

基于蛋白质组学分析色胺酮抑制小鼠乳腺癌的作用机制

曾庆芳, 罗才荣, 张晓燕, 梁妍, 沈祥春, 陶玲*, 周威*

(贵州医科大学药学院, 天然药物资源优效利用重点实验室, 贵阳 550025)

[摘要] **目的:**采用非标记定量(Label-free)蛋白质组学技术研究色胺酮抗小鼠体内乳腺癌的作用机制。**方法:**采用超高效液相色谱-质谱联用技术检测色胺酮抗小鼠乳腺癌的表达蛋白,选择 Ionoptics nano UPLC C₁₈ 色谱柱(0.075 mm×250 mm, 1.6 μm),流动相0.1%甲酸水溶液-0.1%甲酸乙腈溶液梯度洗脱,正离子模式,扫描范围 m/z 100~1 700,使用 MaxQuant 1.6.5.0 进行数据库检索。采用 Label-free 高分辨质谱的蛋白质组学技术筛选 4T1 乳腺癌小鼠模型组与色胺酮(100 mg·kg⁻¹)口服给药组之间的差异表达蛋白,进行色胺酮抗乳腺癌的蛋白质组学研究。**结果:**共鉴定出 3 997 个蛋白质,其中有 2 911 个蛋白可定量。模型组与色胺酮组共 750 个差异表达蛋白,其中 286 个蛋白上调,464 个蛋白下调。基因本体分析表明,这些差异表达蛋白主要参与增殖、细胞迁移、凋亡、免疫、血管生成和炎症调节等生物学过程。京都基因与基因组百科全书通路分析进一步表明,这些蛋白主要集中于 T 细胞受体, B 细胞受体, Toll 样受体, 核转录因子- κ B(NF- κ B), Ras 蛋白, 白细胞介素-17, 肿瘤坏死因子, 磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K-Akt)和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)等信号通路。**结论:**与色胺酮抗 4T1 乳腺癌作用密切相关的差异表达蛋白包括上调蛋白白细胞分化抗原 14(CD14), 前列腺素 G/H 合酶 2(PTGS2), 泛素蛋白连接酶 E3 和下调蛋白 CD44, 70 kDa 热休克蛋白 1A(HSPA1A), 巨噬细胞移动抑制因子(MIF), NF- κ B, 核糖体蛋白 S6 激酶 α -4(RPS6KA4) 和高迁移率族蛋白 B1(HMGB1), 提示色胺酮主要通过调节肿瘤炎症微环境来达到抑制小鼠乳腺癌的作用。

[关键词] 色胺酮; 乳腺癌; 4T1 细胞; 蛋白质组学; 差异表达蛋白; 肿瘤炎症微环境; 药理作用

[中图分类号] R22; Q51; R28; Q2; R96 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)21-0173-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201161

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200325.1848.002.html>

[网络出版日期] 2020-3-26 11:34

Investigation of Mechanism of Tryptanthrin Inhibiting Breast Cancer in Mice Based on Proteomics

ZENG Qing-fang, LUO Cai-rong, ZHANG Xiao-yan, LIANG Yan,
SHEN Xiang-chun, TAO Ling*, ZHOU Wei*

(School of Pharmacy, Key Laboratory of Optimal Utilization of Natural Medicinal Resources,
Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China)

[Abstract] **Objective:** A systematical study on the anti-breast cancer mechanism of tryptanthrin in breast cancer-bearing mice was done by Label-free proteomics. **Method:** UPLC-MS was used to detect the expressed-proteins of tryptanthrin inhibiting breast cancer in mice, chromatographic separation was achieved on the Ionoptics nano UPLC C₁₈ column (0.075 mm×250 mm, 1.6 μm), and gradient elution was performed with 0.1% formic acid aqueous solution-0.1% formic acid acetonitrile solution as mobile phase. Data acquisition was carried out in electrospray ionization (ESI) under the positive ion mode, the scanning range was m/z 100-1 700,

[收稿日期] 20200107(018)

[基金项目] 贵州省自然科学基金项目[黔科合基础(2020)1Y404];贵州医科大学本科教学内容和课程体系改革项目(JG201960);贵州省大学生创新创业计划项目(201510660024, S202010660006)

[第一作者] 曾庆芳,在读硕士,从事抗肿瘤药理与药物研究, E-mail: 614179539@qq.com

[通信作者] *陶玲,教授,从事药物新剂型与新技术研究, E-mail: 649511230@qq.com;

*周威,教授,博士,从事抗肿瘤药物研究与开发, E-mail: drwzhou@126.com

MaxQuant 1.6.5.0 was used for database retrieval. Label-free proteomics with high resolution mass spectrometry was used to screen differentially expressed proteins between the model group of 4T1 breast cancer mice and oral administration group of tryptanthrin ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). The proteomics of tryptanthrin against breast cancer was carried out. **Result:** A total of 3 997 proteins were identified in this proteomics research, and 2 911 proteins were quantifiable. A total of 750 differentially expressed proteins were identified between the model group and the tryptanthrin group, 286 proteins were up-regulated and 464 proteins were down-regulated. Gene ontology analysis showed that these differentially expressed proteins were mainly involved in biological processes of proliferation, cell migration, apoptosis, immunity, angiogenesis, inflammatory regulation, etc. Kyoto encyclopedia of genes and genomes pathway analysis further indicated that these proteins were mainly concentrated in T cell receptors, B cell receptors, Toll-like receptors, nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B), Ras proteins, interleukin-17, tumor necrosis factor, phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K-Akt), mitogen-activated protein kinase (MAPK) and other signaling pathways. **Conclusion:** The differentially expressed proteins closely related to anti-breast cancer effect of tryptanthrin on 4T1 breast cancer mice are effectively screened out, including up-regulating proteins of leukocyte differentiation antigen 14 (CD14), prostaglandin G/H synthase 2 (PTGS2), E3 ubiquitin-protein ligase and down-regulating proteins of CD44, heat shock 70 kDa protein 1A (HSPA1A), macrophage migration inhibitory factor (MIF), NF- κ B, ribosomal protein S6 kinase alpha-4 (RPS6KA4) and high mobility group protein B1 (HMGB1). These findings suggest that tryptanthrin can inhibit breast cancer in mice mainly through regulating tumor inflammatory microenvironment.

