

# 山慈菇乙酸乙酯提取物和阿霉素抗4T1乳腺癌的 差异蛋白分析

张晓东<sup>1</sup>,王 栋<sup>1</sup>,张子英<sup>2</sup>,姚 芳<sup>3</sup>,杜晓鹂<sup>2\*</sup>

(1.内蒙古自治区药品检验研究院,内蒙古 呼和浩特 010010;2.内蒙古医科大学,内蒙古 呼和浩特 010059;  
3.内蒙古自治区妇幼保健院,内蒙古 呼和浩特 010012)

**【摘要】目的** 通过蛋白质组学分析对比研究山慈菇乙酸乙酯提取物(以下简称山慈菇酯提取物)与阿霉素抗4T1乳腺癌的作用靶点。**方法** 利用基于质谱的多肽体外标记技术(TMT),研究山慈菇酯提取物/阿霉素影响4T1乳腺癌荷瘤小鼠的差异蛋白,并利用生物信息学技术解析不同细胞表达蛋白质的相互作用和生物功能。**结果** 蛋白质组学研究发现,以Fold change >1.5 或 < 0.67,  $P < 0.05$  为筛选标准,山慈菇酯提取物/阿霉素两种给药组抗4T1乳腺癌的作用靶点相似,差异表达蛋白仅有13个,包括Ighg1、Ighm、Igkc、Gm5571及Cd5l等,这些差异表达蛋白主要与抗4T1乳腺癌免疫调节作用相关。其中Ighm、Igkc与Th1和Th2细胞因子分泌、Th17细胞分化、吞噬、细胞黏附有关。**结论** 山慈菇酯提取物与阿霉素抗乳腺癌的作用靶点相似。

**【关键词】** 4T1乳腺癌;蛋白质组学;山慈菇酯提取物;阿霉素

中图分类号: R471

文献标识码: B

文章编号: 2095-512X(2022)03-0256-04

乳腺癌是危及妇女身体健康的重要恶性肿瘤,在整个世界范围内,乳腺癌的发生率高居第二,病死率则高居第五,而且仍呈现快速增长的发展趋势,且日益年轻化<sup>[1,2]</sup>。三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)是目前诊断上最为棘手的一种乳腺癌,病人的总生存率仅为23%,且在诊断早期即向远处脏器转移,但化学治疗却并未延长病人的无进展存活期和全生命期。著名的中医大师周仲瑛教授在诊治恶性肿瘤病人时,应用频率最高的药品就是山慈菇<sup>[3]</sup>。山慈菇最早记录于唐代《本草拾遗》,临床上主要用于抗肿瘤、抗病毒活性等<sup>[4]</sup>。其能显著抑制人源性TNBC MDA-MB-231细胞的增殖和转移<sup>[4]</sup>。本课题组前期体外研究发现山慈菇酯提取物(ethyl acetate extract of cremastra appendiculata, Cr Ap)能抑制4T1细胞(鼠源的TNBC)的增殖,体内实验研究发现山慈菇酯提取物能产生抗4T1乳腺癌的免疫调节作用,故本课题组在相对具有免疫功能的BALB/c小鼠上复制了4T1乳腺癌模型<sup>[5,6]</sup>。

阿霉素(adriamycin, ADM)直接插入DNA的双螺旋链,抑制DNA聚合酶活性,发挥解链的作用,是TNBC的常规基础化疗药,对各期癌细胞均有杀伤作用<sup>[7]</sup>。目前ADM抗乳腺癌的药理作用已经明确,通过对比分析山慈菇酯提取物(ethyl acetate extract of cremastra appendiculata, CrAp)与阿霉素(adriamycin, ADM)(CrAp/ADM)蛋白质组学数据发现二者抗4T1乳腺癌作用靶点的异同,以期发现山慈菇酯提取物抗TNBC作用特点及其相关的免疫调节作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本来源

分别在40只BALB/c雌性小鼠[许可证号:SCXK(京)2016-0002]的腋下接种 $1 \times 10^6$ 个/mL的4T1细胞悬液,进行植瘤,植瘤成功一周后按随机数表法分为模型组、ADM对照组、Cr Ap高、中、低剂量

收稿日期: 2022-03-05; 修回日期: 2022-05-25

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目(2020MS08133); 内蒙古自治区卫健委医疗卫生科技计划项目(202201185, 202202148, 202202123); 内蒙古医科大学基金项目(YKD2021MS002)

