

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.01.016 [http://www.crter.org]  
仲卫红, 齐振熙. 土鳖虫含药血清干预骨髓间充质干细胞的蛋白组学差异[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(1):98-105.

## 土鳖虫含药血清干预骨髓间充质干细胞的蛋白组学差异\*☆

仲卫红<sup>1</sup>, 齐振熙<sup>2</sup>

1 福建中医药大学附属康复医院, 福建省福州市 350003

2 福建中医药大学, 福建省福州市 350003

### 文章亮点:

1 以土鳖虫含药血清干预激素诱导后的骨髓间充质干细胞, 然后运用同位素标记相对和绝对定量技术(iTHAQ)以及二维液相色谱质谱仪(2D LC-MS/MS)分析发现 Hspa1L 和 Prx V 两个蛋白表达升高, Serpinh1 和 ADP/ATP translocase 1 两个蛋白表达下降。

2 实验结果证实说明土鳖虫可能是通过抗细胞凋亡和促进成骨分化途径抑制股骨头缺血性坏死的发生发展。

### 关键词:

干细胞; 骨髓干细胞; 干细胞与中医药; 土鳖虫; 分化; 含药血清; 二维液相色谱质谱仪; 差异蛋白质组学; 细胞凋亡; 省级基金

### 摘要

**背景:** 国内外学者对股骨头缺血性坏死做了大量研究, 但股骨头缺血性坏死的确切发病机制仍未完全清楚。

**目的:** 探讨土鳖虫含药血清干预骨髓间充质干细胞后抑制成脂分化和促进成骨分化的靶位蛋白或相关蛋白。

**方法:** 第3代骨髓间充质干细胞分为空白对照组、激素组、土鳖虫组, 分别用含空白血清、地塞米松磷酸钠注射液、土鳖虫含药血清+地塞米松磷酸钠注射液的 DMEM 培养基干预。3组干预6d后运用同位素标记相对和绝对定量技术(iTRAQ)标记3组样本的蛋白, 二维液相色谱质谱仪(2D LC-MS/MS)鉴定蛋白并进行相对定量分析。

**结果与结论:** 以激素组为对照, 在空白对照组中共有15种蛋白质出现显著的表达上调, 12种出现下调蛋白; 在土鳖虫组中共有16种蛋白质出现显著的表达上调, 14种出现显著下调。其中 Hspa1L 和 Prx V 蛋白可能是土鳖虫抗细胞凋亡的作用靶点。Serpinh1 和 ADP/ATP translocase 1 蛋白可能是土鳖虫促进成骨分化的作用靶点。

仲卫红☆, 女, 1977年生, 河南省安阳市人, 汉族, 2011年福建中医药大学毕业, 博士, 副主任医师, 主要从事激素性股骨头坏死的基础与临床研究。zwh7118@126.com

通讯作者: 齐振熙, 博士, 主任医师, 福建中医药大学, 福建省福州市 350003

中图分类号:R394.2

文献标识码:B

文章编号:2095-4344 (2013)01-0098-08

收稿日期: 2012-07-23

修回日期: 2012-09-11 (20120223012/M·S)

## Effects of eupolyphaga-containing serum on proteomics changes in bone marrow mesenchymal stem cells

Zhong Wei-hong<sup>1</sup>, Qi Zhen-xi<sup>2</sup>

1 Rehabilitation Hospital of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350003, Fujian Province, China

2 Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fujian 350003, Fujian Province, China

### Abstract

**BACKGROUND:** Avascular necrosis of the femoral head has been much studied. However, the precise pathological mechanism underlying avascular necrosis of the femoral head remains unclear.

**OBJECTIVE:** To investigate the effects of eupolyphaga-containing serum on the target or related proteins inhibiting adipogenic differentiation and promoting osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells.

Zhong Wei-hong☆, M.D.,  
Associate chief physician,  
Rehabilitation Hospital of Fujian  
University of Traditional  
Chinese Medicine, Fuzhou  
350003, Fujian Province, China  
zwh7118@126.com

Corresponding author: Qi  
Zhen-xi, M.D., Chief physician,  
Fujian University of Traditional  
Chinese Medicine, Fujian  
350003, Fujian Province, China

Supported by: the National  
Natural Science Foundation of  
Fujian Province, No.  
2008J0325\*

Received: 2012-07-23

Accepted: 2012-09-11

**METHODS:** Passage 3 bone marrow mesenchymal stem cells were cultured with DMEM containing blank serum (blank control group), dexamethasone (hormone group) and eupolyphaga-containing serum (eupolyphaga group). After 6 days of culture, isobaric tag for relative and absolute quantitation technique was used to quantify proteins from three groups. The proteins were identified and relatively quantitatively analyzed by mass spectrometry.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Relative to the hormone group, there were 15 proteins significantly up regulated and 12 proteins significantly down regulated in the blank control group, and there were 16 proteins significantly up regulated and 14 proteins significantly down regulated in the eupolyphaga group. Hspa1L1 and Prx V may be the targets of anti-apoptosis in eupolyphaga. The expression of Serpinh1 and ADP/ATP translocase 1 may be the targets of promoting osteogenic differentiation in eupolyphaga.

