

DOI:10.16305/j.1007-1334.2024.2404067

基于蛋白质组学分析参虎半夏汤治疗胃癌机制的实验研究

曹莎莎¹, 任娟², 陈伟霞³, 马纯政³

1. 河南中医药大学第二临床医学院(河南 郑州 450000); 2. 郑州大学第二附属医院中医科(河南 郑州 450000);
3. 河南中医药大学第二附属医院肿瘤科(河南 郑州 450000)

【摘要】 目的 筛选参虎半夏汤对人胃癌裸小鼠皮下移植瘤干预后的差异蛋白,探索参虎半夏汤对胃癌作用机制的生物学基础。**方法** 采用MGC803细胞系建立人胃癌BALB/C裸小鼠皮下移植瘤模型。20只裸小鼠随机分为对照组(氯化钠注射液)、参虎半夏汤组(0.63 g/kg参虎半夏汤)、5-氟尿嘧啶(5-FU)组(0.025 g/kg 5-FU)、参虎半夏汤+5-FU组(0.63 g/kg参虎半夏汤+0.025 g/kg 5-FU),每组5只。各组裸小鼠分别给予相应干预,观察参虎半夏汤抑制胃癌细胞生长的作用。采用非标记定量法(LFQ)对干预后的瘤体进行差异表达蛋白分析,运用基因本体论(GO)、京都基因与基因组百科全书(KEGG)等数据库对蛋白及信息通路进行富集分析。采用Western blot法检测S100钙结合蛋白A9(S100A9)、Rho GDP解离抑制因子(ARHGDI1)、丝氨酸蛋白酶抑制剂(Serpine2)蛋白表达。**结果** ①各给药组瘤体体积均小于对照组($P<0.05$);参虎半夏汤+5-FU组瘤体体积明显小于参虎半夏汤组和5-FU组($P<0.05$)。②参虎半夏汤组、5-FU组及参虎半夏汤+5-FU组的抑瘤率分别为21.13%、32.66%、38.63%,与对照组相比差异均有统计学意义($P<0.05$)。与5-FU组和参虎半夏汤组相比,参虎半夏汤+5-FU组的抑瘤率明显较高($P<0.05$)。③与对照组相比,参虎半夏汤组鉴定得到的差异蛋白中有2个蛋白[羧基肽酶B2(CPB2)、Serpine2]表达上调,以及5个蛋白[S100A9、S100钙结合蛋白A8(S100A8)、ARHGDI1、溶菌酶C2(Lyz2)、整合素 β 2(ITGB2)]表达下调($P<0.05$)。④GO分析结果显示,在新生血管的生成、核转录因子- κ B(NF- κ B)细胞的极化、中性粒细胞的聚集等生物学过程中差异表达蛋白起着重要的作用。KEGG分析结果显示,与差异表达蛋白相关的主要信号通路有白细胞介素-17(IL-17)信号通路、补体通路、凝血级联反应通路等。⑤Western blot实验结果显示,与对照组相比,参虎半夏汤组裸小鼠肿瘤组织中S100A9、ARHGDI1蛋白表达水平明显下降($P<0.01$);Serpine2蛋白表达水平明显升高($P<0.01$),其结果与蛋白质组学分析的结果一致。**结论** 参虎半夏汤可抑制胃癌细胞生长,其可能与调控炎症相关蛋白、迁移蛋白及纤溶蛋白相关,与IL-17信号通路、补体通路、凝血级联反应通路等密切相关。

【关键词】 胃癌;参虎半夏汤;蛋白质组学;裸鼠;中药研究

Experimental research on mechanism of Shenhu Banxia Decoction in treating gastric cancer based on proteomic analysis

CAO Shasha¹, REN Juan², CHEN Weixia³, MA Chunzheng³

1. The Second Clinical Medical College, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan 450000, China;
2. Department of Traditional Chinese Medicine, The Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450000, China; 3. Department of Oncology, The Second Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan 450000, China.

Abstract: Objective To screen the differential proteins of Shenhu Banxia Decoction on subcutaneous transplanted tumor of human gastric cancer in nude mice, and to explore the biological basis mechanism of Shenhu Banxia Decoction on gastric cancer. **Methods** A subcutaneous transplant tumor model of BALB/C nude mice with human gastric cancer was established by using MGC803 cell line. Twenty nude mice were randomly divided into control group (sodium chloride injection), Shenhu Banxia Decoction group (0.63 g/kg Shenhu Banxia Decoction), fluorouracil (5-FU) group (0.025 g/kg 5-FU) and Shenhu Banxia Decoction +5-FU group (0.63 g/kg Shenhu Banxia Decoction+0.025 g/kg 5-FU), with 5 mice in each group. Nude mice in each group were given corresponding intervention. And inhibitory effect of Shenhu Banxia Decoction on the growth of gastric cancer cells was observed. Label-free quantitative

[基金项目] 河南省中医药科学研究专项课题(2022ZY2031)