[Key words] tryptanthrin; breast cancer; 4T1 cells; proteomics; differentially expressed protein; tumor inflammatory microenvironment; pharmacological effects

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,在欧美发达国家的患者中,乳腺癌居首位^[1],并且有研究表明转移和侵袭是乳腺癌致死的主要诱因^[2]。而内源性雌激素和生活方式诱发的致癌刺激(如吸烟、饮酒)会促进乳腺癌的发生与进展。雌激素受体(ER),孕酮受体和人类表皮生长因子受体2(HER2)的表达则是乳腺癌进展的驱动因素和治疗反应的决定因素。磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(PI3K/Akt/mTOR)等途径的激活都与乳腺癌的治疗抗性有关。目前对于乳腺癌的治疗主要包括放化疗和手术治疗,但随着治疗水平的不断发展,乳腺癌患者越来越容易产生不同程度的耐药反应,使治疗效果降低。因此,寻找有效的乳腺癌治疗靶点、新颖的先导化合物具有重要的现实意义。色胺酮是一种天然吡啶喹啉二酮类生物碱,本课题组前期研究发现色胺酮可以显著抑制人乳腺癌细胞MCF-7的增殖和侵袭^[3],抑制4T1乳腺癌小鼠体内肿瘤的生长,但其具体的药理作用机制并不清楚。

蛋白质组学是一项基于质谱、肽鉴定和生物信息学分析为一体的高通量测序技术,能够定性定量检测复杂生物样本中的目标蛋白,绘制不同情况下

的翻译后蛋白质修饰图,可实现蛋白质的整体研究,从而深入了解生物系统中的生理功能、药物对机体的调控作用等,其已成为现代生物医学研究的一个重要组成部分^[4-5]。非标记定量(Label-free)蛋白质组学技术因对待测蛋白样本筛查要求量低、筛选范围广、对样本的操作简便、无需昂贵的同位素标记试剂、不受样本条件的限制而最接近原始状态,并且其绝对定量数据来自蛋白质质谱原始数据的计算标准化,从而克服了标记定量技术对多样本定量方面的缺陷,已经被成功应用到药学科研工作中^[6-7]。本研究将采用Label-free蛋白质组学技术研究连续给予4T1乳腺癌小鼠色胺酮治疗后小鼠体内的差异表达蛋白,进行蛋白质定性、定量分析,探讨色胺酮抑制4T1乳腺癌小鼠体内肿瘤的作用机制。

1 材料

NanoElute™ Nano-Flow UPLC/timsTOF Pro 纳升级超高效液相色谱-捕集离子淌度飞行时间质谱联用仪(美国Bruker公司),AY-120型1/1万电子天平(日本岛津公司),TGL-16G型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂)。色胺酮(自制,纯度>99.0%),1640培养基和胰蛋白酶(美国Gibco公司,批号分别为8119161,1951208);二喹啉甲酸(BCA)

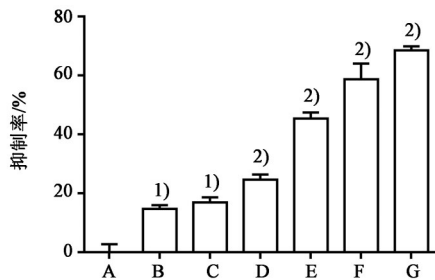
蛋白定量试剂盒,蛋白酶抑制剂,二甲基亚砜(DMSO),彩虹广谱蛋白Marker和噻唑蓝(MTT)(北京Solarbio公司,批号分别为20180816,20170621,1213C02222,20170302,804w054);胎牛血清(德国SeraPro公司,批号1P1701),水为超纯水,乙腈、甲醇为色谱级,其他试剂均为分析纯。

4T1小鼠乳腺癌细胞系购自武汉益普生物科技有限公司,传代数5代以内。SPF级BALB/c雌性小鼠,体质量18~22 g,由贵州医科大学实验动物中心提供,合格证号SCXK(京)2016-0002。所有试验小鼠均饲养在贵州医科大学基础医学院动物实验室,本实验中所有操作均遵循贵州省实验动物伦理委员会的规定,并经贵州医科大学动物护理和使用委员会审查批准。

2 方法与结果

2.1 色胺酮对4T1乳腺癌细胞和4T1乳腺癌小鼠肿瘤的影响

4T1小鼠乳腺癌细胞采用含10%胎牛血清的1640培养液培养,2~3 d传代1次。取对数生长期的4T1细胞,以 8×10^3 个/孔的密度接种于96孔板中,每孔100 μL ,设置6个复孔,于37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 的细胞培养箱中培养,分别加入1.56,3.13,6.25,12.5,25.0,50.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 色胺酮培养液(含0.1% DMSO)100 μL ,空白组给予含0.1% DMSO的1640培养液,于细胞培养箱中孵育24 h,每孔加入5% MTT溶液15 μL ,轻微混匀,继续培养4 h后弃去上清液,每孔加入DMSO 150 μL ,常温震荡10 min以溶解结晶,于490 nm处测定吸光度 A ,计算肿瘤细胞抑制率,计算公式为抑制率= $(A_{\text{空白组}} - A_{\text{实验组}}) / A_{\text{空白组}} \times 100\%$,绘制抑制曲线,见图1。结果发现与空白组比较,不同浓度色胺酮对4T1细胞增殖的抑制率显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),并呈剂量依赖性。

