

TAB1——基于蛋白质组学的卵巢癌紫杉醇耐药的潜在生物标志物探讨

丁亚伟^{1,2}, 陈君君³, 张湘奇³, 张葳¹, 周丽¹, 孔欠文³, 石美智³, 姜波³, 周阳云³,
汪晓河³, 许剑锋^{1,2}, 韩永龙^{3*}, 杨姣^{3*}

(1. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306; 2. 农业部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室, 上海 201306; 3. 上海交通大学附属第六人民医院, 上海 200233)

[摘要] 目的:探究卵巢癌对紫杉醇(PTX)耐药的潜在靶点及其相关机制。方法:体外培养卵巢癌A2780细胞和A2780PTX耐药细胞(A2780/T),采用不同浓度(2,4,8,16,32,64,128,256 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)PTX分别干预24 h或48 h,噻唑蓝(MTT)比色法检测PTX对A2780细胞和A2780/T细胞存活率的影响,利用液相色谱质谱/质谱(LC-MS/MS)非标记(Label-Free)定量蛋白质组学方法鉴定和筛选两组细胞中表达差异的蛋白,通过基因本体(GO)注释和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路分析,筛选卵巢癌细胞对PTX耐药的潜在生物标志物。以正常培养的A2780细胞作为空白组,采用0,1,4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的PTX处理A2780/T细胞,采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测验证潜在靶点转化生长因子- β 活化激酶1结合蛋白1(TAB1)及其下游相关分子转化生长因子- β 活化激酶1(TAK1),p38有丝分裂活化蛋白激酶(MAPK) mRNA和蛋白的表达水平。结果:与空白组比较,PTX干预组的A2780和A2780/T细胞的活力均降低。PTX对A2780细胞的抑制率明显高于A2780/T细胞。A2780细胞中,PTX处理48 h的半抑制浓度(IC_{50})为0.002 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,A2780/T细胞中,PTX的 IC_{50} >设置的最高浓度128 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,与A2780细胞相比,A2780/T细胞对PTX具有耐药性。通过非标记定量蛋白质组学分析筛选出A2780/T和A2780细胞之间有441种差异表达蛋白和421种特殊差异表达蛋白。GO功能富集分析显示,在差异表达的蛋白质中,结合蛋白占大多数(80%)。根据KEGG通路分析结果和表达位点分析,TAB1被认为可能是卵巢癌对PTX耐药的潜在生物标志物。与A2780细胞比较,A2780/T细胞的TAB1 mRNA和蛋白表达显著降低($P<0.01$),与TAB1相互作用的TAK1 mRNA和p38 MAPK mRNA亦明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),但蛋白表达无显著变化。结论:TAB1可能是卵巢癌对PTX耐药的潜在生物标志物,其机制可能与TAB1/TAK1/p38 MAPK通路有关。

[关键词] 转化生长因子- β 活化激酶1结合蛋白1(TAB1); 卵巢癌; 紫杉醇耐药; 非标记定量蛋白质组学; 生物信息学

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)08-0168-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210404

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210223.1745.003.html>

[网络出版日期] 2021-2-24 10:20

TAB1——Potential Biomarker of Paclitaxel Resistance in Ovarian Cancer Based on Label-Free Quantitative Proteomics

DING Ya-wei^{1,2}, CHEN Jun-jun³, ZHANG Xiang-qi³, ZHANG Wei¹, ZHOU Li¹,
KONG Qian-wen³, SHI Mei-zhi³, JIANG Bo³, ZHOU Yang-yun³, WANG Xiao-he³,
XU Jian-feng^{1,2}, HAN Yong-long^{3*}, YANG Jiao^{3*}

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

[收稿日期] 20201203(017)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81773949,82003987);上海市自然科学基金项目(20ZR1442400);上海市卫生和计划生育委员会中医药科研课题(2018YP003);上海市浦东新区科技发展基金民生科研专项资金项目(PKJ2020-Y08);上海市第六人民医院医疗集团课题;中国药学会全国医药经济信息网科技传播创新工程(CME12019KPYJ00421)

[第一作者] 丁亚伟,硕士,从事中药肿瘤药理学研究,E-mail:yaweiding@126.com

[通信作者] *韩永龙,博士,主任药师,博士生导师,从事中药药理学、药物代谢与药物动力学研究,E-mail:yonglongh@126.com;

*杨姣,硕士,副主任药师,从事临床药理学、肿瘤药理学研究,Tel:021-38297594,E-mail:yangjiaolily@sohu.com

2. Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Aquatic Product on Storage and Preservation
(Shanghai), Ministry of Agriculture, Shanghai 201306, China;

3. Shanghai Jiao Tong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the potential targets and related mechanism involved in the paclitaxel resistance to ovarian cancer. **Method:** Ovarian cancer A2780 cells and A2780 paclitaxel-resistant cells (A2780/T) were treated by 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ paclitaxel (PTX) for 24 h or 48 h respectively *in vitro*. The proliferation rate of A2780 cells and A2780/T cells treated with paclitaxel was determined by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) colorimetric method assay. A2780 and A2780/T cells were analyzed by LC-MS/MS Label-Free quantitative proteomics to identify and screen differentially expressed proteins in the two groups of cells. Gene ontology (GO) annotation and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway analysis were used to determine the potential biomarkers of paclitaxel resistance in ovarian cancer. Conventionally cultured A2780 cells were used as a control group, and A2780/T cells were treated with 0, 1, 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTX. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot methods were used to detect and verify the mRNA and protein expression levels of potential target transforming growth factor- β -activated kinase 1 binding protein 1 (TAB1) and its downstream related molecules transforming growth factor- β -activated kinase (TAK1) and p38. **Result:** After PTX treatment for 24 h and 48 h, the cell viability of A2780 and A2780/T cells decreased. The inhibitory rate of PTX on A2780 cells was significantly higher than that of A2780/T cells. In A2780 cells, the IC_{50} of PTX treatment for 48 h was 0.002 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, while in A2780/T cells, the IC_{50} of PTX was greater than the maximum concentration of 128 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, indicating that A2780/T cells were resistant to PTX compared with A2780 cells. 441 differentially expressed proteins and 421 special differentially expressed proteins between A2780/T and A2780 cells were screened by label-free quantitative proteomic analysis. GO function enrichment analysis showed that the binding proteins accounted for the majority (80%) among the differentially expressed proteins. According to the results of KEGG pathway analysis and expression site analysis, TAB1 might be a potential biomarker in paclitaxel-resistant ovarian cancer. Compared with A2780 cells, mRNA and protein expression levels of TAB1 in A2780/T cells were significantly reduced ($P<0.01$). mRNA expression of TAK1 and p38 that interacted with TAB1 were also significantly reduced ($P<0.05$, $P<0.01$), while there was no significant change in protein expression. **Conclusion:** TAB1 may be a potential biomarker of paclitaxel resistance to ovarian cancer, and its mechanism may be related to the TAB1/TAK1/p38 MAPK pathway.