**Key Words:** stem cells; bone marrow-derived stem cells; stem cells and traditional Chinese medicine; eupolyphaga; differentiation; drug-containing serum; two-dimensional liquid chromatography; differential proteomics; cell apoptosis; provincial grants-supported paper

Zhong WH, Qi ZX. Effects of eupolyphaga-containing serum on proteomics changes in bone marrow mesenchymal stem cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013;17(1):98-105.

## 0 引言

课题组既往的研究表明, 用活血化瘀法、渗湿化痰法、补肾壮骨法防治激素所致的股骨头缺血性坏死, 其中活血化瘀法的作用最为显著<sup>[1]</sup>。实验拟通过比较分析激素诱导骨髓间充质干细胞前后蛋白质之间的差异、激素诱导骨髓间充质干细胞后在土鳖虫含药血清干预前后的蛋白质差异表达分析, 明确股骨头缺血性坏死发病及治疗后的蛋白变化情况, 探讨激素诱导骨髓间充质干细胞成脂分化形成机制。

## 1 材料和方法

**设计:** 单一样本观察。

**时间及地点:** 于2008年6月至2010年6月在福建中医药大学中西医结合研究所完成。

**材料:**

**实验动物:** 清洁级4周龄SD大鼠4只, 10周龄SD大鼠40只, 体质量250–300 g, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。

**主要试剂:** iTRAQ试剂盒(美国Applied Biosystems公司), 胰酶(Promega公司), 蛋白浓度检测试剂盒(Bradford公司), Tris(BBI公司), NaF(Fluka公司), 组织裂解液所用苯甲脒和4-(2-氨基乙基)苯磺酰氟盐酸盐(Sigma公司)。

**实验方法:**

**SD大鼠含药血清的制备:** 选用体质量250–300 g 10周龄的SD大鼠40只, 随机分为2组, 根据人鼠用药量及体表面积换算得出灌胃量, 分别给予土鳖虫水煎剂和生理盐水。空白对照组用3.6 g/kg生理盐水灌胃, 连续10 d。土鳖虫组用7.2 g/kg土鳖虫药液灌胃, 2次/d, 早晚各2 mL, 连续10 d。于灌胃后第10天早上1次给予全剂量, 灌胃1 h后, 乙醚麻醉, 腹主动脉抽血, 每只大鼠血液移入1根无菌离心管, 4 °C保鲜冰箱内静置2 h, 3 000 r/min离心20 min, 吸取上层血清, 同组含药血清合并。含药血清经56 °C水浴30 min灭活, 0.22 μm微孔滤膜过滤除菌, -20 °C保存备用。

**细胞干预培养液:** 空白对照组SD大鼠血清15 mL加DMEM培养基85 mL; 空白对照组基础上加地塞米松磷酸钠注射液1 mL(激素组); 土鳖虫组SD大鼠血清15 mL加DMEM培养基84 mL, 再加地塞米松磷酸钠注射液1 mL(土鳖虫组), 培养液中地塞米松的最终浓度为1 μmol/L。

**骨髓间充质干细胞分离培养:** 取4周龄清洁级SD大鼠4只, 颈椎脱臼处死, 剥取其双侧后肢, 置体积分数为75%乙醇中浸泡5 min。剔除大鼠后肢的肌肉及骨膜, 留取股骨和胫骨, 剪去两端

骨髓。用无血清的DMEM液冲洗大鼠骨髓并收集至无菌离心管。弃上清, 于PBS中1 000 r/min离心5 min, 洗涤2遍。加入含体积分数为20%胎牛血清的DMEM培养液, 将其吹打成单细胞悬液, 接种到25 cm<sup>2</sup>细胞培养瓶, 每瓶接种5 mL。接种细胞置37 °C、体积分数为5% CO<sub>2</sub>、95%湿度的恒温CO<sub>2</sub>培养箱中培养。3 d后首次全量换液, 以后每3 d全量换液1次。12 d后原代细胞铺满瓶底, 弃培养液, PBS洗涤2遍。每瓶加入0.25%的胰蛋白酶联合0.02% EDTA消化液 2 mL, 静置3-5 min。倒置显微镜观察, 待细胞触角收缩变圆后, 加入2 mL含体积分数为20%胎牛血清的DMEM培养液终止消化, 移液器吹打成细胞悬浮液。移入离心管1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 加入含体积分数为20%胎牛血清的DMEM培养液吹打均匀, 以 $5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 的浓度接种到25 cm<sup>2</sup>一次性培养瓶中, 每瓶接种5 mL。

**药物干预:** 选取第3代长满瓶底的骨髓间充质干细胞, 给予传代, 以 $5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 接种, 待细胞完全贴壁后(接种12 h)分土鳖虫组、激素组和空白对照组, 每组8瓶。更换细胞干预培养液培养3 d后, 细胞达到70%-80%铺满瓶底时, 用0.02% EDTA及0.25%胰蛋白酶联合消化, 用含体积分数为20%胎牛血清的DMEM培养液终止消化, 1 000 r/min离心10 min, 收集细胞。用10 mL PBS以1 000 r/min离心5 min, 洗涤3次, 细胞沉淀, 反复冻融3次裂解, 3 000 r/min离心10 min, 收集上清液。