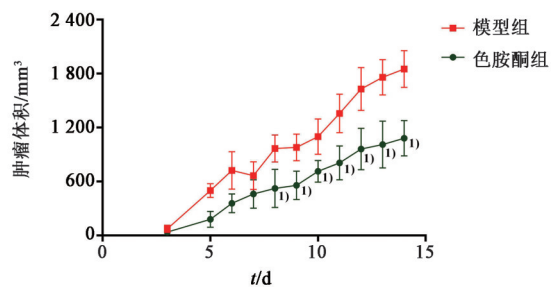


A. 空白组; B. 浓度1.56 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 色胺酮组; C. 浓度3.13 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 色胺酮组; D. 浓度6.25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 色胺酮组; E. 浓度12.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 色胺酮组; F. 浓度25.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 色胺酮组; G. 浓度50.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 色胺酮组; 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

图1 不同浓度色胺酮对4T1乳腺癌细胞的抑制曲线($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 1 Inhibition curves of different concentrations of tryptanthrin on 4T1 breast cancer cells($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

将处于对数生长期的4T1细胞以设定密度为 1×10^6 个/mL的细胞悬液接种于BALB/c小鼠右前肢,每只0.1 mL。当成瘤大小约100 mm^3 后对荷瘤小鼠随机分组,包括模型组(给予0.5% CMC-Na)和色胺酮组(给药剂量为100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),每日灌胃给药1次(色胺酮药液含0.5% CMC-Na),用游标卡尺测量荷瘤小鼠在体肿瘤组织的长径(a)和短径(b),按公式 $V_T = 1/2 \times a \times b^2$ 计算肿瘤组织体积(V_T),记录,连续14 d,见图2。结果发现与模型组比较,从第8天开始,色胺酮组对4T1乳腺癌小鼠的肿瘤生长体积有明显抑制作用($P < 0.05$)。



与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$

图2 色胺酮作用下4T1乳腺癌小鼠的肿瘤组织体积变化曲线($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 2 Change curves of tumor tissue volume of 4T1 breast cancer mice under medication of tryptanthrin($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

2.2 生物组织收集

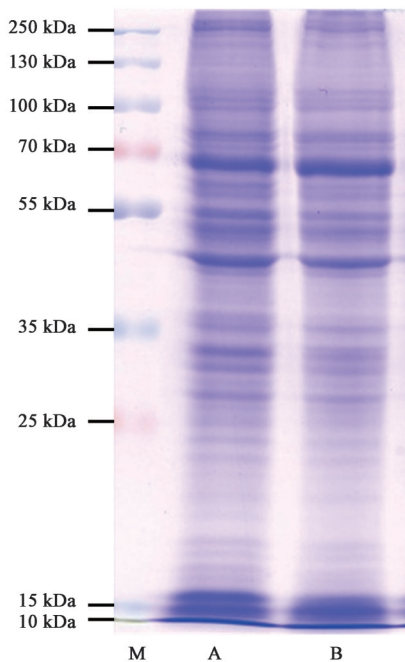
考察色胺酮对4T1乳腺癌小鼠肿瘤组织的影响,连续给予色胺酮治疗14 d后,用4%水合氯醛以0.01 $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 的浓度麻醉4T1乳腺癌小鼠,颈椎脱臼实施安乐死,取出肿瘤组织,于温度-80 $^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱中保存备用。

2.3 肿瘤组织总蛋白的电泳分析

临用前,将相同量肿瘤组织样品从冰箱中取出,称取适量至液氮预冷的研钵中,加液氮充分研磨成粉末。各组样品分别加入4倍量裂解缓冲液(8 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素,1%蛋白酶抑制剂),超声裂解,于4 $^{\circ}\text{C}$,12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min(离心半径5 cm)去除细胞碎片,上清液转移至新的离心管,利用BCA试剂盒测定蛋白浓度,结果发现蛋白提取率及其浓度均符合蛋白质组学测试要求。通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)对2组样品进行检测,结果发现2组样品之间平行度较好,蛋白条带清晰,可用于Label-free蛋白质组学分析,见图3。

2.4 蛋白质样品的制备

4T1乳腺癌小鼠肿瘤组织的提取、裂解及定量分析方法与2.3项相同。分别向待测蛋白样品溶液中加入终浓度5.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二硫苏糖醇,于温度56 $^{\circ}\text{C}$ 还原30 min。加入终浓度



M. 彩虹广谱蛋白Marker; A. 模型组; B. 色胺酮组

图3 4T1乳腺癌小鼠肿瘤组织总蛋白的SDS-PAGE

Fig. 3 SDS-PAGE of total proteins in tumor tissues of 4T1 breast cancer mice

11.0 mmol·L⁻¹碘代乙酰胺,于室温避光烷基化处理15 min。通过加入100 mmol·L⁻¹四乙基溴化铵缓冲液(TEAB),将样品中尿素浓度稀释至<2.0 mol·L⁻¹。以胰蛋白酶-蛋白(1:50)的体积比例加入胰蛋白酶,于37℃酶解过夜,以胰蛋白酶-蛋白(1:100)的体积比例加入胰蛋白酶,继续酶解4 h。将样品脱盐,真空干燥,加0.1%甲酸使溶解,待分析。

