

牛膝醇提物诱导兔骨髓间充质干细胞软骨分化的蛋白组学分析

马笃军^{1,2}, 朱厚均², 刘乐诗², 彭力平¹, 赵静², 廖州伟¹<https://doi.org/10.12307/2023.641>

投稿日期: 2022-03-28

采用日期: 2022-08-23

修回日期: 2022-09-13

在线日期: 2022-10-11

中图分类号:

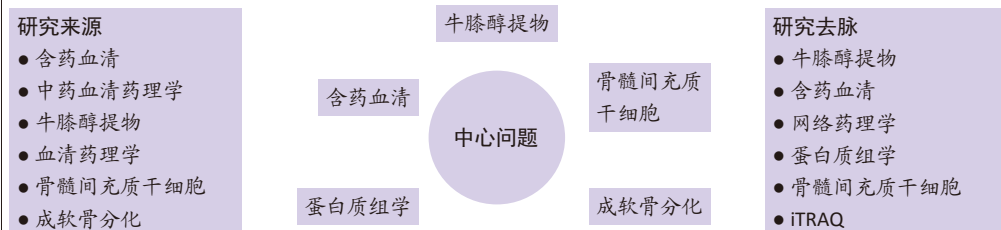
R459.9; R318; R282

文章编号:

2095-4344(2023)24-03795-08

文献标识码: A

文章快速阅读: 牛膝醇提物诱导兔骨髓间充质干细胞成软骨分化的蛋白质组学分析及蛋白质相互作用网络构建



文题释义:

蛋白组学: 是以蛋白质组为研究对象, 研究细胞、组织或生物体蛋白质组成及其变化规律的科学, 本质上指的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, 由此获得在蛋白质水平上对疾病发生、细胞代谢等过程的整体而全面的认识。

骨髓间充质干细胞: 也称为骨髓基质成纤维细胞, 是一类起源于中胚层的成体干细胞, 具有自我更新及多向分化潜能, 可根据所处的微环境不同, 进行细胞迁移、定植、增殖与分化, 其中分化潜能属于目前的研究热点, 常见分化为多种间质组织, 如血管、脂肪、韧带、骨髓、软骨等。

摘要

背景: 前期研究发现牛膝醇提物具有诱导骨髓间充质干细胞定向软骨细胞分化的作用, 但具体作用蛋白靶点和网络机制不详。

目的: 观察牛膝醇提物诱导兔骨髓间充质干细胞软骨分化的蛋白质组学分析及蛋白质相互作用网络构建。

方法: 采用密度梯度离心联合细胞贴壁法分离培养新西兰大白兔骨髓间充质干细胞, 取第3代细胞随机分成5组: 空白组、对照组、牛膝醇提物低、中、高剂量组, 连续成软骨诱导培养21 d后, 用qRT-PCR检测II型胶原mRNA表达及甲苯胺蓝染色鉴定软骨细胞形成, 应用绝对定量同位素标记(iTRAQ)结合双向液相色谱-串联质谱(2DLC-MS/MS)技术对各组差异表达蛋白质进行鉴定, 并对差异蛋白进行GO分析、KEGG分析及蛋白质网络相互作用分析。

结果与结论: ①qRT-PCR结果显示牛膝醇提物高剂量组较其他组II型胶原mRNA表达明显增高($P < 0.05$), 牛膝醇提物高剂量组甲苯胺蓝染色阳性, 蛋白组学分析共鉴定到1 354个差异蛋白点, 上调蛋白633个, 下调蛋白721个。②根据qRT-PCR结果对空白组、牛膝醇提物高剂量组、对照组3组差异表达蛋白进行生物信息分析。GO分析发现这些差异表达蛋白参与代谢、细胞分化、细胞周期与凋亡、炎症反应、免疫调控、氧化应激、磷酸化、泛素化、癌相关等; KEGG分析获得与骨关节病最相关的10个典型信号通路: 白细胞介素17信号通路, Toll样受体信号通路, Wnt信号通路, PI3K-Akt信号通路, mTOR 信号通路, Jak-STAT信号通路, NF-kappa B信号通路, MAPK信号通路, AMPK信号通路, HIF-1信号通路; 根据组间差异蛋白, 使用Cytoscape3.6.0软件成功构建蛋白互作网络图。③结果表明, 牛膝醇提物可以通过调控氧化、细胞周期与凋亡、细胞结构改变、细胞分化、代谢及炎症损伤等环节诱导兔骨髓间充质干细胞成软骨分化, 具有多靶点、多中心的网络调控作用, 其具体作用机制有待进一步研究。

关键词: 牛膝醇提物; 蛋白组学; 骨髓间充质干细胞; 软骨分化; iTRAQ技术

Proteomic analysis on cartilage differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells induced by Achyranthes bidentata alcohol extract

Ma Dujun^{1,2}, Zhu Houjun², Liu Leshi², Peng Liping¹, Zhao Jing², Liao Zhouwei¹

¹The Fourth Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese medicine, Shenzhen 518033, Guangdong Province, China; ²Guangzhou University of Chinese medicine, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China

Ma Dujun, Master, Associate chief physician, Master's supervisor, The Fourth Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese medicine, Shenzhen 518033, Guangdong Province, China; Guangzhou University of Chinese medicine, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China

¹广州中医药大学第四临床医学院, 广东省深圳市 518033; ²广州中医药大学, 广东省广州市 510006

第一作者: 马笃军, 男, 1985年生, 湖南省郴州市人, 汉族, 2013年湖南中医药大学毕业, 硕士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事中医药治疗骨关节疾患及干细胞修复软骨损伤的研究。

通讯作者: 马笃军, 硕士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 广州中医药大学第四临床医学院, 广东省深圳市 518033; 广州中医药大学, 广东省广州市 510006

<https://orcid.org/0000-0002-8050-2849> (马笃军)

基金资助: 国家自然科学基金项目(81804124), 项目负责人: 马笃军

引用本文: 马笃军, 朱厚均, 刘乐诗, 彭力平, 赵静, 廖州伟. 牛膝醇提物诱导兔骨髓间充质干细胞软骨分化的蛋白组学分析 [J].

中国组织工程研究, 2023, 27(24):3795-3802.



Corresponding author: Ma Dujun, Master, Associate chief physician, Master's supervisor, The Fourth Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese medicine, Shenzhen 518033, Guangdong Province, China; Guangzhou University of Chinese medicine, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China

Abstract

BACKGROUND: Preliminary studies have found that *Achyranthes bidentata* alcohol extract can induce the directional chondrocyte differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells, but the specific protein targets and network mechanisms are unknown.

OBJECTIVE: To observe the proteomic analysis of cartilage differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells induced by *Achyranthes bidentata* alcohol extract and the construction of protein interaction network.