**蛋白的提取:** 清空各组培养瓶中的培养基后, 分别用4 °C预冷的0.1 mol/L PBS洗涤3次, 再将细胞小心刮下, 转移至洁净1.5 mL离心管中, 离心后弃去上清液。每管中加入200  $\mu\text{L}$  0.5 mol/L裂解液(7 mol/L尿素, 2 mol/L硫脲, 0.1% PMSF, 65 mmol/L DTT), 超声波破碎仪处理(超声条件: 常规的人或者小鼠细胞超声70-75 W, 超声5 s停10 s, 超声3-5次), 冰上放置40 min, 低温高速离心(14 000 r/min, 4 °C离心30 min)后, 取上清液。用Bradford方法测定各组蛋白的浓度后, -80 °C保存备用。

**iTRAQ试剂标记:** 取各组样品各100  $\mu\text{g}$ 进行如下处理: ①每管各加入预冷的丙酮(丙酮: 样品体积比=5:1), -20 °C沉淀1 h。②12 000 r/min离心15 min, 弃上清, 用试剂盒中自带的溶解液(20  $\mu\text{L}$ )和1% SDS(1  $\mu\text{L}$ )充分混悬溶解样品。③加入还原试剂2  $\mu\text{L}$ , 60 °C反应60 min。④加入半胱氨酸封闭试剂1  $\mu\text{L}$ , 室温处理10 min。⑤按照酶: 蛋白质=1:20的比例加入胰蛋白酶, 37 °C酶解过夜。⑥113, 118, 119各管标记试剂中加入50  $\mu\text{L}$ 异丙醇(试剂盒中自带), 混匀, 分别加入各管样品中, 室温反应1 h, 之后各加入3倍体积水, 使标记试剂分解。标记和样品对

应关系如下: 空白对照组(IT113), 激素组(IT118), 土鳖虫组(IT119)。⑦合并各管标记好的样品, 真空冷冻干燥。

**脱盐:** 采用waters公司的Sep-Pak Vac C18 柱子脱盐。即将标记过程中的标记试剂和相关buffer的盐, 以便于后续分析。①100%乙腈冲洗柱子3次。②0.1% TFA(水溶), 冲洗柱子3次。③用400  $\mu\text{L}$  0.1% TFA溶解样品, 加载到柱子上。④0.1% TFA 冲洗柱子3-5次。⑤用50%乙腈 0.1% TFA 400  $\mu\text{L}$ 洗脱下样品。将样品冷冻干燥后进行后续分析。

**第一维强阳离子柱(SCX)分离:** 第一维强阳离子柱分离: 流动相A液含10 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>和25% ACN, pH 2.6; B液含10 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、350 mmol/L KCl和25% ACN, pH 2.6。将冻干样品溶解于80  $\mu\text{L}$  A液并全部上样。设紫外检测波长为214 nm/280 nm, 流速为200  $\mu\text{L}/\text{min}$ 。线性梯度洗脱程序为: 5-40 min, 5%-25%B; 40-45 min, 25%-80%B; 45-50 min, 80%B; 50-60 min, 0%B。根据峰形和时间共收取20个梯度, 真空离心浓缩后, 每馏分用50  $\mu\text{L}$ 反相液相色谱的A相溶解, 进样量20  $\mu\text{L}$ 。进行第二维分析。

**第二维反相液质联用RPLC-MS:**

**第二维反相液相色谱:** 流动相A液为体积分数为5%乙腈和0.1%甲酸溶液, 流动相B液为体积分数为95%乙腈和0.1%甲酸溶液。流速: 300 nL/min。RPLC柱线性梯度洗脱程序为: 0-5 min, 上样; 5-90 min, 5%-35%B; 90-95 min, 35%-80%B; 95-100 min, 80%B; 100-105 min, 80%-5%B; 1 200 min停止。

**质谱鉴定:** 纳喷雾针直接连接于反相色谱柱末端作为喷雾接口, 喷雾电压2.2 kV。MS扫描范围400-1 800 u, 一个谱图选择4个最强的母离子进行串联扫描, MS/MS扫描范围100-2 000 u。

**数据库搜索:** 所得串联质谱分析数据用Protein Pilot 3.0对IPIV 3.45 mouse数据库进行检索, 得到肽段和蛋白质鉴定信息, 种属选择是大鼠, 根据软件对鉴定到的蛋白质打分, 对应蛋白质的假阳性率为5%。软件依据同位素报告基团的相对含量进行蛋白质定量, 以激素组为对照, 选择差异显著( $P \leq 0.05$ )的结果报告。实验采用0.3为标准差, 设定表达差异大于2个标准差, 即0.6, 为有意义。所以蛋白平均比值大于1.5或小于0.7被认为有明显表达改变。

## 2 结果

通过iTRAQ结合2D LC-MS/MS分析, 在3组样品中

共同鉴定到蛋白质520种, 其中217种有定量信息。以激素组作对照进行相对定量, 其他样品标记峰与对照的比值大于1.5和小于0.7的蛋白作为在分化过程中有明显上调和下调的各蛋白进行鉴定和功能学上的研究, 并通过<http://www.expasy.org/>的UniProtKB数据库, 检索各蛋白质功能。以激素组作为对照, 在空白对照组中共有15种蛋白质出现显著的表达上调, 见表1, 主要参

