

# 基于 iTRAQ 结合质谱技术的养心通脉有效部位方 对大鼠 BMSCs 作用蛋白的探讨

郑景辉<sup>1,2\*</sup>, 黄龙坚<sup>1</sup>, 吴新正<sup>3</sup>, 刘锐<sup>1</sup>, 陈建军<sup>1</sup>, 莫云秋<sup>1</sup>,  
朱志华<sup>1</sup>, 简维雄<sup>2</sup>, 刘吉勇<sup>2</sup>, 黄献平<sup>2</sup>

(1. 广西中医药大学附属瑞康医院, 南宁 530011; 2. 湖南中医药大学, 长沙 410208;  
3. 湖南省第二人民医院, 长沙 410005)

**[摘要]** 目的:采用核素标记相对和绝对定量(iTRAQ)蛋白组学技术分析养心通脉有效部位方(apr-YTF)对骨髓间充质干细胞(BMSCs)的作用蛋白。方法:SD大鼠按照每天 $31.08\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 给予养心通脉有效部位方灌服,以灌服等量生理盐水大鼠含药血清为空白对照,5 d后取含药血清干预BMSCs,提取细胞的膜蛋白,运用液相色谱基质辅助激光解析/电离-飞行时间质谱技术(MALDI-TOF-MS)筛选并鉴定差异表达蛋白,并对其进行生物信息学分析。结果:鉴定出236个蛋白,差异蛋白62个,其中表达上调的蛋白有48个,表达下调的蛋白有14个;这些蛋白主要参与102种生物学过程,35种细胞组分,6种分子途径和3条信号转导通路,这些蛋白在3条信号转导通路上相互发生作用。结论:由结果推测处于差异蛋白功能交互网中交叉点位置的早老蛋白-1(presenilin-1),presenilin-2通过Notch信号通路,突触融合蛋白-4(syntaxin-4)通过可溶性N-乙酰顺丁烯二酰亚胺敏感性的融合蛋白附着蛋白(SNARE)信号通路,丝裂原活化蛋白激酶12(MAPK12)通过MAPK信号通路在apr-YTF诱导BMSCs向心肌分化过程中发挥重要作用。

**[关键词]** 养心通脉有效部位方;骨髓间充质干细胞;核素标记相对和绝对定量;蛋白质组学;生物信息学;信号转导通路

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)20-0107-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015200107

**Effect on Differentially Expressed Proteins in Rat BMSCs Intervened by Active Principle Region of Yangxin Tongmai Formula by iTRAQ Combined with Mass Spectrometry** ZHENG Jing-hui<sup>1,2\*</sup>, HUANG Long-jian<sup>1</sup>, WU Xin-zheng<sup>3</sup>, LIU Rui<sup>1</sup>, CHEN Jian-jun<sup>1</sup>, MO Yun-qiu<sup>1</sup>, ZHU Zhi-hua<sup>1</sup>, JIAN Wei-xiong<sup>2</sup>, LIU Ji-yong<sup>2</sup>, HUANG Xian-ping<sup>2</sup> (1. Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Nanning 530011, China; 2. Hunan University of TCM, Changsha 410208, China; 3. Second People's Hospital of Hunan Province, Changsha 410005, China)

**[Abstract]** **Objective:** To analyze the effective protein of bone mesenchymal stem cells (BMSCs) intervened by active principle region of Yangxin Tongmai formula (apr-YTF) using the proteomics technology of isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ). **Method:** SD rats received apr-YTF  $31.08\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  for 5 days and used the drug-containing serum in rats with equivalent normal saline as blank control group. 5 days later, drug-containing serum was taken to intervene BMSCs, then cell membrane proteins were extracted, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) was used to screen and identify the differentially expressed proteins, and bioinformatics analysis was conducted. **Result:** The 236 proteins and 62 differentially expressed proteins were identified, including 48 up-regulating proteins and 14 down-regulating proteins. These proteins are mainly involved in 102 kinds of biological processes, 35 kinds of cell components, 6

**[收稿日期]** 20140903(018)

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金项目(81102595);广西科学研究与技术开发计划项目(桂科合1347004-26);广西自然科学基金项目(2012GXNSFAA053113,2013GXNSFAA019126);广西高等学校优秀中青年骨干教师培养工程项目(桂教人[2013]16号)

**[通讯作者]** \*郑景辉,博士,副教授,从事心脑血管疾病的中西医结合诊疗工作,Tel:0771-2238816,E-mail:jinghui Zheng@yeah.net

kinds of molecular pathways and 3 signal transduction pathways. These proteins interact in the three signal transduction pathways. **Conclusion:** The following proteins and signal transduction pathways play an important role in the process of apr-YTF to induce BMSCs differentiation into cardiomyocytes: presenilin-1, presenilin-2 in the Notch signaling pathway, syntaxin-4 protein in soluble *N*-ethyl maleimide sensitive fusion protein attachment protein (SNARE), and mitogen-activated protein kinase 12 (MAPK 12) in the MAPK signaling pathway.