[作者简介] 曹莎莎,女,硕士研究生,主要从事中医药防治恶性肿瘤的研究工作

[通信作者] 陈伟霞,主治医师;E-mail:743266224@qq.com。马纯政,主任医师,硕士研究生导师;E-mail:mchzh666@126.com

proteomic analysis was used to analyze the differential proteins of the tumor. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and Gene Ontology (GO) databases were used for enrichment analysis of protein and information pathways. Western blot was used to detect the expression of S100A9, ARHGDI1, and Serpine2. **Results** ①The tumor volume of each treatment group was significantly smaller than that of the control group ($P<0.05$). The tumor volume of the Shenhu Banxia Decoction +5-FU group was significantly smaller than that of the Shenhu Banxia Decoction group and the 5-FU group ($P<0.05$). ②The tumor inhibition rates of the Shenhu Banxia Decoction group, 5-FU group, and Shenhu Banxia Decoction +5-FU group were 21.13%, 32.66%, and 38.63%, respectively, and the differences compared with the control group were statistically significant ($P<0.05$). Compared with the 5-FU group and the Shenhu Banxia Decoction group, the tumor inhibition rate of the Shenhu Banxia Decoction +5-FU group was significantly higher ($P<0.05$). ③Compared with the control group, the differential proteins identified in the Shenhu Banxia Decoction group included 2 up-regulated proteins [Carboxypeptidase B2 (CPB2), Serpine2] and 5 down-regulated proteins [S100A9, S100A8, ARHGDI1, Lyz2, Integrin β 2 (ITGB2)] ($P<0.05$). ④GO analysis results showed that differential proteins played an important role in biological processes such as the formation of new blood vessels, polarization of NF- κ B cells, and aggregation of neutrophils. KEGG analysis results showed that the main signaling pathways related to differential proteins were the IL-17 signaling pathway, complement pathway, and coagulation cascade pathway. ⑤Western blot experimental results showed that compared with the control group, the expression levels of S100A9 and ARHGDI1 in the tumor tissue of the Shenhu Banxia Decoction group were significantly decreased ($P<0.01$), and the expression level of Serpine2 was significantly increased ($P<0.01$), which was consistent with the results of proteomic analysis. **Conclusion** Shenhu Banxia Decoction can inhibit gastric cancer cell growth, which may be related to the regulation of inflammation-related proteins, migration proteins, and fibrinolytic proteins, and is related to the IL-17 signaling pathway, complement pathway, coagulation cascade pathway, etc.

proteomics (LFQ) was used to analyze differentially expressed proteins in tumor after intervention. The Gene Ontology (GO), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and other databases were used to enrich and analyze the proteins and information pathways. Western blot was used to analyze the protein expression of S100 calcium-binding protein A9 (S100A9), Rho GDP dissociation inhibitor (ARHGDI1B), and serine protease inhibitor E2 (Serpine2). **Results** ①Tumor volume in each treatment group was smaller than that in the control group ($P<0.05$). The tumor volume of Shenhu Banxia Decoction+5-FU group was significantly smaller than that of Shenhu Banxia Decoction group and 5-FU group ($P<0.05$). ②The tumor inhibition rates of Shenhu Banxia Decoction group, 5-FU group and Shenhu Banxia Decoction +5-FU group were 21.13%, 32.66% and 38.63%, respectively. Compared with the control group, the differences were statistically significant ($P<0.05$). Compared with 5-FU group and Shenhu Banxia Decoction group, tumor inhibition rate of Shenhu Banxia Decoction+5-FU group was obviously higher ($P<0.05$). ③Compared with the control group, among the differential proteins identified in Shenhu Banxia Decoction group, two proteins [carboxypeptidase B2 (CPB2), SerpinE2] were up-regulated and five proteins [S100A9, S100 calcium-binding protein A8 (S100A8), ARHGDI1B, lysozyme C2 (Lyz2), recombinant Integrin β 2 (ITGB2)] were down-regulated ($P<0.05$). ④The GO analysis showed that differentially expressed proteins play important roles in angiogenesis, polarization of nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B) cells, neutrophil aggregation and other biological processes. KEGG analysis results showed that the main signaling pathways related to differentially expressed proteins were interleukin 17 (IL-17) signaling pathway, complement pathway, coagulation cascade pathway and so on. ⑤Western blot showed that compared with the control group, the S100A9 and ARHGDI1B protein expression levels decreased significantly ($P<0.01$), and the SerpinE2 protein expression level increased significantly in the nude mice tumor tissues of the Shenhu Banxia Decoction group ($P<0.01$). The results were consistent with those of proteomic analysis results. **Conclusion** Shenhu Banxia Decoction can inhibit the growth of gastric cancer cells. The anti-gastric cancer effect of Shenhu Banxia Decoction may be related to the regulation of inflammation-related proteins, migration proteins and fibrinolytic proteins, and it is closely related to IL-17 signaling pathway, complement pathway, coagulation cascade pathway.

Keywords: gastric cancer; Shenhu Banxia Decoction; proteomics; nude mice; traditional Chinese medicine research

国际癌症研究机构(IARC)公布的数据表明,2022年全球胃癌新发病例近2 000万,其在全球恶性肿瘤中发病率、病死率均位于第5位^[1]。在我国,早期胃癌的诊断率仍然较低,大多数胃癌患者确诊时已处于中晚期,丧失了手术根治切除的最佳机会,后期治疗效果不理想。近年来,随着治疗手段的不断更新,传统放射疗法、化学疗法在治疗中晚期胃癌方面已遇到发展瓶颈;由于肿瘤具有异质性特点,免疫治疗和靶向治疗在胃癌治疗领域的进展缓慢^[2]。目前,采用中医药治疗胃癌已经受到广泛关注,大量临床观察和基础实验证明了中医药综合治疗胃癌具有重要价值。根据益气解毒治疗理论,课题组团队带头人马纯政主任医师根据多年中西医结合治疗胃癌的临床经验,创制出参虎半夏汤。在前期的研究^[3]中我们发现了参虎半夏汤治疗胃癌的主要活性成分为槲皮素、山柰酚、柚皮苷、川皮苷,并通过网络药理学进行了验证。近年来,大规模高通量筛选技术广泛应用于医学基础研究,蛋白质组学也成为功能组学研究中重要的工具。差异表达蛋白的鉴定蛋白质组学分析为中医药治疗胃癌机制研究提供新的思路和方法。本研究通过蛋白质组学技术筛选参虎半夏汤对人胃癌MGC803细胞裸小鼠皮下移植瘤干预后的差异蛋白,从蛋白质分子水平上探讨益气解毒中药对胃癌作用机制的生物学基础,为中医临床治疗胃癌提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SPF级雌性BALB/C裸小鼠20只,7~8月龄,平均体质量为16~20 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。实验动物生产许可证号:SCXK(京)2016-0006;实验动物质量合格证号:1100111911057128。动物饲养于河南中医药大学第二附属医院中心实验室SPF级动物房,饲养室温度21~24℃,湿度40%~60%,光照明暗交替各12 h,自由饮水及进食,开始实验前适应性饲养1周。实验动物使用许可证号:SYXK(豫)2016-0009。本动物实验方案已获河南中医药大学第二附属医院实验动物伦理委员会审批(伦理审批号:PZ-HNSZYY-1086-1)。