与能量代谢、信号转导、蛋白折叠、细胞代谢等; 12种出现下调蛋白, 见表2, 主要参与能量代谢、信号转导、蛋白结合、运输、细胞代谢等。以激素组作为对照, 在土鳖虫组中共有16种蛋白质出现显著的表达上调, 见表3, 主要参与能量代谢、信号转导、蛋白结合、运输等; 14种出现显著下调, 见表4, 主要参与能量代谢、信号转导、蛋白结合等。

表1 SD大鼠骨髓间充质干细胞成脂分化过程中空白对照组表达上调的蛋白(以激素组为对照)

Table 1 Significantly up regulated proteins during adipogenic differentiation of SD rat bone marrow mesenchymal stem cells in the blank control group relative to hormone group

| No. | Accession           | Name   | GO function                             | Blank control group/<br>hormone group |
|-----|---------------------|--|---|---------------------------------------|
| 3   | sp P06761 GRP78_RAT | 78 kDa glucose-regulated protein                               | ATP binding                             | 2.558 586                             |
| 6   | sp Q66HD0 ENPL_RAT  | Endoplasmic  | ATP binding                             | 1.887 991                             |
| 8   | sp P11598 PDIA3_RAT | Protein disulfide-isomerase A3                                 | protein disulfide<br>isomerase activity | 2.108 628                             |
| 15  | sp P02262 H2A1_RAT  | Histone H2A type 1   | DNA binding                             | 2.032 357                             |
| 18  | sp P04937 FINC_RAT  | Fibronectin  | heparin binding                         | 2.269 865                             |
| 19  | sp P54001 P4HA1_RAT | Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1                           | iron ion binding                        | 1.614 359                             |
| 46  | sp P06685 AT1A1_RAT | Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1           | ADP and ATP binding                     | 1.706 082                             |
| 66  | sp P62961 YBOX1_RAT | Nuclease-sensitive element-binding protein 1                   | RNA splicing                            | 1.659 587                             |
| 93  | sp P29266 3HIDH_RAT | 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial              | NAD binding                             | 1.674 943                             |
| 157 | sp Q99PD6 TGFI1_RAT | Transforming growth factor beta-1-induced transcript 1 protein | zinc ion binding                        | 1.527 566                             |
| 161 | sp P05942 S10A4_RAT | Protein S100-A4  | calcium ion binding                     | 1.659 587                             |
| 162 | sp P55063 HS71L_RAT | Heat shock 70 kDa protein 1L                                   | ATP binding                             | 2.421 029                             |
| 168 | sp Q6P502 TCPG_RAT  | T-complex protein 1 subunit gamma                              | ATP binding                             | 1.786 488                             |
| 173 | sp Q9R063 PRDX5_RAT | Peroxisdioxidin-5, mitochondrial                               | peroxidase activity                     | 2.070 141                             |

注: 以激素组作为对照, 在空白对照组中共有 15 种蛋白质出现显著的表达上调, 主要参与能量代谢、信号转导、蛋白折叠、细胞代谢等

表2 SD大鼠骨髓间充质干细胞成脂分化过程中空白对照组表达下调的蛋白(以激素组为对照)

Table 2 Significantly down regulated proteins during adipogenic differentiation of SD rat bone marrow mesenchymal stem cells in the blank control group relative to hormone group

| No. | Accession           | Name   | GO function                                | Blank control group/<br>hormone group |
|-----|---------------------|--|--|---------------------------------------|
| 17  | sp P29457 SERPH_RAT | Serpin H1  | collagen binding                           | 0.496 592                             |
| 29  | sp Q62736 CALD1_RAT | Non-muscle caldesmon   | actin binding                              | 0.660 694                             |
| 37  | sp P21775 THIKA_RAT | 3-ketoacyl-CoA thiolase A, peroxisomal                               | ethyl-CoA C-acyltransferase activity       | 0.529 663                             |
| 48  | sp Q63041 A1M_RAT   | Alpha-1-macroglobulin  | protein complex binding                    | 0.194 089                             |
| 63  | sp P01026 CO3_RAT   | Complement C3  | cofactor binding                           | 0.519 996                             |
| 84  | sp P14604 ECHM_RAT  | Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial                                   | enoyl-CoA hydratase activity               | 0.660 694                             |
| 97  | sp Q05962 ADT1_RAT  | ADP/ATP translocase 1  | ATP: ADP antiporter activity               | 0.672 977                             |
| 119 | sp Q5X173 GDIR1_RAT | Rho GDP-dissociation inhibitor 1                                     | GTPase activator activity                  | 0.501 187                             |
| 122 | sp P23965 D3D2_RAT  | 3, 2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial                        | dodecenoyl-CoA delta-isomerase<br>activity | 0.580 764                             |
| 135 | sp P00173 CYB5_RAT  | Cytochrome b5  | electron carrier activity                  | 0.672 977                             |
| 137 | sp Q02253 MMSA_RAT  | Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial | fatty-acyl-CoA binding                     | 0.654 636                             |

注: 以激素组作为对照, 在空白对照组中共有 12 种出现下调蛋白, 主要参与能量代谢、信号转导、蛋白结合、运输、细胞代谢等

表 3 SD 大鼠骨髓间充质干细胞成脂分化过程中土鳖虫组表达上调的蛋白(以激素组为对照)