2.5 色谱条件 Ionoptics nano UPLC C₁₈ 色谱柱(0.075 mm×250 mm, 1.6 μm),流动相选择0.1%甲酸水溶液(A)-0.1%甲酸乙腈溶液(B)进行梯度洗脱(0~44 min, 6%~22%B; 44~54 min, 22%~35%B; 54~57 min, 35%~80%B; 57~60 min, 80%B),流速设定0.3 μL·min⁻¹,柱温55℃,进样量2 μL。

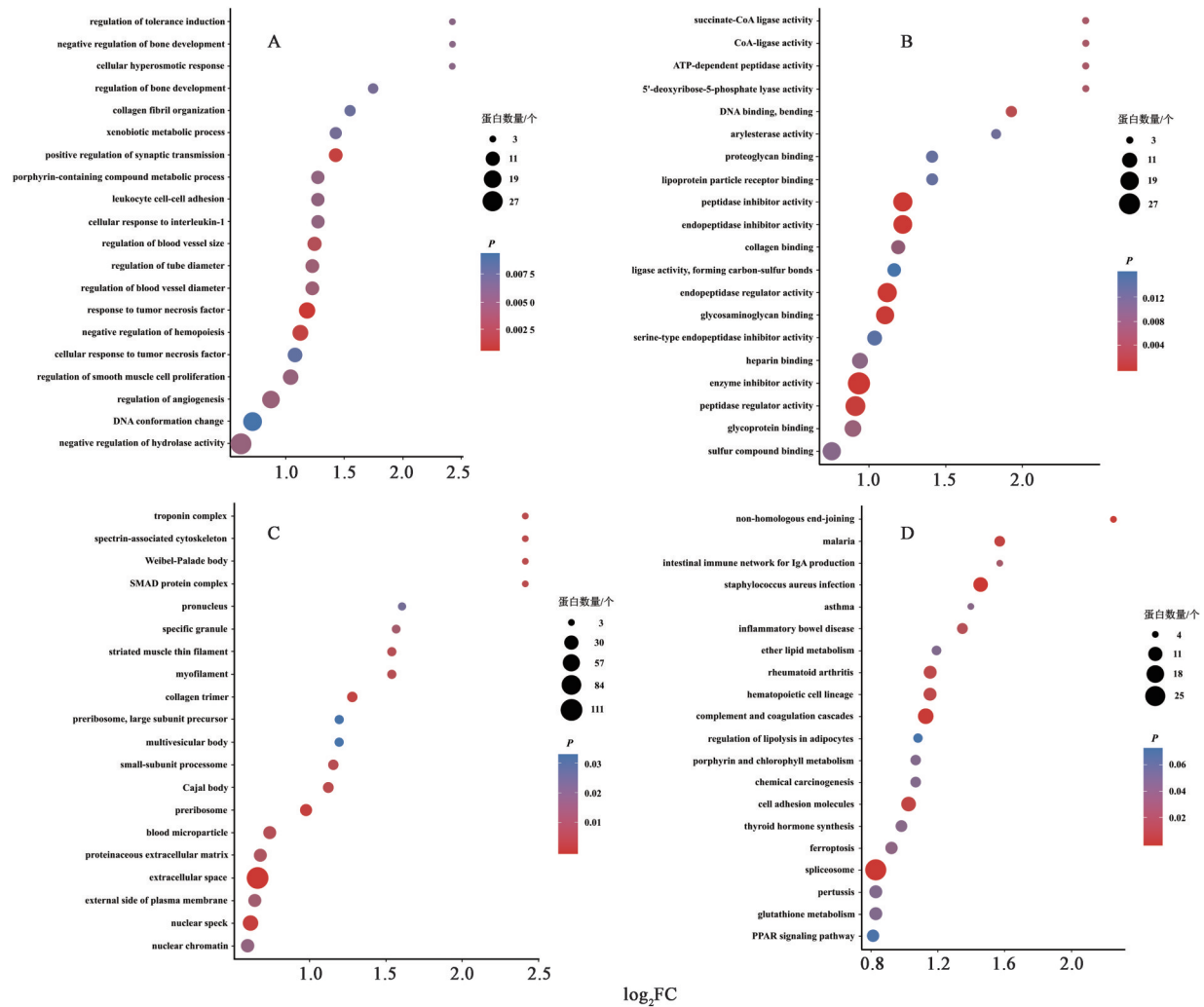
2.6 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),在正离子模式下采集数据,离子源电压1.4 kV,质谱扫描范围m/z 100~1 700,隔离窗口m/z 2~3,离子信号强度阈值2万个/s,利用平行累积串行碎裂(PASEF)模式进行数据采集,淌度释放时间(ramping times)100 ms,串联质谱扫描的动态排除时间24 s(避免母离子重复扫描),每张一级质谱采集后进行10次PASEF模式采集母离子电荷数在0~5个的二级谱图。

2.7 差异表达蛋白与生物信息学分析 对检测得到的高分辨质谱数据,使用MaxQuant 1.6.5.0在Swiss-Port数据库(*Mus musculus*, 16 992条序列)进