1.1.2 细胞 人胃癌MGC803细胞株由上海中医药大学附属龙华医院赵爱光课题组惠赠。

1.1.3 药物与试剂 参虎半夏汤由人参10 g、蛤蚧20 g、重楼10 g、姜半夏12 g、陈皮12 g、厚朴12 g、炙甘草6 g组成,中药材饮片由河南中医药大学第二附属医院中药房提供。由河南省中医院药剂科汪坤主任药师鉴定,符合《中华人民共和国药典(2020年版):一部》^[4]要求。药物采用常规方法煎煮:先浸泡中药2 h,待药物充分浸透后,用大火煮沸,再改为慢火煎煮1 h;药渣过滤后加水再煎,分离药渣,将2次药液混合,浓缩至生药质量浓度为240 g/L,高温灭菌,4℃冰箱储藏备用。模型组药物:氯化钠注射液(9 g/L,批号:A16111604-1),购于四川科伦药业股份有限公司。阳性对照组药物:5-氟尿嘧啶(5-FU),购于上海旭东海普药业有限公司,使用前将5-FU溶于氯化钠注射液中,配制浓度为2.5 g/L。

S100 钙结合蛋白(S100)A9、Rho GDP 解离抑制因子(ARHGDI B)、丝氨酸蛋白酶抑制剂 E2(SerpinE2)(批号分别为 26992-1-AP、66054-1-Ig、11303-1-AP),武汉三鹰生物有限公司;尿素(Urea)测定试剂盒(批号:161-0731),美国 Bio-Rad 公司;碘乙酰胺(IAA)、三氟乙酸(TFA)、碳酸氢铵(NH_4HCO_3)、二硫苏糖醇(DTT)(批号分别为 I1149-5G、T6508、A6141-25G、43819-5G),美国 Sigma 公司;甲酸(批号:A117),美国 Thermo Fisher Scientific 公司;乙腈(批号:1000304008),德国 Merck 公司;二辛可酸(BCA)蛋白定量试剂盒、十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液(批号分别为 P0012、P0015F),上海碧云天生物科技有限公司;牛血清白蛋白(BSA)、十二烷基硫酸钠(SDS)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)(批号分别为 A0332、SB0485-500 g、T0826-500 g),生工生物工程(上海)股份有限公司;胰蛋白酶溶液(Trypsin,批号:V5117),美国 Promega 公司。

1.1.4 主要仪器 C18 Empore™ 固相萃取圆盘(型号:66883-U),美国 Sigma 公司;Easy nLC 色谱系统,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;Agilent 1260 infinity II 液相色谱(HPLC)系统,美国 Agilent 公司;低温高速离心机(型号:5430R),德国 Eppendorf 公司;电泳仪(型号:1645070),美国 Bio-Rad 公司;超声破碎仪(型号:JY96-IIN),宁波新芝生物科技有限公司;Votex 振荡器(型号:Votex-2),美国 GENIE 公司;Nano Drop 超微量分光光度计(型号:ND2000),美国 Thermo Fisher Scientific 公司;质谱仪(型号:Q Exactive Plus LCMS),美国 Thermo Fisher Scientific 公司;酶标仪(型号:Multiskan FC),美国 Thermo Fisher Scientific 公司;真空离心浓缩仪(型号:LNG-T98),太仓华美生化仪器厂;MP Fastprep-24 匀浆仪(型号:MP Fastprep-24 5G),美国 MP 公司;恒温培养箱(型号:GNP-9080),上海精宏实验设备有限公司;电子天平(型号:AX324Z),OHAUS 上海奥豪斯国际贸易有限公司;精巧型恒温混匀仪(型号:HCM-100 pro),北京大龙兴创实验仪器股份公司;C₁₈ Cartridge 液相色谱柱(型号:WAT023590),沃特世科技(上海)有限公司;裂解管 A(Lysing Matrix A)(型号:6910-100-99219),美国 MP 公司。

1.2 动物实验

1.2.1 造模与分组 造模方法参考文献^[5],MGC803 细胞传代培养后,将肿瘤细胞用适量胰蛋白酶消化并收集细胞,制备成肿瘤细胞悬液(1×10^7 个/mL)。将 0.3 mL 上述肿瘤细胞悬液注射于裸小鼠的皮下(3×10^6 个/只)。造模完成后第 7 天,随机分为 4 组,即对照组、参虎半夏汤组、5-FU 组、参虎半夏汤+5-FU 组,每组 5 只。

1.2.2 干预方法 参照《药理实验方法学》^[6]以 60 kg 成人体质量和裸小鼠体质量进行转换,来计算裸小鼠用

药剂量,每 10 g 裸小鼠体质量灌药量体积约等于 0.2 mL,中药浓度为 0.2734 g/0.1 mL=2.734 g/mL。参虎半夏汤组裸小鼠予参虎半夏汤 0.63 g/kg(0.4 mL/只)灌胃,每日 1 次;对照组裸小鼠予氯化钠注射液(0.4 mL/只),每日 1 次;5-FU 组裸小鼠予 5-FU 0.025 g/kg(0.4 mL/只)腹腔注射,每两日 1 次;参虎半夏汤+5-FU 组予参虎半夏汤 0.63 g/kg(0.4 mL/只)灌胃(每日 1 次),同时予 5-FU 0.025 g/kg(0.4 mL/只)腹腔注射(每两日 1 次);共干预 21 d。

1.3 检测指标与方法

1.3.1 裸小鼠皮下移植瘤抑瘤率 在造模后的第 28 天,称取裸小鼠体质量后,采用腹腔注射 150 μL 1% 戊巴比妥钠对裸鼠进行安乐死,并取出瘤体,称取肿瘤质量并测量肿瘤的长径(a)与短径(b),裸小鼠肿瘤体积(V)的计算公式: $V=a \times b^2/2$ 。抑瘤率(%)=(对照组平均瘤体质量-各治疗组平均瘤体质量)/对照组平均瘤体质量 $\times 100\%$ 。