[Key words] transforming growth factor- β -activated kinase 1 binding protein 1 (TAB1); ovarian cancer; paclitaxel resistance; label-free quantitative proteomic; bioinformatics

卵巢癌是世界范围内女性最致命的妇科恶性肿瘤。尽管近几十年来手术和化学疗法取得了进步,但其5年生存率仍低于45%^[1]。基于卡铂和紫杉醇(PTX)的化学疗法一直被视为治疗卵巢癌的主要选择^[2]。但是,超过80%的卵巢癌患者会对化疗产生耐药,这已成为卵巢癌患者治疗失败和死亡的主要原因之一^[3]。PTX是一种促进微管聚集和稳定微管的药物,可用于卵巢癌、乳腺癌、肺癌和卡波西氏肉瘤的一线治疗。此外,PTX还用于胃食管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、前列腺癌和头颈癌的治疗^[4]。作为卵巢癌的一线化疗药物,PTX的耐药性限制了

其临床疗效^[5]。研究表明,PTX的耐药机制复杂,包括多药耐药转运蛋白P-糖蛋白(P-gp)的过表达^[6];有效微管蛋白或微管相关蛋白的改变,如微管蛋白 β -3链(TUBB3),微管相关蛋白(Tau)等蛋白^[7-8];纺锤体装配检查点的改变,如有丝分裂检查点丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶1(BUB1),细胞周期蛋白B, (CCNB1),着丝粒相关蛋白E(CENPE),着丝粒蛋白F(CENPF)等蛋白^[9],但逆转卵巢癌对PTX耐药的靶蛋白仍然难以实现。

定量蛋白质组学被证明可在耐药过程中有效地筛选出相关的靶蛋白,相比于传统的二维凝胶电

泳(2D-GE)和液相色谱质谱联用(LC-MS),基于质谱的定量蛋白质组学最近得以兴起。定量蛋白质组学可分为基于标记的方法和基于非标记的方法^[10]。与基于标记的蛋白质组学分析相比,非标记的定量分析具有较低的实验成本、较少的时间消耗、无限制的样品条件以及能够检测数千种具有更宽动态范围的蛋白质能力的优势^[11-12]。因此,非标记定量蛋白质组学技术在生物医学研究中得到了更多的关注^[13]。

为了进一步寻找卵巢癌中PTX耐药的潜在生物标志物,本研究基于液相色谱质谱/质谱(LC-MS/MS)的非标记定量蛋白质组学分析技术,筛选卵巢癌细胞系A2780及其PTX耐药细胞系A2780/T之间差异表达的蛋白质。蛋白质组学分析结果显示,A2780/T和A2780之间有441种差异表达蛋白;其中,A2780/T细胞中有包括转化生长因子- β 活化激酶1(MAP3K7)结合蛋白1(TAB1)在内的227种蛋白质的表达较A2780细胞显著降低。通过实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测验证TAB1 mRNA和蛋白表达与蛋白质组学的一致性结果。此外,与转化生长因子- β 活化激酶1(TAK1)及其下游p38 MAPK也发生了相应变化。本研究结果提示TAB1可能是卵巢癌对PTX耐药的生物标志物,在未来可能成为卵巢癌PTX耐药的潜在预测因子或治疗靶标。

1 材料

1.1 药品与试剂 PTX对照品(中国食品药品检定研究院,批号100382-201603);胎牛血清(FBS),青霉素-链霉素和胰蛋白酶-EDTA(0.25%)(美国Gibco公司,批号分别为1787601,2199826,2046777);DMEM高糖培养基,磷酸盐缓冲液(PBS)(美国Hyclone公司,批号分别为AD17628284,af29485471);噻唑蓝(MTT)粉末(北京Solarbio公司,批号303H0528);聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)蛋白浓度检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号P0010);R401-01 RNA isolater Total RNA提取试剂,R323-01-HiScript[®] III RT SuperMix for Real-time PCR(+gDNA wiper),Q711-03 ChamQ SYBR Real-time PCR Master Mix(南京诺维赞生物公司,批号分别为7E261K8,7E35189,7E320A9);TAB1, TAK1和p38 MAPK兔一抗(美国Abcam公司,批号分别为GR3273233-2,GR190324-23,GR3215674-1); β -肌动蛋白(β -actin)鼠一抗(上海碧云天生物技

术有限公司,批号AF0003);羊抗兔、羊抗鼠二抗(安徽Biosharp公司,批号分别为1292562802,1294572802)。

1.2 细胞 人卵巢癌A2780细胞(北京北纳创联生物技术研究院)、人卵巢癌PTX耐药的A2780/T细胞(上海美轩生物科技有限公司),A2780细胞和A2780/T细胞分别培养于含10% FBS,1%青霉素:链霉素溶液(使青霉素和链霉素终浓度分别为 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的DMEM高糖完全培养基中,A2780/T细胞的培养基中另含 $800 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PTX,培养条件为 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 饱和湿度,2~3 d传代1次,培养2~3代后,取对数生长期细胞进行实验。

1.3 仪器 MCO-18AIC型二氧化碳培养箱(日本Panasonic公司),Microfuge 20R型台式低温离心机(美国Beckman公司),Class II BSC型生物安全柜(新加坡ESCO公司),DMi8型倒置相差荧光显微镜(德国Leica公司),Spectra Max i3x型多功能酶标仪(奥地利Molecular Devices公司),ME203型分析天平(瑞士梅特勒公司),Roche LightCycler[®]480 II型Real-time PCR仪(瑞士Roche公司),Milli-Q型纯水仪(德国Millipore公司),Mini-protean Tetra型蛋白垂直电泳系统(美国Bio-Rad公司),EASY column型C18色谱柱(美国Thermo scientific公司,上样柱, $100 \mu\text{m} \times 2 \text{ cm}$, $5 \mu\text{m}$;分析柱, $75 \mu\text{m} \times 10 \text{ cm}$, $3 \mu\text{m}$)。

2 方法

2.1 MTT比色法检测细胞活力 将A2780和A2780/T细胞以每孔 5×10^3 个的密度分别接种在96孔板中。用不同浓度(2,4,8,16,32,64,128,256 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的PTX处理细胞24 h或48 h。处理后,将培养基换成新鲜培养基,每孔加入MTT溶液10 μL 后继续孵育4 h。弃去上清,加入DMSO 150 μL 振荡10 min,使紫色晶体溶解。用酶标仪测定在490 nm波长下各孔的吸光度 A 。计算细胞活力 $\text{值} = (A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$,细胞活力值越低说明药物抑制率越高。平行实验重复3次。

2.2 LC-MS/MS非标记定量蛋白质组学和生物信息学分析 用于非标记定量蛋白质组学分析的两组样品是A2780组和A2780/T组。样品采用SDT[4% (w/v) SDS, $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris/HCl pH 7.6, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT]裂解法提取蛋白质,通过BCA法对蛋白质进行定量。每个样品取适量蛋白质采用过滤辅助蛋白质组制备(FASP)方法进行胰蛋白酶酶解,然后采用C18 Cartridge对酶解肽段进行脱盐,肽段冻干后加入Dissolution buffer复溶40 μL ,肽段

定量($A_{280\text{nm}}$)。每组包含3个生物学重复。采用纳升流速HPLC液相系统Easy nLC对每份分级样品进行分离。缓冲液由A,B液组合,A液为0.1%甲酸水溶液,B液为0.1%甲酸乙腈水溶液(乙腈为84%),色谱柱以95%的A液平衡,样品由自动进样器上样到上样柱,再经分析柱分离,流速为 $250\text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。相关液相梯度如下0~50 min,B液线性梯度从0%~35%;50~58 min,B液线性梯度从35%~100%;58~60 min,B液维持在100%。