METHODS: Bone marrow mesenchymal stem cells of New Zealand white rabbits were isolated and cultured by density gradient centrifugation combined with bone marrow adherent method. Passage 3 cells were randomly divided into five groups: blank group, control group, low-dose *Achyranthes bidentata* alcohol extract group, medium-dose *Achyranthes bidentata* alcohol extract group, and high-dose *Achyranthes bidentata* alcohol extract group. After continuous induction and culture for 21 days, qRT-PCR was used to detect the expression of type II collagen mRNA and toluidine blue staining was used to identify the formation of chondrocytes. The differentially expressed proteins of different groups were identified by absolute quantitative isotope labeling (iTRAQ) combined with two-way liquid chromatography tandem mass spectrometry, and the differentially expressed proteins were analyzed by GO analysis, KEGG analysis and protein interaction network analysis.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The qRT-PCR results showed that the expression of type II collagen mRNA in the high-dose *Achyranthes bidentata* alcohol extract group was significantly higher than that in other groups ($P < 0.05$), and toluidine blue staining displayed positive reaction in the high-dose *Achyranthes bidentata* alcohol extract group. A total of 1 354 differential protein spots were identified by proteomic analysis, including 633 up-regulated proteins and 721 down-regulated proteins. (2) According to the results of qRT-PCR, the differentially expressed proteins of blank group, high-dose *Achyranthes bidentata* alcohol extract group and control group were analyzed. Go analysis showed that these differentially expressed proteins were involved in metabolism, cell differentiation, cell cycle and apoptosis, inflammatory response, immune regulation, oxidative stress, phosphorylation, ubiquitination, cancer and so on. KEGG analysis obtained 10 typical signal pathways most related to osteoarthritis: interleukin-17 signaling pathway, Toll like receptor signaling pathway, Wnt signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway, mTOR signaling pathway, JAK-STAT signaling pathway, NF-kappa B signaling pathway, MAPK signaling pathway, AMPK signaling pathway, and HIF-1 signaling pathway. According to the protein difference between groups, Cytoscape 3.6.0 software was used to successfully construct protein interaction network diagram. (3) These results suggest that *Achyranthes bidentata* alcohol extract can induce chondrogenic differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells by regulating oxidation, cell cycle and apoptosis, changes in cell structure, cell differentiation, metabolism and inflammatory injury. It has multi-target and multi-center network regulation, and its specific mechanism needs to be further studied.

Key words: *Achyranthes bidentata* alcohol extract; proteomics; bone marrow mesenchymal stem cell; cartilage differentiation; iTRAQ technology

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81804124 (to MDJ)

How to cite this article: MA DJ, ZHU HJ, LIU LS, PENG LP, ZHAO J, LIAO ZW. Proteomic analysis on cartilage differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells induced by *Achyranthes bidentata* alcohol extract. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2023;27(24):3795-3802.

0 引言 Introduction

骨髓间充质干细胞是来源于骨髓组织中能产生多种效能的原始单核祖细胞,具有分化为成骨细胞、脂肪细胞和软骨细胞等细胞的能力,作为种子细胞能够根据微环境信号的指令分化为不同种类细胞,适合于伴随软骨下骨损伤的软骨缺损修复^[1],已成为细胞组织工程研究的热点。骨髓间充质干细胞对关节病变的治疗主要是直接将干细胞注入病变关节或与生物工程支架混合植入病变关节而发挥干细胞归巢的治疗作用,两者疗效已经在动物实验和临床应用中得到验证,这也证实了骨髓间充质干细胞能够通过产生营养因子修复病变组织。许多研究表明,补肝肾中药对骨髓间充质干细胞成骨和成软骨分化具有促进作用,与中医理论“肾主骨生髓”相符合,故能通过补肾治疗来生“髓”(骨髓干细胞),并达到壮“骨”、强“筋”(软骨属筋)的效果。基于前期研究,牛膝具有促进骨髓干细胞归巢^[2]、骨髓源成体干细胞软骨分化^[3]、兔骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化等作用^[4]。故该实验拟用蛋白质组学绝对定量同位素标记(isobaric tags for relative and absolute quantification, iTRAQ)技术对怀牛膝有效制剂牛膝醇提物(*achyranthes bidentata* alcohol extract, ABE)诱导兔骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化的差异蛋白进行蛋白组学分析,现报道如下。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞学实验,组间差异性分析采用非配对 t 检验。

1.2 时间及地点 实验于2020年1月至2021年12月在广州中医药大学第四临床医学院中心实验室、威斯腾生物实验室

完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 健康新西兰大白兔12只,雌雄各半,两三个月龄,体质量(1.660 ± 0.368) kg,由广东省实验动物中心提供,动物生产许可证号:SCXK(粤)2019-0035。实验通过广州中医药大学实验动物伦理委员会批准(伦理批号2018023),实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

1.3.2 药物、试剂与仪器 牛膝醇提物(原料来源怀牛膝,每毫升含原药材1 g,深圳市中医院院内制剂)。胰蛋白酶(Promega);尿素(GibcoBRL);EDTA(Amresco);PMSF(Amresco);DTT(Promega);考马斯亮蓝染料G250(Amesco);丙烯酰胺(Sigma);TEMED(Sigma);iTRAQ® Reagent-8Plex Multiplex Kit(SCIEX);strata-X C18 除盐柱(Phenomenex);SCX 强阳离子交换柱 Luna SCX 250*4.60 mm 100Å(Phenomenex);L-DMEM 培养基(Gbico,美国,批号11995-065);胎牛血清(Gibco,美国,批号10099-141);地塞米松(普西唐,中国,批号D20066);碱性成纤维细胞生长因子(Gibco,美国,批号PHG0367);维生素C(Sigma,德国,批号A5960);转化生长因子β1(MedChemExpress,美国,批号HY-P70648);0.25%胰蛋白酶(碧云天,中国,批号C0201)。常规液相色谱仪(RIGOL, L-3000);纳升液相色谱仪(Dionex, ultimate 3000 nano LC system);质谱仪(Thermo fisher, Q-Exactive);扫描仪(UMAX, Powerlook 2100XL-USB);电泳仪(北京六一仪器厂, DYY-7C 型);离心机(Eppendorf, 5417R 型);手掌式离心机(其林贝尔仪器, LX-100);电热恒温水浴锅(上海一恒科学

仪器有限公司, HWS24); 数据采集及处理软件 (ThermoFisher Proteome Discoverer 1.4)。

1.4 实验方法

1.4.1 牛膝醇提物含药血清制备 12 只实验兔按照随机数字表法分为空白组、牛膝醇提物低剂量组、牛膝醇提物中剂量组、牛膝醇提物高剂量组, 每组 3 只。《中国药典》2010 年版牛膝常规高用量 12 g, 按照药理实验中动物与人体间的等效剂量进行换算, 实验兔每日用量约 1 g/kg。按照常规用药量的 1, 3, 6 倍, 给予低剂量组 1 g/(kg·d)、中剂量组 3 g/(kg·d)、高剂量组 6 g/(kg·d), 空白组 0 g/(kg·d), 每天灌胃 2 次, 每次灌胃时用蒸馏水配成 10 mL。根据以上用药量连续用药 7 d 后制备牛膝醇提物含药血清。

1.4.2 骨髓间充质干细胞培养、分组及干预 按照前期实验的方法^[5], 从健康新西兰实验兔髌骨穿刺抽吸骨髓液, 采用 Percoll 密度梯度离心法联合细胞贴壁法分离出骨髓间充质干细胞, 并用流式细胞仪检测第 3 代骨髓间充质干细胞抗原表型 CD90、CD44 的表达。

取第 3 代骨髓间充质干细胞, 胰酶消化, 以 $5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 细胞浓度接种于 24 孔板中, 每孔 1 mL, 加入含体积分数为 10% 胎牛血清的 L-DMEM 培养液, 同时加入地塞米松 (39.25 mg/L)、碱性成纤维细胞生长因子 (10 $\mu\text{g/L}$)、维生素 C (50 mg/L), 在 37 °C、体积分数为 5% CO_2 孵箱内培养 1 周, 间隔 72 h 换液 1 次, 换液 2 次。从第 2 周起更换含体积分数为 10% 胎牛血清、体积分数为 10% 含药血清或空白血清的 L-DMEM 培养液, 同时加入地塞米松和维生素 C, 继续培养 3 周, 每日用倒置显微镜观察细胞形态变化并拍照。