1.3.2 差异蛋白的筛选与鉴定

1.3.2.1 蛋白提取与定量 将肿瘤样品放入有少量液氮的研钵中,迅速将肿瘤样本研碎,然后加入三氯乙酸(TCA)-丙酮微量蛋白沉淀试剂后涡旋混匀,放于 -20°C 中 4 h 以上,干燥沉淀。加入 30 倍体积(m/v)的 SDT 裂解液进行蛋白提取,用离心机 14 000 r/min、4 $^\circ\text{C}$ 离心 5 min,分离上清液,使用 0.22 μm 的微孔滤膜对样本进行过滤。按照 BCA 蛋白定量试剂盒说明书对蛋白样品进行定量分析。

1.3.2.2 超滤管内酶解(FASP) 将 DTT 加入蛋白样本中,使其浓度为 5 mmol/L,并置于 56°C 中进行 30 min 的还原;然后加入浓度为 11 mmol/L 的 IAA 中,室温避光孵育 10~15 min;将蛋白样品加入 Urea 溶液中,使样本浓度低于 2 mmol/L。加入胰蛋白酶进行酶解过夜。再添加 1% 胰蛋白酶酶解 4 h。各蛋白样本中添加 100 mmol/L 浓度的 DTT,放入沸水中加热 5 min 后待其冷却降温。在超滤离心管内放入混匀后的 200 μL 的 Urea 缓冲液,12 500 r/min 离心 10~15 min 后过滤。然后加入 100 μL 的 IAA 缓冲液,600 r/min 震荡 1~2 min 后避光反应 30 min,继续 12 500 r/min 离心 15 min。加入浓度为 40 mmol/L 的 NH_4HCO_3 溶液 100 μL ,12 500 r/min 离心 15 min。然后加入 40 μL 的胰蛋白酶抑制剂溶液(Trypsin buffer),600 r/min 震荡 1~2 min,在 37°C 中放置 16~18 h。再加入浓度为 40 mmol/L 的 NH_4HCO_3 溶液 20 μL ,12 500 r/min 离心 10~15 min,收集所需样本。采用 C₁₈ 色谱柱对肽段进行脱盐处理,将 40 μL 的甲酸溶液(体积分数为 0.1%)加入至冻干后的肽段中进行复溶反应,并采用超微量分光光度计进行定量测定(测量 OD₂₈₀)。

1.3.2.3 质谱分析 每种样品的分离均采用 HPLC 仪

系统处理。采用同步累积连续碎裂(PASEF)模式对样本进行质谱分析。质谱分析选择的时长为 120 min,正离子检测方式,母离子扫描范围为 350~1 800 质荷比,一级质谱分辨率为 70 000,自动增益控制(AGC target)为 3e6 inos,一级最大进样时间(一级 Maximum IT)为 50 ms。按照下列方法分析多肽和多肽碎片的质荷比:每次全扫描后采集 10 个碎片图谱(MS2 scan),MS2 解离模式(MS2 activation type)为高能碰撞解离(HCD),隔离窗口(Isolation window)为 2 质荷比,二级质谱分辨率为 17 500,微扫叠加(Microscans)为 1,二级最大进样时间(二级 Maximum IT)为 45 ms,质谱归一化碰撞能量(Normalized collision energy)为 27 eV。

1.3.2.4 数据库搜索 数据库搜索使用 MaxQuant 软件(版本号 1.6.14.0),蛋白质组学数据的定量分析运用非标记定量(LFQ)算法。

1.3.3 差异表达蛋白的功能富集分析 对基因本体论(GO)二级注释定量到的蛋白质进行统计分析。验证差异表达蛋白时采用费歇尔精确检验方法(Fisher's exact test);采用京都基因与基因组百科全书(KEGG)数据库对差异蛋白通路进行注释分析,采用 Fisher's exact test 计算筛选具有显著水平的差异蛋白通路。

1.3.4 Western blot 蛋白样本采用 SDS-PAGE 进行分离,考马斯亮蓝法染色,观察参虎半夏汤组和对照组蛋白条带情况。转膜后加入脱脂奶粉在室温下封闭 1~2 h,封闭完成后,洗膜 3 次,每次 10 min,分别加入 S100A9 蛋白、ARHGDIB 蛋白、Serpine2 蛋白抗体(稀释比例为 1:500)及甘油醛-3-磷酸脱氢酶蛋白抗体(GAPDH,稀释比例为 1:2 000),4℃孵育过夜。洗膜完成后分别加入山羊抗兔、山羊抗鼠二抗(稀释比例分别为 1:6 000、1:5 000),室温摇床孵育 1 h。再洗膜 3 次,每次 10 min。蛋白条带可视化后采用 ImageJ 软件分析目标蛋白灰度值,以量化蛋白表达水平。

1.4 统计学方法 运用 SPSS 22.0 软件分析数据。数据符合正态检验者,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。当研究多组数据时采用单因素方差分析比较多样本的均数,采用 Newman-Keuls 法对均数间两两比较进行检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 对裸小鼠皮下移植瘤体体积的影响 结果显示,各组瘤体体积有明显差异,其中各给药组瘤体体积均<对照组($P < 0.05$);参虎半夏汤+5-FU 组瘤体体积明显<参虎半夏汤组及 5-FU 组($P < 0.05$),而参虎半夏汤组和 5-FU 组瘤体体积无明显差异($P > 0.05$)。见表 1、图 1。

2.2 对人胃癌裸小鼠皮下移植瘤生长的影响 参虎半

表 1 各组裸小鼠皮下移植瘤体体积的比较

组别	肿瘤体积/mm ³
对照组	826.19±477.48
参虎半夏汤组	518.97±245.04*
5-FU 组	457.91±232.57*
参虎半夏汤+5-FU 组	328.23±161.68*#△

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与参虎半夏汤组比较,# $P < 0.05$;与 5-FU 组比较,△ $P < 0.05$;n=5, $\bar{x} \pm s$ 。

