基于 iTRAQ 蛋白质组学技术的四君子汤对小鼠肝组织增龄性改变的研究

梁尔新[1],李奇玮[1],梁华[1],闫起[2],李泽光[2],赵炜明[1*]

(1. 黑龙江中医药大学,黑龙江 哈尔滨 150040;2. 黑龙江中医药大学附属第一医院,黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要 目的:基于 iTRAQ 蛋白质组学研究技术,以 3 月、6 月、12 月增龄小鼠为实验对象,通过比较分析 3 月龄和 6 月、12 月龄雄性小鼠肝脏线粒体中蛋白质的变化规律,挖掘衰老密切相关的蛋白标志物,探究四君子汤对衰老相关蛋白生物标志物的影响,从蛋白质组学的角度阐释衰老的发生发展机制及四君子汤干预小鼠增龄相关证候的生物学基础,为方证研究提供科学依据。方法:选取 50 只不同月龄的自然衰老小鼠作为实验研究对象,其中 3 月龄 10 只,通过饲养后自然衰老的 6 月龄和 12 月龄小鼠共 40 只,根据实验需求将其进行分组,3 月龄小鼠分为空白组,6 月龄及 12 月龄小鼠随机分成两组,即模型组(20 只)和四君子汤组(20 只)。四君子汤组在进行实验研究过程中,以 9.75 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ 的剂量对小鼠实施灌胃操作,空白组和模型组以同体积生理盐水灌胃,于实验第 30 天摘取小鼠肝脏,保存于 -80 ℃冰箱冻存备用。采用蛋白质组学分析方法,对小鼠肝脏样本予以分析。结果:空白组与6 月龄模型组共鉴定出差异蛋白 734 个;空白组与 12 月龄模型组共鉴定出 639 个差异蛋白;6 月龄模型组与四君子汤组有 515 个标志性蛋白质出现了良性回调;12 月龄模型组与四君子汤组有 389 个标志性蛋白质出现了良性回调。取两者的交集,发现 193 个差异蛋白在四君子汤给药后回调。结论:基于蛋白质组学实验研究方法,四君子汤对 6 月龄小鼠肝组织 PPAR 信号通路的调节、亨廷顿病等均有明显的调节作用;四君子汤对 12 月龄小鼠肝组织阿尔茨海默病、帕金森病等途径具有调节作用。四君子汤可能通过调节上述信号通路中的相关蛋白,实现对衰老引起的机体机能障碍的保护与调控。

关键词 四君子汤;衰老;蛋白质组学;方证关系

中图分类号:R285.5 **文献标识码**:A **文章编号**:1002 - 2392(2025)10 - 0016 - 06

DOI:10.19664/j.cnki.1002 - 2392.250203

进入 21 世纪后,随着人口老龄化程度的加剧,人口老龄化已成为全球性的议题。国内外学者对衰老也做了大量的研究,认为衰老不仅仅是指机体的生理功能随着年龄的增加而逐步下降,同时还伴随着代谢性疾病,如肌肉疏松、心血管病、脑血管病、帕金森病等[1],诸如上述这些老年性疾病都有其发病的风险。因此,延缓衰老的研究是保证老年人群健康、长寿的最好方法,同时也是保障老年人老而不衰的主要途径。

蛋白质组学具有多重特征,比如有复杂性、动态性、信息化等特征,这些特征恰好契合了中医学的整体观、辨证观等理念。蛋白质组学技术是一种精准发现疾病标志物的关键技术。该技术不但可以直观地显示疾病发生发展的分子机理、药物靶标等,而且还可以在一定程度上反映不同证候之间的蛋白质差异。在课题组前期研究的基础上[2-3],本研究采用蛋白质组学技术,研究补气方剂四君子汤对 3 月、6 月、12 月龄小鼠衰老状态的干预作用,寻找衰老相关差异蛋白及通路,为证候基础及方证关系研究提供科学依据。