**[Key words]** active principle region of Yangxin Tongmai formula; bone marrow mesenchymal stem cells; isobaric tags for relative and absolute quantitation; proteomics; bioinformatics; signal transduction pathway

近年来研究表明,通过对骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)移植治疗缺血性心肌病,可以起到重建梗死组织丧失的心肌细胞、改善缺血心肌功能的作用,因而成为国内外心血管病研究领域的热点<sup>[1]</sup>。BMSCs 在此级联反应中实际上是细胞感应微环境中外源刺激信号,实现信号的跨膜转导,启动相关基因的表达而向目的成体细胞的转化。因此了解微环境信号在 BMSCs 细胞膜上的靶点蛋白及转导途径对进一步阐明其分化、归巢机制并控制其分化方向具有重要意义。养心通脉方(Yangxin Tongmai formula, YTF)是我国著名中医学家秦伯未先生运用“扶养心气,和通血脉”之法治疗胸痹心痛的有效名方<sup>[6]</sup>。本研究采用了同位素标记相对和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)结合质谱技术养心通脉有效部位方(active principle region of Yangxin Tongmai formula, apr-YTF)对大鼠 BMSCs 作用蛋白进行了鉴定。

## 1 材料

**1.1 动物** 选用 6~8 周龄清洁级雄性 SD 大鼠,体重 130~150 g,购自广西中医药大学动物实验中心。实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准,动物合格证号 SCXK(沪)2009-0004。

**1.2 药物及试剂** apr-YTF 由养心通脉方原方:人参,桂枝,地黄,Li-bosch,丹参,泽泻,经广西中医药大学黄敏主任药师鉴定,综合提取的人参皂苷,丹参酮 II<sub>A</sub>,人参多糖,总生物碱,总挥发油有效成分部位配伍制成,参考本课题组前期研究成果<sup>[3]</sup>,以人参皂苷 10.3 g·kg<sup>-1</sup>体重,丹参酮 II<sub>A</sub> 0.38 g·kg<sup>-1</sup>体重,人参多糖 1.43 g·kg<sup>-1</sup>体重,总生物碱 0.32 g·kg<sup>-1</sup>体重,总挥发油 18.65 mL·kg<sup>-1</sup>体重口服为 apr-YTF 的最佳配伍剂量,使用时用蒸馏水稀释成所需的浓度(总挥发油聚山梨酯乳化),药物提取由广西中医药大学附属瑞康医院完成; iTRAQ 试剂盒(美国 Applied Biosystems 公司,批号 4311971),培养基 DMEM(美国 Gibco 公司,批号 8116254),特级胎牛

血清(北京 Hyclone 公司,批号 20130203)。

**1.3 仪器** MALDI-TOF-TOF 型 4700(美国 ABI 公司),液相色谱仪 2D-nano-HPLC 岛津 LC-20AB(日本津岛公司),ImageScanner III 型扫描仪(美国 Amersham Biosciences 公司)。

## 2 方法

**2.1 大鼠 BMSCs 的分离和培养** 大鼠引颈法处死,用 percoll 细胞分离法提取骨髓间充质细胞,加入 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养、传代。采用 FACScan 流式细胞仪检查细胞表面抗原。以 CD34, CD45, 阳性率低于 5%, CD44, CD90 阳性率高于 95% 鉴定所得细胞为高纯度的 BMSCs。

**2.2 实验用大鼠 apr-YTF 含药血清制备** 大鼠采用结扎左冠脉前降支的方法制备急性心肌缺血模型。apr-YTF 组:急性心肌梗死大鼠于造模后当天按 31.08 g·kg<sup>-1</sup>剂量 *ig* 生理盐水稀释的 apr-YTF,连续 5 d<sup>[4]</sup>。在无菌条件下下腔静脉取血离心,取上清液后用 0.22 μm 滤膜过滤除菌, -20 °C 保存备用。阴性对照组:急性心梗大鼠于造模后当天按 apr-YTF 相同剂量生理盐水 *ig*,连续 5 d。在无菌条件下下腔静脉取血离心,取上清液后用 0.22 μm 滤膜过滤除菌, -20 °C 保存备用。