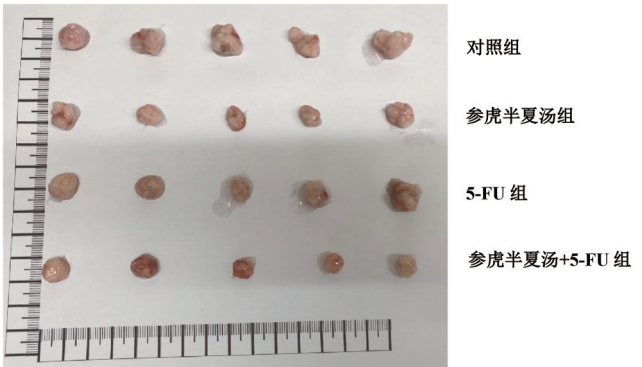


图 1 各组裸小鼠皮下移植瘤体图

夏汤组的肿瘤质量为(0.721±0.056)g,抑瘤率为 21.13%,与对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$);5-FU 组的肿瘤平均质量为(0.616±0.015)g,抑瘤率为 32.66%,与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$);参虎半夏汤+5-FU 组的肿瘤平均质量为(0.5612±0.024)g,抑瘤率为 38.63%,与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 5-FU 组和参虎半夏汤组相比,参虎半夏汤+5-FU 组的抑瘤率明显较高($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组裸小鼠皮下移植瘤生长的比较

组别	肿瘤平均质量/g	抑瘤率/%
对照组	0.915±0.092	—
参虎半夏汤组	0.721±0.056*	21.13
5-FU 组	0.616±0.015*	32.66
参虎半夏汤+5-FU 组	0.561±0.024*#△	38.63

注:“—”表示无。与对照组比较,* $P < 0.05$;与参虎半夏汤组比较,# $P < 0.05$;与 5-FU 组比较,△ $P < 0.05$;n=5, $\bar{x} \pm s$ 。

2.3 差异表达蛋白鉴定 蛋白质组学分析设定差异表达蛋白的差异表达倍数>2 倍(下调/上调)且 $P < 0.05$ 。结果显示,其中 5 个蛋白在参虎半夏汤组中表达下调,包括 S100A9、S100A8、ARHGDIB、溶菌酶 C2(Lyz2)、整合素 $\beta 2$ (ITGB2);2 个蛋白在参虎半夏汤组中表达上调,包括羧基肽酶 B2(CPB2)、Serpine2。见图 2、表 3。

2.4 差异表达蛋白的功能富集分析

2.4.1 GO 富集 通过 GO 注释,可以分析蛋白的功能以及分类情况。差异表达蛋白的富集度是依据 GO 数据库的分析进行排序。差异表达蛋白富集度较高且主要涉及中性粒细胞聚集、核因子- κB (NF- κB)细胞极化、

表 3 各组肿瘤差异表达蛋白的比较

序号	差异蛋白名称	下调/上调倍数	P
1	S100 钙结合蛋白 A9(S100A9)	7.384 8	0.007 2
2	S100 钙结合蛋白 A8(S100A8)	5.287 5	0.001 8
3	Rho GDP 解离抑制因子 (ARHGDIB)	2.554 9	0.007 1
4	溶菌酶 C2(Lyz2)	2.360 6	0.045 5
5	整合素 β 2(ITGB2)	2.305 4	0.022 0
6	羧基肽酶 B2(CPB2)	0.497 6	0.009 7
7	丝氨酸蛋白酶抑制剂 E2(SerinE2)	0.363 9	0.024 4

参与新生血管生成的细胞迁移、生殖细胞迁移、Wnt 信号传导途径调控、炎症的白细胞迁移、细胞基质黏附的调控、新生血管生成、自分泌信号等生物过程。分子功能中差异表达蛋白富集度较高且主要发挥层黏蛋白结合、Toll 样受体 4 结合、半乳糖苷结合、花生四烯酸结合、胰岛素样生长因子 I 结合、乙酰胆碱受体结合等功能。细胞成分差异表达蛋白富集度较高且主要涉及突

