

# 四物汤对放射线致血虚证小鼠骨髓蛋白质表达的影响

郭平<sup>1,2</sup>, 马增春<sup>1</sup>, 李鹰飞<sup>1</sup>, 梁乾德<sup>1</sup>, 王继峰<sup>2</sup>, 王升启<sup>1\*</sup>

(1. 军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850; 2. 北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] 目的:观察四物汤对血虚证小鼠骨髓蛋白质表达的影响,为阐明四物汤补血作用的分子机理提供理论和实验依据。方法:采用 3.5 Gy  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  射线全身 1 次性照射,制备小鼠血虚证模型。利用双向电泳、图像分析、胶内酶切、质谱鉴定等蛋白质组学技术,结合生物信息学,分离、分析、鉴定蛋白质。结果:四物汤可以逆转放射线致血虚证小鼠骨髓 10 个上调和 5 个下调的蛋白质。其中 8 个蛋白质可能分别是淋巴细胞特异性蛋白质-1、蛋白酶体 26S ATP 酶亚组分 4、造血细胞蛋白质酪氨酸磷酸酶、H-ras、3-磷酸甘油醛脱氢酶、生长因子受体结合蛋白-14 及 Igals12。结论:四物汤能调节骨髓蛋白质表达,并可能由此促进造血细胞的生长和分化,发挥补血作用。

[关键词] 四物汤;辐射;血虚证;功能蛋白质组学;骨髓

[中图分类号] R 285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5302(2004)09-0893-04

血虚证是血液亏虚,脏腑百脉失调,表现全身虚弱的证候。四物汤是传统的补血方剂,能促进骨髓细胞增殖,提高外周血象<sup>[1]</sup>。近年来对四物汤补血机理已进行了较为广泛的研究<sup>[2]</sup>,证实四物汤能明显促进血虚证小鼠骨髓各类造血祖细胞的增殖,显著提高骨髓 CD34<sup>+</sup> 细胞比例。但目前尚无深入、全面研究四物汤对造血组织蛋白质作用的报道。作者利用蛋白质组学技术,研究了四物汤对放射线致血虚证小鼠骨髓组织蛋白质的影响,以期从分子水平较深入地阐明四物汤的补血机理,并确定其作用的分子靶标。

## 1 材料

### 1.1 药物

四物汤的四味药熟地、当归、白芍和川芎均购自北京同仁堂中药厂,由本所九室马白平教授鉴定,按

《太平惠民和剂局方》规定的剂量比(15:10:10:6)称取。按人用药剂量计算<sup>[3]</sup>小鼠用药剂量为  $10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。经水煎、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。

### 1.2 主要试剂与仪器

丙烯酰胺、N,N'-甲叉双丙烯酰胺、Tris-base、过硫酸铵、四甲基乙二胺、十二烷基磺酸钠(SDS)、尿素、丙基磺酸盐、Pharmalyte 3~10、固定干胶条(IPG)、IPG 缓冲液、低分子量蛋白质 Marker、甘油、琼脂糖、溴酚蓝等均购自 Amersham Biosciences 公司。甘氨酸、考马斯亮蓝 R-250 和 G-250 购自 AMRESCO 公司。三氟乙酸、碘乙酰胺购自 Acros Organics 公司。乙腈购自 Fisher 公司。RNase A 购自 Sigma 公司,清蛋白标准购自 Pierce 公司。二硫苏糖醇(DTT)购自 Amresco 公司,蛋白质酶抑制剂、胰酶购自 Boehringer Mannheim 公司。其他试剂均为国产分析纯。

蛋白质双向电泳(2DE)及电泳图谱图像处理采用 Amersham Biosciences 公司蛋白质组学研究配套仪器:Ettan<sup>TM</sup> IPGphor 等电聚焦仪,Ettan<sup>TM</sup> DALTsix 二向垂直电泳仪,MultiTemp III 温控循环水浴,Processor Plus Base Unit 全自动染色仪,Image Scanner 扫描仪,

[收稿日期] 2004-04-15

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30271617,30070913);军队“十五”重点项目(01Z019);北京市“二四八”重大创新工程项目(H010210220113)

[通讯作者] \* 王升启, Tel: (010) 66932211, Fax: (010)