1 材料

1.1 动物

50 只 SPF 级 3 月龄雄性 ICR 小鼠,购自辽宁长生生物技术有限公司,许可证号:SCXK(辽)2010 - 0001。小鼠在光照自然、空气质量良好、通风条件优越、整体环境安全舒适的饲养场所中进行饲养,温度保持在(22 ± 2)℃,湿度为 55% ± 20%,并且按时为小鼠提供食物和水。本实验所有操作均通过黑龙江中医药大学动物保护与利用委员会的审核(批号 20151201)。

收稿日期:2024 - 06 - 20 **修回日期**:2025 - 03 - 13

基金项目:国家自然科学基金项目(81473563)

作者简介:梁尔新(1990 -),女,博士,主治医师,研究方向:衰老相关病证及营养代谢性疾病。

* **通信作者**:赵炜明(1969 -),男,博士,教授,研究方向:肿瘤的分子生物学机制、分子诊断与靶向治疗。

1.2 试剂

十二烷基硫酸钠(SDS, L3771, Sigma - Aldrich 公司);尿素(Urea, NIST912B, Sigma - Aldrich 公司);过硫酸铵(AP, A7460, Sigma - Aldrich 公司);二硫苏糖醇(DTT, D9779, Sigma - Aldrich 公司);碘乙酰胺(IAA, I1149, Sigma - Aldrich 公司);过硫酸铵(APS, A7460, Sigma - Aldrich 公司);甘氨酸(Glycine, 62011516, 国药集团化学试剂有限公司);银染试剂盒(Silver Stain Plus Kit, 1610449, 伯乐生命医学产品有限公司)。

1.3 主要仪器

AL204 型电子分析天平(上海梅特勒托利多仪器有限公司);KDC - 160HR 型离心机(中国科大创新股份有限中佳分公司);QL - 861 型涡旋混合器(其林贝仪器制造有限公司);902 - ULTS 型超低温冰箱(赛默飞世尔科技有限公司);KDC - 160HR 型高速冷冻离心机(科大创新股份有限公司)。

1.4 药物

四君子汤:人参 9 g, 白术 9 g, 茯苓 9 g, 炙甘草 6 g, 共 33 g。以上药材购自黑龙江中医药大学国医堂, 经黑龙江中医药大学田明教授鉴定, 所有标准均符合 2015 年版《中华人民共和国药典》。

2 方法

2.1 实验动物分组及给药

选取 SPF 级 ICR 雄性小鼠 50 只, 空白组为 3 月龄小鼠(10 只), 剩余小鼠饲养至 6 月和 12 月龄, 随机分为模型组和四君子汤组, 每组 20 只。

四君子汤组每日对小鼠进行灌胃给药。根据种属之间等效计量折算表计算, 小鼠与人的系数比为 0.002 6, 得出每天给药 13 mL/kg(即四君子汤给药量 4.68 g/kg), 持续给药 30 d;3 月龄空白组、6 月和12 月龄模型组每日对小鼠实施剂量为 13 mL/kg 的生理盐水灌胃操作。

2.2 样品制备、蛋白识别和定量

第 30 天, 各组小鼠禁食。24 h 后, 采用将颈椎脱位法, 处死小鼠, 摘取小鼠肝组织作为分析样本, 用冰生理盐水冲洗, 直到颜色完全褪去, 用吸水纸吸干水分, 再将其切成 1 cm 左右的小块用液氮冷冻, 保存在 -80 ℃冰箱内。将肝组织样本应用蛋白滤膜辅助酶解方法实施酶解、iTRAQ 标记后进行肽段分级及 LC - MS/MS 分析。从 Orbitrap Elite 获得的 MS 图谱用 Maxqunt 软件进行了分析。