**2.3 大鼠 BMSCs 膜蛋白的制备** 参照 Ramus 等<sup>[5-6]</sup>提出的差速离心方法富集膜蛋白质。收集细胞匀浆,离心收集沉淀;然后于膜裂解溶液中于冰上裂解 1 h,即完成制备膜蛋白质。采用 2D 定量试剂盒测定蛋白质质量浓度。

**2.4 蛋白的酶解和标记 iTRAQ** 将蛋白样品加入胰蛋白酶消化过夜,将酶解样品真空干燥后,溶于 iTRAQ 溶液缓冲液中; iTRAQ 试剂 113, 115 分别标记样品阴性对照组和 apr-YTF 组,标记后的样品经过 C<sub>18</sub> spin column 除盐柱除盐,冻干。

**2.5 离线二位液相色谱分离与点靶** 干燥的标记样品用上样缓冲液 A(10 mmol·L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25% CAN, pH 2.7)复溶并稀释 10 倍,上样到 SCX 预装柱(5 μm, 2.1 mm × 200 mm),经上样缓冲液 A 洗涤

后,用含有 KCl 浓度分别为 35, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300 mmol·L<sup>-1</sup> 的缓冲液 B 分布洗脱,收集不同梯度浓度条件下洗脱的多肽。收集到的各组分样品稀释后进行反相 C<sub>18</sub> 柱(77 μm × 150 mm, 5 μm)梯度淋洗和点靶。

**2.6 质谱分析与数据处理** 质谱鉴定和相对定量分析采用 5800 MALDI-TOF/TOF 蛋白分析仪。质谱分析数据用 Protein Pilot 2.0 对 SWISSPROT 数据库进行检索鉴定蛋白,报告置信度高于 95% 的蛋白,同时用 113, 115 试剂报告离子的峰面积积分进行相对定量分析,以 113 为对照,按照 115: 113 的比值,选择  $P \leq 0.05$  的结果进行报告。

**2.7 差异膜蛋白质的生物信息学分析** 用富集分析算法对初步鉴定的蛋白数据进行分组,鉴定的蛋

白与数据库进行对比,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;KEGG 数据库进行信号转到通路分析;VISANT 数据库检索蛋白质相互作用。

### 3 结果

**3.1 质谱鉴定结果** 质谱分析结果显示在 apr-YTF 组和阴性对照组筛选和鉴定出 236 个蛋白。除了所有多重亲和 MARS human14 色谱柱应该去除的 14 种高丰度蛋白,同时满足如下条件的结果进入统计分析:peptides > 2, Unused > 1.3, Pval < 0.05, 115/113 > 1.2 和 115/113 < 0.8 经分析 apr-YTF 组和对对照组差异表达蛋白 62 个,表达上调的蛋白有 48 个,表达下调的蛋白有 14 个。见表 1, 2。