用Q-Exactive质谱仪对经色谱分离后的样品进行质谱分析,分析时长为120 min,检测方式为正离子,母离子扫描范围为 m/z 300~1 800,一级质谱分辨率(m/z 200)为70 000,AGC(automatic gain control) target为 3×10^6 ,Maximum IT为10 ms,动态排除时间(dynamic exclusion)为40.0 s。按照下列方法对多肽和多肽的碎片的质量电荷比进行采集:每次全扫描(full scan)后采集10个碎片图谱(MS2 scan),MS2 Activation Type为HCD,Isolation window为 m/z 2,二级质谱分辨率(m/z 200)为17 500,Normalized collision energy为30 eV,Underfill ratio为0.1%。

质谱测试原始文件(Raw File)用Maxquant软件(版本号1.5.5.1)检索相应数据库,最后得到蛋白质鉴定结果及定量分析结果。利用Omicsbean软件对目标蛋白质集合和总蛋白质集合中各个基因本体(GO)分类或京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路的分布情况进行比较,并对其进行GO注释或KEGG通路注释的富集分析,利用软件R version 3.5.1生成KEGG富集分析气泡图。目标蛋白质相互之间的作用关系基于STRING(<http://string-db.org/>)数据库中的信息进行,生成相互作用网络并对网络进行分析。

2.3 Real-time PCR 检测 TAB1, TAK1, p38 MAPK mRNA 表达水平 将A2780细胞和A2780/T细胞接种在6孔板中,37℃孵育过夜,采用PTX($0, 1, 4\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)孵育24 h。以A2780细胞作为空白组。按照试剂盒说明书,使用trizol试剂提取A2780和A2780/T细胞的总RNA。检测RNA在260,280 nm处的 A ,当 A_{260}/A_{280} 在1.8~2.0时,RNA的质量最佳,可用于mRNA检测。使用HiScript III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)试剂盒将 $1\ \mu\text{g}$ 总RNA配制成 $20\ \mu\text{L}$ 上样体系在PCR仪中按50℃,15 min,85℃,5 s进行逆转录反应。96孔检测板中按照 $20\ \mu\text{L}$ 上样体系加入模板DNA,

$10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物和 $10\ \mu\text{L}$ ChamQ Universal SYBR Real-time PCR Master Mix (High ROX 预混)后 $2\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心2 min,在Real-time PCR仪器中进行Real-time PCR反应。以 β -actin为内参(货号B661102-0001),使用TAB1(上游5'-GATGATTGACACTGAGTTTGCC-3',下游5'-GGTAGCCAAAGTTCCTCACTAG-3',扩增长度170 bp),TAK1(上游5'-GTTTATTGTAGAGCTTCG GCAG-3',下游5'-GGAACACTGTAAACACCAAC TC-3',扩增长度196 bp),p38 MAPK(上游5'-GG CTCCTGAGATCATGCTGAACTG-3',下游5'-AGT CAACAGCTCGGCCATTATGC-3',扩增长度88 bp)的Taq Man mRNA表达引物/探针检测目的mRNA表达水平,所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,并用 $2^{\Delta\Delta Ct}$ 法对结果进行分析。

2.4 Western blot检测 TAB1, TAK1, p38 MAPK 蛋白表达水平 将A2780细胞和A2780/T细胞接种在6孔板中,37℃孵育过夜,采用PTX($0, 1, 4\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理24 h,以A2780细胞作为空白组。作用24 h后,用预冷PBS洗涤1次,随后每孔加入 $200\ \mu\text{L}$ 含1%PMSF的RIPA裂解缓冲液,待冰上裂解30 min后, $12\ 000\times g$ 离心20 min,上清即为总蛋白。用BCA蛋白质测定试剂盒测量蛋白质浓度。将蛋白 $30\ \mu\text{g}$ 通过10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)在60 V,40 min和160 V,40 min的条件下进行分离,然后在100 V下电泳80 min使其转移到硝酸纤维素膜上。在5%脱脂牛奶中封闭2 h后,将硝酸纤维素膜分别与TAB1(1:1 000),TAK1(1:1 000)和p38 MAPK(1:1 000)一抗在4℃孵育过夜,次日PBST洗涤3次,每次10 min,加入羊抗兔或羊抗鼠二抗(1:1万)室温孵育1 h后,PBST洗膜5次,随后通过化学发光检测蛋白条带,用Image J软件进行灰度分析,以 β -actin为内参计算目的蛋白的相对表达量。

2.5 统计学分析 使用Graphpad Prism 7.0软件通过单因素方差分析(One-Way ANOVA)对数据进行统计学分析,实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 PTX 对 A2780 和 A2780/T 细胞增殖的影响 与空白组比较,PTX处理24 h和48 h后,A2780和A2780/T细胞存活率均随着PTX浓度的增高而逐渐降低($P<0.01$)。对于A2780细胞,当PTX浓度高于 $2\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,对细胞存活率的抑制具有显著统计

学意义($P<0.01$),对于A2780/T细胞,当PTX浓度高于 $8\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,对细胞存活率的抑制具有显著统计学意义($P<0.01$),且相同浓度的PTX对A2780细胞的抑制率明显高于A2780/T细胞。在A2780细胞中,PTX处理48 h的半抑制浓度(IC_{50})为 $0.002\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,而在A2780/T细胞中,PTX的 IC_{50} 大于设置的最高浓度 $128\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。结果表明,与A2780细胞比较,A2780/T细胞对PTX具有耐药性。见表1,2。

表1 PTX对卵巢癌A2780细胞存活率的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Effect of paclitaxel on viability of ovarian cancer A2780 cells ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	24 h	48 h
空白		98.398±16.253	99.233±10.354
PTX	2	88.638±11.368	42.075±1.640 ¹⁾
	4	81.283±4.671	37.438±3.174 ¹⁾
	8	82.597±7.133	34.938±2.836 ¹⁾
	64	50.945±11.727 ¹⁾	34.605±8.118 ¹⁾
	128	54.333±3.960 ¹⁾	34.365±4.852 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$ (表1,2同)。