第一作者: 张晓东(1978-), 男, 本科, 副主任药师。研究方向: 中蒙药相关药效物质基础的研究。

E-mail: 825743850@qq.com

\*通信作者: 杜晓鹂, 女, 博士, 副教授。研究方向: 中蒙药药效物质基础研究及心血管分子药理学研究, 现主要方向为复方中药、蒙药作用机理解析和系统药理学技术在创新中药研发中的应用。E-mail: 48121567@qq.com

组,每组8只,每日ADM对照组腹腔注射ADM (2 mg/kg), CrAp (960、96、9.6 mg/kg), 给药21 d后取出瘤组织, 分别选取模型组、中剂量CrAp给药组和ADM对照组进行TMT标记定量蛋白质组学检测。

### 1.2 药品及主要试剂

**1.2.1 CrAp制备** 将山慈菇用无水乙醇加热回流提取3次, 浓缩液分别用石油醚、乙酸乙酯及正丁醇进行萃取, 将乙酸乙酯萃取部分抽滤、低温烘干, 得干燥物, 备用<sup>[6]</sup>。

**1.2.2 主要试剂** BCA试剂盒(碧云天); 0.25% Trypsin-EDTA、DMEM培养基(赛默飞); 胰酶(普洛麦格); TMT标记试剂盒(希而科); FBS(依科赛); 三乙基碳酸氢铵、三氟乙酸、乙腈、二硫苏糖醇, 碘代乙酰胺、尿素(默克); 甲酸(Fluka); 二甲苯、乙醇等为国产试剂。

### 1.3 方法与步骤

**1.3.1 TMT蛋白质组学检测方法** 蛋白质含量检测后, 用二硫苏糖醇、碘代乙酰胺对蛋白质溶液进行处理, 胰蛋白酶酶解, TMT标记肽段。用色谱分析柱 Agilent 300 Extend C18, 液相色谱流动相 A 相 [0.1% (V/V) 甲酸水溶液] 溶解肽段, 流动相 B 相 (含 0.1% 甲酸的乙腈溶液) 以流速 500 nL/min 分离肽片段, 后被注入 Orbitrapfusion Lumos 质谱仪。利用 MaxQuant (v1.5.2.8) 搜索二级质谱数据, 用反库去除随机配对导致的假阳性率 (FDR), 并利用最常见的污染库去除污染蛋白<sup>[7]</sup>。Motif 分析使用 MoMo; 注释 GO 使用 InterProScan; 注释 KEGG 使用 KAAS、KEGG Mapper。

**1.3.2 统计学方法** 在 CrAp/ADM 两个样本中以 1.5 倍变化为差异阈值, 当  $P < 0.05$  时, 以表达量变化  $> 1.5$  倍或  $1/1.5$  倍为差异有统计学意义。t 检验用于两组间比较, Fisher's 检验用于富集检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 4T1 乳腺癌中 CrAp/ADM 差异蛋白分析

前期课题组利用 MaxQuant 软件在 IPI (International Protein Index) 数据库中对 4T1 乳腺癌中 ADM 给药组/模型组癌组织进行检索, 发现 ADM 上调 170 种蛋白, 下调 58 种蛋白<sup>[8]</sup>。本文同样利用 MaxQuant 软件在 IPI 数据库中对 4T1 乳腺癌中 CrAp 中剂量给药组/ADM 给药组 (Cr Ap/ADM) 的癌组织进行检索, 搜索到质谱鉴别的数据分析结果, 发现 CrAp 上调蛋白 13 种 (见图 1)。

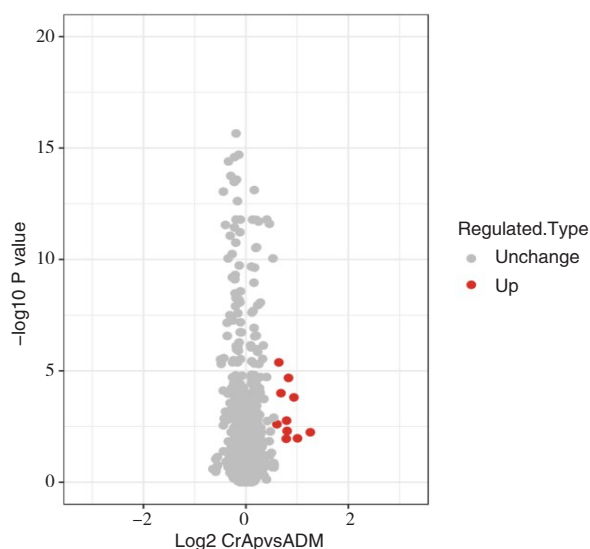


图1 Cr Ap/ADM 的差异蛋白

其中, 细胞外差异蛋白的含量占 62%, 细胞质差异蛋白占 15%, 胞质和胞核中共存的差异蛋白占 8%, 细胞核中的差异蛋白占 15%, 具体的差异蛋白的情况见表 1。

