

DOI 10.19656/j.cnki.1002-2406.20230802

基于蛋白质组学技术探讨榆杞止血颗粒 治疗异常子宫出血大鼠的作用机制

张晓川, 娄素卉, 聂安政, 李晓萍[✉]

(郑州大学第一附属医院, 河南 郑州 450000)

【摘要】目的:使用蛋白质组学技术研究榆杞止血颗粒对异常子宫出血大鼠蛋白表达的影响,探究其作用机制。方法:除对照组外通过药物致早孕大鼠流产的方法建立实验模型,30只SPF级Wistar妊娠雌鼠随机分为模型组、给药组和对照组,每组10只。给药组连续给予榆杞止血颗粒7d,于第1、2、3、7天检测各组大鼠出血量。采用定量蛋白质组学分析榆杞止血颗粒对大鼠血清中蛋白表达差异的影响,并分析差异蛋白参与的信号通路。针对筛选出的差异蛋白和信号通路,利用平行反应监测技术进行验证。结果:模型组大鼠从第1天开始子宫出血量较对照组显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,给药组大鼠从第1天开始子宫出血量显著减少($P < 0.01$)。共定量得到5496个蛋白质。给药组与模型组之间有84个差异蛋白(上调28个,下调56个)。差异蛋白主要富集于PI3K/Akt信号通路、补体和凝血级联、血小板激活等信号通路。选择玻连蛋白、纤溶酶原、丝氨酸蛋白酶抑制剂D1素辅因子II等进行PRM验证,验证结果与TMT结果一致。结论:榆杞止血颗粒能够通过调节玻连蛋白、纤溶酶原等蛋白的表达水平,实现对异常子宫出血大鼠的治疗作用。

【关键词】榆杞止血颗粒;蛋白质组学;异常子宫出血;平行反应监测

【引用格式】

张晓川, 娄素卉, 聂安政, 等. 基于蛋白质组学技术探讨榆杞止血颗粒治疗异常子宫出血大鼠的作用机制[J]. 中医药信息, 2023, 40(8): 9-14, 22.

ZHANG X C, LOU S H, NIE A Z, et al. Action mechanism of Yuzhi Zhixue Granule in treating rats with AUB based on proteomics technology[J]. Information on TCM, 2023, 40(8): 9-14, 22.

异常子宫出血(abnormal uterine bleeding, AUB)是妇科临床常见的症状,指月经的频率、规律性、经期长度和出血量与正常月经周期不符、并源自子宫腔的出血,其中约50%是排卵障碍性AUB(简称AUB-O)^[1-3]。AUB-O可导致贫血、子宫内膜病变、不孕等妇科疾病,其发病率高,严重影响妇女的身心健康及生活质量^[4-6]。中医药在治疗AUB-O方面有其独特的优势,榆杞止血颗粒由地榆炭、墨旱莲、炒栀子、绵马贯众、仙鹤草等17味中药配伍而成,具有清热、凉血、止血的功效,临床上多用于治疗AUB-O所致的月经量多的患

者^[7],效果显著,但其作用机制尚不明确。

蛋白质组学是以蛋白质组为研究对象,采用多种技术探索疾病相关的特异性蛋白标志物,监测特定蛋白的表达变化,对疾病机制研究和药物治疗靶点的研究具有重要作用^[8-9]。目前定量蛋白质组学技术主要分为标记策略和非标记的定量策略,其中标记策略又分体内标记(如SILAC、15N标记)和体外标记(如iTRAQ、TMT标记)。串联质谱标签(tandem mass tag, TMT)是由Thermo Scientific针对TOF/MS开发的蛋白质组分析技术,可用于标记多组样本并进行相对定量,提高了检测

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(LHGJ20190224);郑州大学第一附属医院横向课题(K2020-0003)

第一作者简介:张晓川(1990-),男,主管药师,主要研究方向:临床中药学。

✉通信作者简介:李晓萍(1963-),女,主任药师,主要研究方向:医院药学管理。

速度。而平行反应监测(parallel reaction monitoring, PRM)是一种靶向蛋白质组学技术,具有高灵敏度、高分辨率的特性,可作为后期差异蛋白质验证的手段^[10-11]。

以往榆杞止血颗粒的研究多针对疗效,对止血机制的研究较少^[12-13]。本研究采用TMT技术对榆杞止血颗粒治疗异常子宫出血大鼠的血清进行蛋白质组学定量分析,筛选差异蛋白质,结合生物信息学进行分析,并利用PRM技术对筛选出的差异蛋白质进行验证,在一定程度上揭示了榆杞止血颗粒的作用机制,为临床合理用药提供了理论依据。