Table 3 Significantly up regulated proteins during adipogenic differentiation of SD rat bone marrow mesenchymal stem cells in the eupolyphaga group relative to hormone group

| No. | Accession           | Name  | GO function                             | Eupolyphaga group/<br>hormone group |
|-----|---------------------|---|---|-------------------------------------|
| 2   | sp P31000 VIME_RAT  | Vimentin  | protein kinase binding                  | 1.803 018                           |
| 20  | sp Q9QXQ0 ACTN4_RAT | Alpha-actinin-4                                     | calcium ion binding                     | 1.629 296                           |
| 28  | sp P48721 GRP75_RAT | Stress-70 protein, mitochondrial                    | ATP binding                             | 2.728 978                           |
| 33  | sp P05065 ALDOA_RAT | Fructose-bisphosphate aldolase A                    | fructose-bisphosphate aldolase activity | 1.690 441                           |
| 48  | sp Q63041 A1M_RAT   | Alpha-1-macroglobulin                               | protein complex binding                 | 1.887 991                           |
| 63  | sp P01026 CO3_RAT   | Complement C3                                       | C3a anaphylatoxin receptor activity     | 1.541 7                             |
| 76  | sp P06866 HPT_RAT   | Haptoglobin   | hemoglobin binding                      | 1.836 538                           |
| 92  | sp Q9JK11 RTN4_RAT  | Reticulon-4   | protein binding                         | 4.528 976                           |
| 94  | sp P63025 VAMP3_RAT | Vesicle-associated membrane protein 3               |   | 1.527 566                           |
| 111 | sp Q6IG03 K2C73_RAT | Keratin, type II cytoskeletal 73                    | structural molecule activity            | 1.721 869                           |
| 135 | sp P00173 CYB5_RAT  | Cytochrome b5                                       | electron carrier activity               | 1.644 372                           |
| 162 | sp P55063 HS71L_RAT | Heat shock 70 kDa protein 1L                        | ATP binding                             | 1.836 538                           |
| 163 | sp P85968 6PGD_RAT  | 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating   | NADP binding                            | 1.853 532                           |
| 173 | sp Q9R063 PRDX5_RAT | Peroxiredoxin-5, mitochondrial                      | peroxidase activity                     | 2.937 65                            |
| 179 | sp Q68FU3 ETFB_RAT  | Electron transfer flavoprotein subunit beta         | electron carrier activity               | 1.770 109                           |
| 183 | sp P97586 CGRE1_RAT | Cell growth regulator with EF hand domain protein 1 | calcium ion binding                     | 6.137 62                            |

注: 以激素组作为对照, 在土鳖虫组中共有 16 种蛋白质出现显著的表达上调, 主要参与能量代谢、信号转导、蛋白结合、运输等

表 4 SD 大鼠骨髓间充质干细胞成脂分化过程中土鳖虫组表达下调的蛋白(以激素组为对照)

Table 4 Significantly down regulated proteins during adipogenic differentiation of SD rat bone marrow mesenchymal stem cells in the eupolyphaga group relative to hormone group

| No. | Accession           | Name  | GO function                              | Eupolyphaga group/<br>hormone group |
|-----|---------------------|---|--|-------------------------------------|
| 17  | sp P29457 SERPH_RAT | Serpin H1   | collagen binding                         | 0.505 825                           |
| 31  | sp P11762 LEG1_RAT  | Galectin-1  | galactoside binding                      | 0.691 831                           |
| 49  | sp P62630 EF1A1_RAT | Elongation factor 1-alpha 1                           | GTP binding                              | 0.591 562                           |
| 70  | sp P18666 MRLC2_RAT | Myosin regulatory light chain MRLC2                   | calcium ion binding                      | 0.648 634                           |
| 72  | sp P24368 PPIB_RAT  | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B                 | ptide binding                            | 0.487 529                           |
| 91  | sp P30009 MARCS_RAT | Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate         | calmodulin binding                       | 0.524 808                           |
| 97  | sp Q05962 ADT1_RAT  | ADP/ATP translocase 1                                 | ATP: ADP antiporter activity             | 0.613 762                           |
| 102 | sp P20788 UCRI_RAT  | Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial | protein complex binding                  | 0.492 04                            |
| 115 | sp P46462 TERA_RAT  | Transitional endoplasmic reticulum ATPase             | ATP binding                              | 0.564 937                           |
| 124 | sp P05943 S10AA_RAT | Protein S100-A10                                      | calcium ion binding                      | 0.448 745                           |
| 126 | sp Q0KL00 FA38A_RAT | Protein FAM38A  | ion channel activity                     | 0.613 762                           |
| 145 | sp P35213 1433B_RAT | 14-3-3 protein beta/alpha                             | protein C-terminus binding               | 0.564 937                           |
| 150 | sp P11232 THIO_RAT  | Thioredoxin   | thioredoxin-disulfide reductase activity | 0.496 592                           |
| 166 | sp Q4KM74 SC22B_RAT | Vesicle-trafficking protein SEC22b                    |  | 0.698 232                           |