从分数上分析, MS^2 的 Maxqunt 分数更高。评分超过 30 分以上的肽段, 约占 95%。见图 1 ~ 图 4。

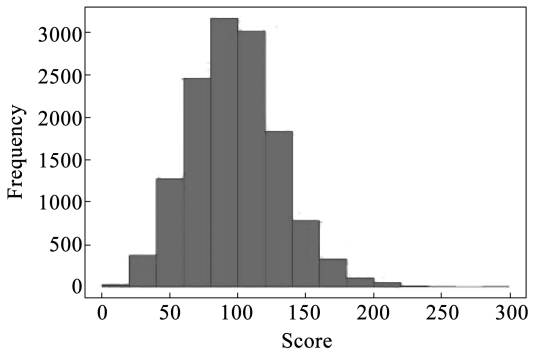

图 1 肽段离子得分分布

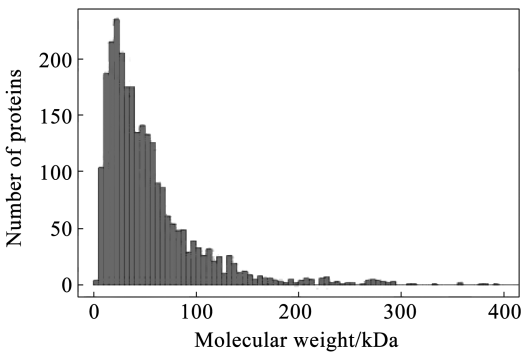

图 2 蛋白质相对分子质量分布的鉴定

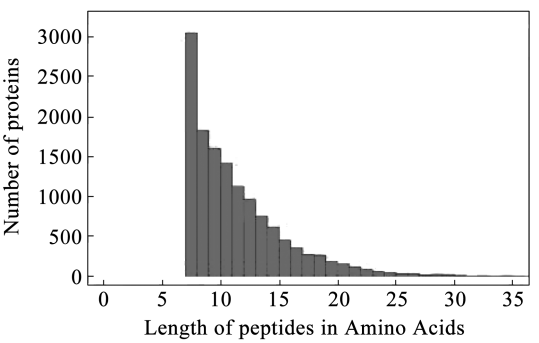

图 3 肽段序列覆盖分布

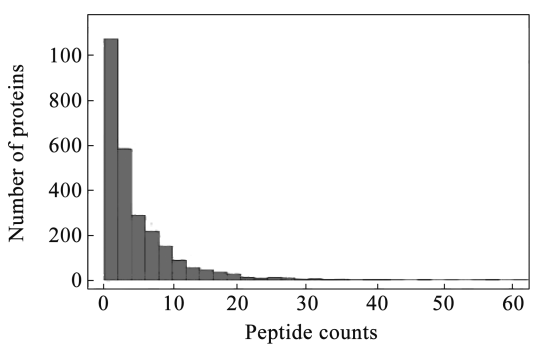

图 4 肽段数量分布的鉴定

3 结果

3.1 蛋白定量结果

结果表明, 蛋白质含量与色氨酸的含量成正线性相关关系, 因此可以通过测定蛋白质样品中的色氨酸含量计算蛋白质的浓度, 见图 5。

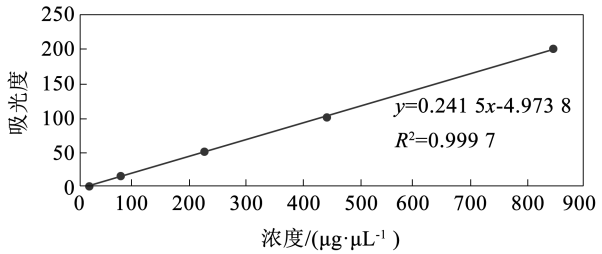

图 5 色氨酸定量标准曲线图

3.2 差异蛋白筛选

基于 iTRAQ 与 LC－MS/MS 技术，对模型组、空白组的标志物进行分析，以 sign. level ≥2 为筛选条件，空白组与 6 月龄模型组共鉴定出差异蛋白 734 个，其中上调 334 个，下调 400 个；空白组与 12 月龄模型组共鉴定出 639 个差异蛋白，其中上调 364 个，下调 275 个。见表 1。