细胞分组如下: ①空白组: 体积分数为 10% 胎牛血清 + L-DMEM 培养液 + 体积分数为 10% 空白血清; ②牛膝醇提物高剂量组: 体积分数为 10% 胎牛血清 + L-DMEM 培养液 + 体积分数为 10% 牛膝醇提物高剂量含药血清; ③牛膝醇提物中剂量组: 体积分数为 10% 胎牛血清 + L-DMEM 培养液 + 体积分数为 10% 牛膝醇提物中剂量含药血清; ④牛膝醇提物低剂量组: 体积分数为 10% 胎牛血清 + L-DMEM 培养液 + 体积分数为 10% 牛膝醇提物低剂量含药血清; ⑤对照组 (经典成软骨诱导组): 体积分数为 10% 胎牛血清 + L-DMEM 培养液 + 体积分数为 10% 空白血清 + 转化生长因子 $\beta 1$ (10 $\mu\text{g/L}$)。

1.4.3 qRT-PCR 检测骨髓间充质干细胞诱导软骨分化后 II 型胶原 mRNA 相对表达量 将骨髓间充质干细胞诱导培养 21 d 后, 用 Trizol 试剂分别提取各组细胞的总 RNA, 以其中的 mRNA 为模板, 采用随机引物, 在反转录酶作用下反转录为 cDNA, 以此 cDNA 为第 1 链为模板, 通过特异性引物, 采用 qRT-PCR 扩增目的基因。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。引物合成使用 Primer Premier 5.0 软件, II 型胶原引物序列 (5' to 3'): Forward: TGT GAA CTG GTA GAT CTG GT; Reverse: AAG AAG TGG AAT AAG TGG GCT。内参基因选择 β -actin, 引物序列 (5' to 3'): Forward: TCA CCA TGG ATG ATG ATA TCG C; Reverse: CGT GCT CGA TGG GGT ACT TCA。

1.4.4 骨髓间充质干细胞诱导软骨分化后甲苯胺蓝染色鉴定 骨髓间充质干细胞诱导培养 21 d 后, 将细胞涂片放入体积分数 95% 乙醇中固定 15 s, 取出后滴加细胞专用甲苯胺蓝染色液, 滴加等量蒸馏水于涂片上混匀, 染色 15 min, 经过水洗、烘干后显微镜下观察。

1.4.5 蛋白质组学方法

(1) 细胞蛋白样品的制备: 取诱导培养 21 d 后细胞, 待细胞生长密度达 90%–100% 时, 吸出培养液, 用胰酶消化, PBS 洗涤细胞 3 次, 加入 500 μL 细胞裂解液, 充分混匀, 冰浴超声 5 min, 4 °C 20 000 r/min 离心 1 h, 取上清, 使用 Bradford 法对蛋白进行定量, 分装于 -80 °C 冻存备用。

(2) 蛋白质的酶解: 每个样品取 100 μg 蛋白, 加入到 10 K 超滤管中, 4 °C, 14 000 $\times g$ 离心 40 min, 弃掉上层残留的培养基和细胞裂解液, 加入 200 μL 50% TEAB, 4 °C, 14 000 $\times g$ 离心 40 min, 弃掉上层残留的液体, 重复上述步骤 2 遍, 加入 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 胰蛋白酶, 每 100 μg 蛋白质底物加入 3.3 μg 胰蛋白酶, 37 °C 水浴 24 h, 冻干酶解后的蛋白质, 然后使用 TEAB (水: TEAB=1:1) 每管 30 μL 复溶冻干后的物质 (肽段)。

(3) 肽段的标记: 标记试剂平衡至室温, 每管标记试剂中加入 70 μL 异丙醇, 混匀 1 min, 离心甩至管底。将混好的标记试剂加入到肽段中, 不同样品用不同大小的同位素标记。肽段标记信息, 空白组: 113; 牛膝醇提物高剂量组: 114; 牛膝醇提物中剂量组: 115; 牛膝醇提物低剂量组: 116; 对照组: 117。混匀后, 离心甩至管底, 室温静置 2 h。

(4) 高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 预分离: 使用常规液相, 强阳离子交换色谱柱 (SCX)。标记后样品用 A 液稀释 10 倍, 磷酸调 pH 值至 3.0, 15 000 $\times g$ 离心 10 min, 取上清; 上样, 按照设置好的分离梯度运行, 得到预分离的色谱图, 见图 1。此次预分离共收集 36 个组分, 按照色谱图分布, 将出峰较少的部分合并, 最终合并成 16 个组分并进行后续处理。

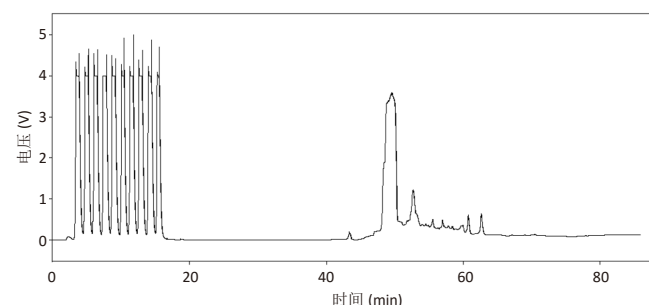


图 1 | 强阳离子交换色谱柱分离色谱图

Figure 1 | Strong cation exchange column separation chromatogram

(5) 肽段的纯化: 使用 C18 反相色谱除盐, 先用 1 mL 甲醇活化柱料, 5% 乙腈平衡, 样品用 1 mL MilliQ 水稀释过柱, 1 mL 5% 乙腈洗柱除盐, 2 \times 500 μL 纯乙腈洗脱, 低温离心抽干乙腈, 0.1% 甲酸复溶纯化后肽段。

(6) 差异蛋白的 2DLC-MS/MS 质谱分析: 将 16 个预分离纯化后的组分分别上机检测。使用 Q-Exactive 质谱仪检测肽段信号。质谱扫描完毕, 得到质谱原始文件, 质谱总离子流示意图见图 2。将质谱原始文件输入到 PD(Proteome Discoverer 1.4, thermo) 软件后, 软件会对质谱谱图进行筛选。PD 软件提取后的谱图用 mascot 进行搜索, 搜索结束后, PD 软件根据 mascot 搜索结果和第一步筛选后的谱图进行定量分析。

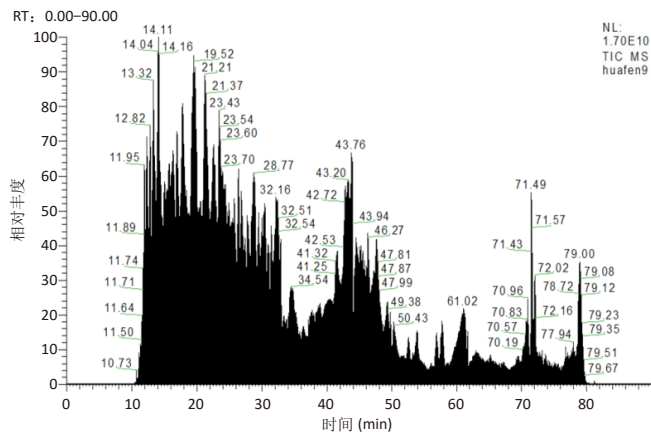


图 2 | 质谱检测总离子流图

Figure 2 | Total ion flow diagram detected by mass spectrometry

(7) 生物信息学分析差异蛋白并构建生物网络预测互作图: 通过 Uniprot 数据库中的注释信息鉴定 iTRAQ 筛选出的差异表达蛋白质, 选择 GO 的生物过程、细胞成分和分子功能注释对蛋白进行分类和富集分析; 利用 KEGG GENES 数据库进行信号通路分析; 对差异蛋白绘制火山图, 查看差异蛋白的分布情况。采用 STRING 11.5(<http://www.string-db.org/>) 数据库对实验鉴定到的所有蛋白质的相互作用进行预测, 并绘制蛋白质相互作用网络图。