1 材料

1.1 动物

7周龄SPF级Wistar雌鼠40只,10周龄以上SPF级Wistar雄鼠20只[北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证号:SCXK(京)2016-0006]。动物饲养环境:自由饮水,温度24~28℃,湿度30%~65%,每日光照12h。

1.2 药物与试剂

榆杞止血颗粒[成分:地榆炭、墨旱莲、炒栀子、绵马贯众、仙鹤草、炒槐花、拳参、大蓟、侧柏叶(炒)、棕榈炭、牡丹皮、茜草、蒲黄炭、生地黄、白芍、黄芩和当归,山东鲁南制药股份有限公司(批号:1471908001)];米非司酮(货号:10412,北京凯瑞基生物科技有限公司);米索前列醇片(货号:RK170327,深圳市洛克生化科技有限公司)。

TMT标记试剂盒(美国赛默飞公司);胰蛋白酶(美国Promega公司),BCA试剂盒(碧云天生物技术有限公司);二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺(IAA)、Tris、SDS(美国Sigma-Aldrich公司);C18固相萃取柱(美国Waters公司)。

1.3 仪器

NanoDrop One/OneC紫外分光光度计、PICO17离心机、EASY-nLC 1200系统高效液相色谱仪、Q Exactive HF质谱系统(美国Thermo Scientific公司)。

2 方法

2.1 分组

SPF级Wistar雌鼠40只,SPF级Wistar雄鼠20只,适应性饲养7d后,按照2:1将雌性与雄性大鼠放在一起饲养,次日清晨检查雌性大鼠阴栓,有阴栓即为大鼠妊娠第1天,随机选择30只妊娠大鼠分为对照组、模型组和给药组,每组10只。

2.2 造模及给药

除对照组外,其余大鼠在妊娠第7天上午9点和下午17点分别灌胃米非司酮(12.4 mg/kg)与米索前列

醇(130 μg/kg),将棉球(85~100 mg)填入阴道内,次日检查棉球是否有血渍检查建模是否成功。建模成功第1天(妊娠第8天),给药组按4.5 g/kg分2次灌胃榆杞止血颗粒(分别为9:00和17:00),连续给药7d,模型组 and 对照组灌服等量生理盐水。每天9:00和17:00用新棉球置换大鼠阴道中的棉球,并密封冷藏保存。灌胃结束后,所有大鼠禁食不禁水12h,用10%水合氯醛麻醉后腹主动脉取血4 mL,分离血清,备用。

2.3 子宫出血量的测定

参考文献[14],用血红蛋白吸管,大鼠尾静脉采血0.02 mL,加入4 mL(V_1)50 g/L的NaOH溶液混匀备用。分别收集第1、2、3、7天大鼠子宫出血的棉球,放入烧杯中,取适量NaOH溶液浸泡洗涤棉球上吸收的血液。此过程重复3次,直至洗出的溶液无色,记录NaOH总体积(V_2),取4 mL过滤备用。在546 nm波长下分别测定上述溶液吸光度值 A_1 、 A_2 ,根据公式计算子宫出血量。

$$\text{子宫出血量(mL)} = 0.02 \times A_2 \times V_2 / (A_1 \times V_1)$$

2.4 血清蛋白质组学分析

2.4.1 样品处理

各组血清样品经预实验后每组随机选取3例进行实验,保证3个生物学重复。向所有样品加入裂解液(1.5% SDS/100 mmol/L Tris-Cl, pH值8.0),充分混合均匀,进行组织匀浆和沸水浴后,在冰水浴中超声10 min,12 000 r/min离心15 min,取上清置于EP管。采用丙酮沉淀法对溶液中的蛋白进行沉淀,向得到的蛋白沉淀中加入复溶液(8 mmol/L Urea/100 mmol/L Tris-Cl, pH值8.0)复溶后,加入二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)至终浓度为10 mmol/L,37℃孵育1h进行还原反应;之后加入碘乙酰胺(iodoacetamide, IAA)至终浓度为40 mmol/L,室温避光进行烷基化反应。

采用Bradford法测定蛋白浓度。蛋白质定量后取50 μg样本用于SDS-PAGE检测,考马斯亮蓝染色后观察蛋白条带。向还原、烷基化后的样品中加入100 mmol/L Tris-HCl溶液(pH值8.0),将Urea浓度稀释至2 mol/L以下,按照酶与蛋白1:50的质量比加入胰蛋白酶,37℃孵育过夜。蛋白酶解液经C18固相萃取柱脱盐,除盐后经真空离心浓缩仪抽干后,-20℃冻存待用。

取等量的样品进行TMT标记,标记操作过程按照TMT生产厂家说明书进行。标记后的样品等量混合后,使用C18固相萃取柱除盐。真空抽干后,利用high pH反向色谱分离法对混合样品进行分级分离,最终合并为15个组分,经真空冷冻干燥后备用。