注: 以激素组作为对照, 在土鳖虫组中共有 14 种蛋白质表达出现显著下调, 主要参与能量代谢、信号转导、蛋白结合等

以激素组为对照, 空白对照组和土鳖虫组同时上调的蛋白有 Heat shock 70 kDa protein 1 Like (Hspa1L)、Peroxiredoxin-5, mitochondrial (Prx V)、cell growth regulator with EF hand domain 1 (Cgref1)。

空白对照组和土鳖虫组同时下调的蛋白有

Serpinh1、ADP/ATP translocase 1。

### 3 讨论

实验利用 iTRAQ 技术结合 2D LC-MS/MS 分别鉴定

了激素诱导骨髓间充质干细胞前后的蛋白质之间的差异, 和土鳖虫含药血清干预激素诱导骨髓间充质干细胞前后的蛋白质之间的差异表达分析, 为展现疾病发病及治疗后的蛋白变化情况, 为激素诱导骨髓间充质干细胞发病机制和激素性股骨头缺血性坏死的发病机制提供理论依据, 同时也为土鳖虫治疗激素性股骨头缺血性坏死提供实验依据。结果发现以激素组为对照, 空白对照组和土鳖虫组同时上调的蛋白有Hspa1L、Prx V、Cgref1; 空白对照组和土鳖虫组同时下调的蛋白有Serpinh1、ADP/ATP translocase 1。下面对这些差异蛋白重点进行阐述。

Hspa1L属于热休克蛋白中的热休克蛋白70家族, 热休克蛋白70具有多种生物学功能, 包括分子伴侣功能, 参与免疫反应, 抗细胞凋亡功能, 抗氧化功能, 提高细胞的应激耐受性, 促进细胞增殖, 参与细胞骨架的形成和修复等等。热休克蛋白70在细胞凋亡过程主要表现为抗细胞凋亡作用, 抗细胞凋亡作用是其细胞保护作用机制的一个方面<sup>[2]</sup>, 作用机制与抑制应激活化蛋白激酶、半胱氨酸蛋白酶的活性和抑制促凋亡基因的表达有关<sup>[3]</sup>。研究证明, 热休克蛋白70的抗细胞凋亡作用在临床上具有重要的应用价值<sup>[4]</sup>。国内外众多学者认为, 细胞凋亡在早期激素性股骨头缺血性坏死中起着重要作用<sup>[5-6]</sup>, 并且激素能够诱导骨细胞及成骨细胞凋亡。还有研究发现, 细胞外热休克蛋白70能通过与单核细胞表面的CD14、TLR2和TLR4等受体结合, 启动先天性免疫应答, 促进各种炎症介质转录、合成及分泌, 启动机体炎症反应<sup>[7]</sup>。而免疫复合物沉积引起动脉血管炎学说是股骨头缺血性坏死发生的重要机制。实验结果发现激素组热休克蛋白70表达较空白对照组下调, 而土鳖虫组热休克蛋白70表达较激素组上调, 结合课题组前一部分透射电镜所观察到的结果: 激素组观察到凋亡的骨髓间充质干细胞, 而土鳖虫组和空白对照组未见到凋亡的骨髓间充质干细胞, 所以推断激素可能通过抑制热休克蛋白70表达而促使骨髓间充质干细胞凋亡, 土鳖虫可能通过促进热休克蛋白70表达而抑制骨髓间充质干细胞凋亡, 这可能是土鳖虫能有效治疗股骨头缺血性坏死的机制之一。

Prx V属于Peroxiredoxin(Prx)蛋白。Prx蛋白是新近发现的一类过氧化物酶, 在生物体内清除活性氧族具有重要作用。Prx V具有3个Cys残基, N-端Cys48残基为该家族的保守残基。该蛋白具有长短2种形式, 存在于细胞质、过氧化物酶体和线粒体中<sup>[8]</sup>。Prx V是

指存在于线粒体中的Prx V, 在线粒体基因组的稳定具有重要作用<sup>[9]</sup>。细胞的氧化还原状态与肿瘤的形成密切相关, 而且越来越多的证据显示Prx与肿瘤有关<sup>[10]</sup>。研究显示, Prx V在乳腺癌组织中表达上调, 而且Prx V的高表达还与淋巴结转移相关<sup>[11]</sup>。还有研究表明, 肿瘤坏死因子 $\alpha$ 刺激可以增加细胞的过氧化氢水平, 升高的过氧化氢可以导致细胞内Prx V表达增加。研究表明, Prx V可以抑制抑瘤基因p53诱导的细胞凋亡。在p53转染的Hela细胞内活性氧的水平升高, 而Prx V与p53共转染的细胞显示较低的活性氧水平, 呈凋亡形态的细胞少<sup>[12]</sup>。目前研究表明血浆肿瘤坏死因子 $\alpha$ 含量的升高可能是股骨头缺血性坏死发生的重要因素。Tang等<sup>[12]</sup>指出肿瘤坏死因子 $\alpha$ 介导的血管平滑肌细胞凋亡参与了动脉粥样硬化的进程, 进而导致血栓的形成。而肿瘤坏死因子 $\alpha$ 又可刺激细胞内Prx V表达增加, 那么Prx V是否与股骨头缺血性坏死的发生相关, 需进一步证实。从参考文献[8]可以看出Prx V有抗细胞凋亡的作用, 本实验发现土鳖虫组和空白对照组都较激素组Prx V上调, 作者推断激素可能通过抑制Prx V表达而促使骨髓间充质干细胞凋亡, 土鳖虫是不是也可能通过促进Prx V表达而抑制骨髓间充质干细胞凋亡, 从而防治股骨头缺血性坏死。

