

定量蛋白质组学筛选及分析山慈菇酯提取物 抗 4T1 乳腺癌的新启示

曹晓东^{1#}, 张楠^{2#}, 杨冬冬³, 刘颖³, 王赫⁴, 张子英^{3*}

¹ 内蒙古医科大学新药安全评价研究中心; ² 内蒙古医科大学公共卫生学院;

³ 内蒙古医科大学基础医学院, 呼和浩特 010110; ⁴ 扎兰屯职业学院, 呼伦贝尔 162650

摘要: 探讨山慈菇酯提取物(ethyl acetate extract of *Cremastra appendiculata*, Cr Ap)作用于 4T1 乳腺癌组织中差异蛋白的表达变化, 筛选 Cr Ap 抗 4T1 乳腺癌的靶点。采用定量蛋白质组学串联质量标签(TMT)标记技术对 Cr Ap 作用的 4T1 乳腺癌组织进行检测, 并筛选 4T1 组织中发生显著变化的差异蛋白。利用多重数据库对 Cr Ap/CON 差异蛋白进一步进行生物信息学分析, QPCR 检测癌组织中 Ly6G、S100a8、S100a9、Tmsb4x 和 GADPH 的 mRNA 表达量。蛋白质组学共获得 15 个上调蛋白, 1 个下调蛋白, 其中有 4 个上调差异蛋白与免疫调节功能密切相关。胸腺素 β -4 下调, 而 Toll 4 受体结合蛋白、Toll 样受体结合蛋白、肥大细胞表达膜蛋白 1 上调, 基因本体论注释分析和功能聚类分析显示这些差异蛋白可能与 Cr Ap 产生抗乳腺癌作用相关; S100-a8、S100-a9 蛋白上调可能与 Cr Ap 产生促凋亡作用和免疫调节过程相关。此外, KEGG 富集通路多与免疫调控过程相关, 其中癌症的转录失调通路、IL-17 信号通路可能与 Cr Ap 抗 4T1 作用和免疫调节机制密切相关。QPCR 结果显示 Cr Ap 能显著提高乳腺癌组织中 Ly6G、S100a8、S100a9 的表达, 而降低 Tmsb4x。TMT 定量蛋白质组学能有效筛选 Cr Ap 抗 4T1 的差异蛋白, 其中 Cr Ap 抗 4T1 乳腺癌机制和相关的免疫调控作用有望成为新的研究方向。

关键词: 4T1 乳腺癌; 蛋白质组学; 串联质量标签; 山慈菇

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)2-0246-10

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.2.009

New revelation of TMT-based quantitative proteomic analysis on anti-4T1 breast cancer of ethyl acetate extract of *Cremastra appendiculata*

CAO Xiao-dong^{1#}, ZHANG Nan^{2#}, YANG Dong-dong³, LIU Ying³, WANG He⁴, ZHANG Zi-ying^{3*}

¹ The Center for New Drug Safety Evaluation and Research of Inner Mongolia Medical University;

² Public Health of Inner Mongolia Medical University;

³ Basic Medical College of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China;

⁴ Zhalantun Vocational College, Hulunbeir 162650, China

Abstract: To explore the different expression of ethyl acetate extract of *Cremastra appendiculata* (Cr Ap) against 4T1 breast cancer for screening its new revelation, tandem mass tag (TMT)-based quantitative proteomics was employed to screen the differential expression proteins treated by Cr Ap in breast cancer tissue. Multiple Bioinformatics databases were used to analyze the differentially expressed proteins. QPCR was used to detect Ly6G, S100a8, S100a9, Tmsb4x and GADPH mRNA expression in cancer tissues. Totally 16 differentially expressed proteins were identified. Among them, 15 proteins were up-regulated and 1 protein was down-regulated. Expression of thymosin β -4 mRNA was down-regulated significantly, but Toll 4 receptor binding protein, Toll-like receptor binding protein, S100-a8/a9 and mast cell expression membrane protein 1 were up-regulated, which may be related to pro-apoptotic effect and immune regulation of Cr Ap against breast cancer. KEGG enrichment

收稿日期: 2020-04-17 接受日期: 2020-12-24

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金(2020MS08136, 2020BS08015); 内蒙古自治区高等学校科学研究项目(NJZZ18100); 内蒙古医科大学博士启动金(YKD2018BSJJ005)

* 通信作者 Tel: 86-018048343957; E-mail: zhangziyingx@sohu.com

共同第一作者

pathway analysis of the differentially expressed proteins were enriched to transcriptional misregulation and IL-17 signaling pathway in cancer signaling pathway. Cr Ap significantly increased the expression of Ly6G, S100a8, and S100a9 genes in breast cancer tissues, and reduced expression of Tmsb4x genes. The immune-related differentially expressed proteins were effectively identified by TMT-based quantitative proteomics between Cr Ap and breast cancer control, and the immunoregulatory effect of Cr Ap against 4T1 breast cancer would be expected to become a new research direction.

Key words: 4T1 breast cancer; proteomics; tandem repeat sequences; *Cremastra appendiculata*

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,是全球第2大高发癌,死亡率在全球排第5^[1]。世界范围内乳腺癌的发病率和死亡率分别占12.2%和9.6%,呈快速增长的趋势,且发病趋于年轻化,给广大女性造成了严重困扰^[2]。三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)在诊断初期就合并远处器官转移,患者的存活率仅为23%,化学治疗TNBC虽有一定的疗效,但并未延长患者的总生存期和无进展生存期。

国医大师周仲瑛教授系我国著名中医药专家,1374 诊次恶性肿瘤病案中共用药物453味,其中使用频次最高的为山慈菇,1062次,占77.29%^[3]。山慈菇为中、蒙、苗医临床常用抗癌药,蒙医常用抗癌方剂益气托毒中药汤剂、蒙药乌门-17味散中均含有山慈菇。山慈菇能明显抑制人源TNBC类细胞MDA-MB-231和ER⁺的T47D细胞的增殖和转移^[4,5]。4T1属于鼠源的TNBC,本课题组特在相对具有免疫功能BALB/c小鼠上复制了4T1乳腺癌模型,应用TMT标记定量蛋白质组学筛选及分析Cr Ap相关的抗乳腺癌机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