2.4.2 仪器参数

样品通过纳升流速的液相 EASY-nLC 1200 系统进行分离。流动相 A 为 0.1% 甲酸,流动相 B 为 0.1% 甲酸和 90% 乙腈。梯度洗脱条件:0~42 min,6%~25%B;42~53 min,25%~45%B;53~53.5 min,45%~80%B;53.5~60 min,80%B,流速为 300 nL/min。质谱 DDA 模式分析时,每个扫描循环中包含一个 MS 全扫描($R = 60\text{ K}$, $\text{AGC} = \text{standard}$, $\text{max IT} = 25\text{ ms}$, $\text{scan range} = 350 \sim 1\,500\text{ m/z}$),以及随后的若干个 MS/MS 扫描($R = 15\text{ K}$, $\text{AGC} = \text{standard}$, $\text{max IT} = 22\text{ ms}$),采用 TurboTMT 模式, cycle time 设为 2 s。HCD 碰撞能量设置为 36。母离子的隔离窗口设置为 1.2 Da。离子重复采集的动态排除时间设置为 35 s。

2.4.3 数据分析

质谱数据通过 MaxQuant(V1.6.6)软件进行检索, Uniprot 数据库中 Rat 的蛋白质组为参考。通过 eggNOG-mapper 软件的 Diamond 程序,得到蛋白序列对应的 GO 条目和 KEGG 通路。

2.4.4 PRM 验证

蛋白提取、定量和肽段酶解方法同“2.4.1”,质谱

PRM 模式分析时,每个扫描循环中包含一个 MS 全扫描($R = 60\text{ K}$, $\text{AGC} = 3\text{e}6$, $\text{max IT} = 50\text{ ms}$, $\text{scan range} = 350 \sim 1\,500\text{ m/z}$),以及若干个针对选定肽段的 PRM MS2 扫描($R = 15\text{ K}$, $\text{AGC} = 2\text{e}5$, $\text{max IT} = 100\text{ ms}$)。HCD 碰撞能量设置为 30。四级杆的筛选窗口设置为 1.2 Da。质谱数据通过 Maxquant 软件进行数据库检索。PRM 方法建立和蛋白定量使用 Skyline 软件进行,得到目标蛋白及肽段的定量信息。

2.5 统计学方法

所有数据均采用 SPSS 20.0 统计软件分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 子宫出血量

与对照组比较,模型组大鼠子宫出血量明显增多($P < 0.01$);与模型组比较,除第 7 天外,给药组从第 1 天开始大鼠子宫出血量明显减少($P < 0.01$),第 7 天模型组出血量较给药组稍低,但不具有显著性差异,可能是由于前期出血量过大导致的。见表 1。

表 1 各组大鼠子宫出血量比较($\bar{x} \pm s$, mL)

组别	<i>n</i>	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 7 天
对照组	6	0.043 7 ± 0.010 8	0.048 4 ± 0.015 1	0.051 2 ± 0.013 0	0.040 6 ± 0.004 2
模型组	6	0.474 0 ± 0.116 4**	0.428 2 ± 0.097 9**	0.399 7 ± 0.090 8**	0.101 1 ± 0.021 4**
给药组	6	0.281 6 ± 0.080 4##	0.188 0 ± 0.016 7##	0.211 2 ± 0.040 6##	0.143 6 ± 0.056 1

注:与对照组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,## $P < 0.01$ 。

3.2 蛋白质组学分析

3.2.1 差异蛋白

对样品进行质谱检测,共鉴定到 5 647 个蛋白,其中 5 496 个蛋白具有定量信息。以模型组为对照,比值 ratio > 1.2 或 < 1/1.2, $P < 0.05$ 作为差异蛋白筛选标准,给药组共筛选出差异蛋白 84 个,其中包含 28 个上调蛋白和 56 个下调蛋白,部分蛋白见表 2。给药组相对于模型组的火山图见图 1,蓝色点表示显著性差异表达下调蛋白,红色点表示显著性差异表达上调蛋白。