66932211, E-mail: Sqwang@nic.bmi.ac.cn

Image Master 2D v4 .01 c 软件。REFLEX II 基质辅助激光解吸/ 电离飞行时间质谱仪。核酸蛋白分析仪 DU640。

1.3 动物

1.3.1 动物及分组 C57BL/ 6J 小鼠 , 雌性 , 51 只 , 6 ~ 8 周龄 , 体重 ( 20 ± 2 ) g , 由中国医学科学院实验动物中心提供 ( 动物合格证号 SCXH1-00-0006 ) 。随机分为 3 组 : 正常对照组、模型对照组和四物汤组。每组 17 只。

1.3.2 动物造模及处理 小鼠常规饲养数天适应环境后 , 模型对照组和四物汤组采用 <sup>60</sup>Co  $\gamma$  射线全身 1 次照射 , 照射剂量 3.5 Gy , 剂量率 1.701 Gy · min<sup>-1</sup> , 制成血虚证模型。照射后小鼠立即灌胃 , 四物汤组灌以四物汤药液 , 0.2 mL/ 次 , 1 次/ d ; 正常对照组和模型对照组灌以等量生理盐水 , 连续灌胃 7 d 。最后 1 次灌胃 24 h 后 , 颈椎脱臼处死小鼠 , 取股骨髓。

2 方法

2.1 样品制备

小鼠骨髓用磷酸盐缓冲液洗涤 , 加入细胞裂解液 , 液氮冻融 3 次 , 加入 RNase A , 冰浴放置 20 min , 离心 , 取上清。用 Bradford 法<sup>[4]</sup>测定蛋白质含量。正常、模型、药物组小鼠骨髓提取液蛋白质含量分别为 20.88 , 23.75 , 22.22 mg · mL<sup>-1</sup>。

2.2 双向电泳

电泳重复 3 次。IPG4 ~ 7 , 24 cm , 采用胶内泡涨法。将含有 2 mg 蛋白质的各组骨髓提取液分别与

IPG 胶条溶胀液混合 , 进行一向等电聚焦电泳。电泳参数 : 30 V 再水化 , 12 h ; 200 V , 1 h ; 500 V , 1 h ; 1 000 V , 1 h ; 8 000 V , 13 h。

IPG 胶条分别在含有 DTT 和碘乙酰胺的平衡液中平衡 15 min。

将 IPG 胶条置于预制的 12.5 % SDS- 聚丙烯酰胺凝胶 ( 简称凝胶 ) 上 , 进行第二向 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳 ( SDS- PAGE ) 。电泳参数 : 120 mA , 40 min ; 150 mA 至溴酚蓝迁移至 SDS- PAGE 凝胶底部边缘。

2.3 凝胶染色与脱色

考马斯亮蓝染色液染色 6 h , 考马斯亮蓝脱色液脱色 12 h。

2.4 凝胶扫描分析及统计处理

扫描凝胶 , 分析电泳图谱。差异蛋白质点标准化量 ( normalized volumes ) ( % ) 以均数 ± 标准差表示 , 统计分析采用 *t* 检验。

2.5 肽质量指纹谱测定

切下凝胶差异蛋白质点 , 脱色 , 胶内酶切 , 检测肽质量指纹谱。

2.6 数据库检索鉴定蛋白质

输入拟查询的物种、肽质量指纹谱数据及其他参数 , 在数据库查寻与其相匹配的蛋白质。检索数据库为 : <http://www.matrixscience.com>。

3 结果

3.1 四物汤对血虚证小鼠骨髓蛋白质的影响

四物汤对血虚证小鼠骨髓蛋白质的影响见表 1。

表 1 四物汤对血虚证小鼠骨髓蛋白质的影响 (  $\bar{x} \pm s$  )