4T1乳腺癌细胞株(中国科学院细胞库);DMEM培养基(Gibco公司);0.25% Trypsin-EDTA(Gibco公司);FBS(ExCell Bio公司);Penicillin-Streptomycin双抗(ExCell Bio公司);DMSO(北京索莱宝科技有限公司);Trizol试剂盒(Generay公司);Prime Script® RTMaster Mix反转录试剂盒(Vazyme公司);FastStart Universal SYBR Green Master(Rox)(Roche公司);BCA试剂盒(碧云天公司);TMT标记试剂盒(Thermo公司);三乙基碳酸氢铵(TEAB)(Sigma公司);DMEM培养基(Gibco公司);0.25% Trypsin-EDTA(Gibco公司);FBS(批号:11G313, Ex-Cell Bio公司);DMSO(北京索莱宝科技有限公司);三氟乙酸(Sigma-Aldrich公司);乙腈(Fisher Chemical公司);二硫苏糖醇(Sigma公司);尿素(Sigma公

司);甲酸(Fluka公司);碘代乙酰胺(Sigma公司);胰酶(Promega公司)。

1.1.2 动物

BALB/c小鼠(许可证号:SCXK(京)2016-0002),雌性,6~8周龄,体质量 18 ± 2 g,购自北京斯贝福生物技术有限公司。饲养于内蒙古医科大学动物实验中心,SPF级鼠房,饲养温度 $18 \sim 22$ °C,所有操作均符合伦理学要求。

2 方法与步骤

2.1 筛选Cr Ap抗4T1乳腺癌的作用

2.1.1 细胞生长曲线

细胞培养至细胞覆盖率达培养瓶的80%左右,加入0.25%胰酶消化。调整细胞密度至 1×10^4 /mL,接种于24孔板中,每孔1 mL,24 h后开始计数,以后每隔24 h计数一次,计数结果取四孔平均值,连续计数6天,绘制细胞生长曲线。

2.1.2 MTT法检测不同浓度的Cr Ap在不同时间对4T1乳腺癌细胞的抑制作用

4T1乳腺癌细胞用0.25%胰酶消化,加入培养基制成单细胞悬液,以每孔 1×10^4 接种于96孔板上,每孔100 μ L,96孔板上设置空白对照组(含细胞的培养基)、不同浓度的Cr Ap给药组(12 500、1 250、125、12.5、1.25、0.125 μ g/mL),每组设5个复孔。置入37 °C、5% CO₂培养箱中培养24~48 h,细胞贴壁后,吸除原培养液,实验组分别加入100 μ L用培养基调整后的不同浓度的Cr Ap。同时使用3块96孔板进行上述步骤,放入37 °C、5% CO₂的恒温细胞培养箱中,分别培养24、48、72 h。加入5 mg/mL MTT溶液10 μ L,避光,孵育4 h,小心地吸出每个孔内所有液体,加入150 μ L DMSO,继续避光,将96孔板放到振荡摇床上低速震荡10 min,上机检测,在OD490 nm测量各孔的吸光值,抑制率=(对照组OD值-药物组OD值)/对照组OD值 \times 100%,进行计算。

2.2 动物分组和造模

所有BALB/c小鼠适应性喂养7天后,进行植瘤,接种4T1前用1%戊巴比妥钠生理盐水溶液进

行麻醉,腹腔注射,10 $\mu\text{L/g}$ 。消毒后,右腋下注射 5×10^6 个 4T1 细胞 200 μL 。5~7 天后,小鼠肿瘤长到 2~5 mm 后,触摸植瘤处可发现不规则硬块,即代表植瘤成功。

2.2.2.1 动物分组

植瘤成功的 BALB/c 小鼠,分层分组法随机分成:模型组、Cr Ap 高、中、低剂量组,每组 8 只。根据临床常用原药量换算,结合前期动物实验结果,给药浓度分别为 960、96、9.6 mg/kg,每日一次,连续腹腔注射给药 21 天;模型组小鼠腹腔注射等量的生理盐水。

2.2.2.2 TMT 定量蛋白质组学

2.2.2.2.1 蛋白提取

从 -80 $^{\circ}\text{C}$ 取出 6 对样品,将适量的瘤组织样品称重,置于液氮预冷的研钵中,添加液氮并充分研磨至粉末。每组样品均加入 4 倍体积含 8 mol/L 尿素,1% 蛋白酶抑制剂的裂解缓冲液中,超声裂解后置高速离心机中,4 $^{\circ}\text{C}$,12 000 g 离心 10 min,小心将上清液转移至新的离心管中,弃掉离心管底部细胞碎片,BCA 试剂盒测定蛋白浓度。

2.2.2.2.2 胰酶酶解

将二硫苏糖醇添加到蛋白质溶液中至终浓度为 5 mmol/L,并在 56 $^{\circ}\text{C}$ 下还原 30 min。然后添加碘乙酰胺,使其浓度为 11 mmol/L,并在室温避光孵育 15 min。最后,将样品的尿素浓度稀释至 2 mol/L 以下。以 1:50(胰蛋白酶:蛋白质)的质量比添加胰蛋白酶,并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下消化过夜。称重后继续加入 1% 的胰酶,继续酶解 4 h。

2.2.2.2.3 TMT 标记

胰酶酶解后的肽段过 Strata X C_{18} (Phenomenex) 色谱柱除盐,真空冷冻干燥。以 0.5 mol/L TE-AB 溶解肽段,根据 TMT 试剂盒操作说明标记肽段。乙腈溶解并与肽段混合,室温孵育 2 h,完成标记后的肽段混合并除盐,真空冷冻干燥待用。

2.2.2.2.4 HPLC 分级

肽段用高 pH 反向 HPLC 分级,色谱柱为 Agilent 300Extend C_{18} (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm)。操作如下:肽段分级梯度为 8%~32% 乙腈、pH = 9, 60 min 分离 60 个组分,随后肽段合并为 18 个组分,最后各组分真空冻干备用。