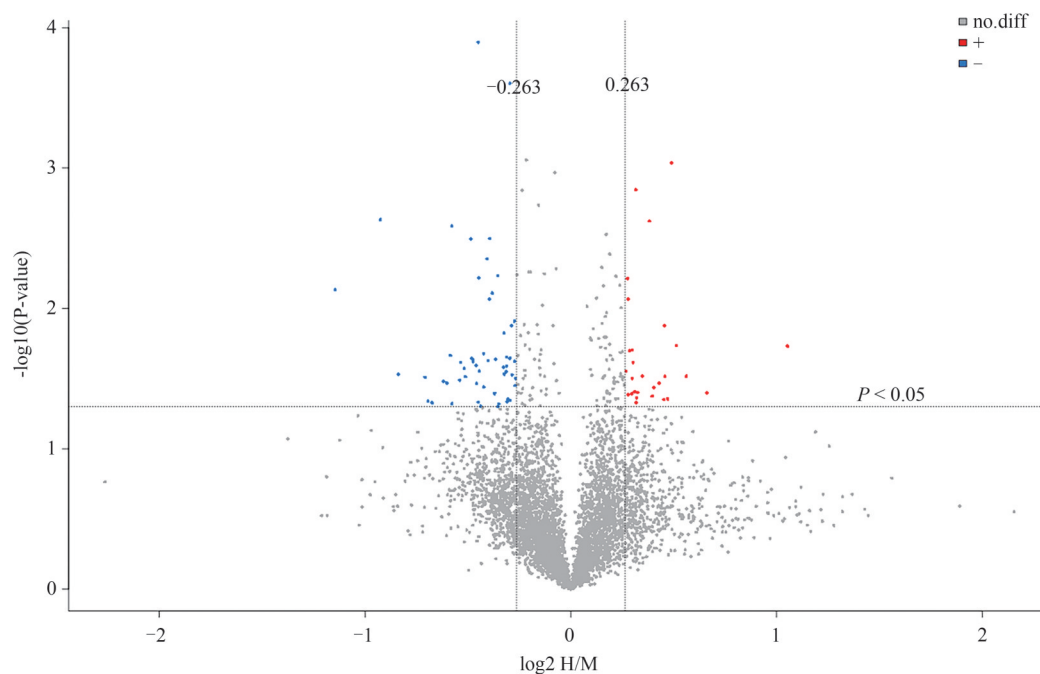
3.2.2 差异蛋白的 GO 富集分析

利用软件对差异蛋白进行 GO 分析,包括生物过程、分子功能和细胞组分 3 个方面,结果见图 2。结果显示,生物过程主要富集于 response to stimulus(对刺激的反应)、multicellular organismal process(多细胞生物过程)、immune system process(免疫系统过程)、multi-organism process(多生物过程)、interspecies interaction between organisms(生物之间的种间相互作用);分子功能富集于 molecular transducer activity(分子换能器活性);细胞组分

富集于 other organism part(其他生物部分)。

表 2 差异蛋白统计表

ID	基因	差异倍数	趋势
D3ZL10	Col6a6	0.45	下调
G3V6X1	Fbln2	0.53	
F7EPF5	Prf1	0.56	
F1MAN2	Tpvc6	0.61	
A0A0G2JW12	LOC103689965	0.62	
A0A0G2JXD5	Chn2	0.63	
Q4V8H9	Ifit2	0.65	
Q3KR94	Vtn	0.72	
F1M957	Vwf	0.75	
B2GVB9	Fermt3	0.83	
Q66HG4	Galm	1.35	上调
A0A0G2K1W0	Nr2f2	1.37	
P08010	Gstm2	1.37	
D3ZE04	Col7a1	1.37	
P04905	Gstm1	1.39	
P08289	Alpl	1.40	
P08009	Gstm3	1.43	
P06757	Adh1	1.47	
D3ZJ08	Hist2h3c2	1.58	
P15978	RT1-Aw2	2.07	