表 1 apr-YTF 对 BMSCs 膜蛋白作用的上调蛋白

Table 1 Higher protein of apr-YTF to membrane protein in BMSCs

No.	蛋白质名称	蛋白标识	生物学过程	分子功能
1	nesprin-4	Q5M844	上皮细胞顶端/基底极性的建立	肌动蛋白结合
2	Lamin-B 受体	O08984	氧化还原过程	NAD 或者 NADP 受体活性
3	双功能硫酸乙酰肝素	Q02353	MAPA 级联过程	磺基转移酶的活性
4	钙结合蛋白 7	Q866X0	-	钙离子结合;金属离子结合
5	外周浆膜蛋白 CASK	O14936	磷酸化;RNA 聚合酶启动子调控	蛋白激酶活性
6	输出膜蛋白 Sec	G2IHK4	转运;胞内蛋白质运输	蛋白跨膜转运活动
7	整体膜蛋白 2B	G5BJX8	-	-
8	钠/钾转运 ATP 酶 β-3 亚基	Q63377	ATP 的代谢过程;钾离子转运;跨膜转运	钠/钾转运;ATP 酶活性
9	小泡相关膜蛋白 B	G5B3K5	-	分子结构活性
10	肿瘤坏死因子受体超家族成员 1B	Q80WY6	免疫应答,细胞表面受体信号通路	肿瘤坏死因子活化受体活性;泛素蛋白连接酶结合活性
11	RNA 结合基序蛋白,X 染色体反转基因样蛋白	P84586	转录调控;由 RNA 聚合酶 II 启动子的转录	核苷酸结合;RNA 结合;蛋白结合
12	完整的膜蛋白 GPR137	G5B6Q2	-	-
13	细胞内氯通道蛋白 1	O00299	转运;氯离子转运;信号转导	蛋白结合;氯离子通道活性
14	完整膜蛋白 GPR137B	G5APM1	-	-
15	N-乙酰半乳糖胺转移酶 7	Q9R0C5	蛋白质糖基化,蛋白质 O-连接糖基化	转移酶活性,转移糖基
16	线粒体导入受体亚基 TOM20 同源蛋白	Q62760	细胞内蛋白质运输;蛋白质跨膜转运	PP-键的水解驱动蛋白跨膜转运活性
17	完整膜蛋白 GPR180	G5B167	G 蛋白偶联受体信号通路;信息素响应	-
18	高尔基体膜蛋白 1	G5ARM2	-	-
19	ER 膜蛋白复合物亚基 2	B0BNG0	-	-
20	完整膜蛋白 GPR137B	G5AMP5	-	-
21	酪氨酸蛋白磷酸激酶	P07948	B 细胞受体信号通路;Fc-ε 受体信号通路	酪氨酸激酶活性
22	分泌载体相关膜蛋白 2	G5AL66	蛋白转运	-
23	溶质载体有机阴离子转运蛋白家族成员 1A1	P46720	二苯乙烯类化合物响应;睾酮刺激响应	有机阴离子转运跨膜活动

续表 1

No.	蛋白质名称	蛋白标识	生物学过程	分子功能
24	膜蛋白	Q9WCD1	病毒的生命周期蛋白	病毒粒子的结构组成
25	血型糖蛋白-C	Q6XFR6	-	-
26	$\alpha$ -1,6-甘露糖的糖蛋白 6- $\beta$ -N-乙酰葡萄糖胺基转移酶 A	Q08834	蛋白质的 N-连接的糖基化	$\alpha$ -1,6-甘露糖基的糖蛋白 6- $\beta$ -N-乙酰转移酶活性
27	外周浆膜蛋白 CASK	G5AM75	ATP 结合;蛋白激酶活性	蛋白激酶活性;转移含磷基团
28	囊泡转运蛋白 SEC20	Q8VHI8	细胞凋亡过程;内质网的膜融合,囊泡介导的转运	分子学功能
29	转位链相关膜蛋白 1	G5AYC5	-	-
30	syntaxin-4	Q08850	膜融合;蛋白质复杂的装配	SNARE 结合;SNAP 受体活性;蛋白结合
31	跨膜丝氨酸蛋白酶 11D	Q8VHJ4	蛋白水解;调控生长	催化活性
32	junctophilin-2	Q2PS20	转运;心肌组织发展的多细胞有机体的调控	钙释放通道活动
33	红细胞膜蛋白带 4.2	G5BM42	肽交联	蛋白质-谷氨酰胺 $\gamma$ -谷氨酰转移活性
34	膜相关磷脂酰肌醇转移蛋白 1	Q5U2N3	转运	金属离子结合
35	包膜蛋白(E 蛋白)(SM 蛋白)	Q9IKC8	细胞凋亡过程	-
36	$\gamma$ -谷氨酰转移酶 1	P20735	蛋白水解;酶原激活	$\gamma$ -谷氨活性,肽酶活性;转移酶活性;水解酶活性
37	完整的膜蛋白的 $\alpha$ 前链	Q95572	免疫系统的过程	-
38	$\alpha$ -(1,3)-岩藻糖基转移酶 9	Q99JB3	蛋白质糖基化;神经系统的发育,岩藻糖基转移	转移酶活性,转移糖基团
39	高尔基 SNAP 受体复合体 1	Q62931	运输;ER 到高尔基体囊泡介导的运输	SNAP 受体活性
40	丝裂原活化蛋白激酶 12	Q63538	MAPK 级联反应	核苷酸结合;镁蛋白激酶活性;转移酶活性
41	JNK1 相关膜蛋白	G5B7F1	-	-
42	解聚素及金属蛋白酶结构域的蛋白 17	Q9Z1K9	膜蛋白胞外蛋白水解;Notch 信号通路	金属内肽酶的活性;Notch 绑定
43	$\beta$ -1,3-N-乙酰极性分子	Q924T4	卵巢卵泡发育;Notch 信号通路正调控	转移酶活性
44	O-岩藻糖肽 3- $\beta$ -N-乙酰转移酶	Q9R1U9	多细胞有机体的发展;Notch 信号通路负调控	转移酶活性
45	前咽缺陷蛋白 1 同源 A	Q5PQQ3	膜蛋白的胞外结构域的蛋白水解;Notch 受体的处理	内肽酶的活性,蛋白结合
46	nicastrin	Q8CGU6	膜蛋白胞外蛋白水解;Notch 信号通路	内肽酶的活性,蛋白结合;肽酶活性
47	presenilin-1	P97887	激活 MAPKK 活动;血管发育;蛋白质磷酸化的调控	-
48	presenilin-2	O88777	缺氧响应;蛋白磷酸化;细胞的分化;Notch 信号传导	内肽酶的活性,天冬氨酸型内肽酶的活性,水解酶活性