2.2.2.2.5 液相色谱-质谱联用分析

设置 EASY-nLC 1000 超高效液相系统色谱条件,流动相 A:0.1% 甲酸的水溶液;流动相 B:0.1%

甲酸的乙腈溶液。液相梯度设置:0~42 min,6% \rightarrow 22% B;42~54 min,22% \rightarrow 30% B;54~57 min,30% \rightarrow 80% B;57~60 min,80% B,流速:500 nL/min。肽段用流动相 A 溶解进行分离,样品首先进入 trap 柱富集并除盐,随后通过自填装的 C_{18} 分析柱(柱子内径 150 μm ,柱料粒径 3.6 μm ,长度 30 cm)进行分离。

通过超高效液相系统分离肽段后,注入 NSI 离子源进行电离。然后通过 Orbitrap Fusion Lumos 质谱分析。设置离子源电压为 2.4 kV,使用高分辨率 Orbitrap 对肽前体离子及其二级片段进行检测和分析。一级质谱扫描范围设置为 350~1 550 m/z ,扫描分辨率设置为 60 000;二级质谱扫描范围则固定起点为 100 m/z ,二级扫描分辨率设置为 15 000。数据采集模式使用数据依赖型扫描程序,即在一级扫描后选择信号强度最高的前 20 肽段依次进入 HCD 碰撞池,使用 32% 的碎裂能量进行碎裂,再依次进行二级质谱分析。为了提高质谱的有效利用率,自动增益控制 (AGC) 设置为 5E4,信号阈值设置为 10 000 ions/s,最大注入时间设置为 60 ms,串联质谱扫描的动态排除时间设置为 30 s 以避免重复扫描母离子。

2.2.2.2.6 数据库搜索

二级质谱数据使用 Maxquant (v1.5.2.8) 进行检索。检索参数设置:数据库为 Mus_musculus_10090_SP_20191115 (17 032 条序列),添加了反库以计算随机匹配造成的假阳性率,并且在数据库中加入常见的污染库,用于消除鉴定结果中污染蛋白的影响;酶切方式设置为 Trypsin/P;漏切位点数设为 2;肽段最小长度设置为 7 个氨基酸残基;肽段最大修饰数设为 5;First search 和 Main search 的一级母离子质量误差容忍度分别设为 20 ppm 和 5 ppm,二级碎片离子的质量误差容忍度为 0.02 Da。将半胱氨酸烷基化设置为固定修饰,可变修饰为甲硫氨酸的氧化,蛋白 N 端的乙酰化,脱酰胺化 (NQ)。定量方法设置为 TMT-6 plex,蛋白鉴定、PSM 鉴定的 FDR 都设置为 1%。

2.2.2.2.7 质谱质控检测

大部分肽段分布在 7~20 个氨基酸,符合基于 trypsin 酶解和 HCD 碎裂方式的一般规律。其中小于 5 个氨基酸的肽段由于产生的碎片离子过少,不能产生有效的序列鉴定。大于 20 个氨基酸的肽段由于质量和电荷数较高,不适合 HCD 的碎裂方式。

质谱鉴定到的肽段长度的分布符合质控要求。

2.2.2.8 生物信息学分析软件

分析质谱数据解析,使用 MaxQuant;v. 1. 5. 2. 8 <http://www.maxquant.org/>;分析 Motif 使用 MoMo; V5.0.2 <http://meme-suite.org/tools/momo>;GO、Domain 注释使用 Inter ProScan ;v. 5. 14-53. 0 <http://www.ebi.ac.uk/interpro/>;KEGG 注释使用 KAAS;v. 2. 0 http://www.genome.jp/kaas-bin/kaas_main,KEGG Mapper; V2. 5 <http://www.kegg.jp/kegg/mapper.html>;亚细胞定位使用 Wolfpsort;v. 0. 2 http://www.genscript.com/psort/wolf_psort.html,CELLO;v. 2. 5 <http://cello.life.nctu.edu.tw/>;富集分析使用 Perl module;v. 1. 31 <https://metacpan.org/>

pod/Text::NSP::Measures::2D::Fisher。

2.2.3 QPCR

采用 Trizol 提取乳腺癌组织总 RNA,浓度调一致后,反转录得 cDNA。按照说明书去基因组 DNA,反应条件:42 °C 2 min,配制 20 μL 反应体系,反应条件为:50 °C 15 min,85 °C 5 s。用 SYBR@ Prime-ExTaqTW II 检测癌组织中 Ly6G、S100a8、S100a9、Tmsb4x 和 GADPH 的 mRNA 表达量,按照试剂盒说明书配制 20 μL qPCR 反应体系;反应过程采用两步法,即 95 °C 10 min;95 °C 15 s,60 °C 退火 1 min,扩增 40 个循环;每个样品 6 个重复;用相对表达量 = 2^{-ΔΔct} 公式计算各个基因的相对表达量,基因引物序列见表 1。

表 1 靶基因的引物序列
Table 1 Primer sequences of target gene

基因名称 Gene name	上游引物 Forward primer(5'→3')	下游引物 Reverse primer(5'→3')	退火温度 Annealing temperature(°C)	产物长度 Product length (bp)
Ly6G	AGAGTAGTGGGGCAGATGGG	CTGATGGATTTTGCGTTGCT	60	100
Tmsb4x	CTGCCCTTTCACATCA	TCATCATCTCCCACCCA	60	141
S100a8	TCCGTGACAATGCCGTCT	TCTGCACAACTGAGGACA	60	150
S100a9	CTGCATGAGAACAACCCA	AGGCCATTGAGTAAGCCA	60	125
GADPH	AAATGGTGAAGGTCGGTGTGAAC	CAACAATCTCCACTTTGCCACTG	60	256

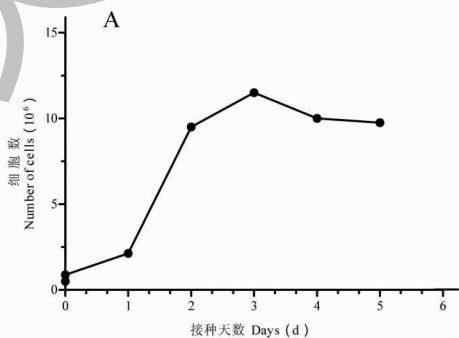
2.3 统计学方法

在 ADM/CON 两个样本中以 1.5 倍变化为差异表达变化阈值,统计学检验采用 t-test, P < 0.05 为显著性阈值。富集检验使用 Fisher's exact test。两个样本中蛋白对应特异性肽段的定量值取 log2(以使得数据符合正态分布),然后用双样本双尾 T 检验方法计算 P。当 P < 0.05 时,超过 1.5 作为显著上调的变化阈值,小于 1/1.5 作为显著下调的变化阈值。