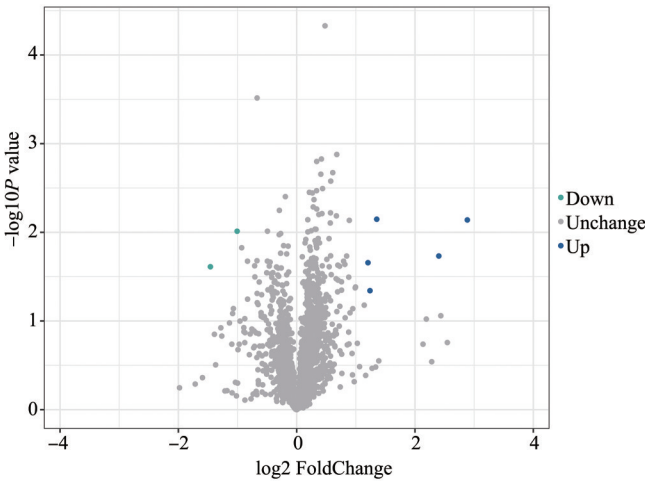


图 2 各组肿瘤差异表达蛋白的火山图

触膜、网格蛋白包被的囊泡、整合素、细胞外间隙、胞外区部分、内膜系统等。见图 3。

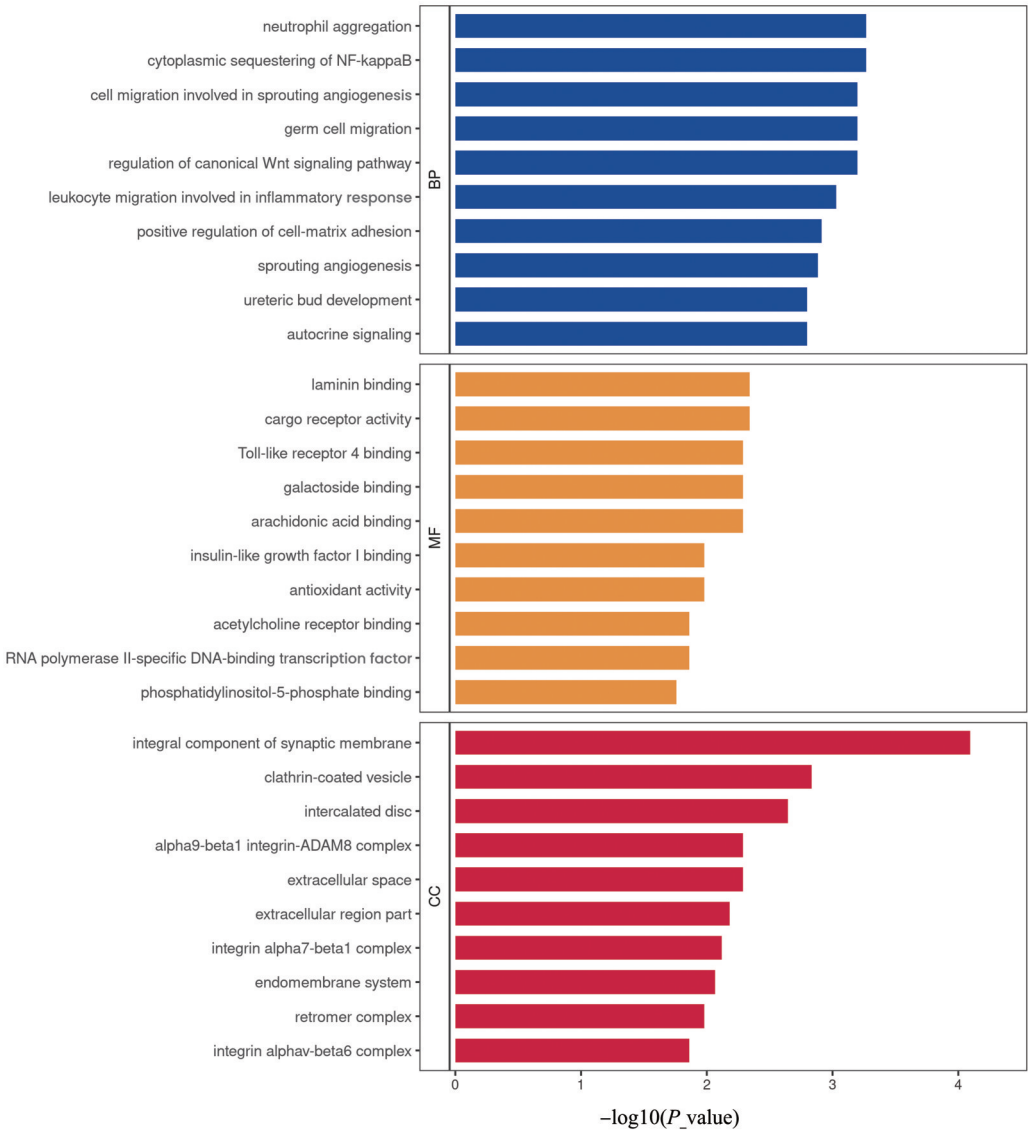


图 3 基因本体论(GO)二级注释的富集统计柱状图

2.4.2 KEGG 通路富集分析 利用 KEGG 通路富集分析,可发现差异表达蛋白的信号通路,为了解胃癌的形成因素及治疗提供参考。我们通过 GO 数据库分析差异表达蛋白的分布,根据 KEGG 数据库分析差异表达蛋白基因所参与的全部通路,筛选出与肿瘤相关的差

异表达蛋白显著通路为白细胞介素-17(IL-17)信号通路、补体和凝血级联反应通路、河马(Hippo)信号通路、细胞黏附分子通路、神经营养因子信号通路、自然杀伤细胞介导细胞毒性通路、白细胞跨内皮迁移通路、Ras 相关蛋白 1(Rap1)信号通路($P<0.05$)。见图 4。

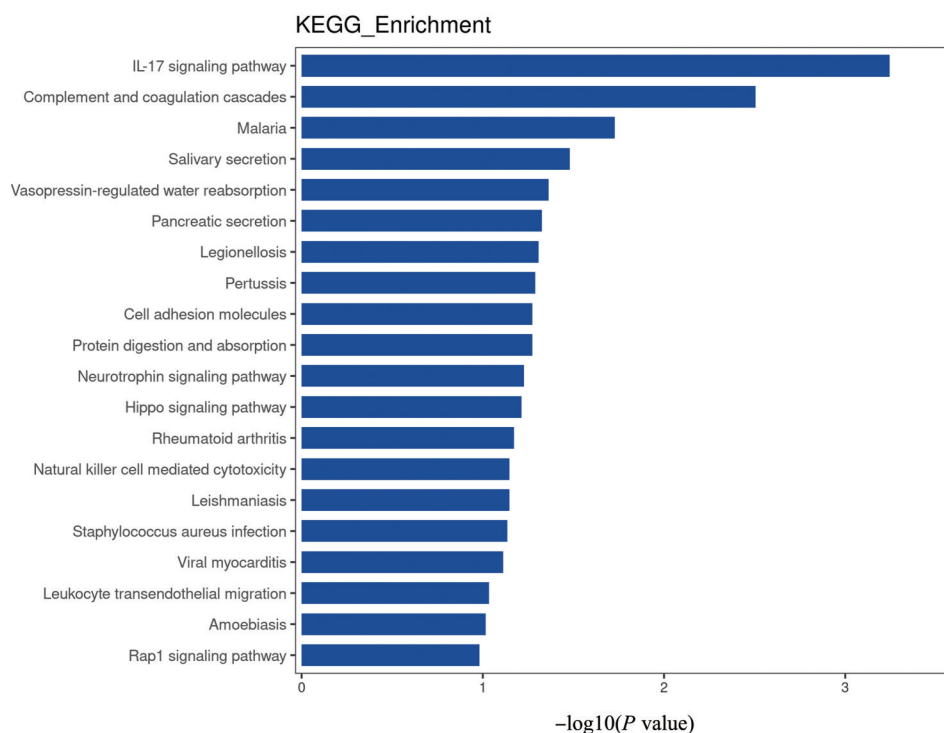
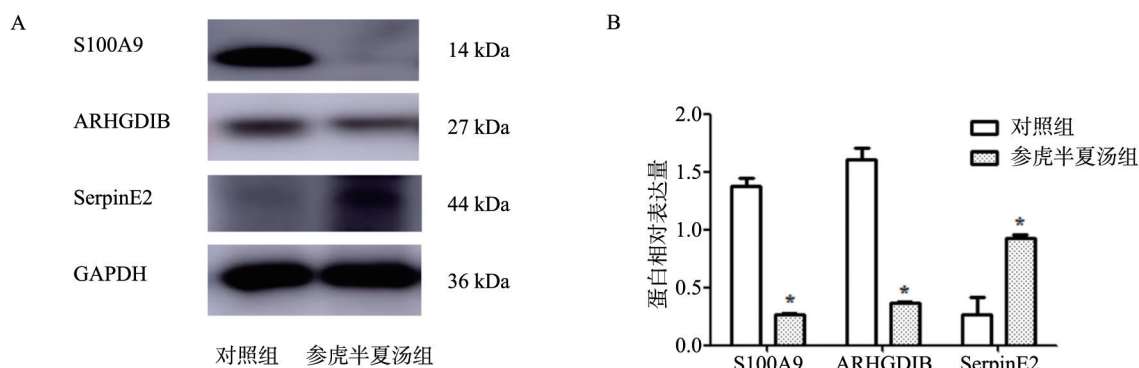