注:“-”表示不明确蛋白对应的功能(表 2 同)。

### 3.2 生物信息学分析

**3.2.1 差异蛋白 DAVID 富集分析** 通过 DAVID 富集分析系统对本实验获得的 62 种差异表达蛋白进行 GO 分析。这些蛋白主要参与 102 种生物学过程,35 种细胞组分和 6 种分子途径,主要涉及肽酶活性,内肽酶活,肽酶的活性-作用于 L-氨基酸的肽,

乙酰氨基葡萄糖转移活性,O-岩藻糖肽 3- $\beta$ -N-乙酰氨基葡萄糖转移酶活性。

**3.2.2 差异蛋白 KEGG 信号转导通路分析** 通过差异蛋白的 KEGG 通路分析,发现实验中所鉴定的差异蛋白主要集中的 3 条信号转导通路上。见表 3。

表 2 apr-YTF 对 BMSCs 膜蛋白作用的下调蛋白

Table 2 Lower protein of apr-YTF to membrane protein in BMSCs

No.	蛋白质名称	Entry	生物学过程	分子功能
1	亮氨酸 cystinyl 氨肽酶	P97629	G-蛋白偶联受体信号通路	氨肽酶活性;氨肽酶活性;金属肽酶的活性
2	溶酶体相关膜糖蛋白 2	P17046	生物进程	分子功能
3	基质金属蛋白酶 23	O75900	再生;蛋白水解	金属酶活性;肽酶活性;锌离子结合
4	可溶性钙活化核苷酸酶 1	Q8K4Y7	信号转导	焦磷酸酶的活性,水解酶活性,核苷二磷酸酶的活性,尿苷二磷酸酶的活性
5	细胞内氯通道蛋白 2	Q5M883	转运;氧化还原过程	谷胱甘肽过氧化物酶的活性;电压门控离子通道的活性
6	突触蛋白-12	G3V7P1	转运胆固醇流出;蛋白质稳定	SNARE 结合;SNAP 受体活性,蛋白结合
7	小泡相关膜蛋白 8	G5C263	小泡介导的转运	-
8	线粒体内膜蛋白(mitofilin)	Q3KR86	线粒体钙离子平衡	分子学功能
9	整合膜蛋白 GPR137C	G5BLP3	-	-
10	Emc4 蛋白	D4A0W1	-	-
11	推定的膜蛋白	G2IAE8	代谢过程	丝氨酸型内肽酶活性
12	Scamp2 蛋白	Q5U2U4	蛋白转运	蛋白结合;蛋白质转运活动
13	T 细胞免疫球蛋白及粘蛋白结构域蛋白 2	Q5FVR0	-	-
14	Adam19 蛋白	D3ZPM7	水解;心脏发育	金属内肽酶活性;锌离子结合

