

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.19.026

基于蛋白质组学探讨准噶尔阿魏抗结肠癌的作用机制*

刘巧贇¹, 张海英^{2,3}, 李 迅⁴, 王德奎², 林 燕^{4△}

1. 新疆医科大学第四临床医学院, 新疆乌鲁木齐 830000; 2. 新疆医科大学附属中医医院药学部, 新疆乌鲁木齐 830000; 3. 新疆中药炮制研究重点实验室, 新疆乌鲁木齐 830000;
4. 新疆医科大学附属中医医院肿瘤科, 新疆乌鲁木齐 830000

摘要:目的 通过动物实验分析准噶尔阿魏乙醇提取物(简称醇提取物)的体内抗结肠癌活性,基于蛋白质组学探讨准噶尔阿魏醇提取物治疗结肠癌可能涉及的药理作用机制。方法 建立结肠癌 CT26 荷瘤小鼠模型,随机分为正常对照组、模型组、顺铂组及准噶尔阿魏醇提取物低、中、高剂量组,连续给药 12 d,取材并计算各组抑瘤率及脏器指数。取模型组和抑瘤率 $>40\%$ 的准噶尔阿魏醇提取物剂量组小鼠肿瘤组织标本,利用串联质谱标记(TMT)技术筛选准噶尔阿魏醇提取物组与模型组间的差异蛋白,分析涉及的生物功能、关键作用靶标及信号通路。结果 准噶尔阿魏醇提取物高、中、低剂量组的抑瘤率分别为 $(63.82\pm 4.01)\%$ 、 $(38.17\pm 3.78)\%$ 、 $(36.25\pm 3.43)\%$,准噶尔阿魏醇提取物高剂量组的抑瘤率明显高于准噶尔阿魏醇提取物中、低剂量组($P<0.05$)。与正常对照组相比,顺铂组及准噶尔阿魏醇提取物高、中、低剂量组小鼠的脾重、肾重及胸腺重均明显减小($P<0.05$);准噶尔阿魏醇提取物高、中、低剂量组间小鼠的脾重、肾重及胸腺重比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。与正常对照组相比,准噶尔阿魏醇提取物高剂量组小鼠的脾指数、胸腺指数明显减小($P<0.05$),肾指数差异无统计学意义($P>0.05$);与正常对照组相比,准噶尔阿魏醇提取物中剂量组小鼠的脾指数、肾指数、胸腺指数均明显减小($P<0.05$);与正常对照组相比,准噶尔阿魏醇提取物低剂量组小鼠的肾指数、胸腺指数明显减小($P<0.05$),脾指数差异无统计学意义($P>0.05$);准噶尔阿魏醇提取物高剂量组小鼠的肾指数明显高于准噶尔阿魏醇提取物中、低剂量组($P<0.05$)。蛋白质组学筛选出 642 个差异蛋白,其中 FN1、FLNC、HSPH1、HSP90AA1 等蛋白排名在前 10;COG 分析结果显示差异蛋白共参与了 582 个生物功能,主要涉及翻译后修饰及蛋白转运(15.8%)、信号转导机制(15.1%)、转录(9.1%)等;KEGG 富集分析显示差异蛋白参与的信号通路主要涉及 PI3K-Akt 信号通路、细胞外基质-受体相互作用、癌症中的蛋白聚糖、补体和凝血级联反应、TNF 信号通路、AMPK 信号通路、甘氨酸丝氨酸和苏氨酸代谢等。结论 动物实验显示准噶尔阿魏醇提取物的抗结肠癌活性好,蛋白质组学分析揭示了准噶尔阿魏治疗结肠癌可能的关键靶标及分子机制, FN1、FLNC、HSPH1、HSP90AA1 等可能是其中的关键蛋白。

关键词: 结肠癌; 蛋白质组学; 准噶尔阿魏; 增殖; 抑瘤率

中图分类号: R282.71; R735.3+5; **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-9455(2024)19-2913-07

Investigation on anti-colon cancer action mechanism of Junggar Ferula based on proteomics*

LIU Qiaoyun¹, ZHANG Haiying^{2,3}, LI Xun⁴, WANG Dexi², LIN Yan^{4△}

1. Fourth Clinical Medical College of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830000, China; 2. Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830000, China; 3. Xinjiang Key Laboratory of Processing and Research of Traditional Chinese Medicine, Urumqi, Xinjiang 830000, China; 4. Department of Oncology, Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830000, China

Abstract: Objective To analyze the in vivo anti-colon cancer activity of Junggar Ferula ethanol extract by the animal experiment, and to explore its possibly involved pharmacological mechanisms in treating colon cancer based on proteomics. **Methods** The mouse model of colon cancer CT26 bearing tumor was established, randomly divided into the normal control group, model group, cisplatin group and Junggar Ferula ethanol extract low, medium and high doses groups. Continuous medication lasted for 12 d, The samples were taken, and the tumor inhibition rate and organ index were calculated in each group. The mice tumor tissue samples were taken from the model group and the Junggar Ferula ethanol extract dose groups with the tumor inhibition