图4 京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路的富集统计柱状图

2.5 差异表达蛋白的验证 采用 Western blot 实验验证蛋白质组学结果,结果显示,与对照组比较,治疗后小鼠肿瘤组织中 S100A9、ARHGDI B 蛋白表达水平明显

下降,差异具有统计学意义($P<0.05$);SerpinE2 蛋白表达水平明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 5。



注:S100A9 为 S100 钙结合蛋白 A9,ARHGDI B 为 Rho GDP 解离抑制因子蛋白,SerpinE2 为丝氨酸蛋白酶抑制剂 E2 蛋白。A 为各组蛋白表达条带图;B 为各组蛋白相对表达量。与对照组比较,* $P<0.05$; $n=3$, $\bar{x}\pm s$ 。

图5 各组肿瘤组织中 S100A9、ARHGDI B、SerpinE2 蛋白表达的比较

3 讨论

在胃癌的治疗过程中,著名中医专家刘沈林教授提倡“脾虚毒蕴”的理论,始终遵循脾虚为本,癌毒为标的治疗思想^[7]。参虎半夏汤是在“益气解毒”治则指导

下制定的复方,前期本课题组在临床研究^[8]中发现参虎半夏汤可明显延长胃癌晚期患者生存时间;并在基础实验^[9]中发现参虎半夏汤可抑制人胃癌裸小鼠皮下移植瘤的生长,也可诱发肿瘤细胞凋亡。随着高通量筛选方法的发展,蛋白质组学技术进一步推进了中医现

代化的进程,其主要广泛运用于疾病相关的生物标记和靶点等方面^[10-11]。本研究采用蛋白质组学进行差异表达蛋白分析,结果发现与对照组相比,参虎半夏汤组有 5 个蛋白的表达下调,按排名顺序为 S100A9、S100A8、ARHGDIB、Lyz2、ITGB2;有 2 个蛋白表达上调,包括 CPB2、Serpine2。

本研究进一步对重要的差异蛋白质进行文献分析,发现参虎半夏汤所调控的差异蛋白主要为炎症相关蛋白、迁移相关蛋白、纤溶蛋白等,具体相关重要蛋白质功能分析如下。①炎症相关蛋白:S100 钙结合蛋白与炎症类的疾病紧密相关,也参与肿瘤的发展和转移;在 S100 家族中,S100A8 和 S100A9 在骨髓源性细胞中表达,常以 Ca^{2+} 依赖方式形成 S100A8/A9 异二聚体,在细胞内外具有重要作用^[12];多数研究^[13-14]显示 S100A8/A9 可以促进肿瘤生长,主要通过促进原癌基因激活、推动髓源抑制性细胞(MDSC)的聚拢、促使肿瘤的转移及浸润等途径;研究^[15]结果显示,S100A8/A9 在胃癌患者的血浆中水平升高,胃癌患者的外周血来源的 MDSC 表达并分泌 S100A8/A9,由此将 S100A8/A9 确定为胃癌治疗的潜在靶点。②迁移相关蛋白:ARHGDIB 在肿瘤细胞的转移、浸润以及肿瘤多重耐药等发展中起着重要作用,并且是 Rho GDP 酶的重要调控因子之一;有研究^[16]报道敲低 ARHGDIB 的表达可通过抑制胃癌的上皮间质转化(EMT),进而抑制其侵袭和转移;研究^[17]发现 ARHGDIB 也可以通过增加血管内皮生长因子(VEGF)的表达而引起耐药性基因的表达;所以 ARHGDIB 可能是同时降低胃癌转移风险和增强化疗疗效的潜在治疗靶点。③纤溶蛋白:Serpine2 是丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族中的重要组成部分,其可以限制各种蛋白酶(如胰蛋白酶、尿激酶、凝血酶和纤溶酶)的活性;多项研究^[18-19]结果证明,Serpine2 在很多肿瘤中出现表达上调或下调,而且 Serpine2 可促进肿瘤进展;仅有一项研究^[20]表明 Serpine2 在胃癌中高表达,与胃癌远近处转移及患者预后不佳等相关;相关体外实验结果表明,Serpine2 可以促使胃癌细胞的增殖、侵袭、转移,揭示 Serpine2 可能参与胃癌发生发展,但具体相关机制和通路暂未有详细研究报道。