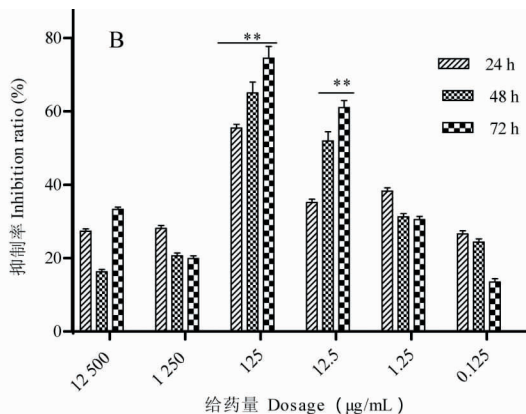
3 结果

3.1 差异蛋白

图 1A 显示,由 4T1 细胞的生长曲线发现,该细胞系在铺板 3 天内为对数生长期,MTT 给药选在对数生长期,可在铺板后的 1.5 天给予 Cr Ap 明确其药理作用。图 1B 显示,Cr Ap 在体外有抗 4T1 乳腺癌的作用;图 1C、D 显示,造模成功,且 Cr Ap 能降低体内 4T1 乳腺癌的大小,选 Cr Ap96 mg/kg 作为给药样本与模型组进行蛋白质组学检测。



续图 1(Continued Fig1)



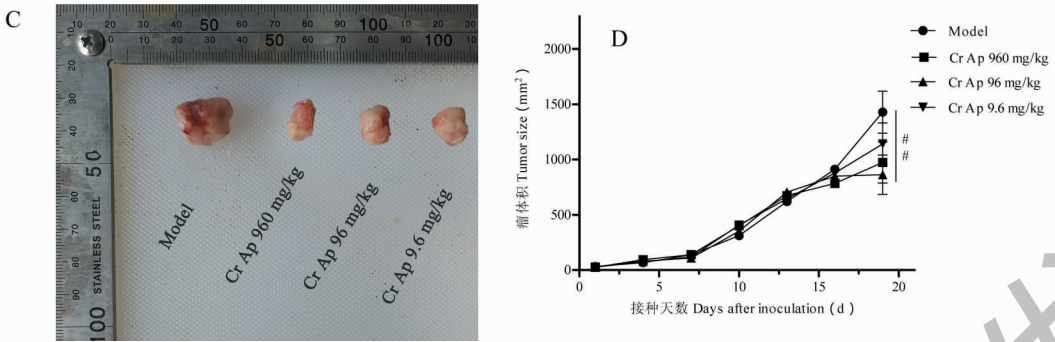


图1 Cr Ap 对4T1 乳腺癌细胞和荷瘤鼠乳腺癌组织的抑制作用

Fig. 1 Inhibitory effects of Cr Ap on 4T1 breast cancer cells and breast cancer tissues

注:A:4T1 细胞的生长曲线;B:MTT 试验;C:不同浓度的 Cr Ap 作用于4T1 乳腺癌;D:肿瘤体积曲线;图 B:与 Cr Ap 12 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 相比, ** $P < 0.01$;图 D:与模型组相比,### $P < 0.01$ 。Note:A:Growth curve of 4T1 cells;B:MTT test;C:Effects of different concentration of Cr Ap on 4T1 breast cancer;D:Tumor volume curve;Compared with Cr Ap 12 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ** $P < 0.01$;Compared with the model group,### $P < 0.01$ 。

Cr Ap/CON 利用 MaxQuant 软件在 IPI (International Protein Index) 数据库中检索质谱鉴定 6 162

个可定量蛋白,其中有 15 个上调的蛋白,下调蛋白仅有胸腺素 β -4。具体差异蛋白的变化见表 2。

表 2 4T1 乳腺癌中的差异表达蛋白

Table 2 Differentially expressed proteins in 4T1 breast cancer

分类 Category	蛋白质编号 Protein accession	蛋白质描述 Protein description	比值 Ratio	P 值 P value	基因名称 Gene name
细胞核 Nucleus	P84228	Histone H3.2	2.0	0.020	Hist1h3b
	C0HKE9	Histone H2A type 1-P	2.2	0.003	Hist1h2ap
	P84244	Histone H3.3	1.7	0.017	H3-3a
	P62806	Histone H4	1.7	1E-32	H4c1
	P01872	Immunoglobulin heavy constant	1.5	1E-32	Ighm
	Q6ZWY9	Histone H2B type 1-C/E/G	2.2	0.002	H2bc4
细胞质 Cytoplasm	P20065	Thymosin beta-4	0.5	0.001	Tmsb4x
	P27005	Protein S100-A8	1.5	2.6E-11	S100a8
	P35175	Stefin-1	1.6	0.001	Stfa1
	P31725	Protein S100-A9	1.7	1E-32	S100a9
质膜 Plasma membrane	P11370	Retrovirus-related Env polyprotein	1.5	0.003	Fv4
	P35461	Lymphocyte antigen 6G (Fragment)	1.9	0.019	Ly6g
	Q9D8U6	Mast cell-expressed membrane protein 1	1.6	0.003	Mcemp1
线粒体 Mitochondria	P56379	ATP synthase subunit ATP5MPL, mitochondrial	1.5	0.001	Atp5mpl
	O09167	60S ribosomal protein L21	1.5	8.0E-08	Rpl21
细胞外 Extracellular	Q8R2S8	CD177 antigen	1.6	2.9E-12	Cd177

3.2 差异表达蛋白的功能分类

3.2.1 GO 二级注释分类

Cr Ap/CON 的 Gene Ontology (GO) 分析:有 7 ~ 10 个差异蛋白参与调控细胞过程、单细胞生物过程、生物调节、代谢过程、对刺激的反应等生物进程

(biological process), Histone 参与上述生物进程;此外,有 4 种差异蛋白参与免疫调控,3 种差异蛋白参与细胞黏附。有 14 种差异蛋白参与细胞组成 (cellular component) 的特定成分;有 10 种差异蛋白参与结合活性调控 (见图 2)。