注:H为给药组;M为模型组。

图1 H/M组差异蛋白火山图

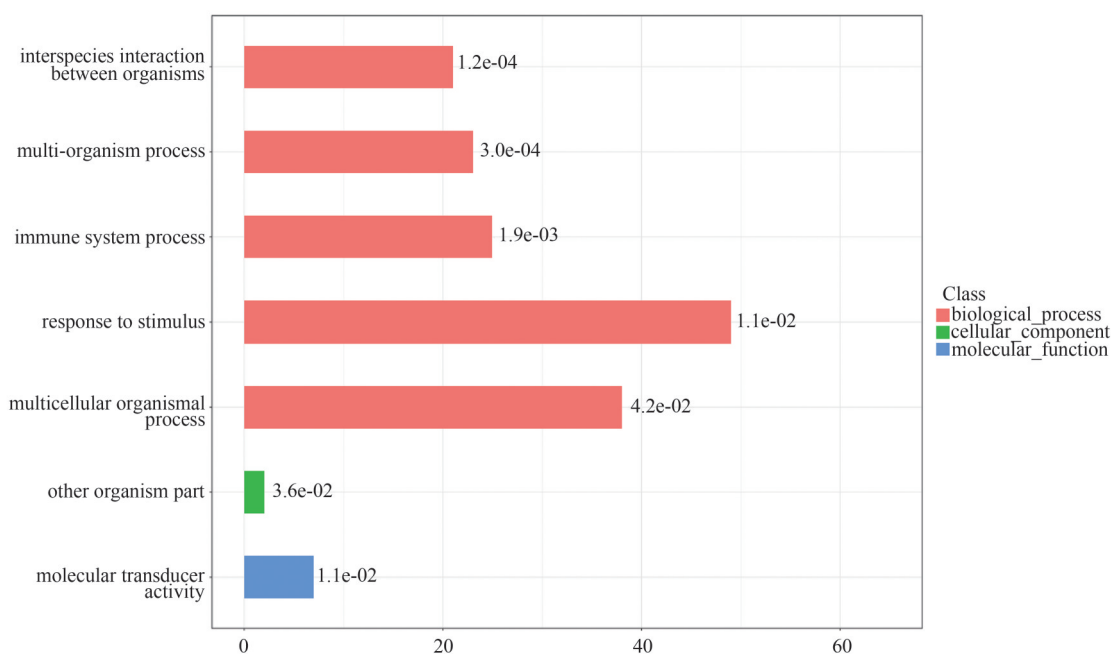


图2 差异蛋白GO富集分析

3.2.3 差异蛋白的KEGG富集分析

KEGG富集分析发现,给药组涉及的信号通路有Drug metabolism – cytochrome P450(药物代谢 – 细胞色素p450)、Glutathione metabolism(谷胱甘肽代谢)、PI3K/Akt signaling pathway(PI3K/Akt信号通路)、Complement and coagulation cascades(补体和凝血级联)、Platelet activation(血小板激活)等,见图3。

3.2.4 PRM验证

通路分析发现,PI3K/Akt信号通路、补体和凝血级

联、血小板激活可能参与了止血的作用机制,因此笔者从3条通路中的差异蛋白筛选出5个Vtn(玻连蛋白)、LOC103689965、Fermt3、Plg(纤溶酶原)、Serpina1(丝氨酸蛋白酶抑制剂D1)进行PRM靶向蛋白质组学验证,验证结果与TMT结果进行比较,见表3。可以看出PRM验证结果与TMT相对定量结果趋势比较一致。其中Plg和Serpina1结果有一定误差,说明使用TMT定量方法筛选的差异蛋白质有必要经过验证加以确认。

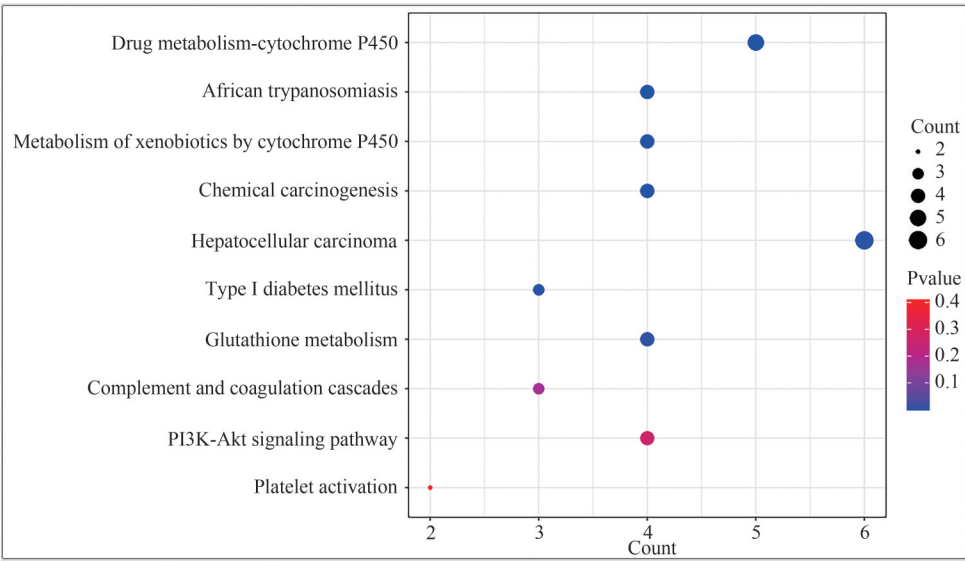


图3 差异蛋白KEGG富集分析

表3 TMT和PRM验证结果比较

ID	基因名称	FC	
		TMT	PRM
Q3KR94	Vtn	0.72	0.71
A0A0G2JW12	LOC103689965	0.62	0.67
B2GV9	Fermt3	0.83	0.57
Q01177	Plg	1.11	0.66
Q64268	Serpin D1	1.10	0.70

注:FC > 1 表示上调,FC < 1 表示下调。

4 讨论

AUB-O是由于女性下丘脑-垂体-卵巢轴调节功能异常,引起排卵障碍,进而导致的异常子宫出血。现代医学认为AUB-O与生殖内分泌功能和子宫内膜激素受体的表达有关,病理机制较为复杂,尚未完全清楚^[15]。榆杞止血颗粒是治疗AUB-O的常用药,具有清热、凉血、止血的作用。本研究结果显示,榆杞止血颗粒能够显著减少子宫异常出血模型大鼠的出血量。支运霞等^[4]研究发现,榆杞止血颗粒不仅可以缓解大鼠子宫内膜固有层间质增生及炎症细胞浸润等病理损伤,并且能呈剂量依赖性降低大鼠子宫出血量,提高凝血功能,升高激素水平。