表 3 差异蛋白的 KEGG 通路分析

Table 3 KEGG pathway analysis of differences in protein

通路名称	所含蛋白数量	所含差异蛋白情况
Notch 信号转导系统	7	解聚素及金属蛋白酶结构域的蛋白 17, $\beta$ -1,3-N-乙酰极性分子, <i>O</i> -岩藻糖肽 3- $\beta$ -N-乙酰转移酶,前咽缺陷蛋白 1 同源 A, nicastrin, presenilin-1, presenilin-2
阿尔茨海默氏病	5	解聚素及金属蛋白酶结构域的蛋白 17,前咽缺陷蛋白 1 同源 A, nicastrin, presenilin-1, presenilin-2
可溶性 N-乙基顺丁烯二酰亚胺敏感性的融合蛋白附着蛋白	3	囊泡转运蛋白 SEC20,高尔基 SNAP 受体复合体 1, syntaxin 4

3.2.3 蛋白之间相互作用网络 运用 VISANT 检索蛋白质相互作用,蛋白:presenilin-1 和 presenilin-2 在 Notch 信号转导系统功能网络交叉点, Syntaxin-4 在在网图中处于可溶性 N-乙基顺丁烯二酰亚胺敏感性的融合蛋白附着蛋白(SNARE, interactions in vesicular transport)功能网络交叉点,丝裂原活化蛋白激酶 12(mitogen-activated protein kinase 12, MAPK 12)在 MAPK 通路功能网络交叉点。它们可能在蛋白相互作用发展过程中扮演重要角色。

#### 4 讨论

本课题组在临床和实验研究的基础上,通过对各有效成分部位的有效剂量配伍抗心肌缺血的实验研究,已研制成 apr-YTF。实验研究显示, apr-YTF 对缺血大鼠的 BMSCs 具有体外诱导向心肌分化、移植归巢于心肌组织、动员外周血 CD34 细胞数增多的作用<sup>[7-8]</sup>。

免疫蛋白质组学技术据信号转导通路中第一信使与膜蛋白受体结合的原理,通过提取 BMSCs 细胞膜蛋白,同时结合 apr-YTF 含药血清再进行免疫印迹杂交,这样便可以鉴定出患者 apr-YTF 含药血清与 BMSCs 膜蛋白的结合靶点。iTRAQ 标记偶联 MALDIMS/MS 的方法可同时分离和鉴定成百上千蛋白质,最大化的获得蛋白质的“全组信息”。本研究中成功筛选出 apr-YTF 干预 BMSCs 与阴性对照组比较 62 种差异表达蛋白,其中上调超过 1.2 倍的蛋白 48 种,下调超过 0.8 倍的蛋白 14 种。这些蛋白主要参与 102 种生物学过程,35 种细胞组分和 6 种分子途径,3 条信号转导通路(KEGG 数据库),这些蛋白在 3 条信号转导通路上相互发生作用。

apr-YTF 作为 1 种总的有效部位的混合物,在诱导 BMSCs 的过程中具体通过调控肽酶的表达,引起一系列蛋白构象变化二引发细胞功能的变化。接

下来进一步的分析发现在差异蛋白分子生物学过程中还有乙酰氨基葡萄糖转移活性和 *O*-岩藻糖肽 3- $\beta$ -*N*-乙酰氨基葡萄糖转移酶活性;乙酰糖基转移酶的作用是延长糖蛋白上的糖链。在这种修饰中岩藻糖以 *O*-连接方式连接在 EGF 样结构域的丝氨酸或苏氨酸残基上,正确的糖基化对于正常的 Notch 信号的传递是必须的,有重要调节作用。