表1 CrAp/ADM 的部分差异蛋白

Protein description	CrAp/ADM Ratio	Regulated Type	Gene name	Subcellular localization
Ig kappa chain V-V region K2 (Fragment)	1.606	Up	-	Extracellular
Ig heavy chain V region AC38	1.746	Up	-	Cytoplasm
CD5 antigen-like	1.779	Up	Cd5l	Extracellular
Ig heavy chain V region PJ14	2.391	Up	-	Extracellular
Immunoglobulin heavy constant mu	2.101	Up	Ighm	Nucleus
Ig kappa chain V-V region MOPC 41	1.522	Up	Gm5571	Extracellular
Bone marrow proteoglycan	1.915	Up	Prg2	Extracellular
Immunoglobulin kappa constant	1.673	Up	Igkc	Extracellular
Ig kappa chain V-II region 26-10	1.734	Up	-	Nucleus
Ig kappa chain V-V region HP 93G7	1.562	Up	-	Cytoplasm Nucleus
Ig heavy chain V region M511	1.726	Up	-	Cytoplasm
Ig gamma-1 chain C region secreted form	1.683	Up	Ighg1	Extracellular
Ig kappa chain V-III region PC 7769	2.010	Up	-	Extracellular

Note: Proteins associated with immune regulation against breast cancer.

## 2.2 差异表达蛋白的功能分类

GO 二级注释分类 Gene Ontology (GO) 分析与免疫复合物相关的差异蛋白包括 Ighg1、Ighm、Igkc、Gm5571, 属于结合免疫球蛋白受体, 参与 B 细胞免疫, 免疫应答, 免疫递呈, 粒细胞和淋巴细胞分化的生物进程。其中, Ighm、Igkc 参与嘧啶代谢, 属于细胞间黏附分子, 结合抗原。此外, Cd5l 参与机体的免疫调节信号转导及吞噬作用, 而 Prg2 调控生物过程及对生物刺激的反应等生物过程见图 2。