序号	等电点 / 分子量 / kDa	标准化量 / %		
		正常组	模型组	四物汤组
1	4.703/66.874	0.172 ± 0.018 <sup>1)</sup>	0.079 ± 0.005	0.102 ± 0.018
2	4.666/66.874	0.121 ± 0.016 <sup>1)</sup>	0.059 ± 0.008	0.072 ± 0.027
3	5.204/64.499	0.207 ± 0.011 <sup>2)</sup>	0.140 ± 0.008	0.157 ± 0.008 <sup>1)</sup>
4	6.223/66.766	0.037 ± 0.009 <sup>1)</sup>	0.091 ± 0.013	0.055 ± 0.008
5	6.291/64.571	0.063 ± 0.019 <sup>1)</sup>	0.137 ± 0.005	0.092 ± 0.004 <sup>1)</sup>
6	5.865/52.265	0.134 ± 0.028 <sup>1)</sup>	0.238 ± 0.008	0.177 ± 0.021
7	6.056/45.608	0.194 ± 0.020 <sup>1)</sup>	0.309 ± 0.021	0.247 ± 0.052
8	4.916/43.737	0.693 ± 0.015 <sup>2)</sup>	0.410 ± 0.008	0.442 ± 0.094
9	5.116/33.05	0.537 ± 0.068 <sup>1)</sup>	0.269 ± 0.035	0.341 ± 0.009
10	4.424/26.716	0.167 ± 0.055 <sup>1)</sup>	0.414 ± 0.083	0.293 ± 0.064
11	4.386/26.429	0.063 ± 0.000 <sup>1)</sup>	0.115 ± 0.008	0.087 ± 0.011
12	4.415/24.126	0.225 ± 0.042 <sup>1)</sup>	0.465 ± 0.029	0.346 ± 0.002 <sup>1)</sup>
13	5.147/25.421	0.044 ± 0.009 <sup>2)</sup>	0.127 ± 0.006	0.075 ± 0.009 <sup>1)</sup>
14	6.075/61.405	0.128 ± 0.028 <sup>1)</sup>	0.274 ± 0.003	0.167 ± 0.018 <sup>1)</sup>
15	6.324/61.189	0.048 ± 0.001 <sup>1)</sup>	0.098 ± 0.013	0.062 ± 0.004

注 : 与模型组相比 <sup>1)</sup> *P* < 0.05 , <sup>2)</sup> *P* < 0.01

表 1 可见,放射线照射后,小鼠骨髓 1,2,3,8,9 号蛋白质量显著降低(  $P < 0.05$  或  $< 0.01$  );4,5,6,7,10,11,12,13,14,15 号蛋白质量显著升高(  $P < 0.05$  或  $< 0.01$  ),四物汤可逆转其变化。

3.2 差异蛋白质鉴定分析

四物汤作用于血虚证小鼠的差异蛋白质鉴定结果见表 2。

表 2 可见,经鉴定,1,2,3,5,7,8,9,12,13,14,15 号蛋白质分别是淋巴细胞特异性蛋白质 1 ( lymphocyte-specific protein 1 , LSPI )、蛋白酶体 26S ATP 酶亚

组分 4( proteasome 26S ATPase subunit 4 )、造血细胞蛋白酪氨酸磷酸酶( hematopoietic cell protein-tyrosine phosphatase , HCP )、免疫球蛋白重链 VDJ 区( immunoglobulin heavy chain VDJ region )、H-ras、3-磷酸甘油醛脱氢酶( glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase )、Krox-6.1 A 蛋白( Krox-6.1 A protein )、生长因子受体结合蛋白 14( growth factor receptor binding protein 14 , Grb14 protein )、RIKEN cDNA 1700049E17 和 Lgals12 蛋白。

4 讨论

表 2 四物汤作用于血虚证小鼠骨髓差异蛋白质鉴定

序号	匹配序号	分值	等电点/分子量/ Da	肽段匹配	序列覆盖率/ %	蛋白质名称
1	gil_1346470	88	4.77/36 692	8/28	39	淋巴细胞特异性蛋白质 1
2	gil_1346470	69	4.77/36 692	9/32	39	淋巴细胞特异性蛋白质 1
3	gil_25742677	69	5.09/47 379	9/39	34	蛋白酶体 26S ATP 酶亚组分 4
5	gil_21903454	122	7.66/67 517	14/37	31	造血细胞蛋白酪氨酸磷酸酶
7	gil_28874962	54	8.87/11 023	4/20	65	免疫球蛋白重链 VDJ 区
8	gil_7768785	51	6.18/17 268	4/22	45	H-ras
9	gil_38079919	38	6.43/39 860	5/20	24	3-磷酸甘油醛脱氢酶
12	gil_125687	47	9.01/6 492	3/11	92	Krox - 6.1 A 蛋白
13	gil_18256070	40	8.93/23 378	4/20	34	生长因子受体结合蛋白 14
14	gil_21735459	59	8.33/19 608	7/29	50	RIKEN cDNA 1700049E17
15	gil_21410142	52	9.11/35 437	5/28	25	Lgals12 蛋白