行检索。酶切方式 trypsin/P,漏切位点数设为2, first search 和 main search 的一级母离子质量误差容忍度均为70 ppm,二级碎片离子的质量误差容忍度为0.02 Da。蛋白鉴定和肽段-谱图匹配(PSM)鉴定的错误发现率(FDR)均设为1%^[8-9]。对色胺酮组和模型组4T1乳腺癌小鼠肿瘤组织的整体蛋白质进行定量分析,共鉴定得到3 997个蛋白,其中2 911个可定量,上述两组蛋白定量分析的差异倍数(fold change, FC)>1.5为上调,<1/1.5为下调。结果发现模型组与色胺酮组共有750个差异表达蛋白,其中286个蛋白上调,464个蛋白下调。对差异表达蛋白进行基因本体(GO)分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路分析。GO分析包括生物过程(BP),分子功能(MF)和细胞组成(CC)。BP分析发现这些蛋白主要涉及细胞对肿瘤坏死因子(TNF)的反应(cellular response to tumor necrosis factor),突触传递的正调节(positive regulation of synaptic transmission),细胞对白细胞介素-1(IL-1)的反应(cellular response to interleukin-1)等,见图4(A)。差异蛋白涉及的MF包括肽酶抑制剂活性(peptidase inhibitor activity),内肽酶抑制剂活性(endopeptidase inhibitor activity),酶抑制剂活性(enzyme inhibitor activity)等,见图4(B)。CC分析表明差异蛋白主要位于胞外空间(extracellular space)和核小斑(nuclear speck)中,见图4(C)。通过KEGG通路分析对750个差异蛋白进行检索后发现,这些蛋白共参与调控了44个信号转导通路,其中包括拼接体(spliceosome),细胞死亡(ferroptosis),炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD),过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)信号通路等,见图4(D)。

2.7.1 与炎症相关的蛋白 本课题组前期研究发现,色胺酮通过调控丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路来抑制人乳腺癌MCF-7细胞的增殖,通过影响体内炎症微环境来发挥抗小鼠体内乳腺癌的作用^[3]。对检测出的750个差异表达蛋白进行系统分析,筛选出9个与炎症相关的蛋白,其中明显上调的蛋白有3个,下调的蛋白有6个,见表1。

2.7.2 炎症相关抗乳腺癌的部分上调蛋白 PTGS2是一种有效的促炎酶,俗称环氧合酶2(COX-2)。PTGS2负责炎症前列腺素的产生,PTGS2的上调与细胞黏附增加、表型改变和血管生成呈正相关^[10]。研究数据显示色胺酮组PTGS2的表达与模型组比较显著增加,可能是通过影响血管生成等途径发挥



A. 生物过程; B. 分子功能; C. 细胞组成; D. 差异蛋白质

图 4 色胺酮抑制小鼠乳腺癌的生物信息学分析

Fig. 4 Bioinformatics analysis of tryptanthrin inhibiting breast cancer in mice

抗乳腺癌的作用。泛素蛋白连接酶 E3 在炎症调节中起着至关重要的作用,其定位在细胞核中,细胞内大量基因编码的蛋白,例如 p53 和 c-Myc,通过泛素蛋白连接酶 E3 介导的泛素-蛋白酶体系统降解,进而影响肿瘤的发生与发展^[11]。泛素连接酶 E3 在色胺酮组小鼠肿瘤组织中的表达较模型组高,提示该酶可能不是色胺酮抗乳腺癌的主要信号通路的靶点蛋白。

2.7.3 炎症相关抗乳腺癌的下调蛋白 CD44 是一种分布广泛的跨膜糖蛋白,在细胞-细胞相互作用、细胞黏附和迁移中发挥作用。其作为生长/阻滞传感器、血管生成和侵袭的抑制剂,能够感知和响应组织微环境的变化,从而参与多种多样的细胞和生理过程,包括活化、造血、炎症和对细菌感染的反应^[12]。近年研究证实,CD44 在乳腺癌、胃肠道肿瘤和泌尿系统肿瘤等恶性肿瘤中表达增加,且可通过

PI3K/Akt 和 Ras-MAPK 等信号通路来调节乳腺癌细胞的增殖和侵袭^[13];此外,CD44 还是检测乳腺癌与良性乳腺肿瘤的诊断指标^[14]。色胺酮组中 CD44 的表达较模型组显著降低,提示色胺酮可能通过降低 CD44 的表达来抑制乳腺癌细胞的增殖和侵袭。

HSPA1A 是涉及多种细胞过程的分子伴侣。据报道,HSPA1A 在恶性胸膜间皮瘤中的表达升高,是其生物标志物或治疗靶点^[15]。色胺酮组中该蛋白的表达明显低于模型组,说明色胺酮治疗乳腺癌可能是通过下调 HSPA1A 的表达起作用的。MIF 是一种多效炎症细胞因子,参与了许多细胞过程,还能够促进癌症的发生。经研究发现,MIF 基因不仅在人乳腺癌 MCF-7 细胞中明显上调,在头颈癌、肝癌、卵巢癌和其他恶性肿瘤中的表达也在增加^[16]。与模型组相比,色胺酮组 MIF 的表达明显下调,说明色胺酮发挥抗肿瘤作用有可能是通过对

表 1 色胺酮调节 4T1 乳腺癌小鼠炎症的相关差异表达蛋白
Table 1 Differentially expressed proteins related to tryptanthrin for regulating inflammation of 4T1 breast cancer mice