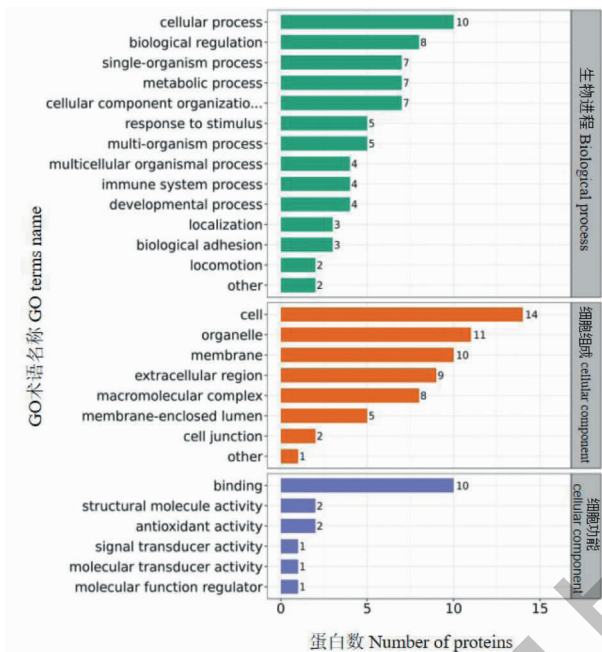


图 2 差异表达蛋白在 GO 二级分类中统计分布图

Fig. 2 Statistical distribution of differentially expressed proteins in GO secondary classification

其中 Histone、Protein S100 分布于细胞内外， 的差异蛋白分布在细胞核、细胞质和细胞膜中，主要 Protein S100 与免疫调节和凋亡密切相关。细胞内 位于细胞核(见表 3)。

表 3 差异表达蛋白的亚细胞结构定位分布表

Table 3 Distribution map of the subcellular structure of differentially expressed proteins

分类 Category	比值 Ratio(%)
细胞核 Nucleus	37.5
细胞质 Cytoplasm	25
质膜 Plasma membrane	18.75
线粒体 Mitochondria	12.5
细胞外 Extracellular	6.25

3.2.2 COG 功能分类

差异蛋白起源于染色质结构和动力学分类;而 Thy- 具有诸多生物学功能的,与 Histone 相关的 5 种 mosin beta-4 起源于细胞运动分类(见表 4)。

表 4 差异表达蛋白的 COG 功能分类分布图

Table 4 COG functional classification distribution map of differentially expressed proteins

分类 Category	蛋白质编号 Protein accession	蛋白质描述 Protein description	比值 Ratio	P 值 P value	基因名称 Gene name
[B] 染色质的结构和动力学 [B] Chromatin structure and dynamics	P84228	Histone H3.2	2.0	0.020	Hist1h3b
	C0HKE9	Histone H2A type 1-P	2.2	0.003	Hist1h2ap
	P84244	Histone H3.3	1.7	0.017	H3-3a
	P62806	Histone H4	1.7	1E-32	H4c1
	Q6ZWY9	Histone H2B type 1-C/E/G	2.2	0.002	H2bc4
[N] 细胞运动 [N] Cell motility	P20065	Thymosin beta-4	0.5	0.001	Tmsb4x