* 基金项目:国家自然科学基金项目(82060734)。

作者简介:刘巧贇,女,主治医师,主要从事消化道肿瘤的防治研究。△ 通信作者, E-mail: 3322844168@qq.com。

rate $>40\%$. The tandem mass labeling (TMT) technology was used to screen the differential proteins between the Junggar Ferula ethanol extract group and the model group, the involved biological functions, key action targets and signaling pathways were analyzed. **Results** The tumor inhibition rates of the Junggar Ferula ethanol extract high, medium and low dose groups were $(63.82 \pm 4.01)\%$, $(38.17 \pm 3.78)\%$ and $(36.25 \pm 3.43)\%$ respectively. The tumor inhibition rate of the Junggar Ferula ethanol extract high dose group was significantly higher than that of the Junggar Ferula ethanol extract medium and low dose groups ($P < 0.05$). Compared with the normal control group, the spleen weight, kidney weight and thymus weight of mice in the cisplatin group and the Junggar Ferula ethanol extract high, medium and low dose groups were significantly decreased ($P < 0.05$). There was no statistically significant difference in the spleen weight, kidney weight and thymus weight among the Junggar Ferula ethanol extract high, medium and low dose groups ($P > 0.05$). The spleen index and thymus index in the Junggar Ferula ethanol extract high dose group was significantly decreased ($P < 0.05$), while the difference in kidney index was not statistically significant ($P > 0.05$); compared with the normal control group, the spleen index, kidney index, and thymus index of mice in the Junggar Ferula ethanol extract medium dose group were significantly decrease ($P < 0.05$); compared with the normal control group, the kidney index and thymus index the Junggar Ferula ethanol extract low dose group were significantly decreased ($P < 0.05$), while the difference in the spleen index was not statistically significant ($P > 0.05$); the renal index of mice in the Junggar Ferula ethanol extract high dose group was significantly higher than that in the Junggar Ferula ethanol extract medium and low dose groups ($P < 0.05$). Proteomic screened 642 differential proteins, in which FN1, FLNC, HSPH1, HSP90AA1 and other proteins ranked in the top 10; the COG analysis results showed that differential proteins were involved in 582 biological functions, mainly involving post-translational modifications and protein transport (15.8%), signal transduction mechanisms (15.1%), transcription (9.1%), etc; the KEGG enrichment analysis showed that the signaling pathways involved in differential proteins mainly involve PI3K-Akt signaling pathway, extracellular matrix receptor interaction, proteoglycans in cancer, complement and coagulation cascade reactions, TNF signaling pathway, AMPK signaling pathway, glycine serine and threonine metabolism, etc. **Conclusion** The animal experiment shows that the anti-colon cancer activity of Junggar Ferula ethanol extract is good. The proteomic analysis reveals the possible key target and molecular mechanism of Junggar Ferula ethanol extract in treating colorectal cancer. FN1, FLNC, HSPH1 and HSP90AA1 may be its key proteins.

Key words: colon cancer; proteomics; Junggar Ferula; proliferation; tumour inhibition rate

结肠直肠癌(CRC)是最常见的消化道恶性肿瘤之一。据全球癌症统计报告(GLOBOCAN 2022)显示, CRC 位于全球发病谱第 3 位(9.6%)和死因谱第 2 位(9.3%)^[1]。在我国, CRC 的发病率以 12.2% 居癌症发病率第 2 位, 死亡率以 9.5% 居癌症死亡率第 5 位^[2], 且这个数据还将随着不良的饮食和生活习惯以及人口老龄化的加剧而不断增长^[3]。手术及放疗作为 CRC 的常见治疗手段, 其临床受益有限, 术后的复发转移、诸多药物不良反应及越来越多的化疗耐药, 可能最终导致临床治疗失败^[4]。中药具有多种有效活性成分, 可以多途径、多靶点、多通路作用于肿瘤细胞, 不但能杀伤肿瘤细胞, 还有很好的化学保护作用^[5]。因此, 积极寻找新的防治中药, 探索 CRC 的发病机制及治疗靶位, 对于 CRC 的精准诊治具有十分重要的意义。

阿魏是新疆特色珍贵中药材, 素有“西域国珍”之美称。近年来, 阿魏独特的广谱抗肿瘤作用受到研究者的广泛关注, 其富含倍半萜、香豆素、黄酮类化合物, 这些物质已被证实具有良好的抑瘤作用^[6], 能通