TMT标记定量蛋白质组学共鉴定并定量得到5496个差异蛋白,给药组相对于模型组共筛选出差异蛋白84个,包括Vtn、Fermt3、Vwf、LOC103689965等。Vtn又称血清扩散因子、纤溶酶原激活物抑制剂-1结合蛋白,在人体外周血管系统的浓度大约200~400 μg/mL。一方面Vtn分子可以通过与肝素的相互作用来调节与血液系统相关的蛋白酶级联反应,例如凝血和纤维蛋白溶解^[16]。另一方面,Vtn通过与纤维蛋白竞争结合整合素αIIbβ3表现出抗凝效应^[17]。本

研究发现给药组通过下调异常子宫出血模型大鼠的Vtn蛋白从而起到止血的作用。Vtn不仅参与了PI3K/Akt通路,而且也参与补体及凝血级联通路。池晓蓉等^[18]利用蛋白免疫印迹法检测相关蛋白,发现榆杞止血颗粒可能通过调节PI3K/Akt通路从而发挥止血作用,与本文研究结果一致。

凝血系统作为机体免疫应答的重要组成部分发挥功能,生物普遍存在的补体和凝血级联系统维持天然免疫的激活^[19]。补体系统是先天免疫的组成部分,与止血通路的组成部分有许多相互作用,有助于维持生理平衡^[20]。补体系统也与凝血和纤溶密切相关^[21-23]。差异蛋白Plg和Serpin D1同样也参与了补体及凝血级联通路。丝氨酸蛋白酶抑制剂D1以其典型的凝血酶抑制机制在抗凝系统中起至关重要的作用^[24],可特异性地抑制凝血酶的活性而不影响其他凝血或抗凝因子的活性^[25]。纤溶酶原是纤溶酶的酶原形式,它会降解纤维蛋白,在纤溶系统中起关键作用^[26]。纤溶系统在血栓和止血、伤口愈合中扮演重要角色。若血液当中的纤溶酶过多,则会有出血的危险。研究结果表明,榆杞止血颗粒能够下调Serpin D1和纤溶酶原蛋白的表达而发挥止血作用。

Fermt3也被称为kinlin-3(KIND3),是一种由Fermt3基因编码的蛋白质,它参与整合素激活,在细胞黏附、迁移、分化和增殖中起作用^[27-28]。Fermt3基因突变会引起整合素粘连缺乏症,从而导致出血障碍及其他疾病^[28-30]。Fermt3在整合素内外活化中起着至关重要的作用,而整合素内外活化是血小板聚集、白细胞黏附和渗出所必需的机制^[31]。Fermt3蛋白在止血和血栓形成的调节中起着关键作用。KEGG通路富集分析发

现Fermt3富集于血小板激活通路。众所周知,血小板在止血、伤口愈合、血栓形成等生理和病理过程中有重要作用。榆枢止血颗粒很可能通过调节Fermt3蛋白,激发血小板的生理活性,从而达到止血的作用。

综上所述,本研究利用TMT定量蛋白质组学结合PRM靶向验证技术,对榆枢止血颗粒治疗异常子宫出血大鼠血清进行研究,筛选出了与止血作用相关的3条通路,并对通路中的5个差异蛋白进行验证,验证结果与TMT定量结果一致,为阐明榆枢止血颗粒的作用机制提供了理论依据。