Cgref1位于细胞外区域。转录调控生长反应基因在一个细胞命运的决定性上起到关键的作用。在调节细胞生长潜能方面p53基因是已知的重要的转录调控基因。用不同的反转录聚合酶链反应分析大鼠胚胎成纤维细胞含有温度敏感的p53基因片段, 从隐藏的细胞里能够分离几个转录上调的具有P53功能蛋白。其中两个基因SM20和微粒体环氧化物水解酶是前面描述的基因。两个以前未知功能基因, 细胞生长调节(CGR)基因CGR11和CGR19被分离出来。CGR11和CGR19似乎是p53细胞在中等水平的初级反应基因功能表达。CGR11和CGR19能抑制多种细胞的生长<sup>[13]</sup>。根据EXPASY中的功能注释, Cgref1主要生物功能是抑制细胞生长, 分子功能是钙离子结合。目前尚无其他相关文献。

Serpinh1属于serpins家族, serpins家族是参与了基本的生物过程, 如血液凝固、补体活化、纤维蛋白溶解、血管生成、炎症、肿瘤抑制, 而且是一个细胞特异性地表达出来。一个家庭成员的平均蛋白质抑制物大小为350-400个氨基酸, 但基因结构的数量和规

模上外显子和内含子不同<sup>[14]</sup>。SerpH1的生物功能是与胶原蛋白的结合, 作为胶原蛋白分子伴侣参与生物合成。基因SerpH1编码的热休克蛋白47存在于胶原蛋白分泌细胞的内质网内, 对胶原蛋白的正常加工、合成和分泌具有重要的调节作用, 是一种对胶原合成至关重要的分子伴侣<sup>[15-16]</sup>。作为编码热休克蛋白47胶原蛋白分子伴侣的基因SerpH1发生突变可导致成骨不全症, 说明SerpH1突变参与了胶原蛋白生物合成通路的关键步骤, 并且是成骨不全症的分子发病机制<sup>[17]</sup>。胶原蛋白是细胞外基质的结构蛋白质, 是骨组织有机物中的主要成分, 对骨组织结构完整以及维持其生物力学特性起着非常重要的作用<sup>[18]</sup>。因而I型胶原蛋白可以作为成骨细胞分化的一个检测指标。实验结果显示, 激素组SerpH1表达较空白对照组上调, 而土鳖虫组SerpH1表达较激素组下调, 根据文献提示<sup>[19]</sup>: 激素可能刺激SerpH1突变, 导致成骨不全, 而土鳖虫可能抑制SerpH1突变, 抑制成骨不全。作者推测SerpH1可能通过与胶原蛋白的结合, 参与了成骨分化, 从而参与股骨头缺血性坏死的形成与发展。

ADP/ATP translocase 1是促进ATP通过细胞膜与ADP进行交换的非常独特的运输工具, 如此独特的运输蛋白只有在植物成形原体和原核生物中起作用, 到目前为止也仅仅在少数几个属于衣原体目和立克次氏体目的细胞内细菌中鉴别出来。ADP/ATP translocase家族在细胞能力代谢方面起到重要作用<sup>[20]</sup>。三磷酸盐抑制线粒体氧化消耗是通过ADP/ATP translocase竞争抑制机制。尽管主要的凋亡是出现在晚期, 但是用脂质体包裹的氯磷酸盐(抗骨质疏松症药)的长时间治疗造成线粒体膜电位的下降。因此, 通过三磷酸盐代谢物的ADP/ATP translocase的抑制很可能是氯磷酸盐导致破骨细胞凋亡和抑制骨再吸收的途径<sup>[21]</sup>。实验结果显示, 激素组ADP/ATP translocase表达较空白对照组上调, 而土鳖虫组ADP/ATP translocase表达较激素组下调, 提示激素可能通过促进ADP/ATP translocase的表达, 而抑制破骨细胞凋亡, 促进骨再吸收, 抑制成骨分化; 土鳖虫可能通过抑制ADP/ATP translocase表达, 导致破骨细胞凋亡、抑制骨再吸收、促进成骨分化; 这与第一部分实验结果相吻合, 即激素有抑制骨髓间充质干细胞成骨分化作用, 土鳖虫有促进骨髓间充质干细胞成骨分化作用。所以ADP/ATP translocase1也可能参与股骨头缺血性坏死的形成与

发展。

综上所述, 土鳖虫上调Hspa1L和Prx V两个蛋白表达, 可能通过抗细胞凋亡而干预股骨头缺血性坏死的发生发展; Cgref1的相关文献较少; 土鳖虫还可能通过下调SerpH1和ADP/ATP translocase 1表达, 促进成骨分化, 从而抑制股骨头缺血性坏死的发生发展。这些都可能是土鳖虫有效防治股骨头缺血性坏死发生发展的分子机制及作用靶点。但这些蛋白具体是如何相互作用还有待于进一步的研究和证实。