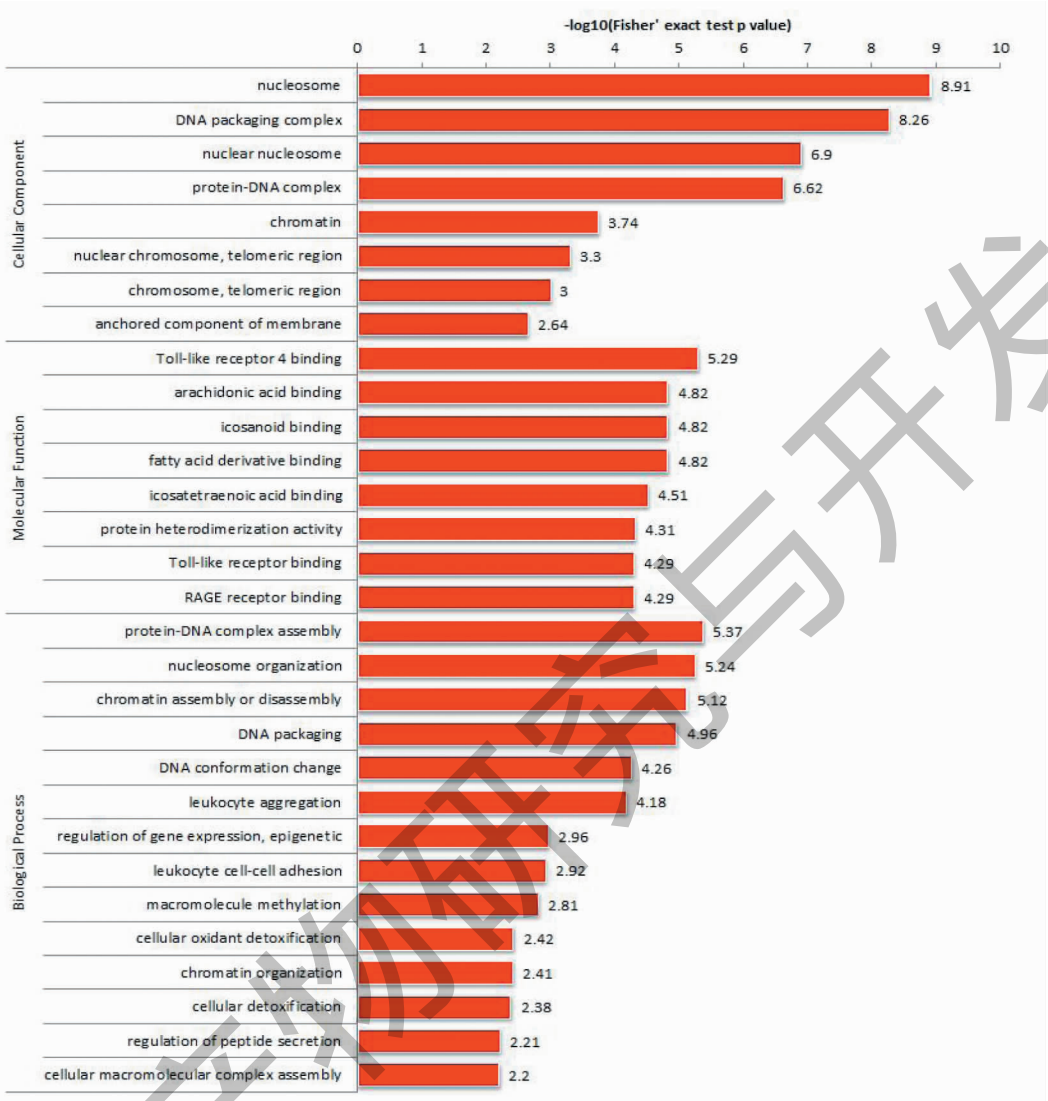


图3 Cr Ap/CON 差异表达蛋白的 GO 富集图

Fig. 3 GO enrichment map of Cr Ap/CON differentially expressed proteins

3.3 差异表达蛋白功能富集分析

3.3.1 GO 富集

差异蛋白 Histone、Protein S100 上调参与组成 DNA 包装复合、核小体、蛋白-DNA 复合核、染色体、端粒区域染色体、端粒区域固定膜组件等；差异上调蛋白 ProteinS100 参与 Toll 4 受体结合蛋白、花生四烯酸结合蛋白、类二十烷酸结合蛋白、脂肪酸衍生物结合蛋白、二十碳四烯酸结合蛋白、蛋白质异二聚化活性蛋白、Toll 样受体结合蛋白、RAGE 受体结合蛋白相关的分子功能。上调 Histone、Protein S100 参与 Toll 4 受体结合，参与蛋白质-DNA 复合物组装、核小体组织、染色质组装或拆卸、DNA 包装及构象变化、白细胞聚集、基因表达的调控，表观遗传、白细胞

与细胞的粘附、大分子甲基化、细胞氧化剂排毒、染色质组织、细胞排毒、肽分泌的调节、细胞大分子复合物组装等生物进程（见图 3）。

3.3.2 KEGG 通路富集

差异蛋白富集于癌症中的转录失调、IL-17 信号通路、系统性红斑狼疮、产生 IgA 的肠道免疫网络、哮喘、移植物抗宿主病、病毒致癌、自身免疫性甲状腺疾病、同种异体移植排斥等通路（见图 4）。

3.3.3 蛋白结构域富集

上调差异蛋白结构域富集于组蛋白折叠、组蛋白 H2A/H2B/H3、Ly-6 抗原/uPA 受体样、S100/CaBP-9k 型、钙结合亚结构域（见图 5）。

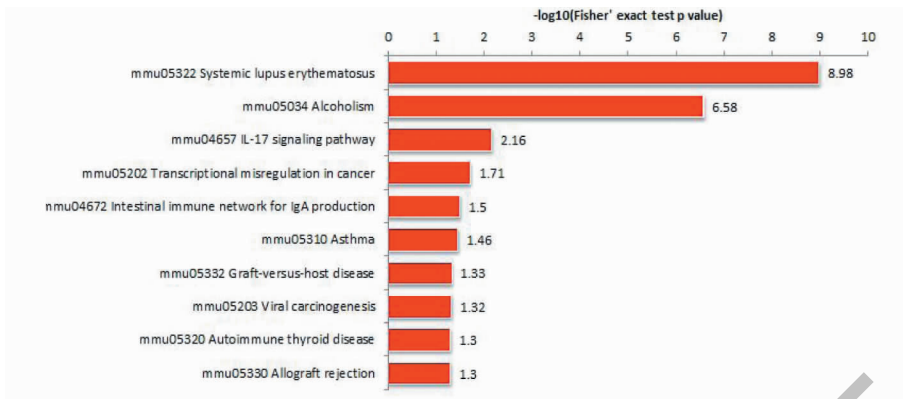


图 4 Cr Ap/CON 差异表达蛋白在 KEGG 通路图

Fig. 4 Cr Ap/CON differentially expressed protein in KEGG pathway

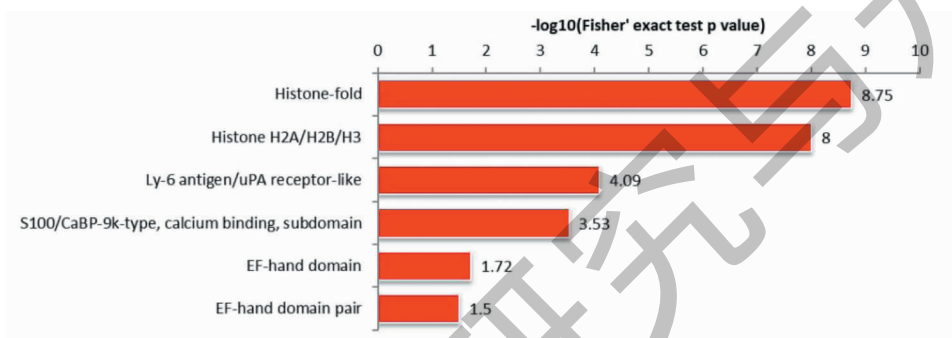


图 5 差异表达蛋白富集蛋白结构域图

Fig. 5 Enriched protein domains of differentially expressed proteins

3.3.4 QPCR 验证结果

QPCR 结果显示 Cr Ap 能显著提高乳腺癌组织中 Ly6G、S100a8、S100a9 的表达,显著降低 Tmsb4x 基因的表达量(见图 6)。

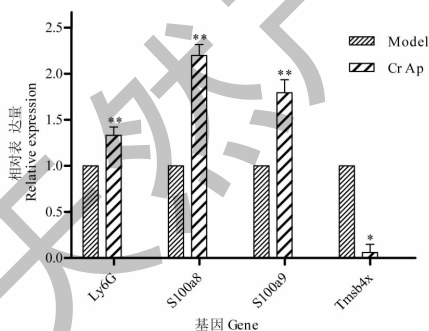


图 6 QPCR 结果

Fig. 6 QPCR results

注:与模型组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。Note: Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