【参考文献】

- [1] 中华医学会妇产科学分会妇科内分泌学组. 排卵障碍性异常子宫出血诊治指南[J]. 中华妇产科杂志, 2018, 53(12): 801–807.
- [2] MICHELLE M L. Abnormal uterine bleeding in reproductive – aged women[J]. Obstet Gynecol Clin North Am, 2015, 42(1): 103–115.
- [3] 景晓昭, 杜惠兰. 排卵障碍性异常子宫出血中医证候研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2021, 30(14): 1591–1596.
- [4] 支运霞, 张丽娟, 徐善荣, 等. 榆枢止血颗粒治疗子宫出血的HIF-1 α /miR-210轴机制研究[J]. 安徽中医药大学学报, 2021, 40(5): 83–88.
- [5] BENDER R A. Medroxyprogesterone acetate for abnormal uterine bleeding due to ovulatory dysfunction: the effect of 2 different – duration regimens[J]. Med Sci Monit, 2022, 28: e936727.
- [6] SOONTRAPA N, RATTANACHAIYANONT M, WARNNISSORN M, et al. The effectiveness of desogestrel for endometrial protection in women with abnormal uterine bleeding – ovulatory dysfunction: a non – inferiority randomized controlled trial [J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 1662.
- [7] 杨春惠, 侯顺玉, 邱伍英. 榆枢止血颗粒对子宫内膜异位症大鼠PI3K/Akt信号通路及异位内膜体积的影响[J]. 世界中医药, 2021, 16(3): 437–442.
- [8] 宋如铮, 彭英, 王广基, 等. 定量蛋白质组学常用研究技术及其在肝源性疾病发病机制中的应用进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2021, 26(5): 570–578.
- [9] 汤冀强. 基于TMT标记联合液相色谱 – 串联质谱技术关于强直性脊柱炎的血清蛋白质组学研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2018: 59–60.
- [10] 王素兰, 高华萍, 张菁, 等. 基于稳定同位素标记和平行反应监测的蛋白质组学定量技术用于肝癌生物标志物的筛选和验证[J]. 色谱, 2017, 35(9): 934–940.
- [11] 覃珂, 刘丹宁, 周希媛. 基于TMT和PRM技术的湿性年龄相关性黄斑变性泪液蛋白质组学研究[J]. 第三军医大学学报, 2021, 43(6): 473–480.
- [12] 冯媛, 丁丽, 杜国丽. 榆枢止血颗粒联合富马酸亚铁治疗月经量过多所致贫血的疗效观察[J]. 药物评价研究, 2021, 44(2): 362–365.
- [13] 姜艳玲, 丁丽, 李发余, 等. 榆枢止血颗粒减轻宫腔粘连大鼠子宫内纤维化[J]. 基础医学与临床, 2022, 42(8): 1220–1224.
- [14] 尹艳艳, 明亮, 李前进, 等. 妇科止血颗粒对早孕大鼠子宫出血的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2003, 38(2): 120–122.
- [15] 周琳琳. 功能失调性子宫出血发病机制和治疗进展[J]. 临床医药文献电子杂志, 2020, 7(8): 197.
- [16] 武晓桐. 血浆玻连蛋白在脓毒症器官功能障碍中的作用及其机制[D]. 开封: 河南大学, 2021: 11–42.
- [17] REHEMAN A, GROSS P, YANG H, et al. Vitronectin stabilizes thrombi and vessel occlusion but plays a dual role in platelet aggregation[J]. J Thromb Haemost, 2005, 3(5): 875–883.
- [18] 池晓蓉, 陈德招, 王赵伟, 等. 榆枢止血颗粒调控PI3K – Akt通路对子宫出血大鼠的保护作用[J]. 西部医学, 2021, 33(10): 1451–1456.
- [19] 冯丽娜, 黎明全, 任吉祥. 基于补体及凝血级联通路及PI3K – AKT信号通路探究抵挡汤对急性出血性脑卒中大鼠蛋白组学的影响[J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(14): 3049–3057.
- [20] KERAGALA C B, DRAXLER D F, MCQUILTEN Z K, et al. Haemostasis and innate immunity – a complementary relationship: A review of the intricate relationship between coagulation and complement pathways[J]. Br J Haematol, 2018, 180(6): 782–798.
- [21] AMARA U, FLIERL M A, RITTIRSCH D, et al. Molecular intercommunication between the complement and coagulation systems[J]. J Immunol, 2010, 185(9): 5628–5636.
- [22] FOLEY J H. Examining coagulation – complement crosstalk: complement activation and thrombosis[J]. Thromb Res, 2016, 141: S50–S54.
- [23] FOLEY J H, WALTON B L, ALEMAN M M, et al. Complement activation in arterial and venous thrombosis is mediated by plasmin[J]. EBioMedicine, 2016, 5: 175–182.
- [24] GETTINS P G. Serpin structure, mechanism, and function[J]. Chem Rev, 2002, 102(12): 4751–4804.
- [25] LIN W Y, ZHU R, ZHANG Z, et al. RNAi targeting heparin cofactor II promotes hemostasis in hemophilia A [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2021, 24: 658–668.
- [26] OKAFOR O N, GOROG D A. Endogenous fibrinolysis: an important mediator of thrombus formation and cardiovascular risk [J]. J Am Coll Cardiol, 2015, 65(16): 1683–1699.
- [27] YAHYA A M, ALMULLA A A, ALRUFAYE H J, et al. Case report: a case of leukocyte adhesion deficiency, type III presenting with impaired platelet function, lymphocytosis and granulocytosis [J]. Front Pediatr, 2021, 9: 713921.
- [28] BU W, LEVITSKAYA Z, TAN S M, et al. Emerging evidence for kindlin oligomerization and its role in regulating kindlin function[J]. J Cell Sci, 2021, 134(8): jcs256115.
- [29] KERR B A, SHI L, JINNAH A H, et al. Kindlin – 3 mutation in mesenchymal stem cells results in enhanced chondrogenesis[J]. Exp Cell Res, 2021, 399(2): 112456.
- [30] NURDEN P, STRITT S, FAVIER R, et al. Inherited platelet diseases with normal platelet count: phenotypes, genotypes and diagnostic strategy[J]. Haematologica, 2021, 106(2): 337–350.
- [31] SCHMIDT S, NAKCHBANDI I, RUPPERT R, et al. Kindlin – 3 – mediated signaling from multiple integrin classes is required for osteoclast – mediated bone resorption[J]. J Cell Biol, 2011, 192(5): 883–897.