1.5 主要观察指标 骨髓间充质干细胞诱导培养 21 d 后, qRT-PCR 检测各组细胞的 II 型胶原 mRNA 相对表达量, 对 II 型胶原 mRNA 相对表达量最高的组进行甲苯胺蓝染色和 iTRAQ 检测, 并对差异蛋白点进行鉴定及 GO、KEGG 和蛋白质网络相互作用分析。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 23.0 统计软件进行统计学分析, 计量资料结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异性分析采用非配对 t 检验, 差异蛋白组间直接比值, 一般取 1.2 倍为差异筛选标准 [≥ 1.2 (蛋白上调) 和 ≤ 0.8 (蛋白下调)] 选取差异蛋白, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义, $P < 0.01$ 为差异有非常显著性意义。

2 结果 Results

2.1 骨髓间充质干细胞形态及鉴定结果 骨髓间充质干细胞呈多角形贴壁生长, 细胞形态较均匀、突起较多, 呈集落状分布, 经流式细胞术鉴定培养的细胞表型 CD44、CD90 阳性表达, 见图 3。

2.2 骨髓间充质干细胞诱导软骨分化 II 型胶原 mRNA 表达及甲苯胺蓝染色结果 qRT-PCR 检测结果表明, 与空白组比较, 牛膝醇提物高、中、低剂量组及对照组 II 型胶原 mRNA 表达

量明显增多, 其中空白组与牛膝醇提物高剂量组比较差异有非常显著性意义 ($P < 0.01$), 牛膝醇提物高剂量组与对照组比较无明显差异 ($P > 0.05$), 见图 4, 并且牛膝醇提物高剂量组甲苯胺蓝染色呈阳性改变, 见图 5。

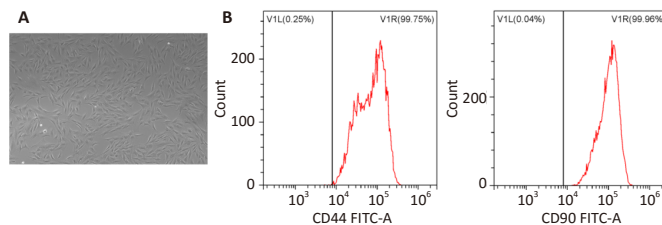


图 3 | 骨髓间充质干细胞形态及鉴定结果

Figure 3 | Morphology and identification results of bone marrow mesenchymal stem cells

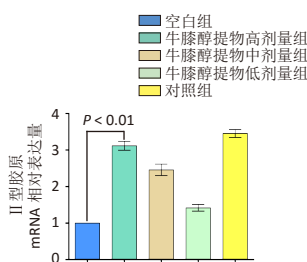


图 4 | 各组骨髓间充质干细胞诱导分化 21 d 后 II 型胶原 mRNA 相对表达量

Figure 4 | Relative expression of type II collagen mRNA 21 days after induced differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in each group

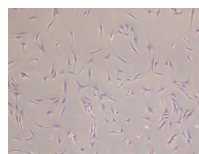


图 5 | 牛膝醇提物高剂量组甲苯胺蓝染色阳性 (x200)

Figure 5 | Toluidine blue staining exhibited positive reaction in the high-dose Achyranthes bidentata alcohol extract group (x200)

2.3 iTRAQ 的定性分析 各组的同位素标记标签分别为空白组 113; 牛膝醇提物高剂量组 114; 牛膝醇提物中剂量组 115; 牛膝醇提物低剂量组 116; 对照组 117, 将原始质谱数据进行数据库搜索, 并用 $FDR < 1\%$ 的标准来进行结果过滤 (FDR 为假阳性率), 得到肽段及蛋白鉴定结果。根据鉴定结果, 对鉴定到的肽段和蛋白进行了肽段蛋白匹配情况、蛋白覆盖率、蛋白基本理化性质的统计分析, 见图 6。

2.4 iTRAQ 的定量分析 根据标签离子的峰强度进行样本间定量分析, 得到的各组对比差异蛋白数统计结果见图 7。

2.5 生物信息学分析 根据 II 型胶原 qRT-PCR mRNA 表达结果显示牛膝醇提物高剂量组诱导软骨细胞分化效果最佳, 因此, 选择空白组、牛膝醇提物高剂量组、对照组进行生物信息学分析。

2.5.1 差异蛋白质的 2DLC-MS/MS 及数据库检索 经过质谱分析、搜库、组间比较, 共鉴定了组间差异上调或下调前 15 个有效差异表达蛋白, 见表 1, 2。

2.5.2 差异蛋白的 GO 分类、Pathway 功能富集分析 见图 8, 9。

2.5.3 差异蛋白的火山图 对鉴定到的蛋白质根据其变化倍数及 P 值进行火山图展示, 可直观显示差异蛋白的分布, 见图 10。

表 1 | 空白组与牛膝醇提物高剂量组差异蛋白鉴定成功蛋白点数据

Table 1 | Data of successful protein points of differential protein identification between blank group and high-dose Achyranthes bidentata alcohol extract group

蛋白编号	蛋白描述	蛋白得分	蛋白鉴定覆盖率	蛋白分子质量 (kD)	蛋白等电点	P 值
上调蛋白	P01885 Beta-2-microglobulin; GN=B2M	11.38	13.13%	11.6	7.44	0.009 801
	U3KPG6 Intercellular adhesion molecule 1; GN=ICAM1	75.12	22.85%	57.5	5.69	9.66×10 ⁻⁵
	G1TAH8 Non-specific serine/threonine protein kinase; GN=AKT3	7.63	9.19%	55.8	6.02	0.026 002
	G1U2Y0 Nuclear factor kappa B subunit 1; GN=NFKB1	25.62	10.25%	105.1	5.34	0.003 765
	U3KM48 Transcription factor BTF3 ; GN=BTF3L4(ENSOCUG00000001517)	12.87	18.54%	16.4	9.79	0.003 034
	U3KMX6 Transcription factor BTF3	9.67	36.42%	17.7	7.5	0.017 049
	G1TH86 RAB11B, member RAS oncogene family; GN=RAB11B	81.55	34.66%	27.4	7.93	0.011 404
	G1SQZ2 BCL2 associated X,apoptosis regulator; GN=BAX	20.58	24.34%	20.8	5.38	0.002 246
	Q9BGH4 Beta-actin (Fragment); GN=ENSOCUG00000005867	2 126.33	76.06%	15.7	4.84	0.002 312
	G1TKK9 ISG15 ubiquitin-like modifier; GN=ISG15	8.35	19.51%	17.7	7.09	0.032 143
	G1T994 Collagen alpha-1(XII) chain; GN=COL12A1	6 607.7	56.07%	339.4	5.5	2.68×10 ⁻³⁵
	G1T7F1 Histone H2B; GN=LOC100348835(ENSOCUG000000014447)	544.16	46.03%	13.9	10.32	1.18×10 ⁻²⁴
	G1T4A5 Collagen alpha-1(I) chain; GN=COL1A1	476.87	51.46%	109.7	7.53	8.39×10 ⁻²⁴
	G1SVK5 Protein S100; GN=S100A4	152.9	36.63%	11.7	6.11	5.09×10 ⁻²²
	G1TKN4 Rac family small GTPase 1; GN=RAC1	90.96	24.87%	21.6	8.9	3.31×10 ⁻⁸
下调蛋白	P30946 Heat shock protein HSP 90-alpha; GN=HSP90AA1	892.71	47.41%	79.7	4.97	4.43×10 ⁻⁷
	G1SFU0 Ras-related protein Rab-7a; GN=RAB7A	247.6	79.71%	23.5	6.7	5.11×10 ⁻⁷
	G1SJS1 Histone H2B; GN=HIST2H2BE	477.89	46.03%	13.9	10.32	1.67×10 ⁻⁵
	G1T2Z5 Collagen alpha-2(I) chain; GN=COL1A2	335.59	42.23%	128.7	8.95	6.36×10 ⁻⁵
	G1TYN0 Transmembrane p24 trafficking protein 9; GN=TMED9(ENSOCUG000000025345)	36.31	21.19%	27.2	7.94	6.98×10 ⁻⁵
	G1U5Q7 Actin-related protein 2/3 complex subunit 4; GN=ARPC4	132.58	46.52%	21.7	9.06	0.000 129
	G1T8H6 Histone H3; GN=H3F3B	30.91	26.47%	15.4	10.98	0.000 43
	P62740 Actin, aortic smooth muscle; GN=ACTA2(ACTB)	2 847.56	71.62%	42	5.39	0.000 497
	G1T6P5 ADP ribosylation factor like GTPase 8B; GN=ARL8B	141	64.14%	16.7	8.46	0.000 517
	P02252 Histone H1.4; GN=HIST1H1E	89.36	35.62%	21.9	11.03	0.004 857