4 讨论与结论

本研究选用蛋白质组学筛选 Cr Ap 抗 4T1 乳腺癌的作用靶点,通过生物信息学分析了 Cr Ap/CON

的差异蛋白的主要功能、细胞定位、富集的信号通路和蛋白结构域,找到 Cr Ap 抗 4T1 乳腺癌的免疫调节作用靶点,并通过 qPCR 验证 Cr Ap/CON 的差异蛋白的表达情况。由于文献中选用的蛋白质组学的差异倍数为 1.2 倍、1.3 倍、1.5 倍和 2 倍,本实验选用 1.5 倍作为差异倍数,筛选出变化差异相对较大的靶蛋白,便于后期验证。由于 Histone 与乳腺癌的相关文献报道未检索到,因此选用除组蛋白外,差异较明显的 Ly6G、S100a9、Tmsb4x、S100a8 进行验证,在此实验中 S100a8 虽然差异表达量不算太高,但和其和 S100a9 与癌症的发生发展密切相关。本研究发现 Cr Ap 在体内外均有抗 4T1 乳腺癌的作用,这与刘银花研究的山慈菇水提液抑制 4T1 细胞增殖作用一致^[6]。在 TCMSp 数据库中检索到山慈菇的化学成分有 18 种,依据筛选条件 (OB > 30% 且 DL > 0.18),获得山慈菇的抗乳腺癌的 3 种活性成分 beta-sitosterol、2-methoxy-9, 10-dihydrophenanthrene-4, 5-diol 和 stigmasterol。为了明确 Cr Ap 作用的差异蛋白间的相关性,做了 KEGG 通路富集。KEGG 富集通路结果显示差异蛋白富集在 IL-17 信号通路和

癌症的转录失调信号通路。其中差异蛋白 S100a8 和 S100a9 富集于 IL-17 信号通路,而 IL-17 与 Cr Ap 抗乳腺癌的免疫调节作用密切相关。

文献报道山慈菇能降低乳腺癌大鼠血清及癌组织中的 VEGF 和基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)的水平^[7];而 MMP-9 干扰乳腺癌细胞的侵袭及迁移,IL-17 可以刺激肿瘤微环境中的各种细胞产生 MMPs,促进肿瘤浸润和转移。IL-17F 通过募集及激活 CTL,下调促血管生成因子 IL-6、IL-8 及 VEGF 的表达抑制血管生成,产生抗乳腺癌免疫调节作用,本研究也检测到山慈菇能影响癌组织中 MMP 含量,但差异倍数为 1.2 倍,因此本文中未列出。此外,IL-17F 还促进肿瘤细胞分泌 TNF- α ,而高浓度 TNF- α 抑制血管形成。IL-17F 募集 CD8⁺ T 细胞至肿瘤组织激活 NF- κ B 通路,从而增强抗肿瘤免疫^[8]。有研究认为,IL-17F/IL-17RA 缺陷小鼠,局部组织 Th₂ 淋巴细胞因子增多,通过下调 Th₂ 细胞因子抑制肿瘤进展。IL-17A 募集 CD4⁺ T 细胞,并促进 CTL 细胞的分化从而抑制肿瘤的生长^[9],由此可见,IL-17 与 Cr Ap 抗乳腺癌的免疫调节作用密切相关。本研究发现 Cr Ap/CON 的差异蛋白包含多种组蛋白的变化,组蛋白与肿瘤转录调控(包括修饰、染色质重塑蛋白和甲基化修饰)密切相关,如转录后调节因子 Tristetraprolin (TTP) 可以负调控肿瘤的发生^[10]。由此可见,癌症中的转录失调通路可能是 Cr Ap 抗 4T1 乳腺癌的作用机制。已有研究发现山慈菇通过阻滞 G₂ 期细胞(与组蛋白修饰有关)而影响乳腺癌细胞生长增殖以及诱导凋亡^[11]。

本研究发现 Cr Ap 可以降低胸腺素 β -4 (thymosin β 4, T β -4),而 T β -4 调节缺氧/复氧经历的癌细胞迁移和转移^[12];且 T β -4 通过下调层粘连蛋白-5 调控细胞迁移,T β -4 可能通过诱导肿瘤血管生成,从而促进肿瘤转移。T β 4 和 T β 10 均能在体外促进小鼠乳腺癌细胞的迁移,体内促进小鼠乳腺癌的转移,可能与上调 MMP2, MMP9, Sdf1 和 Stat3mRNA 水平有关^[13]。由此可见 T β 4 的下调可能是 Cr Ap 产生抗 4T1 乳腺癌的机制。Ly6G (淋巴细胞抗原 6) 蛋白由骨髓中髓样来源的细胞表达,分子量约为 21 ~ 25 kDa, Ly6G 基因复合体与 Ly6C 一起组成骨髓分化抗原 Gr-1。Ly6G 是检测外周中性粒细胞,单核细胞和粒细胞的标记物, Ly6G 的生理作用尚不清楚,但参与抗肿瘤反应^[14]。

S100-a8 蛋白与 ER 表达水平和组织学类型有关,并与乳腺癌淋巴结转移相关^[30]。S100a9 表达水平在乳腺癌血清和组织中明显升高,在乳腺癌组织中表达明显高于癌旁正常组织,S100/CaBP-9k 属于钙结合蛋白,提示 Cr Ap 可能促使细胞内钙含量增加。S100a8 和 S100a9 均为 S100 钙结合蛋白家族成员,研究显示 S100a8 和 S100a9 在多种肿瘤中高表达,多种肿瘤细胞中,S100a8/a9 通过双重机制诱导细胞凋亡,由此可见 S100a8 和 S100a9 的上调可能是 Cr Ap 促进 4T1 乳腺癌细胞凋亡和产生免疫调节的主要机制。目前临床治疗 TNBC 的效果和预后比较差,文献报道免疫调节治疗 TNBC 具有相对较好的预后。机体可通过调节免疫功能产生抗 TNBC 作用,但肿瘤细胞可以形成特殊免疫抑制微环境逃避机体免疫系统的识别和攻击,产生免疫逃逸^[15],然而,打破肿瘤微环境的屏障作用,便于机体免疫系统攻击肿瘤。免疫治疗 TNBC 已成为国际乳腺癌研究领域的新热点^[16]。也有文献表明促进 CD4⁺ T Th₂ 亚型向 Th₁ 亚型的转变,也将是抗乳腺癌药物的新作用机制^[17],本研究下一步将研究山慈菇酯提物对乳腺癌荷瘤鼠的 T 淋巴细胞分型和转型的影响。因此,本研究特在小鼠体内复制 TNBC 模型,以期揭示 Cr Ap 抗 TNBC 的免疫作用靶点。