表 1 衰老模型小鼠肝线粒体蛋白生物标志物信息表

编号	基因	基因 ID	sign. level	Trend
1	Saa4	20 211	4	↑
2	Rcc2	108 911	4	↑
3	Pigt	78 928	4	↑
4	Abcf3	27 406	4	↑
5	Mmaa	109 136	4	↑
6	Prkaa2	108 079	4	↑
7	Cd163	93 671	4	↑
8	Xrcc5	22 596	4	↑
9	Bag5	70 369	4	↑
10	Ddx58	230 073	4	↑
11	Srsf6	679 96	4	↑
12	Fcho2	218 503	4	↑
13	Slc22a27	171 405	4	↑
14	Pnp2	667 034	4	↑
15	Dpagt1	13 478	4	↑
16	Ptpn6	15 170	4	↑
17	Cox11	69 802	4	↑
18	F13b	14 060	4	↑
19	Uqcc3	107 197	4	↑
20	Bad	12 015	4	↑
21	Ceacam1	26 365	4	↑
22	Gbf1	96 979	4	↑
23	Aprt	11 821	4	↑
24	Gps1	209 318	4	↑
25	Col6a5	665 033	4	↑
26	Wasf2	242 687	4	↑

续表 1

编号	基因	GeneID	sign. level	Trend
27	Tmem2	83 921	4	↑
28	Akap1	11 640	4	↑
29	Wdfy1	69 368	4	↑
30	Sh3bgrl3	73 723	4	↑
31	Stard7	99 138	4	↑
32	Vav2	22 325	4	↑
33	Coq7	12 850	4	↑
34	Nt5e	23 959	4	↑
35	Proc	19 123	4	↑
36	Sumo2	170 930	4	↑
37	Ero1lb	67 475	4	↑
38	Cul2	71 745	4	↑
39	Tnpo1	238 799	4	↑
40	Scamp1	107 767	4	↑
41	Ago2	239 528	4	↑
42	Tmem141	51 875	4	↑
43	Tmem104	320 534	4	↓
44	Ccdc25	67 179	4	↓
45	Capn2	12 334	4	↓
46	Chmp1b1	67 064	4	↓
47	Ugt1a10	394 430	4	↓
48	Ube2z	268 470	4	↓
49	Dcaf11	28 199	4	↓
50	Arl6ip1	54 208	4	↓
51	Selenbp2	20 342	4	↓
52	B4galnt1	14 421	4	↓
53	Chmp1a	234 852	4	↓
54	Idnk	75 731	4	↓
55	Slco2b1	101 488	4	↓
56	Trim25	217 069	4	↓
57	H2afx	15 270	4	↓
58	Rps15	20 054	4	↓
59	Mup20	381 530	4	↓

注：↑ ↓分别代表模型组与空白组相比，该标志物的表达升高或降低。

3.3 Gene Ontology 分析

四君子汤对 6 月、12 月龄小鼠干预作用所得差异蛋白利用 GO 数据库进行功能富集分析，发现这些差异蛋白主要富集于以下功能类别：在生物过程方面，主要涉及细胞代谢过程和氧化还原过程；在细胞组分方面，主要集中在细胞部分和细胞内组分；在分子功能方面，则主要与水解酶活性和核苷酸结合等功能相关。

见表 2、图 6。

表 2　异表达蛋白 Gene Ontology 分析富集结果(前 5 位)

类别	编号	功能描述	数目	*P* 值
生物学途径	GO:0044237	细胞代谢过程	151	0.001
	GO:0044238	初级代谢过程	151	0.008
	GO:0006810	运输	77	0.000
	GO:0051234	建立本地化	77	0.000
	GO:0009058	生物合成过程	76	0.069
细胞成分	GO:0044464	细胞成分	322	0.080
	GO:0005622	细胞内	263	0.000
	GO:0044424	细胞内组分	259	0.000
	GO:0043229	细胞内细胞器	233	0.000
	GO:0043227	膜结合细胞器	196	0.000
分子功能	GO:0016787	水解酶活性	67	0.001
	GO:0000166	核苷酸结合	63	0.005
	GO:0016740	转移酶活性	49	0.019
	GO:0016491	氧化还原酶活性	44	0.000
	GO:0022857	跨膜转运蛋白活性	26	0.032

3.4　KEGG PATHWAY 分析

基于 KEGG 中的 PATHWAY 数据库,对经筛选得到的差异蛋白进行分析,最终确定以下生物途径:核糖体,氧化磷酸化,阿尔茨海默病,帕金森病,亨廷顿病。见表 3。