四物汤是临床上常用补血方剂。作者的研究结果显示,四物汤可使放射线致血虚证小鼠骨髓 LSPI、蛋白酶体 26S ATP 酶亚组分 4、H-ras、3-磷酸甘油醛脱氢酶回升;HCP、Krox-6.1 A 蛋白质、Grb14 和 RIKEN cDNA 1700049E17 及 Lgals12 蛋白回落。

LSPI 在体内通过不同剪接和磷酸化形成不同异构体<sup>[5]</sup>。1 号和 2 号蛋白质即为其两种异构体。LSPI 在人及小鼠所有的造血细胞中表达。推测它是一种钙结合蛋白,可能通过钙结合功能具有跨膜信号转导活性<sup>[6]</sup>。实验显示,在骨髓粒细胞和单核细胞分化时其表达上调<sup>[7]</sup>;能对抗 anti-IgM 诱导的未成熟 B 淋巴细胞凋亡<sup>[8]</sup>。四物汤能升高 LSPI,因而可能促进骨髓细胞分化。

研究显示,proteasome ATPase S4 具有 ATP 依赖的 RNA/ DNA 解旋酶功能<sup>[9]</sup>,还能与 TATA 结合蛋白形成复合物,具有转录活化作用<sup>[10]</sup>。四物汤能提高其在骨髓组织中的表达,促进转录。

HCP 是一种非跨膜蛋白酪氨酸酶,主要在造血细胞表达,在造血调控中起关键作用,直接与生长因子和其他信号蛋白相关<sup>[6]</sup>,使造血细胞增殖下调<sup>[11]</sup>。近年来,对 HCP 在造血中的作用进行了大量的研究。蛋白酪氨酸磷酸化和脱磷酸化与造血细

胞的生长和功能密切相关。许多促进造血干细胞生长和分化的生长因子和分化因子通过各种细胞内激酶使酪氨酸残基磷酸化而介导其效应。抑制造血干细胞分化的机制之一就是由 HCP 催化酪氨酸残基脱磷酸化。实验显示,白介素-1( IL-1 )、白介素-3( IL-3 )、促红细胞生成素( EPO )和粒-巨系集落刺激因子( CFS- GM )介导的造血干细胞分化可被蛋白酪氨酸磷酸酶抑制<sup>[12]</sup>。四物汤减少 HCP 表达,从而促进造血细胞的生长和分化。

3-磷酸甘油醛脱氢酶催化 3-磷酸甘油醛生成 1,3-二磷酸甘油酸,是糖分解代谢的重要酶。四物汤能升高骨髓该酶表达,从而促进糖氧化分解,为细胞提供能量。

经受体酪氨酸激酶作用的造血生长因子信号转导是经 ras 信号途径。ras 蛋白是一种 G 蛋白。作为信号的转导体,当与 GTP 结合转化而活化后,经一系列中间信号分子最终作用于效应基因,促进细胞生长。四物汤升高骨髓 H-ras 水平,促进骨髓细胞生长。

Grb14 是近年发现的一种蛋白质,Grb7/ Grb14 与生长因子受体相互作用,抑制 ras 信号途径<sup>[13]</sup>。Grb14 蛋白能在配体的诱导下结合于各种受体酪氨

酸激酶,是胰岛素受体酪氨酸激酶的抑制剂,并由此抑制胰岛素效应。Grb1 4 也抑制成纤维细胞生长因子信号<sup>[14]</sup>。四物汤减少骨髓 Grb1 4 表达,加强生长因子信号,促进骨髓细胞生长。

Lgals1 2(又称为 galectin 12)具有调节细胞周期的作用,使细胞周期滞留在 G1 期,抑制细胞生长<sup>[15]</sup>。四物汤能减少骨髓 Lgals1 2 表达,促进细胞分裂。

由本实验结果可见:四物汤作用于骨髓多个靶点。通过升高骨髓 LSP1、蛋白质酶 26S ATP 酶亚组分 4、H-ras 和 3-磷酸甘油醛脱氢酶,降低 HCP, Grb1 4, Lgals1 2, 四物汤能调节骨髓组织糖代谢,促进基因转录,促进造血生长因子信号转导和造血细胞的生长和分化,并可能由此发挥补血作用。