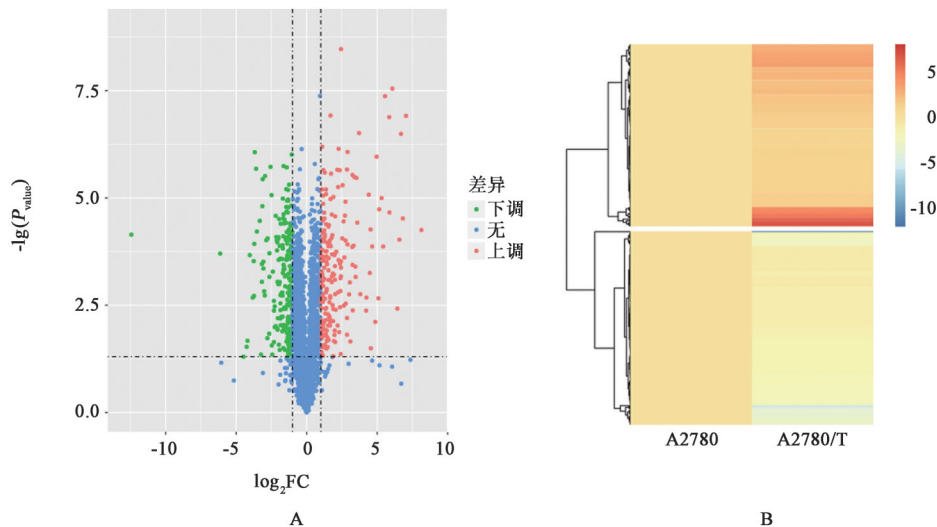
3.2 A2780和A2780/T细胞中差异表达蛋白的鉴定和筛选 通过非标记定量分析法共鉴定出A2780和A2780/T细胞中3522种蛋白。根据蛋白倍数变化大于2倍(上调大于2倍或者下调 <0.5 倍)且 $P<0.05$ 筛选差异表达的蛋白。在A2780/T和A2780之

表2 PTX对卵巢癌PTX耐药A2780/T细胞存活率的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of paclitaxel on viability of paclitaxel-resistant ovarian cancer A2780/T cells ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	24 h	48 h
空白		98.128±3.665	96.270±13.199
PTX	2	99.783±17.441	80.545±12.870
	4	91.315±6.474	81.090±10.169
	8	84.015±17.139	66.818±9.749 ¹⁾
	64	81.235±6.383	60.345±8.971 ¹⁾
	128	65.508±14.789 ¹⁾	48.630±4.329 ¹⁾

间共鉴定出了441个差异表达蛋白;与A2780细胞相比,A2780/T细胞中有214个被上调的差异表达蛋白,227个被下调的差异表达蛋白。根据某种蛋白在一组中至少表达两次重复而在另一组中没有表达,被认定为特殊差异蛋白;检测结果显示,有135种特殊差异蛋白在A2780组中检出而在A2780/T组中未检出;有286种特殊差异蛋白在A2780/T组中检出,而在A2780组中未检出。差异表达蛋白质的结果以火山图表示,见图1A。使用层次聚类算法对差异表达的蛋白进行聚类分析,并以热图的形式显示。通过倍数变化大于2倍且 $P<0.05$ [Student's-*T* Test或者单因素方差分析(One-way ANOVA)]的标准筛选得到差异表达的蛋白,见图1B。



A.A2780/T和A2780组间倍数差异表达蛋白火山图;B.A2780/T和A2780组间差异表达蛋白聚类分析结果

图1 鉴定和筛选A2780和A2780/T细胞中差异表达的蛋白

Fig. 1 Identification and screening of differentially expressed proteins

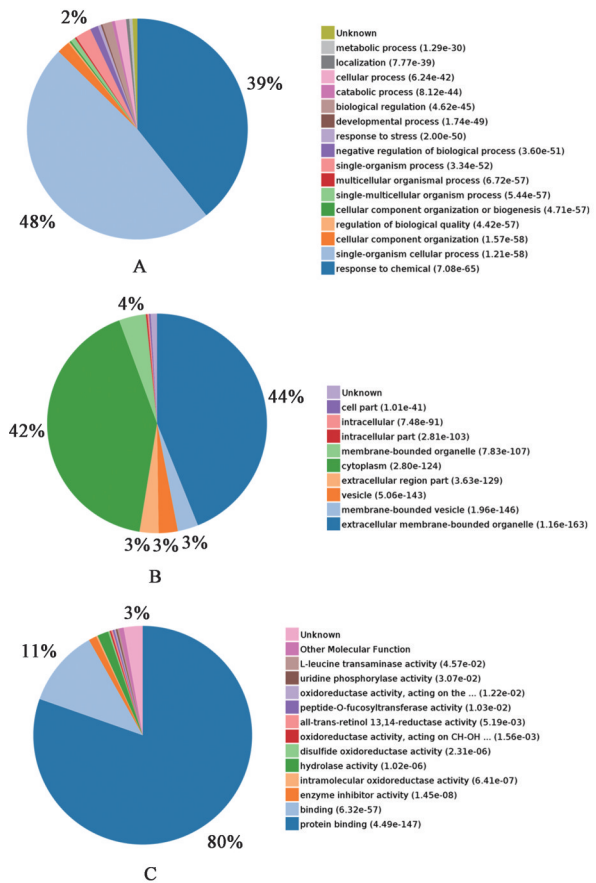
3.3 基于生物信息学分析筛选目标蛋白 为明确高通量蛋白组学筛选所得的蛋白功能或生物学途

径,采用GO富集分析和KEGG通路进行研究。图2A,2B和2C分别显示了在生物过程、细胞组分和

分子功能中上调或下调的蛋白质的功能富集分析。GO富集分析的结果表明,在生物学过程中,48%的差异表达蛋白被归类为单一生物细胞过程,39%的差异表达蛋白参与化学反应过程。在细胞组分中,44%的差异表达蛋白在细胞外膜结合的细胞器中具有显著变化,而42%的差异表达蛋白在细胞质中具有显著变化。关于分子功能,差异表达的蛋白质的80%富集在结合蛋白。

考虑到结合蛋白占差异表达蛋白的大部分,因此在A2780/T细胞中筛选了11个下调的结合蛋白和14个上调的结合蛋白,见表3,4。除了卵巢,所有蛋白质还在多个组织中表达。表中列出了表达最明显的两个组织部位。根据列出的每种蛋白质的表达位点,在所有筛选出的结合蛋白中,只有TAB1在卵巢中普遍表达。在A2780细胞中表达了8种特殊差异结合蛋白,但在A2780/T细胞中未表达,见表5。9种特殊的差异结合蛋白在A2780/T细胞中表达,但在A2780细胞中不表达,见表6。根据两个表中列出的每种蛋白质的表达位点,在这些结合蛋白中,只有IGBP1卵巢中普遍表达。

基于Fisher精确检验的差异表达蛋白的KEGG途径富集分析表明,与A2780细胞相比,A2780/T细胞中的内质网蛋白加工(protein processing in endoplasmic reticulum),精氨酸和脯氨酸代谢(arginine and proline metabolism),氨基酸的生物合成(biosynthesis of amino acids),军团菌病(legionellosis)和致病性大肠埃希菌感染(pathogenic *Escherichia coli* infection)等途径发生了显著变化。TAB1参与致病性大肠埃希菌感染途



A.生物学功能;B.细胞组分;C.分子功能

图2 差异表达蛋白GO功能的富集分析

Fig. 2 Enrichment analysis pie chart of GO function of differentially expressed proteins

径。但是,IGBP1参与了酵母自噬(autophagy-yeast),动物自噬(autophagy-animal)和其他自噬(autophagy-other),这在上述KEGG分析结果中没有出现。因此,KEGG的结果表明,卵巢癌的耐药性