表 3　差异蛋白基因 KEGG 通路富集分析结果

序号	数据库编号	数据名称	差异蛋白个数	*P* 值
1	mmu03010	核糖体	18	0.000
2	mmu05010	阿尔茨海默病	13	0.009
3	mmu05016	亨廷顿病	12	0.023
4	mmu00190	氧化磷酸化	11	0.006
5	mmu05012	帕金森病	10	0.019

4　讨论

本研究立足中医补法延缓衰老理论,选用自然衰老动物模型,以四君子汤干预动物增龄不同阶段,探究“以方测证”的研究模式,解析证候的生物学基础。本实验通过蛋白质组学技术发现模型小鼠肝细胞线粒体中与增龄相关的生物标志物,经过四君子汤干预后回调了 193 个差异蛋白。实验结果表明,差异蛋白主要参与的生物过程包括氧化还原过程、细胞代谢过程等;所涉及的细胞组分主要集中在细胞成分、细胞内、细胞内组分等方面;参与的分子功能则主要包括水解酶活性和核苷酸结合等。通路富集分析显示,这些蛋白显著集中在核糖体、氧化磷酸化、阿尔茨海默病、帕金森病和亨廷顿病等相关通路。本部分着重对实验中所发现的衰老相关通路进行归纳和总结,以期阐述“方剂 – 自然衰老 – 生物学信息 – 证候”,解析方证相关性。

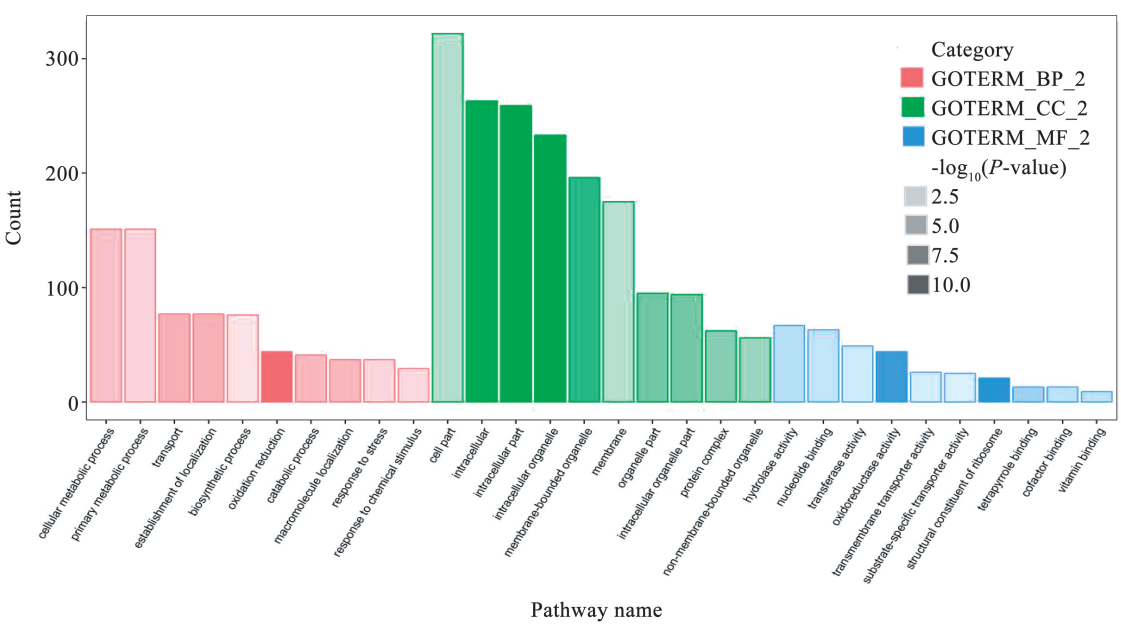

图 6　衰老相关差异蛋白的 GO 富集柱状图

4.1　阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)的调节

阿尔茨海默病是一种最常见的老年痴呆性疾病,早期症状主要表现为记忆力减退,然而就其发病机制而言,迄今还尚未完全明确[4]。淀粉样蛋白(APP)是阿尔茨海默病的关键性致病因子[5]。APP 是指位于 21 号染色体上的 APP 基因。它位于 21 号染色体长臂