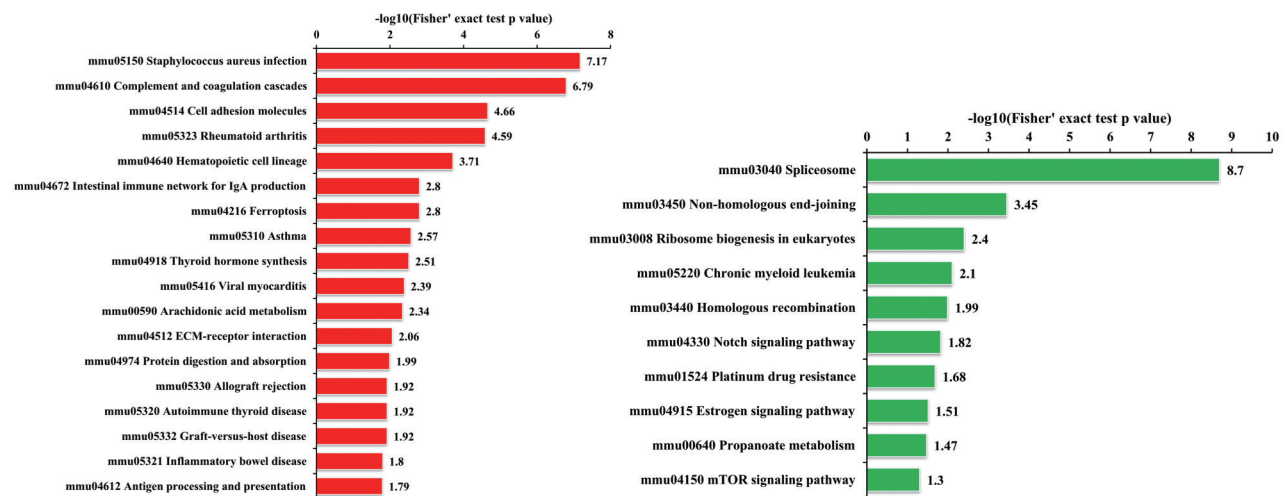
编号	蛋白	差异倍数(色胺酮组/模型组)
Q05769	前列腺素 G/H 合酶 2 (prostaglandin G/H synthase 2, PTGS2)	2.160
Q8C863	泛素蛋白连接酶 E3 (E3 ubiquitin-protein ligase)	1.999
P10810	白细胞分化抗原 14 (leukocyte differentiation antigen 14, CD14)	1.513
P15379	CD44	0.643
Q61696	70 kDa 热休克蛋白 1A (heat shock 70 kDa protein 1A, HSPA1A)	0.643
P34884	巨噬细胞移动抑制因子 (macrophage migration inhibitory factor, MIF)	0.601
Q04207	核转录因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)	0.580
Q9Z2B9	核糖体蛋白 S6 激酶 α -4 (ribosomal protein S6 kinase alpha-4, RPS6KA4)	0.576
P63158	高迁移率蛋白 B1 (high mobility group protein B1, HMGB1)	0.558

MIF 进行负调控实现的。NF- κ B 是大部分细胞类型中都存在的多效性转录因子,也是一系列信号转导事件的终点,参与了许多生物学过程。炎症、免疫、细胞生长、肿瘤发生和凋亡等能够刺激引发 NF- κ B 的大量产生^[17-18]。研究表明 NF- κ B 在乳腺癌恶性转化之前出现明显的转录活性增加,此恶性转化是 NF- κ B 抑制蛋白(I κ B)激酶 ϵ (IKK ϵ)通过激活的 NF- κ B 所介导的^[19]。由图 5 的 KEGG 通路分析可知,NF- κ B 信号的级联放大与 T 细胞受体, B 细胞受体, Toll 样受体, IL-17, Ras, TNF, PI3K-Akt 和

MAPK 信号通路相互作用,共同调节 NF- κ B 的转录活性。色胺酮组中 NF- κ B 的表达较模型组明显下调,表明色胺酮可能通过抑制 NF- κ B 蛋白表达和 NF- κ B 信号通路来抑制小鼠乳腺癌的增长,从而发挥其抗肿瘤作用。RPS6KA4 也称 MSK2,是丝裂原或应激诱导的转录因子环磷腺苷效应元件结合蛋白(CREB)和转录激活因子 1(ATF1)磷酸化,以及 NF- κ B 调节所必需的,通过组蛋白磷酸化促进基因激活,并在炎症基因调节中发挥作用^[20]。RPS6KA4 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,其表现出促进许多不同类型肿瘤生长和转移的表型,目前研究证实 RPS6KA4 在体外和体内宫颈癌细胞中的表达均显著上调^[21]。色胺酮组中 RPS6KA4 蛋白的表达较模型组低,表明色胺酮可能通过负调控 RPS6KA4 的表达来发挥抗乳腺癌的作用。HMGB1 是染色体蛋白家族中广泛表达的成员,其通过与特定的脱氧核糖核酸结构相互作用或在被各种脱氧核糖核酸结合蛋白募集后发挥其功能。HMGB1 作为促炎细胞因子可以通过诱导不同来源内皮细胞中 MAPK/细胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2)活化、细胞增殖和趋化性来发挥促血管生成作用^[22]。在色胺酮组中 HMGB1 蛋白的表达比模型组低,提示色胺酮可能通过抑制促炎因子 HMGB1 的表达来发挥其抗炎、抗肿瘤作用。

3 讨论

有研究报道显示,色胺酮及其衍生物具有很好的抗肿瘤、抗炎活性,拥有良好的安全性和新药开发前景^[23-24]。近年来,蛋白质组学技术已陆续出现在乳腺癌的机制研究领域。例如,WANG 等^[25]分析



红色条代表上调的蛋白质,绿色条代表下调的蛋白质

图 5 色胺酮抑制小鼠乳腺癌的差异表达蛋白的 KEGG 注释

Fig. 5 KEGG annotation of differentially expressed proteins of tryptanthrin inhibiting breast cancer in mice

