低,与造模后外周血红细胞降低的时间点相一致^[1],而四物汤能够在一定程度上起升高 CA I 表达的作用。这说明四物汤可能通过作用于 CA I 来促进红细胞的分化成熟。

可能通过高表达 ANX A1 或者其加工产物来激活胱冬肽酶-3,从而启动凋亡途径加速细胞凋亡,而四物汤则通过抑制 ANX A1 的表达或是其加工产物的生成来抑制 CTX 引起的凋亡,但是其具体作用机制有待进一步研究探讨。

本研究中还发现一种含硫醇的蛋白 peroxiredoxin V (Prx V),在 CTX 造模后表达明显升高,如表 1 中 16 号蛋白点数据所示,应用四物汤后其表达又有所下降。该蛋白主要存在于线粒体、过氧化物酶体和细胞核的过氧化还原酶中,目前已发现该家族有 6 个亚型成员(I-IV),它们在氧化应激中起信号转导和降解过氧化氢的作用。此外,还参与受体信号转导、蛋白磷酸化、转录调节和凋亡等过程。Prx V 在细胞抗氧化过程中的作用是通过与 P53 诱导产生的活性氧发生作用,因此 Prx V 抑制 P53 引起的凋亡可能是通过氧化还原反应来实现的^[11],而 P53 是诱导基因损伤而无法修复的细胞发生凋亡^[12]。因此四物汤可能是通过抑制 Prx V 的表达来减轻其对 P53 诱导的凋亡的抑制,从而清除由 CTX 导致的基因损伤而无法修复的细胞。四物汤还可以抑制 CTX 诱导微核率升高^[13],可能由该机制介导。

由本实验结果证明四物汤能在多个作用靶点上

参与促进化学损伤小鼠骨髓造血,可能主要是通过作用于 CA I,cofilin,ANX A1 和 Prx V 等蛋白来促进红细胞的分化成熟、促进造血干/祖细胞进入造血微环境增殖、分化以及参与细胞凋亡过程等途径来促进骨髓造血,与本课题组的前期研究结果相一致。因此,四物汤可能通过影响与细胞凋亡、造血干祖细胞增殖分化有关的蛋白质而促进骨髓造血。

[参考文献]

- [1] 马增春,高月,刘永学. CTX 所致血虚证小鼠骨髓 CD34⁺ 细胞的变化. 中国中医基础医学杂志, 2001, 7(7):42.
- [2] 陈奇. 中药药理研究方法学. 北京:人民卫生出版社,1996. 1103.
- [3] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 1976, 7(72):248.
- [4] 郭平,马增春,王升启,等. 四物汤对放射线致血虚证小鼠骨髓蛋白质表达的影响. 中国中药杂志, 2004, 29(9):893.
- [5] 马增春,高月,谭洪玲,等. 四物汤对放射线致血虚证小鼠血清蛋白质表达的影响. 中国中药杂志, 2003, 28(11):1050.
- [6] Villevall J L, Testa U, Vinci G, et al. Carbonic anhydrase I is an early specific marker of normal human erythroid differentiation. Blood, 1985, 66(5):1162.
- [7] Konakahara S, Ohashi K, Mizuno K, et al. CD29 integrin and LIMK1/cofilin-mediated actin reorganization regulates the migration of haematopoietic progenitor cells underneath bone marrow stromal cells. Genes Cells, 2004, 9(4):345.
- [8] Solito E, de Coupade C, Canaider S, et al. Transfection of annexin I in monocytic cells produces a high degree of spontaneous and stimulated apoptosis associated with caspase-3 activation. Br J Pharmacol, 2001, 133(2):217.
- [9] Canaider S, Solito E, de Coupade C, et al. Increased apoptosis in U937 cells over-expressing lipocortin 1 (annexin I). Life Sci, 2000, 66(18):PL265.
- [10] Debret R, El Btaouri H, Duca L, et al. Annexin A1 processing is associated with caspase-dependent apoptosis in BZR cells. FEBS Lett, 2003, 546(2-3):195.
- [11] Zhou Y, Kok K H, Chun A C, et al. Mouse peroxiredoxin V is a thioredoxin peroxidase that inhibits p53-induced apoptosis. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 268(3):921.
- [12] Laura D Attardi. The role of p53-mediated apoptosis as a curcial anti-tumor response to genomic instability: lessons from mouse models. Mutat Res, 2005, 569:145.
- [13] 周昆福,王明艳,陈全良,等. 四物汤抑制 CTX 诱导微核率增高的实验研究. 江苏中医, 1997, 18(12):44.

Effects of Siwu decoction on bone marrow protein expression of blood deficiency mice induced by cyclophosphamide

LIU Li-li, MA Zeng-chun, WANG Yu-guang, QIN Hong-lin, TAN Hong-ling, XIAO Cheng-rong, GAO Yue
(Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of Siwu decoction on protein expression of blood deficiency mice induced by cyclophosphamide(CTX) and discuss the possible molecular mechanism on blood enriching function of Siwu decoction. **Method:** Blood deficiency mice were established by injecting ip with 250 mg·kg⁻¹ CTX. Proteomic technologies were applied to identify the different protein. **Result:** Siwu decoction could restore the changes of 12 up-regulated and 3 down-regulated proteins in bone marrow of blood deficiency mice induced by cyclophosphamide. **Conclusion:** Siwu decoction could effect expression of proteins which functions including apoptosis, proliferation and differentiation of the haematopoietic stem/progenitor cell. The regulation in the molecular level might be the mechanism of stimulating hematopoiesis in bone marrow fo siwu decoction.

[Key words] Siwu decoction; cyclophosphamide; bone marrow; proteomics