(收稿日期: 2023 – 01 – 17)

(下转第22页)

and edema state, there was inflammatory cell infiltration, and the tight junction between cells was broken in the model group. After the intervention of Tongxie Yaofang, the pathological changes of rat colonic mucosa were significantly improved and the tight junction between cells was normal. Compared with those in the blank group, the serum contents of COX-2 and iNOS increased significantly ($P < 0.01$), and the mRNA and protein expressions of Claudin-1 and ZO-1, as well as the average optical density decreased significantly in the model group ($P < 0.01$). Compared with those in the model group, the contents of COX-2 and iNOS decreased in the Mesalazine group ($P < 0.01$); the contents of COX-2 and iNOS significantly decreased in the Tongxie Yaofang groups of high-dose and medium-dose ($P < 0.01$), and the contents of COX-2 and iNOS decreased in the low-dose group as well ($P < 0.05$). Compared with those in the model group, the mRNA expressions of Claudin-1 and ZO-1, as well as the average optical density increased significantly in the Mesalazine group and the Tongxie Yaofang groups of high-dose and medium-dose ($P < 0.01$); there were no statistical differences in the mRNA expressions of Claudin-1 and ZO-1 between the model group and the Tongxie Yaofang group of low-dose ($P > 0.05$); the average optical density increased in the Tongxie Yaofang group of low-dose ($P < 0.05$). The protein expressions of Claudin-1 and ZO-1 increased significantly in the Mesalazine group and the Tongxie Yaofang groups of high-dose and medium-dose ($P < 0.01$), and the protein expressions of Claudin-1 and ZO-1 increased in the Tongxie Yaofang group of low-dose ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Conclusion: The mechanism of Tongxie Yaofang in treating UC of Liver depression and Spleen deficiency may be related to up-regulating the expression of key proteins of Claudin-1 and ZO-1 and reducing the contents of inflammatory cytokines of COX-2 and iNOS.

【Key words】 Tongxie Yaofang; Ulcerative colitis; Claudin-1; ZO-1; COX-2; iNOS

(上接第14页)

Action Mechanism of Yuzhi Zhixue Granule in Treating Rats with AUB Based on Proteomics Technology

ZHANG Xiaochuan, LOU Suhui, NIE Anzheng, LI Xiaoping✉

(The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China)

【Abstract】 Objective: To study the effect of Yuzhi Zhixue Granule (YZZXG) on protein expressions in rats with abnormal uterine bleeding (AUB), and to explore its mechanism in treating AUB. Methods: 30 SPF Wistar female pregnant rats were randomly divided into the control group, the model group and the medication group, with 10 rats in each group. The model drug-induced abortion in early pregnancy were established in the rats of the model group and the medication group. The medication group was administrated with YZZXG for 7 days, the amount of bleeding in each group was measured on day 1, day 2, day 3 and day 7. Quantitative proteomics was used to analyze the effect of YZZXG on the differential expression of serum proteins in the rats and to analyze the signaling pathway of differential proteins. And the differential proteins and signaling pathways were verified by parallel reaction monitoring. Results: The amount of uterine bleeding was significantly increased in the model group from day 1 ($P < 0.01$); compared with that in the model group, the amount of uterine bleeding was significantly reduced in the medication group from day 1 ($P < 0.01$). The results showed that 5,496 proteins were obtained by total quantitation. There were 84 differential proteins between the medication group and the model group; among them, 28 were up-regulated and 56 were down-regulated. Differential proteins were mainly enriched in PI3K/Akt signaling pathway, complement and coagulation cascade, platelet activation and other signaling pathways. Vitronectin, plasminogen and serine protease inhibitor D1 heparin cofactor II were selected for PRM verification, and the verification results were consistent with the TMT results. Conclusion: YZZXG can regulate the protein expressions of hyalenin and plasminogen to achieve the therapeutic effect in treatment of AUB in rats.

【Key words】 Yuzhi Zhixue Granule; Proteomics; Abnormal uterine bleeding; Parallel reaction monitoring