表3 A2780/T组与A2780组之间下调的结合蛋白

Table 3 Down-regulated binding proteins between A2780/T group and A2780 group

基因名称	蛋白名称	表达位点 (NCBI基因数据库)
RNPC3	含RNA结合区的蛋白质3(RNA-binding region-containing protein 3)	甲状腺,子宫内膜
MCMBP	微染色体维持复合物结合蛋白(mini-chromosome maintenance complex-binding protein)	胎盘,阑尾
ABCF2	ATP结合盒亚家族F成员2(ATP-binding cassette sub-family F member 2)	睾丸,脑
TAB1	TGF-beta激活的激酶1和MAP3K7结合蛋白1(TGF-beta-activated kinase 1 and MAP3K7-binding protein 1)	卵巢,脑
RHEB	GTP结合蛋白Rheb(GTP-binding protein Rheb)	肾上腺,脑
HEBP1	血红素结合蛋白1(heme-binding protein 1)	十二指肠,小肠
ABCB9	ATP结合盒亚家族B成员9(ATP-binding cassette sub-family B member 9)	睾丸,脑
GC	维生素D结合蛋白(vitamin D-binding protein)	肝
RBBP7	组蛋白结合蛋白RBBP7(histone-binding protein RBBP7)	肾上腺,睾丸
PAIP1	聚腺苷酸结合蛋白相互作用蛋白1(polyadenylate-binding protein-interacting protein 1)	睾丸,甲状腺
CBFB	核心结合因子β亚基(core-binding factor subunit beta)	淋巴结,阑尾

表 4 A2780/T 组与 A2780 组之间上调的结合蛋白

Table 4 Up-regulated binding proteins between A2780/T group and A2780 group

基因名称	蛋白名称	表达位点 (NCBI 基因数据库)
CAB39	钙结合蛋白 39(calcium-binding protein 39)	结肠, 阑尾
RBM3	RNA 结合蛋白 3(RNA-binding protein 3)	骨髓, 脂肪
GNG12	鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 G(I)/G(S)/G(O) gamma-12 亚基[guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) sub-unit gamma-12]	十二指肠, 小肠
ACBD4	含酰基辅酶 A 结合结构域的蛋白质 4(Acyl-CoA-binding domain-containing protein 4)	肝, 十二指肠
GNAS	鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 G(s) α 同工型短亚基[guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms short]	甲状腺, 脑
PEBP1	磷脂酰乙醇胺结合蛋白 1(phosphatidylethanolamine-binding protein 1)	肾上腺, 肝
MBD3	甲基-CpG 结合域蛋白 3(methyl-CpG-binding domain protein 3)	胎盘, 脂肪
SLC25A24	钙结合线粒体载体蛋白 SCaMC-1(calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-1)	小肠, 结肠
OSBP	氧固醇结合蛋白 1(oxysterol-binding protein 1)	肾上腺, 肾
PAIP2	聚腺苷酸结合蛋白相互作用蛋白 2(polyadenylate-binding protein-interacting protein 2)	睾丸, 肾上腺
ABCD3	ATP 结合盒亚家族 D 成员 3(ATP-binding cassette sub-family D member 3)	肝, 肾
LGALS3BP	Galectin-3 结合蛋白(galectin-3-binding protein)	胃, 结肠
ABCB1	ATP 结合盒 B 亚家族成员 1(ATP-binding cassette sub-family B member 1)	肾上腺, 小肠
FABP5	脂肪酸结合蛋白 5(fatty acid-binding protein 5)	食道, 脂肪

表 5 仅在 A2780 细胞中的特殊差异结合蛋白

Table 5 Special differential binding proteins in A2780 cells but not in A2780/T cells

基因名称	蛋白名称	表达位点 (NCBI 基因数据库)
GBP1	鸟苷酸结合蛋白 1(guanylate-binding protein 1)	阑尾, 淋巴结
SH3BGRL	SH3 结构域结合谷氨酸样蛋白 3(SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3)	子宫内膜, 膀胱
SDF4	基质细胞衍生因子 4(stromal cell-derived factor 4)	结肠, 肾
GBP2	鸟苷酸结合蛋白 2(guanylate-binding protein 2)	阑尾, 膀胱
ARL2BP	ADP-核糖基化因子样蛋白 2 结合蛋白(ADP-ribosylation factor-like protein 2-binding protein)	睾丸, 脂肪
SERPINA7	甲状腺素结合球蛋白(thyroxine-binding globulin)	肝
RBM34	RNA 结合蛋白 34(RNA-binding protein 34)	睾丸, 淋巴结
AAGAB	α 和 γ -adaplin 结合蛋白 p34(alpha- and gamma-adaplin-binding protein p34)	甲状腺, 结肠

表 6 仅在 A2780/T 细胞中的特殊差异结合蛋白

Table 6 Special differential binding proteins in A2780/T cells but not in A2780 cells

基因名称	蛋白名称	表达位点 (NCBI 基因数据库)
HEL-S-134P	附睾分泌精子结合蛋白 Li 134P(epididymis secretory sperm binding protein Li 134P)	结肠, 肺
FABP3	心脏脂肪酸结合蛋白(fatty acid-binding protein, heart)	心脏, 脑
FABP1	肝脏脂肪酸结合蛋白(fatty acid-binding protein, liver)	肝, 结肠
GNA11	鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 α -11 亚基(guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11)	小肠, 十二指肠
IGBP1	免疫球蛋白结合蛋白 1(immunoglobulin-binding protein 1)	卵巢, 甲状腺
EHBP1L1	EH 结构域结合蛋白 1 样蛋白 1(EH domain-binding protein 1-like protein 1)	脾脏, 阑尾
DDB2	DNA 损伤结合蛋白 2(DNA damage-binding protein 2)	皮肤, 食道
SAP30BP	SAP30 结合蛋白(SAP30-binding protein)	骨髓, 脑
ABCG2	ATP 结合盒亚家族 G 成员 2(ATP-binding cassette sub-family G member 2)	小肠, 十二指肠

可能与涉及TAB1的途径的变化有关,图中纵坐标表示前20个显著富集的KEGG通路,见图3。

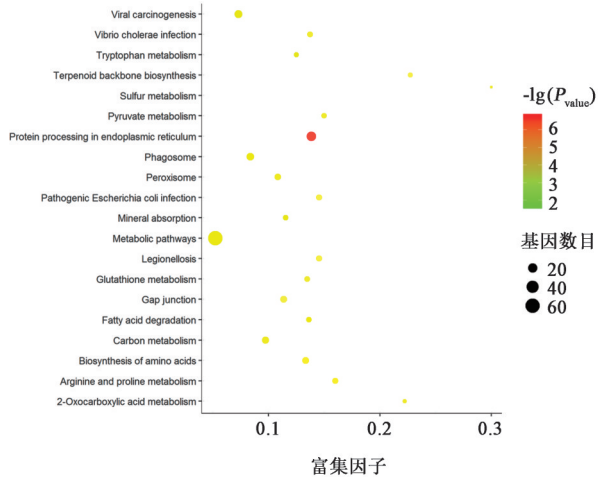


图3 A2780/T与A2780细胞之间差异表达蛋白的KEGG途径富集分析

Fig. 3 KEGG pathway enrichment analysis of differentially expressed proteins between A2780/T and A2780 cells