过促进肿瘤细胞的自噬与凋亡, 抑制肿瘤细胞增殖、侵袭、迁移, 抑制肿瘤血管生成等多种途径发挥抗肿瘤的作用, 并在多种癌症的实验模型中显示出良好的抑瘤效果^[7-11]。课题组在前期研究中^[12-15], 将新疆 10 种阿魏(北屯阿魏、臭阿魏、多伞阿魏、荒地阿魏、全裂叶阿魏、山地阿魏、托里阿魏、新疆阿魏、圆锥茎阿魏、准噶尔阿魏)分别作用于结肠癌、宫颈癌及胃癌等多种癌症模型, 结果显示, 准噶尔阿魏对结肠癌、宫颈癌及胃癌均表现出了优秀的抗肿瘤作用, 且对耐长春新碱结肠癌细胞具有逆转耐药作用, 药用价值高, 具有进一步研究及开发的價值。

蛋白质组学是研究细胞、组织、生物体的全部蛋白及其活动规律的新兴交叉科学, 对蛋白质进行整体的定性、定量和动态鉴定, 阐释其生物学功能, 从蛋白层面上获取有关于疾病发生过程的整体认知^[16], 目前已成为攻克重大疾病及新药研发的技术手段之一。肿瘤是具有高度异质性和动态演化的疾病, 随着质谱技术的发展, 蛋白质组学为认识肿瘤病变机制以及发现肿瘤生物标志物和治疗靶标等提供了重要技术手

段^[17]。近年来,蛋白质组学在推动 CRC 的精准诊治方面取得了重要进展,旨在阐明 CRC 发生、发展分子机制,寻找生物标记物以及新的药物靶点,为 CRC 的早期发现、精准诊治及疗效评估提供了切实依据^[18]。

本研究先通过动物实验明确准噶尔阿魏乙醇提取物(简称醇提取物)的药理学活性,再运用串联质谱标记(TMT)技术筛选差异蛋白并分析其生物学信息,从分子、组织、动物不同层面展开系统研究,多角度探讨准噶尔阿魏治疗结肠癌的药理学活性及可能涉及的作用机制,进一步探明准噶尔阿魏的药用价值,为开发利用新疆特色药准噶尔阿魏奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 试药 准噶尔阿魏于 2021 年 5 月采集于新疆塔城北山,经新疆医科大学附属中医医院李永和主任中药师鉴定,符合《新疆植物志》中对准噶尔阿魏的描述。

1.2 动物 SPF 级 Balb/c 小鼠 60 只,雌雄各半,4 周龄,体质量(19±3)g,来源于新疆医科大学动物中心[SCXK(新)2023-0003],饲养条件:室温 20~25℃、湿度 40%~70%、12 h 明暗交替照明、动物自由饮水进食。研究人员通过实验动物伦理知识相关培训,实验过程中严格遵守《实验动物管理条例》及“3R”原则^[19]。本研究获得新疆医科大学实验动物伦理委员会批准(IAACUC-20230227-86)。

1.3 细胞 小鼠结肠癌 CT26. WT 细胞(中国医学科学院基础医学研究所),实验使用 3~5 代细胞。

1.4 主要仪器与试剂 分析天平(德国 strtorius 公司,型号:BSA224S-CW);高效液相色谱仪(美国 Thermo 公司,型号:nanoUPLC EASYnLC1200);质谱仪(美国 Thermo 公司,型号:Q Exactive HFX)。甲基噻唑四氮唑(MTT,美国 Sigma 公司,规格:1 g,批号:EZ3234D158);二甲基亚砜(DMSO,德国 BioFrox 公司,规格:100 mL,批号:EZ7890A253);Matrigel 基质胶(美国 Corning 公司,规格:5 mL,批号:2307003);顺铂注射液(云南植物药业有限公司,规格:2 mL:10 mg,批号:20230201);4%多聚甲醛组织固定液(Bio-sharp 公司,规格:500 mL,批号:23067175);西域娜依葵花籽油(新疆鸿盛锦粮油科技公司,规格:5 L)。

1.5 方法

1.5.1 动物实验

1.5.1.1 建模与分组 Balb/c 小鼠适应性喂养 7 d,取小鼠结肠癌 CT26. WT 细胞,以生理盐水配置成浓度为 2×10^6 cells/mL 的细胞混悬液,按每只 0.2 mL 的剂量无菌接种于小鼠右侧腹部皮下。待 Balb/c 小鼠建模成功后随机分为模型组、顺铂组和准噶尔阿魏醇提取物低、中、高剂量组,每组 10 只,另取 10 只健康小鼠作为正常对照组。将食用油、水、吐温-80 以 8:4:1 的比例混合,与准噶尔阿魏醇提取物稠浸膏配置成含药乳剂,正常对照组和模型组小鼠分别给予相同比