鼠尾草酸处理的RAW264.7细胞,发现鼠尾草酸对217个脂多糖诱导的蛋白进行负调控,这些蛋白参与了多种炎症过程,涉及MAPK, NF- κ B和叉头框蛋白O(FoxO)信号通路,并通过实验进一步证实鼠尾草酸通过IKK β /I κ B- α /NF- κ B, ERK/c-Jun氨基末端激酶(JNK)/p38 MAPK和FoxO1/3信号通路有效抑制炎症的发生和发展。对人参皂苷提取物处理的非小细胞肺癌A549细胞系进行定量蛋白质组学和磷酸化修饰组学分析^[8],发现Ras蛋白在多个功能途径中都起到了调节作用,并且可能是人参皂苷中化合物的直接靶蛋白。除此之外,研究人员利用亲和质谱技术还筛选出了3个Ras结合配体,分别为20(S)-原人参二醇[20(S)-PPD], 20(S)-人参皂苷Rh₂[20(S)-Rh₂]和20(S)-人参皂苷Rg₃[20(S)-Rg₃]。基于前期研究,明确了色胺酮抗乳腺癌的部分作用机制,本研究通过建立4T1乳腺癌小鼠模型,给予色胺酮治疗^[26],对发现的750个差异表达蛋白进行了比较和筛选,展开生物信息学分析。KEGG通路分析筛选出的差异表达蛋白参与到了T细胞受体, B细胞受体, Toll样受体等信号通路中。通过对差异蛋白进一步分析后发现,色胺酮能够通过上调CD14, PTGS2, 泛素蛋白连接酶E3和下调CD44, HSPA1A, MIF等与炎症相关的蛋白起到抗体内乳腺癌的作用。

CD14是脂多糖的共受体,已知与脂多糖和脂多糖结合蛋白结合,并且在免疫细胞中广泛表达^[27]。有研究表明,在乳腺癌患者中CD14⁺细胞表达水平显著低于正常人的水平,并且CD14⁺细胞的表达率与肿瘤组织细胞凋亡检出率呈正相关,是肿瘤快速复发的重要危险因素,这也进一步说明了肿瘤局部组织中细胞凋亡可能是巨噬细胞和细胞毒性T细胞杀伤肿瘤细胞的一个重要方式^[28]。色胺酮组中CD14蛋白的水平较模型组显著升高,说明色胺酮通过上调CD14蛋白的表达来促进肿瘤组织细胞的凋亡,从而抑制肿瘤细胞的增殖。通过KEGG通路分析得到,CD14通过调控Toll样受体, NF- κ B, MAPK等信号通路来调节肿瘤细胞的增殖。CD44是乳腺癌干细胞的一个常见标志, Al-OTHMAN等^[29]通过对CD44的研究发现,其在结肠癌、直肠癌、非小细胞肺癌、胰腺癌和乳腺癌等肿瘤中都过度表达,并且与预后不良、存活率较低密切相关。研究表明放疗6周后血清内游离HSPA1A水平的纵向升高和自然杀伤细胞计数的下降可能预示乳腺癌患者预后不良^[30]。MIF与乳腺癌等几种癌症的

癌症风险增加呈正相关^[31]。NF- κ B一直是药理学研究的热点,广泛参与了调控免疫、炎症、癌症过程,已有多项研究证明NF- κ B在乳腺癌中呈过度活化趋势,可作为乳腺癌治疗的重要分子靶标。WU等^[21]研究发现RPS6KA4能够促进不同类型肿瘤的生长和转移,在体内和体外宫颈癌细胞中显著表达。HMGB1蛋白在乳腺癌中呈高表达状态^[32],而在乳腺纤维腺瘤和癌旁正常组织中弱表达。

综上所述,本研究结果提示色胺酮可能通过调节肿瘤炎症微环境来发挥抗乳腺癌作用,涉及不同信号通路和蛋白靶点,有待后续进一步验证。

[参考文献]

- [1] CADET M J. Comparing the various breast cancer screening guidelines [J]. J Nurse Pract, 2019, 15(8): 574-578.
- [2] CARDOSO F, FALLOWFIELD L, COSTA A, et al. Locally recurrent or metastatic breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up [J]. Ann Oncol, 2011, 22(Suppl 6): v15-v19.
- [3] 周威, 曾庆芳, LAI D, 等. 色胺酮通过丝裂原活化蛋白激酶信号通路对人乳腺癌MCF-7细胞增殖的影响 [J]. 中国药理学杂志, 2019, 54(9): 693-698.
- [4] MIAH S, BANKS C A, ADAMS M K, et al. Advancement of mass spectrometry-based proteomics technologies to explore triple negative breast cancer [J]. Mol Biosyst, 2016, 13(1): 42-55.
- [5] MARDAMSHINA M, GEIGER T. Next-generation proteomics and its application to clinical breast cancer research [J]. Am J Pathol, 2017, 187(10): 2175-2184.
- [6] LIU W H, YUAN J B, CHANG J X. Label-free quantitative proteomics for investigation of signaling pathways of GATA6 regulating trastuzumab resistance in gastric cancer cells [J]. Chin J Anal Chem, 2020, 48(2): 187-196.
- [7] 杨晓伟, 张银环, 段飞鹏, 等. 基于Label-free蛋白质组学技术研究大黄素致大鼠肝损伤作用机制 [J]. 世界中医药, 2019, 14(2): 320-325.
- [8] WANG Z H, KIM U, JIAO Y T, et al. Quantitative proteomics combined with affinity MS revealed the molecular mechanism of ginsenoside antitumor effects [J]. J Proteome Res, 2019, 18(5): 2100-2108.
- [9] LAGOUTTE R, SERBA C, ABEGG D, et al. Divergent synthesis and identification of the cellular targets of deoxyelephantopins [J]. Nat Commun, 2016, 7: 12470.
- [10] MARKOSYAN N, LI J Y, SUN Y H, et al. Tumor cell-