表 2 | 对照组与牛膝醇提物高剂量组差异蛋白鉴定成功蛋白点数据

Table 2 | Data of successful protein points of differential protein identification between control group and high-dose Achyranthes bidentata alcohol extract group

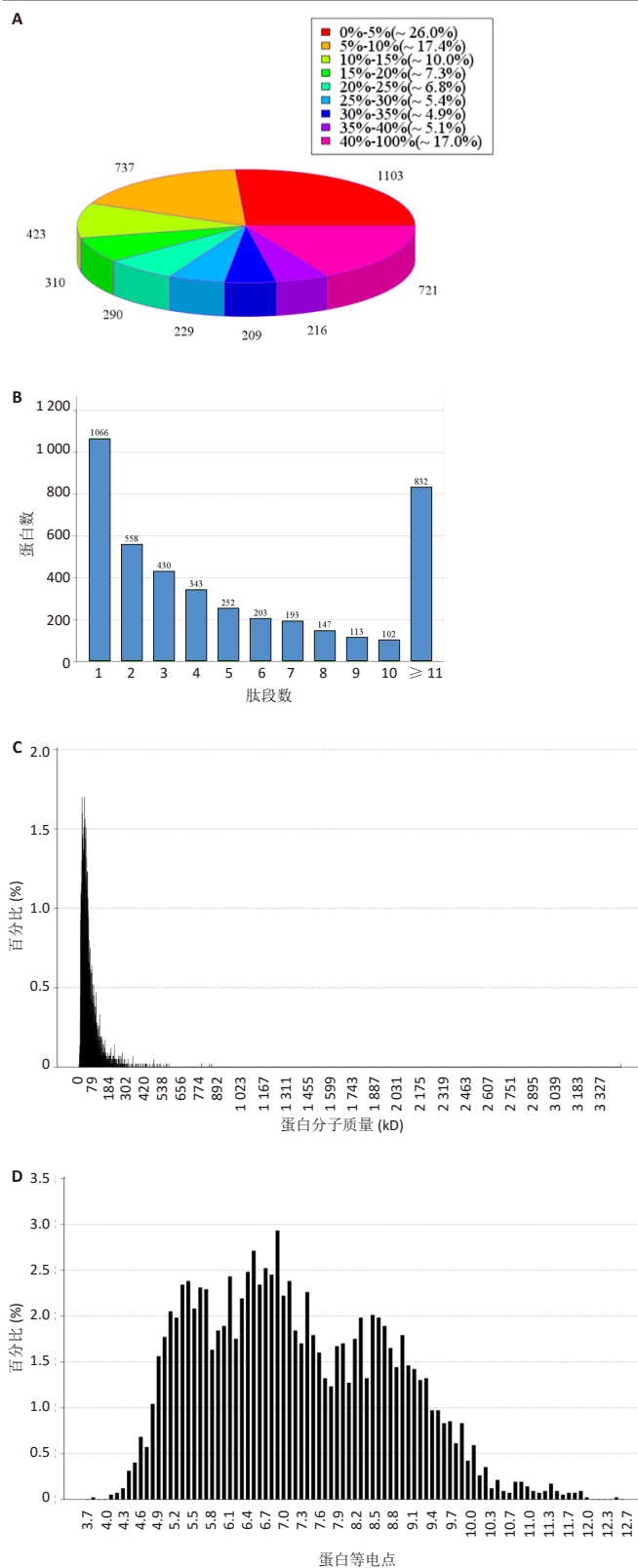
蛋白编号	蛋白描述	蛋白得分	蛋白鉴定覆盖率	蛋白分子质量 (kD)	蛋白等电点	P 值
上调蛋白	P01885 Beta-2-microglobulin; GN=B2M	11.38	13.13%	11.6	7.44	0.000 566
	G1U826 V-type proton ATPase subunit G; GN=ATP6V1G1	12.27	19.49%	13.7	7.97	0.036 591
下调蛋白	G1U9S2 Serum albumin; GN=ALB	3 164.92	77.14%	68.9	6.3	3.696×10 ⁻⁶⁰
	G1TN89 Heparan sulfate proteoglycan 2; GN=HSPG2	1 560.33	47.65%	468.3	6.51	1.372×10 ⁻³⁴
	G1U0A4 Biglycan; GN=BGN	594.66	58.06%	41.8	7.52	2.297×10 ⁻²⁷
	Q28888 Decorin; GN=DCN	402.4	67.50%	39.9	8.21	5.09×10 ⁻²¹
	G1SP97 Lumican; GN=LUM	655.72	57.69%	38.4	6.29	1.14×10 ⁻²⁰
	P10658 Phosphoserine aminotransferase; GN=PSAT1	335.74	61.35%	40.6	7.93	1.514×10 ⁻¹³
	G1T4A5 Collagen alpha-1(I) chain; GN=COL1A1	476.87	51.46%	109.7	7.53	3.873×10 ⁻¹²
	G1U677 Aggrecan core protein; GN=ACAN	107.28	14.86%	222.5	4.32	1.898×10 ⁻⁹
	G1SVK5 Protein S100; GN=S100A4	152.9	36.63%	11.7	6.11	2.512×10 ⁻⁹
	G1U754 Histidine-rich glycoprotein; GN=HRG	208.39	42.34%	60.8	7.43	5.49×10 ⁻⁵
	G1SYM3 Tetraspanin; GN=CD9	54.69	12.21%	37.8	7.74	0.000 147
	G1SPY8 Solute carrier family 2,facilitated glucose transporter member 1; GN=SLC2A1	40.39	13.24%	54	8.73	0.000 198 8
	G1TRW0 Serine hydroxymethyltransferase; GN=SHMT2	499.64	62.43%	55.8	8.78	0.000 245 6
	P37153 Apolipoprotein D; GN=APOD	26.48	32.80%	21.5	5.27	0.000 554 8
	G1SMX7 ER lumen protein-retaining receptor; GN=KDEL3	15.63	16.82%	24.9	8.79	0.000 641 4