在对差异蛋白的信号通路分析及蛋白质相互作用分析是发现:①有 7 种蛋白在 Notch 信号转导通路上,其中 presenilin-1 和 presenilin-2 在 Notch 网图中处于功能网络交叉点,他们可能在蛋白相互作用发展过程中扮演重要角色。Notch 蛋白是一种整合型膜蛋白,Notch 信号在脊椎动物心脏生发中的作用,已在对蟾蜍进行的相关研究中得到了充分的体现,在体外建立的大鼠 BMSCs 与心肌细胞间接接触的共培养体系中,当向其中加入 Notch 受体激活物 Jagged1 时,BMSCs 向心肌细胞的分化率将大大提高,同时再加以抑制剂 DAPT 时,则可完全抵消其促分化的效应<sup>[9]</sup>。同样作为体外研究,在 Nemir 等<sup>[10]</sup>进行的诱导胚胎干细胞向心肌细胞分化的实验中,则主要体现为 Notch 信号的下调。可见在不同的条件背景下,Notch 信号通路的效应并非完全一致,时也说明其在心肌细胞的分化发展中作用的复杂性。②有 5 种蛋白在阿尔茨海默氏病通路上,值得注意的是这 5 种蛋白与 Notch 信号通路上的蛋白完全重复,并且蛋白质相互作用分析中未发现存在通路重要交叉点的蛋白,故而认为 apr-YTF 并没有通过此通路发挥作用,只是数据上的巧合,应该是通过 Notch 信号通路发挥作用。③有 3 种蛋白在可溶性 *N*-乙基顺丁烯二酰亚胺敏感性的融合蛋白附着蛋白通路上,其中 syntaxin-4 蛋白在网图中处于功能网络交叉点。可溶性 *N*-乙基顺丁烯二酰亚胺敏感性的融合蛋白附着蛋白是 *N*-乙基顺丁烯二酰亚胺敏感性的融合蛋白 (*N*-ethylmaleimide-sensitive fusion protein, NSF)与高尔基体膜的相互作用需要重要受体。SNAP 与 NSF 结合后可增加 NSF 的 ATP 酶活性。NSF 只有在 SNARE 存在的前提下才能与 SNAP 结合。其在膜融合过程的多个阶段均发挥作用。④丝裂原活化蛋白激酶 12 (Mitogen-activated protein kinase 12, MAPK 12)在 MAPK 通路上。通过对通路的做这些分析发现 apr-YTF 含药血清对 BMSCs 的作用蛋白主要集中地以上 4 条通路,这也为下一步的验证提供了基础。

总之,本研究通过 iTRAQ 技术联合质谱初步筛

选得到一系列 apr-YTF 含药血清对 BMSCs 的作用蛋白及其信号转导通路,表明该技术用于干细胞相关生物标志物的研究具有良好的前景。有助于发现与药物相关的生物标志物及治疗靶点<sup>[11]</sup>。但这些蛋白在 pr-YTF 含药血清对 BMSCs 的作用的发生、发展尚未完全清楚,需要进一步生物学验证。

#### [参考文献]

- [1] Zhang Y, Liang X, Lian Q, et al. Perspective and challenges of mesenchymal stem cells for cardiovascular regeneration[J]. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2013, 11(4):505-517.
- [2] 秦伯未. 谦斋医学讲稿[M]. 上海:上海科学技术出版社,1978:208.
- [3] 袁肇凯,陈清华,黄献平,等. 养心通脉方有效成分部位的最佳剂量配伍抗急性心肌缺血的研究[J]. 湖南中医药大学学报,2008,28(6):21-27.
- [4] 李勇华,郑景辉,袁肇凯,等. 养心通脉有效部位方对梗死心肌细胞因子分泌、血管新生及动员 MSCs 归巢的影响[J]. 中国中医基础医学杂志,2011,17(5):514-516.
- [5] Ramus C, Gonzalez de Peredo A, Dahout C, et al. An optimized strategy for ICAT quantification of membrane proteins [J]. Mol Cell Proteomics, 2006, 5(1):68-78.
- [6] 陈瑜,李娇阳,李茂玉,等. 不同转移潜能鼻咽癌细胞株的差异膜蛋白质组研究[J]. 国际病理科学与临床杂志,2012,32(6):479-487
- [7] 李勇华,袁肇凯,郑景辉,等. 养心通脉有效部位方与急性心肌梗死大鼠骨髓间充质干细胞的动员及定向归巢[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2010,14(23):4285-4289.
- [8] 李勇华,袁肇凯,郑景辉,等. 养心通脉有效部位方动员心肌梗塞大鼠 MSCs 归巢及对心功能和病理的影响[J]. 时珍国医国药,2010,22(9):2167-2170.
- [9] Sassoli C, Pini A, Mazzanti B, et al. Mesenchymal stromal cells affect cardiomyocyte growth through juxtacrine Notch-1/Jagged-1 signaling and paracrine mechanisms: clues for cardiac regeneration [J]. J Mol Cell Cardiol, 2011, 51(3):399-408.
- [10] Nemir M, Croquelois A, Pedrazzini T, et al. Induction of cardiogenesis in embryonic stem cells via downregulation of Notch1 signaling [J]. Circ Res, 2006, 98(12):1471-1478.
- [11] Patel S. Role of proteomics in biomarker discovery: prognosis and diagnosis of neuropsychiatric disorders [J]. Adv Protein Chem Struct Biol, 2014, 94:39-75.

[责任编辑 周冰冰]