在A2780/T和A2780细胞之间的STRING蛋白质-蛋白质相互作用网络功能富集分析表明,441种差异表达的蛋白质中的大多数都可以相互作用。蛋白质与蛋白质的相互作用非常复杂,见图4。其中,TAB1分别与HSPA1L,核转录因子- κ B1(NF- κ B1),NF- κ B2,RPS27A和EGFR相互作用,见图5。

3.4 A2780和A2780/T细胞中TAB1, TAK1和p38 MAPK的表达 根据MTT实验结果,选用对A2780/T细胞存活率影响较小的PTX浓度进行研究,在PTX(0, 1, 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理的A2780/T细胞中,TAB1, TAK1和p38 MAPK mRNA表达均明显低于A2780细胞($P<0.05$, $P<0.01$)。见表7。在PTX(0, 1, 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理的A2780/T细胞中,TAB1的蛋白表达显著低于A2780细胞($P<0.01$),但TAK1和p38 MAPK的蛋白表达变化差异无统计学意义。见表8,图6。此外,A2780/T细胞各组间TAB1, TAK1和p38 MAPK的mRNA和蛋白表达均差异无统计学意义。

4 讨论

卵巢癌对PTX的耐药是导致肿瘤复发和转移的主要原因之一,寻找新的逆转卵巢癌化疗耐药的方案迫在眉睫。本研究在A2780和A2780/T细胞中发现并鉴定出441个差异表达蛋白和421个特殊差异表达蛋白。通过GO富集分析发现这些蛋白的结合功能发生了重大变化。基于结合功能的显著变

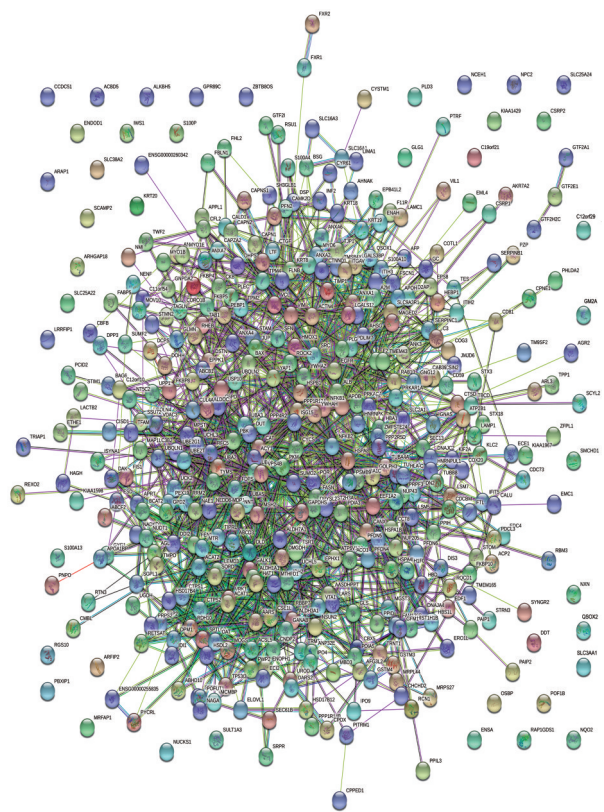


图4 A2780/T和A2780细胞之间441个差异表达蛋白的蛋白-蛋白相互作用网络

Fig. 4 Protein-protein interaction network of 441 differentially expressed proteins between A2780/T and A2780 cells

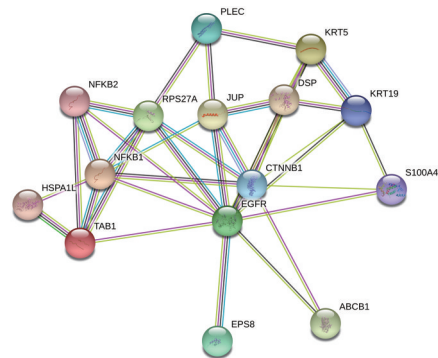


图5 与TAB1相互作用的差异表达蛋白的蛋白-蛋白相互作用网络
Fig. 5 Protein-protein interaction network of differentially expressed proteins that interacts with TAB1

化,筛选出42种结合蛋白,其中仅TAB1和免疫球蛋白结合蛋白1(IGBP1)在卵巢中表达。IGBP1主要参与酵母自噬,动物自噬和其他自噬,而这在KEGG通路富集分析结果中并未显示。免疫球蛋白结合蛋白IGBP1也称为alpha4,最初被鉴定为与B细胞抗原受体复合物的MB1(Ig α)共沉淀的信号转导分子,后来被发现在各种组织中广泛表达。IGBP1可与蛋白质磷酸酶2A相互作用,后者在细胞生长和细胞周期调节中起重要作用。一些报道发现IGBP1

表 7 PTX 对 A2780/T 细胞中 TAB1, TAK1, p38 MAPK mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Effect of paclitaxel on mRNA expression of TAB1, TAK1 and p38 MAPK in A2780/T cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	TAB1	TAK1	p38 MAPK
空白		3.672 \pm 0.910	4.883 \pm 1.345	2.066 \pm 0.693
PTX		1.047 \pm 0.386 ²⁾	1.011 \pm 0.177 ²⁾	1.017 \pm 0.215 ¹⁾
	1	1.025 \pm 0.176 ²⁾	1.138 \pm 0.184 ²⁾	1.020 \pm 0.268 ¹⁾
	4	0.864 \pm 0.143 ²⁾	1.092 \pm 0.191 ²⁾	0.949 \pm 0.039 ¹⁾

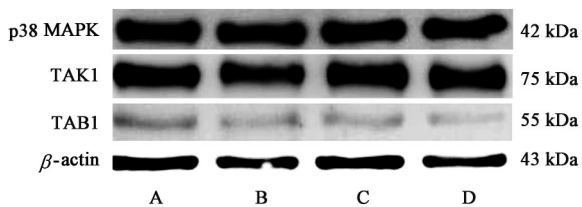
注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 8 同)。

表 8 PTX 对 A2780/T 细胞中 TAB1, TAK1 和 p38 MAPK 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 8 Effect of paclitaxel on protein expression of TAB1, TAK1 and p38 MAPK in A2780/T cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	TAB1 / $\beta\text{-actin}$	TAK1 / $\beta\text{-actin}$	p38 MAPK / $\beta\text{-actin}$
PTX		0.569 \pm 0.093 ²⁾	0.800 \pm 0.216	0.830 \pm 0.256
	1	0.483 \pm 0.206 ²⁾	0.708 \pm 0.194	0.813 \pm 0.193
	4	0.453 \pm 0.091 ²⁾	0.760 \pm 0.125	0.737 \pm 0.270

注:设空白组各指标蛋白相对表达量均为 1。



A. 空白组; B. PTX 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; C. PTX 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; D. PTX 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组;

图 6 PTX 作用的 A2780 细胞和 A2780/T 细胞中 p38 MAPK, TAK1, TAB1 蛋白表达电泳

Fig. 6 Electrophoresis of p38 MAPK, TAK1, TAB1 protein expression in A2780 cells and A2780/T cells treated by paclitaxel

与肺腺癌和食道鳞状细胞癌有关^[14-15]。在涉及 TAB1 的复杂途径中,致病性大肠埃希菌感染途径在 KEGG 结果中显示出显著变化。目前已有大量研究表明, TAB1 与癌细胞的增殖有关^[16]。因此,与 IGBP1 比较, TAB1 更可能是卵巢癌 PTX 耐药的关键靶点。