2.5.4 差异蛋白质相互作用网络图 将空白组与牛膝醇提物高剂量组、对照组与牛膝醇提物高剂量组差异蛋白输入 <https://version-11-0.string-db.org/> 网站 “Multiple proteins” 中产生 STRING 数据库网络图，再采用 Cytoscape 3.6.0 软件进行蛋白相互作用网络图构建，见图 11。

3 讨论 Discussion

在一定条件下，骨髓间充质干细胞具有分化为软骨细胞的特性，并优于其他来源，自体骨髓间充质干细胞移植修复软骨损伤的效果也优于自体软骨细胞植入 [6]，因此，使之

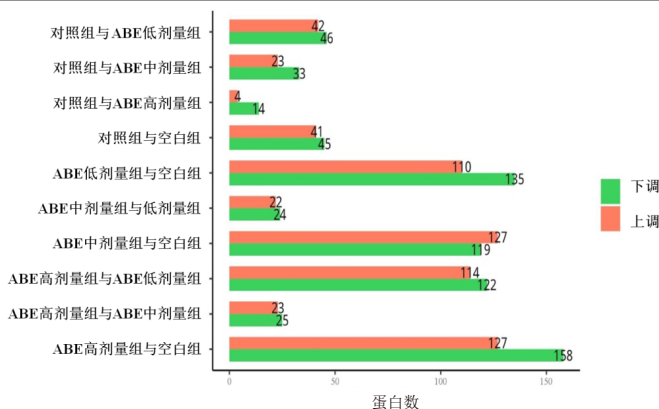
成为该领域中研究最为深入的种子细胞。利用此项技术修复软骨，具有取材方便、对机体损伤小、体外扩增能力强、分化能力稳定等优点 [7]，展现出良好前景。中医药治疗关节炎病损有一定的优势，含有多种有效成分，可多途径、多靶点发挥作用而提高疗效 [8]，牛膝是在此类中药中较为突出的一味 [9]。牛膝不但能活血通经，还能补肝肾、强筋骨，主要化学成分含有多糖类、皂苷类、甾酮类、黄酮类及多种微量元素等 [10]，针对关节疾患的主要药理作用包括抗炎镇痛 [11]、保护关节软骨 [12]、促进干细胞修复软骨等 [13]，但具体作用机制不详。



图注：图 A 为鉴定到的蛋白相应覆盖率统计情况，不同颜色代表不同的蛋白覆盖率，图上的数字代表该覆盖率蛋白的个数；图中可以看出相应覆盖率使用的颜色及蛋白数目占比；B 为蛋白匹配的肽段数目分布统计，横坐标为匹配上的肽段数目，纵坐标为蛋白个数，如横坐标为 5 的柱形图，代表在此次结果中匹配上 5 条肽段的蛋白有 252 个；C 为蛋白分子质量分布，横坐标为蛋白理论分子质量，纵坐标为该分子质量的蛋白占比；D 为蛋白等电点分布，横坐标为蛋白理论等电点，纵坐标为该等电点的蛋白占比

图 6 | 蛋白质的 iTRAQ 定性分析

Figure 6 | iTRAQ qualitative analysis of proteins



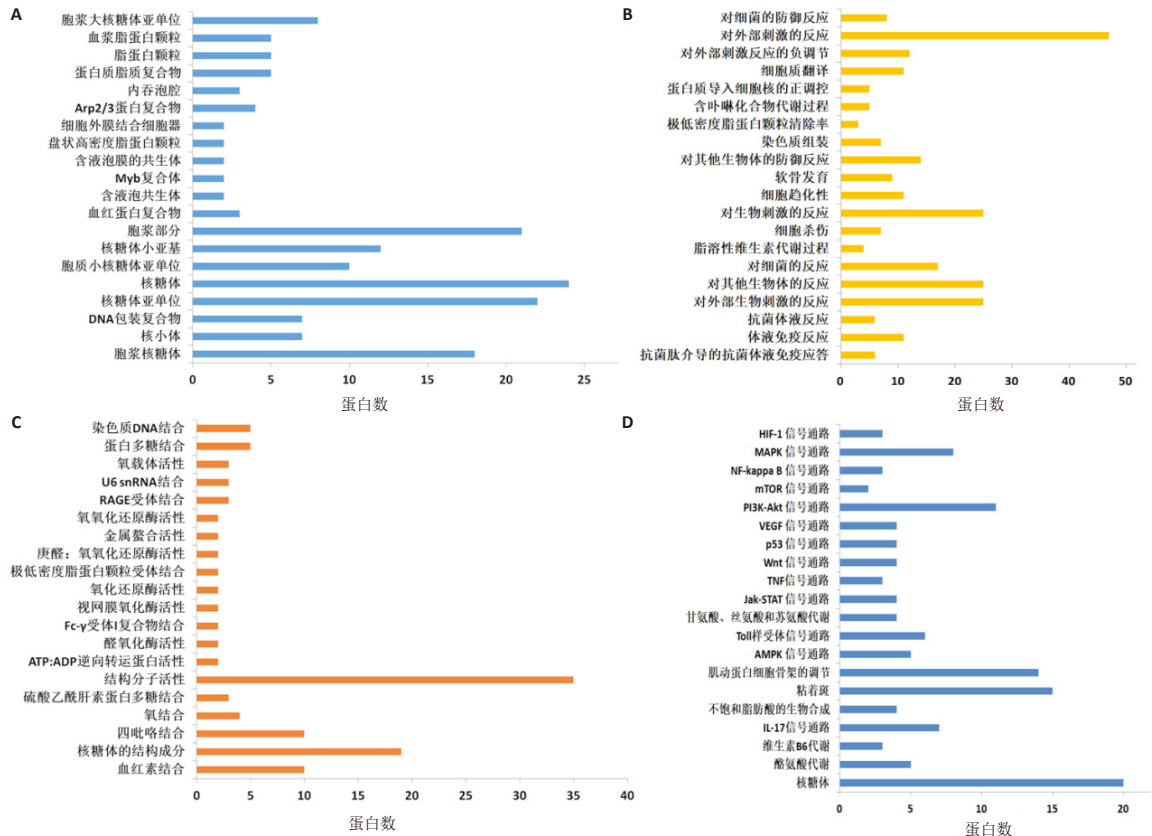
图注：ABE 为牛膝醇提物

图 7 | 各组对比差异蛋白数统计

Figure 7 | Statistics of the number of differentially expressed proteins in each group