Cr Ap 抗 4T1 乳腺癌的免疫调节机制与增加 S100-a8、S100a9 的表达,降低 T β -4 的表达相关。抗 TNBC 的作用机制和免疫调节作用可作为研究 Cr Ap 的新方向。

参考文献

- 1 Albeshan SM, Mackey MG, Hossain SZ, et al. Breast cancer epidemiology in gulf cooperation council countries: a regional and international comparison[J]. Clin Breast Cancer, 2018, 18(3): e381-e392.
- 2 Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66: 115-132.
- 3 Zhao H, Wang ZY, Zhou ZY. Analysis of herb used in malignant tumor treatment based on phlegm syndrome differentiation by Zhou Zhongying [J]. J Tradit Chin Med (中医杂志), 2015, 56: 740-742.
- 4 Niu XY, Wang L, Sun F, et al. Effect of water decoction of shiitake mushroom on MDA-MB-231 cells in breast cancer [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2018, 40: 197-200.
- 5 Guo C, Gong YJ, Sun F, et al. Effect of *Iphigenia* decoction on proliferation and migration of human breast cancer cell

- line T-47D [J]. *Acta Chin Med (中医学报)*, 2017, 32: 1832-1835.
- 6 Liu YH, Zhong SJ, Zeng T, et al. Inhibitory effect and mechanism of shancigu water extracts on mice 4T1 cell [J]. *Hubei Agr Sci (湖北农业科学)*, 2016, 55(1): 134-137.
 - 7 Yang XW, Wang SY, Zhao J, et al. Effect of arrowhead extract on the expressions of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-9 in tumor tissues of breast cancer rats [J]. *Chin J Clin Pharmacol (中国临床药理学杂志)*, 2018, 34: 838-840.
 - 8 Osooli M, Berntorp E. Inhibitors in haemophilia: what have we learned from registries? A systematic review [J]. *J Intern Med*, 2015, 277(1): 1-15.
 - 9 Qian X, Chen HK, Wu XF, et al. Interleukin-17 acts as double-edged sword in anti-tumor immunity and tumorigenesis [J]. *Cytokine*, 2017, 89: 34-44.
 - 10 Park JM, Lee TH, Kang TH. Roles of tristetruprolin in tumorigenesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(11): 3384.
 - 11 Cyprian FS, Akhtar S, Gatalica Z, et al. Targeted immunotherapy with a checkpoint inhibitor in combination with chemotherapy: a new clinical paradigm in the treatment of triple-negative breast cancer [J]. *Bosn J Basic Med Sci*, 2019, 19: 227-233.
 - 12 Lee JW, Ryu YK, Ji YH, et al. Correction: Hypoxia/reoxygenation-experienced cancer cell migration and metastasis are regulated by Rap1-and Rac1-GTPase activation via the expression of thymosin beta-4 [J]. *Oncotarget*, 2018, 9: 37608-37609.
 - 13 Ma L, Shi RZ, Deng JL, et al. Expressions of thymosin $\beta 4$ and $\beta 10$ promote metastasis of mouse breast cancer [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol (中国药理学与毒理学杂志)*, 2018, 32: 565-572.
 - 14 Wang SB, Zhang C, Chen ZX, et al. A versatile carbon monoxide nanogenerator for enhanced tumor therapy and anti-inflammation [J]. *ACS Nano*, 2019, 13: 5523-5532.
 - 15 Zhang Y, Xie W, Zhang SW, et al. Progress in immunotherapy for triple breast cancer [J]. *Chin Bull Life Sci (生命科学)*, 2019, 31: 879-885.
 - 16 Fan DW, Yao CY, Yao TJ. Research progress of triple negative breast cancer [J]. *Med Recapit (医学综述)*, 2018, 24(1): 71-75.
 - 17 Cheng Z, Zhao WH, Huang X, et al. Anti-tumor immunomodulatory effects of polysaccharides from *Salvia chinensis* Benth. in H22 tumor-bearing mice [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2016, 28: 846-851.
-
- (上接第 197 页)
- 5 Liu SW, Yin C, Wu ZC, et al. Effect of *Carthamus tinctorius* oxidative stress of kidney in rats with diabetic nephropathy [J]. *Chin Pharm (中国药房)*, 2009, 20: 409-411.
 - 6 Li MZ, Gao YB, Ma MF, et al. Overview of current researches on pathogenetic mechanism of diabetic nephropathy [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志)*, 2012, 18(22): 344-349.
 - 7 Chen Y, Zheng H, Gao J. Protection of diabetic retinal ganglion cells by safflower yellow pigment regulated p38MAPK signaling pathway [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2019, 50: 2639-2644.
 - 8 Li WQ, Luo XR, Li P, et al. Clinical effects of safflower yellow pigment on angina pectoris of diabetic patients with coronary heart [J]. *Acad J Kunming Med Coll (昆明医学院学报)*, 2010, 31(4): 50-53.
 - 9 Klamann LD, Boss O, Peroni OD, et al. Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20: 5479-5489.
 - 10 Li LN, Yang Y, Hou XL, et al. Bioassay-guided separation and purification of water-soluble antioxidants from *Carthamus tinctorius* L. by combination of chromatographic techniques [J]. *Sep Purif Technol*, 2013, 104: 200-207.
 - 11 Ma Y, Li J, Tong F, et al. Optimization of microwave-assisted extraction using response surface methodology and the potential anti-diabetic efficacy of *Nigella glandulifera* Freyn determined using the spectrum-effect relationship [J]. *Ind Crop Prod*, 2020, 153: 112592.
 - 12 Xu XM, Li JA, Tian CY, et al. Inhibitory effects of water extract of *Gynura divaricata* on dipeptidyl peptidase-4 and α -glucosidase: an experimental study [J]. *Hunan Tradit Chin Med (湖南中医杂志)*, 2017, 33(3): 149-150.
 - 13 Wang ZY, Mu WC, Li YR, et al. Study on fingerprint and activity relationship of hawthorn leaf standard decoction [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2020, 32: 557-566.