本研究结果还显示 ABC 转运蛋白家族成员中的 ABCB1, ABCF2, ABCB9, ABCD3, ABCG2 的表达在 A2780 和 A780/T 细胞中存在显著差异。尽管他们并非在卵巢中普遍表达,但已有研究表明,卵巢癌的耐药性与其异常表达有关。ATP 结合盒转运蛋白超家族是可以通过 ATP 水解提供动力的转运蛋白基因家族的成员。该家族的多个成员中,有 49

个成员具有同源序列,其中约 10 个可以介导耐药,主要包括 P-糖蛋白(ABCB1),多药耐药相关蛋白(MRP/ABCC),乳腺癌耐药蛋白(BCRP/ABCG2)等。ABCB1 的过表达被认为是导致卵巢癌对 PTX,铂和其他化疗药物产生耐药性的常见机制^[17]。ABCG2 是另一种被广泛研究其与卵巢癌耐药性相关的机制的蛋白质^[18]。关于 ABCF2, ABCB9 和 ABCD3 的研究很少,但有研究显示他们与卵巢癌的耐药性有关^[19-20]。当检测到 ABCB1 和 ABCG2 异常表达时, ABCF2 和 ABCD3 的表达也异常^[21-22]。因此,由于当前关于卵巢癌耐药机制的研究中, ABC 转运蛋白家族已经被广泛研究。为了寻找新的靶点,集中研究在 PTX 耐药性卵巢癌中很少报道的 TAB1 作为研究对象。

MAPK 信号通路被认为是肿瘤对 PTX 耐药的关键途径之一。与肿瘤发生、侵袭、转移和化疗耐药性密切相关的 p38 MAPK 信号转导途径也被广泛研究。在耐 PTX 的子宫内膜癌细胞中高表达的亲环蛋白 A 被下调后, MAPK 信号通路的活性受到抑制,从而提高子宫内膜癌对 PTX 的敏感性^[23]。卵巢癌耐药的形成也与 MAPK 信号通路有关,卵巢癌对化疗药物耐药性的逆转伴随着 MAPK 信号通路的调节^[24]。与普通卵巢癌细胞相比,耐药人卵巢癌细胞中的 lncRNA FER1L4 水平降低, FER1L4 的上调可调节 MAPK 信号通路来提高卵巢癌细胞对 PTX 的敏感性^[25]。据报道,在 SKOV3 细胞系中,重组人 CUE 结构域蛋白 2(CUEDC2)的高表达与浆液性卵巢癌细胞的顺铂耐药有关, CUEDC2 的过表达可抑制 p38 MAPK 激活来抑制顺铂诱导的细胞死亡并促进细胞增殖。用 siRNA 敲除 CUEDC2 后,细胞对顺铂的敏感性显著增强。此外,敲除 CUEDC2 后, p38 MAPK 的磷酸化显著增加,并且 p38 MAPK 信号转导有助于细胞生长和凋亡^[26]。研究表明,酪氨酸类似物 NK007 可以通过 p38 MAPK 激活和 HK2 降解来克服卵巢癌对 PTX 的耐药^[27]。CRM197 通过下调 NAC-1/Gadd45gip1/Gadd45 途径激活促凋亡的 JNK/p38 MAPK 途径,从而导致卵巢癌 PTX 耐药的逆转^[28]。因此,本研究也对卵巢癌 PTX 耐药与 p38 MAPK 信号通路的关系进行探索,并分别采用不含 PTX,接近耐药浓度(800 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ =0.94 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTX 和对 A2780/T 细胞存活率影响较小的 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTX 进行干预,结果显示,当卵巢癌细胞对 PTX 耐药时, p38 MAPK 分子在 mRNA 水平上均显著下调,这与上述研究结果一致,但 p38 MAPK

在蛋白水平表达差异不显著,其磷酸化水平差异是否与其他研究一致,p38 MAPK 磷酸化激活是否能逆转卵巢癌PTX耐药仍需进一步验证。

TAB1的主要作用是调节TAK1的催化活性。此外,TAB1与p38 MAPK相互作用并通过变构机制激活其自身磷酸化。根据KEGG通路图,可以发现TAB1/TAK1/p38 MAPK通路的激活可以激活下游转录激活因子AP-1,从而激活下游炎性细胞因子。研究表明,转录激活因子AP-1和炎性细胞因子与肿瘤的发生、发展、转移、侵袭和耐药性等有关^[29-30]。因此,本研究不仅通过蛋白质组学研究和筛选出了TAB1的表达变化,还进一步探索了其相互作用蛋白TAK1和p38 MAPK的变化。最近的一项研究发现,卵巢癌中TAB1异常上调与PTX耐药有关^[31]。然而,另外一些研究发现,双靶MDM2/MDMX抑制剂增强了阿霉素的敏化作用,该抑制剂激活了TAB1/TAK1/p38 MAPK途径^[32]。此外,重组双靶MDM2/MDMX抑制剂通过激活TAB1/TAK1/p38 MAPK途径逆转了野生型p53多药耐药乳腺癌对阿霉素的耐药^[33]。据报道,与健康的卵巢组织相比,在卵巢细胞顺铂耐药克隆和卵巢患者肿瘤中TAB1水平相对较低。TAB1是一种潜在的肿瘤抑制因子,可作为p53-MDM2通路与MAPK信号通路之间的功能性连接^[34]。这些研究的结果与本研究的蛋白质组学结果一致,并提示TAB1对PTX耐药性的潜在的抑制作用。本研究进一步验证了该结果,与A2780细胞比较,A2780/T细胞中TAB1的mRNA和蛋白水平显著降低,与TAB1相互作用的TAK1和p38 MAPK在mRNA水平亦显著降低,但在蛋白水平上变化无统计学差异,这可能是由于转录调控和翻译后修饰所致。实际上,本研究在KEGG通路图中发现TAK1和p38 MAPK在激活下游分子之前已被磷酸化,这需要更深入的研究进行验证。