**基金资助:** 福建省自然科学基金资助(2008J0325)。

**致谢:** 感谢上海复旦大学生物医学研究院蛋白质组中心实验室的帮助。

**作者贡献:** 实验设计为齐振熙, 实验实施为仲卫红, 实验评估为齐振熙。仲卫红成文, 齐振熙审核, 齐振熙对文章负责。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理要求:** 实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

**作者声明:** 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

#### 4 参考文献

- [1] Qi ZX, Cao Y. Zhongguo Gushang. 2002;15(2):77-78. 齐振熙, 曹阳. 不同治法防治激素性股骨头缺血性坏死的实验研究[J]. 中国骨伤, 2002, 15(2):77-78.
- [2] Kiang JG, Tsokos GC. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. Pharmacol Ther. 1998; 80(2):183-201.
- [3] Sun PM, Wang ZL, Li JM. Zhongguo Shouyi Xuebao. 2007; 27(2): 284-288. 孙培明, 王志亮, 李金明. 热休克蛋白70研究新进展[J]. 中国兽医学报, 2007, 27(2):284-288.
- [4] Chen H, Xiao WM, Zhang YD. Zhongguo Xiandai Yixue Zazhi. 2002;12(14):4-7. 陈辉, 肖卫民, 张阳德. 肝细胞生长因子对TNF- $\alpha$ 诱导肝细胞凋亡的保护作用及其机制的研究[J]. 中国现代医学杂志, 2002, 12(14): 4-7.
- [5] O'Brien CA, Jia D, Plotkin LI, et al. Glucocorticoids act directly on osteoblasts and osteocytes to induce their apoptosis and reduce bone formation and strength. Endocrinology. 2004; 145(4):1835-1841.
- [6] Yun SI, Yoon HY, Jeong SY, et al. Glucocorticoid induces apoptosis of osteoblast cells through the activation of glycogen synthase kinase 3 $\beta$ . J Bone Miner Metab. 2009; 27(2):140-148.

- [7] Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, et al. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med.* 2000;6(4):435-442.
- [8] Zhang B, Xiang YM, Bai Y. *Shengli Kexue Jinzhan.* 2004;35(4):352-355.  
章波, 向渝梅, 白云. 抗氧化蛋白 Peroxiredoxin 家族研究进展[J]. *生理科学进展*, 2004, 35(4):352-355.
- [9] Declercq JP, Evrard C, Clippe A, et al. Crystal structure of human peroxiredoxin 5, a novel type of mammalian peroxiredoxin at 1.5 Å resolution. *J Mol Biol.* 2001;311(4):751-759.
- [10] Zeng YP, Liu J, Wang BX. *Aizheng Jinzhan.* 2010;8(2):164-166.  
曾跃平, 刘洁, 王宝玺. 过氧化物酶 Peroxiredoxin 家族与肿瘤关系研究进展[J]. *癌症进展*, 2010, 8(2):164-166.
- [11] Karihtala P, Mäntyniemi A, Kang SW, et al. Peroxiredoxins in breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2003;9(9):3418-3424.
- [12] Tang V, Dhirapong A, Yabes AP, et al. TNF- $\alpha$ -mediated apoptosis in vascular smooth muscle cells requires p73. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005;289(1):C199-206.
- [13] Madden SL, Galella EA, Riley D, et al. Induction of cell growth regulatory genes by p53. *Cancer Res.* 1996;56(23):5384-5390.
- [14] van Gent D, Sharp P, Morgan K, et al. Serpins: structure, function and molecular evolution. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35(11):1536-1547.
- [15] Dafforn TR, Della M, Miller AD. The molecular interactions of heat shock protein 47 (Hsp47) and their implications for collagen biosynthesis. *J Biol Chem.* 2001;276(52):49310-49319.
- [16] Koide T, Nishikawa Y, Asada S, et al. Specific recognition of the collagen triple helix by chaperone HSP47. II. The HSP47-binding structural motif in collagens and related proteins. *J Biol Chem.* 2006;281(16):11177-11185.
- [17] Christiansen HE, Schwarze U, Pyott SM, et al. Homozygosity for a missense mutation in SERPINH1, which encodes the collagen chaperone protein HSP47, results in severe recessive osteogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet.* 2010;86(3):389-398.
- [18] Oxlund H, Mosekilde L, Ortoft G. Reduced concentration of collagen reducible cross links in human trabecular bone with respect to age and osteoporosis. *Bone.* 1996;19(5):479-484.
- [19] Schmitz-Esser S, Linka N, Collingro A, et al. ATP/ADP translocases: a common feature of obligate intracellular amoebal symbionts related to Chlamydiae and Rickettsiae. *J Bacteriol.* 2004;186(3):683-691.
- [20] Schiebel K, Weiss B, Wöhrle D, et al. A human pseudoautosomal gene, ADP/ATP translocase, escapes X-inactivation whereas a homologue on Xq is subject to X-inactivation. *Nat Genet.* 1993;3(1):82-87.
- [21] Lehenkari PP, Kellinsalmi M, Näpänkangas JP, et al. Further insight into mechanism of action of clodronate: inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable, adenine-containing metabolite. *Mol Pharmacol.* 2002;61(5):1255-1262.