该研究通过 iTRAQ 技术分析牛膝醇提物干预骨髓间充质干细胞实验共鉴定到 1 354 个差异蛋白点，其中上调蛋白 633 个，下调蛋白 721 个。采用 qRT-PCR 检测显示牛膝醇提物高剂量组较其他组 II 型胶原 mRNA 表达明显增高，甲苯胺蓝染色呈阳性表现。因此，对空白组、牛膝醇提物高剂量组、对照组进行 GO 及 Pathway 功能富集分析，其中空白组与牛膝醇提物高剂量组差异蛋白 GO 分析显示主要亚细胞定位于核糖体、细胞浆、细胞膜，生物学过程涉及细胞应激、细胞趋化、软骨发育、蛋白调控、代谢等，分子功能涉及核糖体结构变化、蛋白酶活性改变、DNA 及 RNA 的结构重组等；KEGG 分析涉及核糖体通路、肌动蛋白细胞骨架的调节通路、白细胞介素 17 信号通路、Toll 样受体信号通路、Jak-STAT 信号通路、TNF 信号通路、Wnt 信号通路、p53 信号通路、VEGF 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、mTOR 信号通路、NF-kappa B 信号通路、MAPK 信号通路、HIF-1 信号通路、AMPK 信号通路，不饱和脂肪酸的生物合成、黏着斑、酪氨酸代谢及甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢等通路。对照组与牛膝醇提物高剂量组差异蛋白 GO 分析显示主要亚细胞定位于细胞膜、细胞骨架，生物学过程涉及蛋白质聚合、细胞分化、代谢等，分子功能涉及分子结构、泛素化、NAD 结合、表皮的结构成分等；KEGG 分析涉及吞噬体、系统性红斑性狼疮类风湿性关节炎、类固醇激素合成、细胞分化等通路。通过结合文献，以上 KEGG 分析与骨关节病变最相关的 10 个典型信号通路：白细胞介素 17 信号通路^[14]，Toll 样受体信号通路^[15]，Wnt 信号通路^[16]，PI3K-Akt 信号通路^[17]，mTOR 信号通路^[18]，Jak-STAT 信号通路^[19]，NF-kappa B 信号通路^[20]，MAPK 信号通路^[21]，AMPK 信号通路^[22]，HIF-1 信号通路^[23]，这些信号通路涉及细胞增殖、分化、代谢以及炎症微环境的调控。

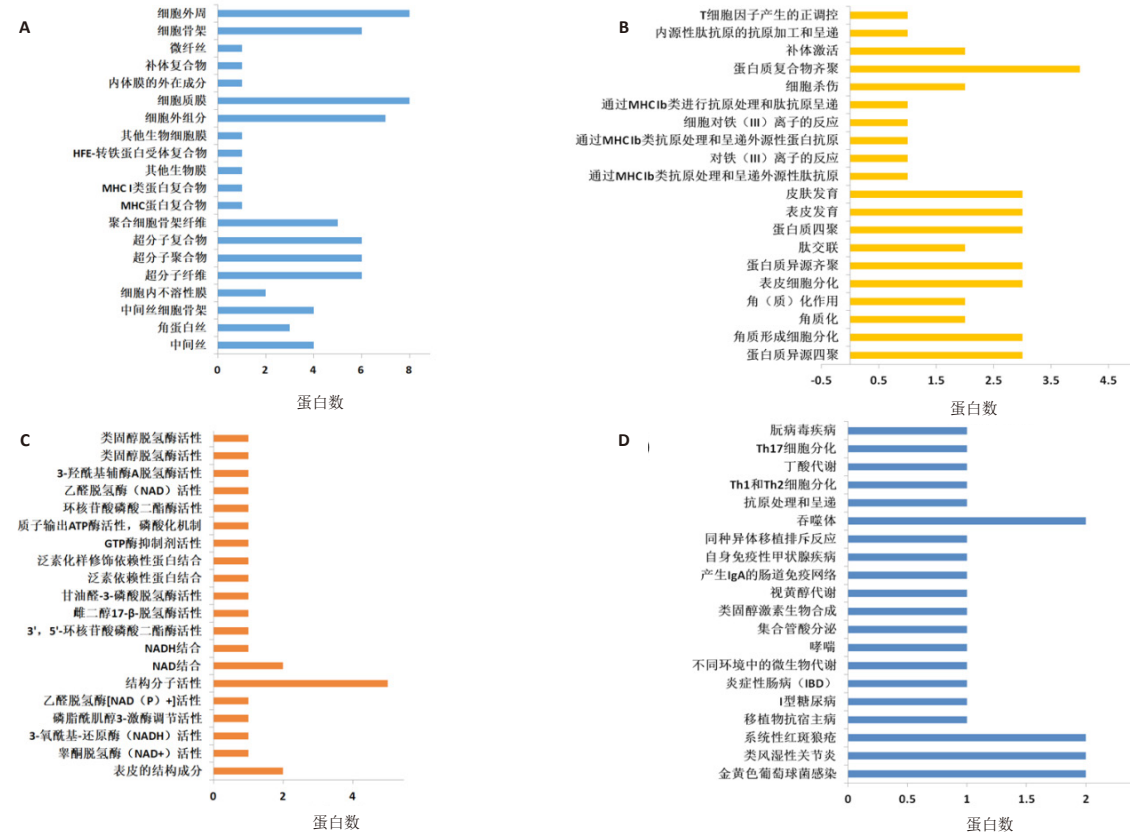
综上所述，利用 iTRAQ 技术筛选牛膝醇提物诱导骨髓间充质干细胞软骨分化的相关差异蛋白，对差异表达蛋白进行 GO 及 KEGG 分析，为中药诱导干细胞分化提供了一定的新思路。未来需要扩大样本量，并利用基因编辑技术修饰关键信号通路靶点蛋白的特异基因进行验证，以期更加准确的寻找靶点蛋白，并利用动物实验验证靶点蛋白、靶点基因的疗效结果，为“中药 + 干细胞”修复关节软骨病损提供更多的理论支持。



图注：差异蛋白 GO 功能分类：A 为细胞成分，B 为生物学过程，C 为分子功能；D 为差异蛋白富集的代谢通路

图 8 | 空白组与牛膝醇提物高剂量组比较的 GO 分类及 Pathway 功能富集分析

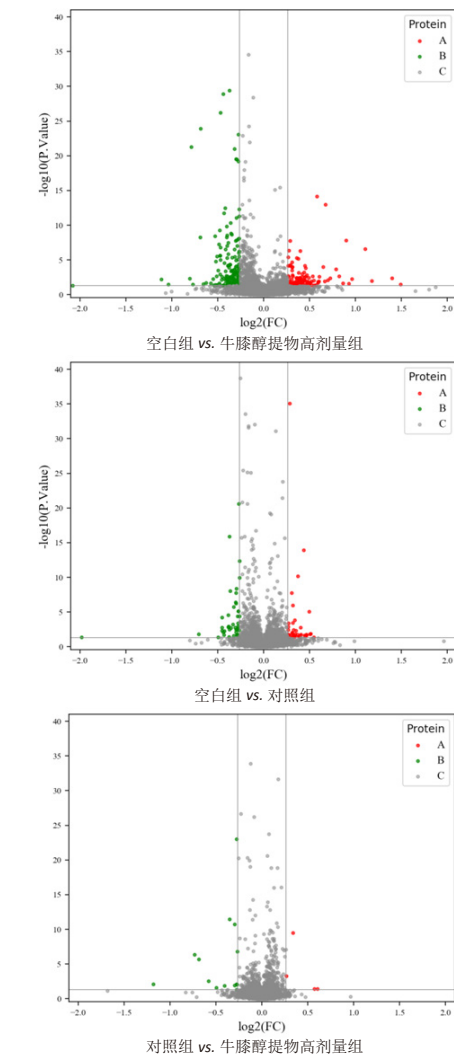
Figure 8 | Go classification and Pathway function enrichment analysis of blank group and high-dose Achyranthes bidentata alcohol extract group