综上所述,本研究通过非标记定量蛋白质组学分析筛选了卵巢癌PTX耐药细胞A2780/T及A2780之间差异表达的蛋白。通过生物信息学分析,TAB1被认为可能是卵巢癌PTX耐药的潜在生物标志物,其表达差异性在mRNA和蛋白质水平上得到了验证。而与TAB1相互作用的TAK1和p38 MAPK仅在mRNA水平上显著下调。结果表明TAB1可能是卵巢癌PTX耐药性的潜在生物标志物。抑制TAB1可能是逆转PTX耐药的新策略,而TAB1在卵巢癌对PTX耐药机制中的作用仍需更深入的研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2019 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(1): 7-34.
- [2] LEDERMANN J A. Front-line therapy of advanced ovarian cancer: new approaches [J]. *Ann Oncol*, 2017, 28(suppl 8): 46-50.
- [3] WEEN M P, ARMSTRONG M A, OEHLER M K, et al. The role of ABC transporters in ovarian cancer progression and chemoresistance [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2015, 96(2): 220-256.
- [4] WEAVER B A. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells [J]. *Mol Biol Cell*, 2014, 25(18): 2677-2681.
- [5] KAMPAN N C, MADONDO M T, MCNALLY O M, et al. Paclitaxel and its evolving role in the management of ovarian cancer [J]. *Biomed Res Int*, 2015, doi:10.1155/2015/413076.
- [6] GUO W, DONG W, LI M, et al. Mitochondria P-glycoprotein confers paclitaxel resistance on ovarian cancer cells [J]. *OncoTargets Ther*, 2019, 12: 3881-3891.
- [7] GEORGE E, DURAN, YAN C, et al. Decreased levels of baseline and drug-induced tubulin polymerisation are hallmarks of resistance to taxanes in ovarian cancer cells and are associated with epithelial-to-mesenchymal transition [J]. *Brit J Cancer*, 2017, 116: 1318-1328.
- [8] SMOTER M, BODNAR L, GRALA B, et al. Tau protein as a potential predictive marker in epithelial ovarian cancer patients treated with paclitaxel/platinum first-line chemotherapy [J]. *J Exp Clin Oncol*, 2013, 30, 32(1): 25-25.
- [9] CHONG T, SARAC A, YAO C Q, et al. Deregulation of the spindle assembly checkpoint is associated with paclitaxel resistance in ovarian cancer [J]. *J Ovarian Res*, 2018, 11(1): 27.
- [10] ANAND S, SAMUEL M, ANG C S, et al. Label-based and label-free strategies for protein quantitation [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1549: 31-43.
- [11] ABDALLAH C, DUMAS-GAUDOT E, RENAUT J, et al. Gel-based and gel-free quantitative proteomics approaches at a glance [J]. *Int J Plant Genomics*, 2012, doi:10.1155/2012/494572.
- [12] ANKNEY J A, MUNEEER A, CHEN X. Relative and absolute quantitation in mass spectrometry-based proteomics [J]. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*, 2018, 11(1): 49-77.
- [13] MOULDER R, GOO Y A, GOODLETT D R. Label-

- free quantitation for clinical proteomics [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1410: 65-76.
- [14] JIANG S, LI D, LIANG Z, et al. High expression of IGBP1 correlates with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Int J Biol Marker*, 2020, 35(1): 33-40.
- [15] SATO T, SHIBA A, KIM Y, et al. P2. 01-014 miR-3941: a novel microRNA that controls IGBP1 expression and is associated with malignant progression of lung adenocarcinoma: topic: analysis of RNA [J]. *J Thorac Oncol*, 2017, 12(1): S792.
- [16] ZHU J, LI Q, HE J T, et al. Expression of TAK1/TAB1 expression in non-small cell lung carcinoma and adjacent normal tissues and their clinical significance [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(12): 15801-15807.
- [17] SUN N K, KOHLI A, HUANG S L, et al. Androgen receptor transcriptional activity and chromatin modifications on the ABCB1/MDR gene are critical for taxol resistance in ovarian cancer cells [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(6): 8760-8775.
- [18] FANG C, LIN Y, LIANG C, et al. A novel c-Kit/phospho-prohibitin axis enhances ovarian cancer stemness and chemoresistance via Notch3-PBX1 and β -catenin-ABCG2 signaling [J]. *J Biomed Sci*, 2020 27(1): 42.
- [19] HOU L, ZHANG X, JIAO Y, et al. ATP binding cassette subfamily B member 9 (ABCB9) is a prognostic indicator of overall survival in ovarian cancer [J]. *Medicine*, 2019, 98(19): e15698.
- [20] BAO L, WU J, DODSON M, et al. ABCF2, an Nrf2 target gene, contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells [J]. *Mol Carcinogen*, 2017, 56(6): 1543-1553.
- [21] SEBOROVA K, VACLAVIKOVA R, SOUCEK P, et al. Association of ABC gene profiles with time to progression and resistance in ovarian cancer revealed by bioinformatics analyses [J]. *Cancer Med-US*, 2019, 8(2): 606-616.
- [22] YASUI K, MIHARA S, ZHAO C, et al. Alteration in copy numbers of genes as a mechanism for acquired drug resistance [J]. *Cancer Res*, 2004, 64 (4): 1403-1410.
- [23] LI Z, MIN W, GOU J. Knockdown of cyclophilin A reverses paclitaxel resistance in human; endometrial cancer cells via suppression of MAPK kinase pathways [J]. *Cancer Chemoth Pharm*, 2013, 72(5): 1001-1011.
- [24] DAI F, ZHANG Y, ZHU X, et al. The anti-chemoresistant effect and mechanism of MUC1 aptamer-miR-29b chimera in ovarian cancer [J]. *Gynecol Oncol*, 2013, 131(2): 451-459.
- [25] LIU S, ZOU B, TIAN T, et al. Overexpression of the lncRNA FER1L4 inhibits paclitaxel tolerance of ovarian cancer cells via the regulation of the MAPK signaling pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 120: 7581-7589.
- [26] WANG A, LI J, ZHOU T, et al. CUEDC2 contributes to cisplatin-based chemotherapy resistance in ovarian serous carcinoma by regulating p38 MAPK signaling [J]. *J Cancer*, 2019, 10(8): 1800-1807.
- [27] LI Z, TANG X, LUO Y, et al. NK007 helps in mitigating paclitaxel resistance through p38MAPK activation and HK2 degradation in ovarian cancer [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234: 16178-16190.
- [28] TANG X H, LI H, ZHENG X S, et al. CRM197 reverses paclitaxel resistance by inhibiting the NAC-1/Gadd45 pathway in paclitaxel-resistant ovarian cancer cells [J]. *Cancer Med*, 2019, 8 (14): 6426-6436.
- [29] YANG W, ZHAO S, WU B, et al. BATF2 inhibits chemotherapy resistance by suppressing AP-1 in vincristine-resistant gastric cancer cells [J]. *Cancer Chemoth Pharm*, 2019, 84 (6): 1279-1288.
- [30] GALDIERO M R, MARONE G, MANTOVANI A. Cancer inflammation and cytokines [J]. *Csh Perspect Biol*, 2018, 10(8): a028662.
- [31] SHUANG T, WANG M, ZHOU Y, et al. NF- κ B1, c-Rel, and ELK1 inhibit miR-134 expression leading to TAB1 upregulation in paclitaxel-resistant human ovarian cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (15): 24853-24868.
- [32] FAN Y, LI M, MA K, et al. Dual-target MDM2/MDMX inhibitor increases the sensitization of doxorubicin and inhibits migration and invasion abilities of triple-negative breast cancer cells through activation of TAB1/TAK1/p38 MAPK pathway [J]. *Cancer Biol Ther*, 2019, 20(5): 617-632.
- [33] FAN Y, MA K, JING J, et al. Recombinant Dual-target MDM2/MDMX inhibitor reverses doxorubicin resistance through activation of the TAB1/TAK1/p38 MAPK pathway in Wild-type p53 multidrug-resistant breast cancer cells [J]. *J Cancer*, 2020, 11(1): 25-40.
- [34] ZHU Y, REGUNATH K, JACQ X, et al. Cisplatin causes cell death via TAB1 regulation of p53/MDM2/MDMX circuitry [J]. *Gene Dev*, 2013, 27(16): 1739-1751.

[责任编辑 周冰冰]