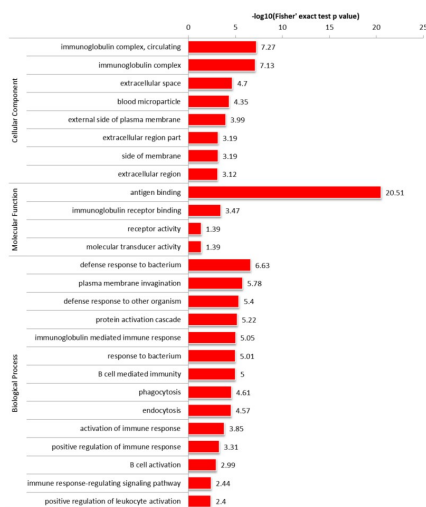


图2 CrAp/ADM 差异表达蛋白在GO二级分类中统计分布图

## 2.3 差异表达蛋白功能富集研究分析

2.3.1 KEGG 通路富集 差异蛋白富集于自身免疫性疾病、细胞黏附分子、造血细胞谱系通路、癌症的转录调控通路。Ighm、Igkc 与 Th1 和 Th2 细胞因子分泌、Th17 细胞分化、吞噬、细胞黏附有关(见图 3)。

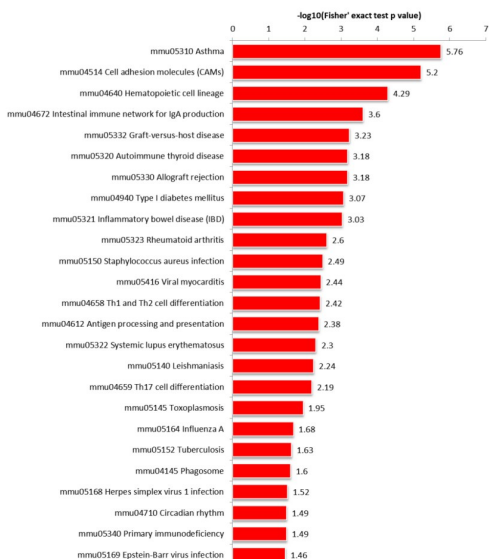


图3 CrAp/ADM 差异表达蛋白在KEGG通路中富集图

## 3 讨论

蛋白质组学筛选的 CrAp/ADM 抗乳腺癌靶点已明确, 本研究分析 CrAp/ADM 抗 4T1 乳腺癌的免疫调节作用差异靶点, 有 13 种差异蛋白参与抗乳腺癌的免疫调节作用, 这也提示 CrAp 与 ADM 抗 TNBC 的靶点相似。CrAp/ADM 的上调差异蛋白 Ighm、Igkc 调控 Th1 和 Th2 细胞因子分泌, 参与抗乳腺癌的免疫调节作用。本课题组前期研究发现 CrAp 和 ADM 提高 4T1 乳腺癌荷瘤小鼠脾和癌组织中 Th1 型细胞因子 IL-2 的含量; 降低 Th2 型细胞因子 IL-10 的表达, 说明二者的抗乳腺癌作用与乳腺癌的免疫微环境和机体的免疫调节功能有关。免疫球蛋白 Igkc、Ighm 和 Ighg1 基因的表达与浆细胞呈正相关, 浆细胞和 B 细胞的表达呈正相关, 而表达免疫球蛋白基因较高的 TNBC 预后较好, 故 CrAp 能改善 4T1 乳腺癌的预后<sup>[9]</sup>。A 糖蛋白的关键重复片段 (glycoprotein-a repetitions predominant, GARP) 是在乳腺癌中高表达的膜蛋白, 随着抗 GARP 抗体水平的增加, 患乳腺癌的概率增加, Igkc 基因型调控机体对抗 GARP 抗体的反应性, 表明 CrAp 在对抗原发性乳腺癌中的效果主要与自身免疫性作用有关<sup>[10]</sup>。Cd5l (cd5 分子样) 调节免疫反应参与癌症过程; 而 Prg2 基因是一种肿瘤抑制基因, Cd5l 和 Prg2 作为 CrAp 的靶蛋白, 提示 CrAp 具有抗乳腺癌免疫调节作用<sup>[11-13]</sup>。本研究发现 CrAp/ADM 上调的差异蛋白, 提示 CrAp 抗乳腺癌免疫调节的作用靶点较 ADM 多。

### 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): e381-392
- [2] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(10): 115-132
- [3] 赵惠, 王志英, 周仲瑛. 周仲瑛从痰辨治恶性肿瘤用分析[J]. 中医杂志, 2015, 56(9): 740-744
- [4] 牛晓雨, 王璐, 孙放, 等. 山慈菇水煎剂对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的影响[J]. 中成药, 2018, 40(1): 197-200
- [5] 曹晓东, 张楠, 张子英, 等. 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[J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(6): 246-255
- [6] 刘颖. 山慈菇酯提取物抗 4T1 乳腺癌作用与免疫机制的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古医科大学, 2020
- [7] Li RY, Cao ZJ, Issam M, et al. Immune response proteins as predictive biomarkers of doxorubicin-induced cardiotoxicity in breast cancer patients[J]. Exp Biol Med, 2018, 243(3): 248-255

(下转第 267 页)



骨密度显著高于对照组。这提示降钙素联合椎体成形术对椎体压缩性骨折患者有效,能显著提高患者的骨密度。我们推测其作用机制可能在于通过降钙素与作用受体具有较高的亲和力,通过特异性结合发挥抑制破骨细胞活性的作用。脊柱椎体获得了骨密度的显著增加和骨微结构的重建,从而加速骨组织量的增加。此外,还获得了抑制椎骨骨折发生的效果<sup>[9]</sup>。

骨质疏松性椎体压缩性骨折是老年人群急性和慢性疼痛的常见原因,约1/3的骨质疏松性椎体压缩性畸形表现为急性疼痛,患者多以疼痛为主诉,因此对于患者接受治疗前后疼痛的评估至关重要。本研究采用VAS评分评估了患者的疼痛程度,结果显示,接受治疗后,两组患者的VAS评分均显著低于治疗前。观察组患者的VAS评分显著低于对照组( $P < 0.05$ )。这提示在接受单侧经皮椎体成形术的骨折患者中,联合应用降钙素能更显著降低患者的疼痛评分。我们推测其作用机制可能在于降钙素可增加5-HT受体数量、升高 $\beta$ -内啡肽水平、抑制前列腺素释放及调节神经细胞钙离子浓度,具有中枢性镇痛作用。