本研究对 S100A9、S100A8、ARHGDIB、Lyz2、ITGB2 等差异蛋白的功能进行 GO 功能富集分析,结果显示其富集度较高,主要涉及中性粒细胞通过聚集、NF- κ B 细胞极化、参与新生血管生成的细胞迁移等生物过程;分子功能中差异表达蛋白富集度较高,主要发挥层黏蛋白结合、Toll 样受体 4 结合、半乳糖苷结合、花生四烯酸结合等功能。通过 KEGG 富集分析,我们发现与肿瘤相关的差异表达蛋白存在较为显著的通路(如凝血级联通路、IL-17 通路和补体通路等)。在蛋白的验证过

程中,我们发现参虎半夏汤干预后 S100A9 蛋白表达水平明显下降,其与 S100A9 蛋白和 IL-17 信号通路相关;ARHGDIB 蛋白表达水平明显下降,其主要参与新生血管生成的细胞迁移;Serpine2 蛋白表达明显升高,其主要与补体通路和凝血级联反应通路相关。上述结果提示参虎半夏汤抗胃癌的机制可能通过下调 S100A9 相关炎症蛋白和 ARHGDIB 迁移相关蛋白、上调 Serpine2 纤溶蛋白有关,其具体机制需要进一步深入探索研究。

综上所述,本研究通过蛋白质组学分析发现,参虎半夏汤对人胃癌细胞的抗癌作用机制可能与炎症相关蛋白、迁移相关蛋白、纤溶蛋白等蛋白以及 IL-17 信号通路、补体通路和凝血级联反应通路等通路相关。以往研究成果从临床和细胞水平确认了参虎半夏汤在胃癌治疗中的药效学作用,以及其促进胃癌细胞凋亡和抑制肿瘤细胞增殖的作用^[8-9]。后期我们将进一步从肿瘤炎症微环境、胃癌侵袭转移等方面开展参虎半夏汤的实验研究,进一步探讨其治疗胃癌的分子机制,筛选胃癌治疗中的关键干预靶点,为胃癌的治疗及其复发转移的预防提供更好的参考依据。

参考文献:

- [1] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229-263.
- [2] Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma[J]. Nature, 2014, 513(7517): 202-209.
- [3] 任娟,康妍,陈伟霞,等. 基于网络药理学与分子对接技术的参虎半夏汤抗胃癌机制研究[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2021, 47(6): 607-617.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2020 年版):一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020.
- [5] 黄梦遥,陈国忠,郑日辉,等. 七方胃痛颗粒对人胃癌细胞 MKN-45 裸鼠移植瘤生长及 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响[J]. 时珍国医国药, 2023, 34(12): 2861-2863.
- [6] 魏伟,吴希美,李元建,等. 药理实验方法学[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社,2010: 69-72.
- [7] 杨文娟,戴安伟,邹玺,等. 刘沈林教授辨治中晚期胃癌的经验探析[J]. 现代中医临床, 2023, 30(3): 113-116.
- [8] 陈伟霞,任娟,朱珍珍,等. 益气解毒中药参虎半夏汤对晚期胃癌患者预后的影响[J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(8): 1812-1815.
- [9] 闫喜凤. 益气解毒方对裸鼠胃癌皮下移植瘤生长及相关蛋白表达的影响[D]. 郑州:河南中医药大学, 2017.
- [10] CHIOU S H, LEE K T. Proteomic analysis and translational perspective of hepatocellular carcinoma: Identification of diagnostic protein biomarkers by an onco-proteogenomics approach [J]. Kaohsiung J Med Sci, 2016, 32(11): 535-544.
- [11] BURTON L J, RIVERA M, HAWSAWI O, et al. Muscadine grape skin extract induces an unfolded protein response-mediated autophagy in prostate cancer cells: A TMT-based quantitative proteomic analysis

- [J]. PLoS One, 2016, 11(10):e0164115.
- [12] ROTH J, BURWINKEL F, VAN DEN BOS C. MRP8 and MRP14, S-100-like proteins associated with myeloid differentiation, are translocated to plasma membrane and intermediate filaments in a calcium-dependent manner[J]. Blood, 1993, 82(6):1875-1883.
- [13] TANIGAWA K, TSUKAMOTO S, KOMA Y I, et al. S100A8/A9 induced by interaction with macrophages in esophageal squamous cell carcinoma promotes the migration and invasion of cancer cells via Akt and p38 MAPK pathways[J]. Am J Pathol, 2022, 192(3):536-552.
- [14] CHEN Y, OUYANG Y, LI Z, et al. S100A8 and S100A9 in Cancer [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2023, 1878(3):188891.
- [15] WANG L, CHANG E W, WONG S C, et al. Increased myeloid-derived suppressor cells in gastric cancer correlate with cancer stage and plasma S100A8/A9 proinflammatory proteins [J]. J Immunol, 2013, 190(2):794-804.
- [16] ZENG Y, REN M, LI Y, et al. Knockdown of RhoGDI2 represses human gastric cancer cell proliferation, invasion and drug resistance via the Rac1/Pak1/LIMK1 pathway [J]. Cancer Lett, 2020, 492: 136-146.
- [17] CHO H J, KIM I K, PARK S M, et al. VEGF-C mediates RhoGDI2-induced gastric cancer cell metastasis and cisplatin resistance [J]. Int J Cancer, 2014, 135(7):1553-1563.
- [18] ZHANG S, JIA X, DAI H, et al. SERPINE2 promotes liver cancer metastasis by inhibiting c-Cbl-mediated EGFR ubiquitination and degradation [J]. Cancer Commun (Lond), 2024, 44(3):384-407.
- [19] LIU Y, LI X, CHEN S, et al. Pan-cancer analysis of SERPINE family genes as biomarkers of cancer prognosis and response to therapy [J]. Front Mol Biosci, 2023, 10:1277508.
- [20] WANG K, WANG B, XING A Y, et al. Prognostic significance of SERPINE2 in gastric cancer and its biological function in SGC7901 cells [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2015, 141(5):805-812.

编辑:杨轶舜

收稿日期:2024-04-15