图注：差异蛋白 GO 功能分类：A 为细胞成分，B 为生物学过程，C 为分子功能；D 为差异蛋白富集的代谢通路

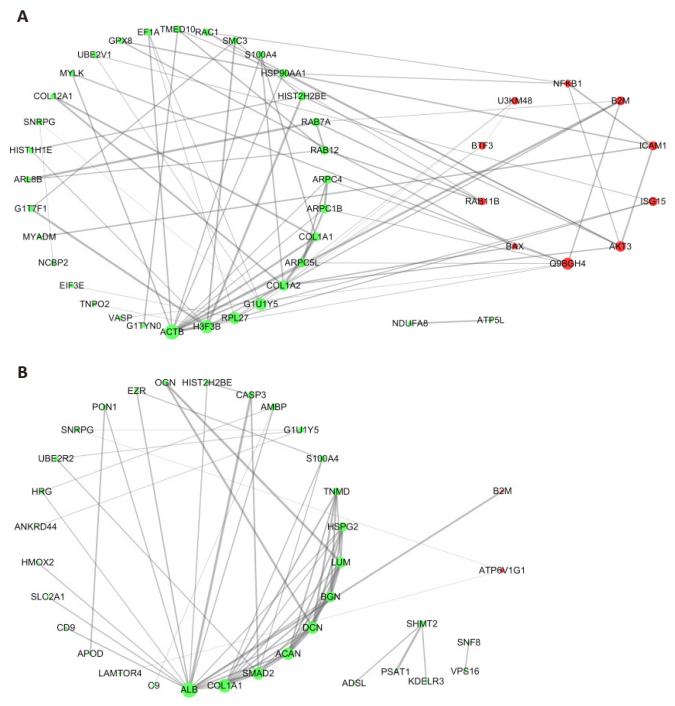
图 9 | 对照组与牛膝醇提物高剂量组比较的 GO 分类及 Pathway 功能富集分析

Figure 9 | Go classification and Pathway function enrichment analysis of control group and high-dose Achyranthes bidentata alcohol extract group



图注：差异蛋白火山图统计结果，红色的点 A 代表差异表达上调蛋白，绿色的点 B 代表差异表达下调蛋白，灰色的点 C 代表非差异表达蛋白。横坐标为差异倍数取 \log_2 的值，纵坐标为 P 值取 $-\log_{10}$ 的值

图 10 | 差异蛋白火山图
Figure 10 | Differential protein volcano plot



图注：A 为空白组与牛膝醇提物高剂量组，B 为对照组与牛膝醇提物高剂量组，红色圆形为上调基因，绿色方形为下调基因，圆点大小表示该蛋白富集程度，线条大小表示蛋白之间联系程度

图 11 | 差异蛋白质相互作用网络图

Figure 11 | Differential protein interaction network

致谢：感谢孙志涛博士在实验设计阶段给予的指导和建议。

作者贡献：马笃军负责实验实施、论文撰写，朱厚均负责实验数据分析处理，刘乐诗、赵静负责细胞培养、指标检测，彭力平、廖州伟负责数据和文章的校对，马笃军负责实验设计。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让：文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范：该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》；文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次文字和图表查重；文章经小同行外审专家双盲审稿，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] 高子龙, 李婷, 吕政, 等. 补骨脂素联合转化生长因子 $\beta 1$ 诱导骨髓间充质干细胞向软骨细胞的分化 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(30): 4884-4888.
- [2] 田能, 孔祥英, 王荣田, 等. 不同引经药对股骨头坏死模型兔骨髓干细胞归巢的影响 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(11): 1624-1628.
- [3] 黄勇, 黄秀深, 胡一梅, 等. “左归丸”配伍规律对骨髓源成体干细胞定向分化的调控作用 [J]. 成都中医药大学学报, 2010, 33(1): 48-52.
- [4] 马笃军, 彭力平, 王立新, 等. 牛膝醇提物诱导兔骨髓间充质干细胞软骨定向分化的实验研究 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2017, 25(2): 6-11.
- [5] 马笃军, 彭力平, 王立新, 等. 实验兔骨髓间充质干细胞的分离、培养及鉴定 [J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(1): 99-104.
- [6] AKGUN I, UNLU MC, ERDAL OA, et al. Matrix-induced autologous mesenchymal stem cell implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation in the treatment of chondral defects of the knee: a 2-year randomized study. Arch Orthop Trauma Surg. 2015;135(2):251-263.
- [7] 李强强, 谢亚东, 杨国清, 等. 骨髓间充质干细胞成骨分化的研究进展 [J]. 医学综述, 2022, 28(3): 434-438.
- [8] 高松, 孙珍珍. 近 20 年中医药治疗骨关节炎临床用药规律分析 [J]. 西南医科大学学报, 2021, 44(1): 73-77.
- [9] 黄艳峰, 谢新宇, 林晴, 等. 基于计算机模拟探讨牛膝治疗骨关节炎软骨退变机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(15): 148-155.
- [10] 张巍, 张慧, 张振凌. 牛膝、酒牛膝片色度测定方法的建立及检测 [J]. 中医药导报, 2022, 28(1): 59-62.
- [11] LI Z, MA D, PENG L, et al. Compatibility of Achyranthes bidentata components in reducing inflammatory response through Arachidonic acid pathway for treatment of Osteoarthritis. Bioengineered. 2022;13(1):1746-1757.
- [12] 肖伟, 马笃军, 彭力平, 等. 牛膝醇提物对兔骨关节炎软骨细胞体外增殖及糖胺聚糖的干预作用 [J]. 中国医药导报, 2017, 14(5): 20-24.
- [13] 马笃军, 彭力平, 蒋顺婉, 等. 牛膝醇提物干预 BMSC-Exos 对 OA 模型兔局部骨组织超微结构及炎症小体的影响 [J]. 中医药导报, 2022, 28(1): 12-18.
- [14] 刘璐, 刘传慧, 段智霞. 膝关节炎患者血清 RANKL、IL-17 水平与疾病严重程度度的关系 [J]. 中国实用医刊, 2021, 48(19): 16-19.
- [15] 孙桂芳, 张雪锋, 茅瑜, 等. 温针灸治疗轻中度膝骨关节炎疗效观察及其对 TLR4/NF- κ B 信号通路的影响 [J]. 上海针灸杂志, 2021, 40(12): 1452-1457.
- [16] 刘晶, 林巧璇, 卢莉铭, 等. 基于 Wnt3a/ β -catenin 信号通路探讨针对膝骨关节炎免疫肌纤维化的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(1): 136-140.
- [17] 邓欢, 吕艺葵, 刘宣, 等. PI3K/AKT 信号通路调控骨关节炎软骨细胞自噬及损伤的机制 [J]. 西安交通大学学报 (医学版), 2022, 43(2): 309-314.
- [18] 曹舒兴, 周楠, 王进, 等. 姜黄素通过 Akt-mTOR 信号通路调控细胞自噬对骨关节炎大鼠的保护作用研究 [J]. 河北医药, 2021, 43(24): 3685-3689.
- [19] 徐斌, 周明旺, 李盛华, 等. JAK/STAT 信号通路在骨关节炎致病机制及治疗靶点的研究进展 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2022, 28(2): 125-129.
- [20] 郑晓慧, 董博, 袁普卫, 等. NF- κ B 信号通路在骨性关节炎软骨破坏中的研究进展 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2021, 27(7): 540-544.
- [21] 冯帅华, 吴官保, 文哲, 等. 超微贴附对兔膝骨关节炎模型的软骨中 JNK/p38 MAPK 信号通路的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(1): 31-36.
- [22] 马笃军, 华树良, 彭力平, 等. 牛膝醇提物对实验兔膝骨关节炎模型 AMPK/Wnt/MAPK 信号通路的影响 [J]. 中医药导报, 2021, 27(7): 16-21, 26.
- [23] 徐高丽, 张建兴, 周健, 等. 静压力下缺氧诱导因子-1 α 信号通路对髌间软骨细胞增殖与调亡的调控作用 [J]. 中华老年病研究电子杂志, 2021, 8(3): 24-29.

(责任编辑: MZH, ZN, ZH)