中段,包含 18 个外显子及 17 个内含子,启动子区含有丰富的鸟嘌呤 - 胞嘧啶,但仅有少数胸腺嘧啶 - 腺嘌呤重复序列盒及胞嘧啶 - 腺嘌呤 - 胸腺嘧啶盒,相当于是一种管家基因。前期研究发现[6-7] APP 存在695 ~ 770 位氨基酸,其中包含 APP695, APP751, APP770。这类蛋白质主要分布于肝脏、心脏等器官,且呈时空特异性表达。经过 β - 和 γ - 分泌酶切割后,APP 可生成为A - β 淀粉样蛋白,对动物神经系统有很强的毒害性,会抑制动物神经细胞生长,甚至可引起神经细胞凋亡。已有研究显示[8-9],APP 主要存在于某些神经间质细胞中,通过与其上的死亡受体结合,启动凋亡通路,导致神经细胞凋亡。

4.2 亨廷顿病(Huntington's disease, HD)的调节

亨廷顿蛋白互作蛋白 1(Huntingtin - interacting protein 1 Hip1)是由 Hip1 基因编码所形成的一类蛋白质,其在细胞周期中的表达频率较高。在胞质分裂期间,Hip1 由纺锤极性的纺锤体分叉到有丝分裂期。在细胞分裂之前,它依附于细胞核,并黏附于其中的染色质[10]。在有丝分裂晚期,Hip1 从细胞核中脱出,并以小点的形式分布于内质网上[11]。

综上所述,四君子汤对延缓衰老有较好的疗效[12-16],此次研究着重采用蛋白组学技术,发现6 月、12 月龄模型组小鼠肝组织样本中蛋白质标志物与3 月龄空白组存在明显差异,通过调节阿尔茨海默病、亨廷顿病等信号通路的相关蛋白,进而对增龄产生的相关机体紊乱起到保护和调节作用,为衰老及老年疾病防治研究提供科学依据。

参考文献:

[1] CHOI S H, LEE R, NAM S M, et al. Ginseng gintonin, aging societies, and geriatric brain diseases[J]. Integr Med Res, 2021, 10(1): 100450.

[2] 西旺. 基于代谢/蛋白质组学研究补益气血剂对增龄小鼠影响及气血关系探析[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学,2020.

[3] 梁华,王燕,朱明雪,等. 基于方证相关探寻肾阳虚证物质基础的蛋白质组学研究[J]. 中华中医药学刊,2020,38(12):10 - 13,275.

[4] MCKHANN G M, KNOPMAN D S, CHERTKOW H, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging - Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease[J]. Alzheimers Dement, 2011, 7(3): 263 - 269.

[5] BUKHARI H, GLOTZBACH A, KOLBE K, et al. Small things matter: Implications of APP intracellular domain AICD nuclear signaling in the progression and pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. Prog Neurobiol, 2017, 156: 189 - 213.

[6] PONTE P, DEWHITT P G, SCHILLING J, et al. A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine proteinase inhibitors[J]. Nature, 1988, 331(6156): 525 - 527.

[7] O'BRIEN R J, WONG P C. Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease[J]. Annual Review of Neuroscience, 2011, 34(1): 185 - 204.

[8] NIKOLAEV A, MCLAUGHLIN T, O'LEARY D D, et al. APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases[J]. Nature, 2009, 457(7232): 981 - 989.

[9] SOTTHIBUNDHU A, SYKES A M, FOX B, et al. Beta - amyloid(1 - 42) induces neuronal death through the p75 neurotrophin receptor[J]. Journal of Neuroscience, 2008, 28(15): 3941 - 3946.

[10] HUREZ V, DAO V, LIU A J, et al. Chronic mTOR inhibition in mice with rapamycin alters T, B, myeloid, and innate lymphoid cells and gut flora and prolongs life of immune - deficient mice[J]. Aging Cell, 2015, 14(6): 945 - 956.