有无疼痛症状的骨质疏松性椎体骨折都会导致严重的脊柱畸形、功能受限和生活质量下降。Oswestry 功能障碍指数问卷表可评估患者因腰痛导致的功能障碍,可作为评估椎体成形术治疗效果的有效工具<sup>[10]</sup>。问卷由患者生活中10方面的问题组成,从而评估功能障碍。通过ODI指数的评估,经治疗6个月后观察组患者的ODI指数显著低于对照组。椎骨骨折可以是轻微或严重,均可能导致疼痛、身体机能下降、行动不便、社会孤立和抑郁,这些均降低了患者的生活质量。本研究结果通过SF-36量表的评估,经治疗后观察组患者的SF-36量表评分显著高于对照组。这提示接受单侧经皮椎体

成形术的骨折患者联合应用降钙素,能更显著提高患者的生活质量。

综上所述,降钙素联合单侧经皮椎体成形术治疗椎体压缩性骨折疼痛患者,能显著促进骨折愈合、提高骨密度、减轻患者疼痛、改善胸腰椎功能、提高患者生活质量。

#### 参考文献

- [1]Niu J, Feng T, Huang C, et al. Characteristics of osteoporotic low lumbar vertebral fracture and related lumbosacral sagittal imbalance[J]. Orthopedics, 2020, 44(1):1-6
- [2]Yong H, Cheng F, Yi M, et al. Percutaneous curved vertebroplasty in the treatment of thoracolumbar osteoporotic vertebral compression fractures[J]. The Journal of International Medical Research, 2019, 47(6):2424-2433
- [3]汤勇,陈雄,刘佳,等.鲑鱼降钙素对骨质疏松症患者骨痛影响的随机对照临床研究文献Meta分析[J].临床药物治疗杂志,2016,14(5):32-36
- [4]中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会.原发性骨质疏松症诊疗指南(2017)[J].中华内分泌代谢杂志,2017,33(10):890-913
- [5]程晓光,王亮,曾强,等.中国定量CT(QCT)骨质疏松症诊断指南(2018)[J].中国骨质疏松杂志,2019,25(6):733-737
- [6]李鲁,王红妹,沉毅.SF-36健康调查量表中文版的研制及其性能测试[J].中华医学杂志 2002,36(2):109-113
- [7]Lopez PM, Humbert L, Gregorio S, et al. Discrimination of osteoporosis-related vertebral fractures by DXA-derived 3D measurements: a retrospective case-control study[J]. Osteoporosis International, 2019, 30(15):1099-1110
- [8]张国博,赵辰旭.经皮后路短节段椎弓根固定结合椎体成形术治疗骨质疏松性椎体压缩性骨折[J].中国中医骨伤科杂志,2021,29(10):51-54
- [9]翁科迪,蒋国华,石钢,等.阿仑膦酸钠联合鲑鱼降钙素对老年髋部骨质疏松性骨折患者的疗效及对骨密度和骨代谢标志物的影响[J].中国老年学杂志,2020,40(21):4597-4599
- [10]Fairbank J, Pynsent PB. The oswestry disability index[J]. Spine, 2000, 10(22):2940-2942
- [11]Sanjurjo L, Aran G, Tellez E, et al. CD5L promotes M2 macrophage polarization through autophagy-mediated upregulation of ID3[J]. Frontiers in Immunology, 2018, 9(21):1-16
- [12]Sanjurjo L, Aran G, Roher N, et al. AIM/CD5L: a key protein in the control of immune homeostasis and inflammatory disease[J]. Journal of Leukocyte Biology, 2015, 98(2):173-184
- [13]Seebauer CT, Brunner S, Glockzin G, et al. Peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer is characterized by structural and functional reorganization of the tumor microenvironment inducing senescence and proliferation arrest in cancer cells[J]. Oncoimmunology, 2016, 5(12):1-12

(上接第258页)

- [8]张楠,曹晓东,刘颖,等.阿霉素抗4T1乳腺癌荷瘤小鼠的免疫调控机制[J].生物工程学报,2021,37(7):2522-2533
- [9]Yeong J, Lim JC, Lee B, et al. High densities of tumor-associated plasma cells predict improved prognosis in triple negative breast cancer[J]. Frontiers in Immunology, 2018, 9(6):1-10
- [10]Pandey JP, Namboodiri AM, Armeson KE, et al. IGHC, IGKC, and FCGR genes and endogenous antibody responses to GARP in patients with breast cancer and matched controls[J]. Human Immunology, 2018, 79(8):632-637
- [11]Sanjurjo L, Aran G, Tellez E, et al. CD5L promotes M2