- intrinsic EPHA2 suppresses antitumor immunity by regulating PTGS2 (COX-2) [J]. *J Clin Invest*, 2019, 130(9):3594-3609.
- [11] 谢少利, 刘家有, 王碧娟, 等. 泛素蛋白连接酶E3A在乳腺癌细胞中作用的蛋白质组学与生物信息学分析[J]. *中国普通外科志*, 2019, 28(5):590-596.
- [12] 王倩, 劳淑贞, 朴金松, 等. 乳腺良恶性肿瘤组织中CD44的表达及其与淋巴管生成的关系[J]. *现代检验医学杂志*, 2018, 33(4):16-19.
- [13] OUHTIT A, RIZEQ B, SALEH H A, et al. Novel CD44-downstream signaling pathways mediating breast tumor invasion[J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14(13):1782-1790.
- [14] STRATI A, NIKOLAOU M, GEORGOULIAS V, et al. Prognostic significance of *TWIST1*, *CD24*, *CD44*, and *ALDH1* transcript quantification in EpCAM-Positive circulating tumor cells from early stage breast cancer patients[J]. *Cells*, 2019, 8(7):652.
- [15] KURAMITSU Y, TOMINAGA W, BARON B, et al. 106p Proteomic analysis showed heat shock 70 kDa protein and 78 kDa glucose-regulated protein were upregulated in human malignant pleural mesothelioma cells[J]. *Lung Cancer*, 2013, 80(1):S46-S48.
- [16] RICHARD V, KINDT N, SAUSSEZ S. Macrophage migration inhibitory factor involvement in breast cancer (Review) [J]. *Int J Oncol*, 2015, 47(5):1627-1633.
- [17] NICOLINI A, FERRARI P, DIODATI L, et al. Alterations of signaling pathways related to the immune system in breast cancer: new perspectives in patient management [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(9):2733.
- [18] PARK Y H. The nuclear factor-kappa B pathway and response to treatment in breast cancer [J]. *Pharmacogenomics*, 2017, 18(18):1697-1709.
- [19] 包立豪, 房林. NF- κ B信号通路在乳腺癌发生及发展中作用的研究进展[J]. *同济大学学报:医学版*, 2017, 38(3):128-132.
- [20] WIGGIN G R, SOLOAGA A, FOSTER J M, et al. MSK1 and MSK2 are required for the mitogen-and stress-induced phosphorylation of CREB and ATF1 in fibroblasts[J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(8):2871-2881.
- [21] WU Y L, LI H M, WANG H, et al. MSK2 promotes proliferation and tumor formation in squamous cervical cancer via PAX8/RB-E2F1/cyclin A2 axis [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(7):11432-11440.
- [22] MITOLA S, BELLERI M, URBINATI C, et al. Cutting edge: extracellular high mobility group box-1 protein is a proangiogenic cytokine [J]. *J Immunol*, 2006, 176(1):12-15.
- [23] CHANG H N, HUANG S T, YEH Y C, et al. Indigo naturalis and its component tryptanthrin exert anti-angiogenic effect by arresting cell cycle and inhibiting Akt and FAK signaling in human vascular endothelial cells[J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 174:474-481.
- [24] LEE S J, KIM D C, BAEK H Y, et al. Anti-neuroinflammatory effects of tryptanthrin from *Polygonum tinctorium* Lour. in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells [J]. *Arch Pharm Res*, 2018, 41(4):419-430.
- [25] WANG L C, WEI W H, ZHANG X W, et al. An integrated proteomics and bioinformatics approach reveals the anti-inflammatory mechanism of carnosic acid [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9:370.
- [26] ZHANG X Y, XIA J, ZHANG W J, et al. Study on pharmacokinetics and tissue distribution of single dose oral tryptanthrin in Kunming mice by validated reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection [J]. *Integr Med Res*, 2017, 6(3):269-279.
- [27] ZHAO J, HE D H, SU Y L, et al. Lysophosphatidic acid receptor 1 modulates lipopolysaccharide-induced inflammation in alveolar epithelial cells and murine lungs [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2011, 301(4):L547-L556.
- [28] 王书奎, 王自正, 夏伟, 等. 乳腺癌100例患者肿瘤组织CD14⁺和CD8⁺/CD28⁺细胞的检测[J]. *南京医科大学学报*, 2002, 22(5):442-443.
- [29] AL-OTHMAN N, ALHENDI A, IHBAISHA M, et al. Role of CD44 in breast cancer [J]. *Breast Dis*, 2020, 39(1):1-13.
- [30] ROTHAMMER A, SAGE E K, WERNER C, et al. Increased heat shock protein 70 (Hsp70) serum levels and low NK cell counts after radiotherapy-potential markers for predicting breast cancer recurrence? [J]. *Radiat Oncol*, 2019, 14(1):78.
- [31] AVALOS-NAVARRO G, MUÑOZ-VALLE J F, DANERI-NAVARRO A, et al. Circulating soluble levels of MIF in women with breast cancer in the molecular subtypes: relationship with Th17 cytokine profile [J]. *Clin Exp Med*, 2019, 19(3):385-391.
- [32] 南卓, 国麒麟, 焦成斌. HMGB1在乳腺癌中的表达水平及临床意义[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(44):177-180.

[责任编辑 刘德文]