[11] MARTIN E J, KIM M, VELIER J, et al. Analysis of Huntingtin - associated protein 1 in mouse brain and immortalized striatal neurons[J]. J Comp Neurol, 1999, 403(4): 421 - 430.

[12] 西旺,闫起,郭慧,等. 基于代谢组学分析补益气血方剂对自然衰老小鼠的影响[J]. 中华中医药杂志,2019,34(5):2238 - 2243.

[13] 隋雨桐,李泽光,朱明雪,等. 四君子汤对自然衰老小鼠干预作用的代谢组学研究[J]. 中医药学报,2017,45(1):16 - 20.

[14] 高啸,张璇,葛晓真,等. 加味四君子汤通过 mTOR 信号通路延缓小鼠脾脏组织衰老[J]. 第二军医大学学报,2020,41(12):1410 - 1413.

[15] 梁华,王燕,李泽光. 基于网络药理学探析四君子汤抗衰老作用机制[J]. 辽宁中医药大学学报,2021,23(3):1 - 7,221.

[16] 沈莹,高啸,覃艳琼,等. 加味四君子汤通过 mTOR 信号通路延缓小鼠脑组织衰老的机制研究[J]. 华中科技大学学报(医学版),2018,47(4):417 - 420.

Study on the Effect of Sijunzi Decoction on Age - Related Changes in Mouse Liver Tissue Based on iTRAQ Proteomics Technology

LIANG Erxin[1], LI Qiwei[1], LIANG Hua[1], YAN Qi[2], LI Zeguang[2], ZHAO Weiming[1]

(1. *Heilongjiang University of Chinese Medicine*, *Harbin* 150040, *China*;

2. *The First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine*, *Harbin* 150040, *China*)

Abstract Objective: This experiment employed iTRAQ proteomics technology to investigate age - related changes in mouse liver mitochondria using 3 - , 6 - , and 12 - month - old mice as experimental subjects. By comparing protein

expression patterns in liver mitochondria among these age groups, we aimed to identify protein biomarkers closely associated with aging and examine the effects of Sijunzi Decoction on these biomarkers. The study sought to elucidate the molecular mechanisms of aging and the biological basis of Sijunzi Decoction's intervention in age – related syndromes from a proteomics perspective, thereby providing scientific evidence for formula – syndrome research. Methods: Fifty naturally aging mice of different ages were selected as experimental subjects, including ten 3 – month – old mice and forty mice that naturally aged to 6 and 12 months through feeding. The mice were divided into groups according to experimental requirements: the 3 – month – old mice served as the blank group, while the 6 – and 12 – month – old mice were randomly divided into two groups – the model group (20 mice) and the Sijunzi Decoction group (20 mice). During the experiment, the Sijunzi Decoction group received intragastric administration at a dose of 9.75 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$, while the blank and model groups received an equal volume of saline. On day 30 of the experiment, mouse livers were extracted and stored at −80 ℃ for subsequent analysis. Proteomics analysis methods were employed to examine the liver samples. Results: Comparative analysis identified 734 differentially expressed proteins between the blank group and 6 – month model group, and 639 differentially expressed proteins between the blank group and 12 – month model group. The Sijunzi Decoction treatment induced beneficial regulation of 515 characteristic proteins in the 6 – month model group and 389 characteristic proteins in the 12 – month model group. Intersection analysis revealed 193 differentially expressed proteins that were regulated by Sijunzi Decoction in both age groups. Conclusion: The proteomics study demonstrated that Sijunzi Decoction significantly regulates the PPAR signaling pathway and Huntington's disease – related proteins in 6 – month – old mouse liver tissue, while showing regulatory effects on Alzheimer's disease and Parkinson's disease pathways in 12 – month – old mouse liver tissue. Sijunzi Decoction may exert its protective and regulatory effects on age – related physiological dysfunction by modulating key proteins in these signaling pathways.

Key words Sijunzi Decoction; Aging; Proteomics; Formula – syndrome relationship