#### [参考文献]

- [1] 马增春,高月,刘永学,等.四物汤对 $\gamma$ 射线照射致血虚证小鼠造血细胞作用的研究.中国实验方剂学杂志,2001,7(3):41.
- [2] 郭平,王继峰,王升启.四物汤及其有效成分药理作用研究进展.日中医学交流,2004,1:17.
- [3] 陈奇.中药药理研究方法学.北京:人民卫生出版社,1996.1103.
- [4] 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*, 1976,72:248.
- [5] Matsumoto N, Kita K, Kojima S, *et al* . Lymphocyte isoforms of mouse p50 LSP1, which are phosphorylated in mitogen-activated T cells, are formed through alternative splicing and phosphorylation. *J Biochem (Tokyo)*, 1995, 118(1):237.

- [6] <http://www.matrixscience.com/cgi/protein-view>.
- [7] Li Y, Guerrero A, Howard T H. The actin-binding protein, lymphocyte-specific protein 1, is expressed in human leukocytes and human myeloid and lymphoid cell lines. *J Immunol*, 1995, 155(7):3563.
- [8] Jongstra-Bilen J, Wielowieyski A, Misener V, *et al* . LSP1 regulates anti-IgM induced apoptosis in WEHI-231 cells and normal immature B-cells. *Mol Immunol*, 1999, 36(6):349.
- [9] Makino Y, Yogosawa S, Kanemaki M, *et al* . Structures of the rat proteasomal ATPases: determination of highly conserved structural motifs and rules for their spacing. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 220(3):1049.
- [10] Makino Y, Yoshida T, Yogosawa S, *et al* . Multiple mammalian proteasomal ATPases, but not proteasome itself, are associated with TATA-binding protein and a novel transcriptional activator, TIP120. *Genes Cells*, 1999, 4(9):529.
- [11] Matozaki T, Uchida T, Fujioka Y, *et al* . Src kinase tyrosine phosphorylates PTPLC, a protein tyrosine phosphatase containing Src homology-2 domains that down-regulates cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 204(2):874.
- [12] Cheng J, Daimaru L, Fennie C, *et al* . A novel protein tyrosine phosphatase expressed in lin(lo) CD34(hi) Sca(hi) hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 1996, 88(4):1156.
- [13] Cailliau K, Le Marcis V, Berezat V, *et al* . Inhibition of FGF receptor signalling in *Xenopus* oocytes: differential effect of Grb7, Grb10 and Grb14. *FEBS Lett*, 2003, 548(1-3):43.
- [14] Cariou B, Berezat V, Moncoq K, *et al* . Regulation and functional roles of Grb14. *Front Biosci*, 2004, 9(2):1626.
- [15] Yang RY, Hsu DK, Yu L, *et al* . Cell cycle regulation by galectin-12, a new member of the galectin superfamily. *J Biol Chem*, 2001, 276(23):20252.

## Effects of Siwu Tang on protein expression of bone marrow of blood deficiency mice induced by irradiation

GUO Ping<sup>2</sup>, MA Zeng-chun<sup>1</sup>, LI Ying-fei<sup>1</sup>, LIANG Qian-de<sup>1</sup>, WANG Ji-feng<sup>2</sup>, WANG Sheng-qi<sup>1</sup>

(1. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;

2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effects of Siwu Tang on protein expression of bone marrow of blood deficiency mice and provide the theoretical and experimental basis for understanding the molecular mechanism of blood enriching function of Siwu Tang. **Method:** Blood deficiency mice were established by using 3.5 Gy <sup>60</sup>Co  $\gamma$ -ray. With proteomic technologies including two-dimensional electrophoresis, image analysis, in-gel digestion, peptide mass fingerprinting and bioinformatics the proteins of bone marrow of blood deficiency mice were isolated, analyzed, and identified. **Result:** Siwu Tang could reverse 10 up-regulated and 4 down-regulated proteins of blood deficiency mice bone marrow. Seven of the proteins were likely to be lymphocyte specific protein 1, proteasome 26S ATPase subunit 4, hematopoietic cell protein-tyrosine phosphatase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, growth factor receptor binding protein 14 and Lgals12 respectively. **Conclusion:** Siwu Tang can regulate the protein expression of bone marrow of blood deficiency mice and thus promote the growth and differentiation of hematopoietic cells and then exert its effects on blood enriching function.

**[Key words]** Siwu Tang; irradiation; blood deficiency; functional proteomics; bone marrow

[责任编辑 方文贤]