例浓度的空白乳剂灌胃,1 次/d;顺铂组给予顺铂 5 mg/kg,腹腔注射,1 次/3 d;阿魏根的临床用量为生药 10 g/d,本实验中按成人(60 kg)的用药量,参照《药理实验方法学》^[20]按人与小鼠的等效剂量系数计算出实验小鼠的给药剂量为生药 1.5 g/kg,即准噶尔阿魏醇提取物高剂量组,取 2/3 倍剂量即生药 1.0 g/kg 为准噶尔阿魏醇提取物中剂量组,取 1/3 倍剂量即生药 0.5 g/kg 为准噶尔阿魏醇提取物低剂量组,准噶尔阿魏醇提取物不同剂量组依照给药浓度灌胃,1 次/d;接种瘤株的次日开始给药,连续给药 12 d,记录各组小鼠的体质量与肿瘤生长情况。

1.5.1.2 取材 末次给药 24 h 后麻醉处死小鼠,迅速剥离各组小鼠的肿瘤组织及脾脏、肾脏、胸腺,称重并记录数据,计算每只小鼠的抑瘤率及脏器指数。将肿瘤组织标记分组并迅速放入液氮中保存,为后期的蛋白质组学分析备用。抑瘤率(%)=(模型组平均瘤重-给药组平均瘤重)/模型组平均瘤重×100%。脏器指数=脏器重/体质量×100%。

1.5.2 蛋白质组学分析

1.5.2.1 标本信息 从 1.5.1.2 中获得模型组小鼠肿瘤组织标本 5 个(模型组),从准噶尔阿魏醇提取物不同剂量组中选取抑瘤率>40%的剂量组小鼠肿瘤组织标本 5 个(准噶尔阿魏醇提取物组)。

1.5.2.2 蛋白质提取和肽段降解 取适量小鼠肿瘤组织标本,加入 RIPA 工作液,钢珠低温研磨加冰水浴超声充分裂解样品,12 000 r/min,4℃离心 10 min 取上清液。蛋白定量后加入预冷的丙酮取沉淀,蛋白重溶、还原、烷基化、酶解,按照 Thermo 公司 TMT 标记试剂盒说明书进行标记,得到标记的多肽样品。

1.5.2.3 色谱分离及质谱分析 经 nano-UPLC 液相系统 EASY-nLC1200 进行分离,用配备纳升离子源的质谱仪 Q Exactive HFX 对分离后的标本进行质谱分析。色谱分离采用 100 μL ID×15 cm 反相色谱柱。质谱使用数据依赖性采集模式,采取正离子检测模式,总分析时长为 90 min。

1.5.2.4 搜库分析 原始数据文件使用 Proteome Discoverer 软件(version 2.4.0.305)及内置的 Sequest HT 搜索引擎进行差异蛋白筛选,将筛选出的差异蛋白进行直系同源簇(COG)聚类分析、亚细胞定位分析、KEGG 富集分析、基因本体论(GO)分析。

1.6 统计学处理 使用 SPSS 20.0 软件对数据进行分析。对数据进行正态性及方差齐性检验,呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,若方差不齐先进行对数转换后再进行方差分析,多组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠体质量、瘤重及脏器重比较 模型组、顺铂组、各给药组小鼠的精神状态均变差,小鼠出现

食欲不振、体质量下降、不喜活动、萎靡不振、乏力嗜睡,个别小鼠存在泄泻现象,其中顺铂组表现更为显著,准噶尔阿魏醇提取物不同剂量组小鼠随着用药剂量的减少,所表现出的毒副症状随之减轻。

在体质量方面:与正常对照组相比,顺铂组与准噶尔阿魏醇提取物高、中剂量组小鼠的体质量均明显降低($P < 0.05$);模型组与准噶尔阿魏醇提取物低剂量组小鼠体质量与正常对照组相比,差异均无统计学意义($P > 0.05$);与准噶尔阿魏醇提取物低剂量组相比,准噶尔阿魏醇提取物高剂量组小鼠的体质量明显降低($P < 0.05$);准噶尔阿魏醇提取物高、低剂量组小鼠的体质量与准噶尔阿魏醇提取物中剂量组相比,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

在瘤重方面:与模型组相比,顺铂组与准噶尔阿魏醇提取物高剂量组小鼠的瘤重均明显减轻($P < 0.05$);准噶尔阿魏醇提取物中、低剂量组小鼠瘤重与模型组相比,差异均无统计学意义($P > 0.05$);准噶尔阿魏醇提取物高剂量组的瘤重显著低于准噶尔阿魏醇提取物中、低剂量组($P < 0.05$);准噶尔阿魏醇提取物中、低剂量组间瘤重比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

在脏器重方面:与正常对照组相比,顺铂组及准噶尔阿魏醇提取物高、中、低剂量组小鼠的脾重、肾重及胸腺重均明显减小($P < 0.05$);准噶尔阿魏醇提取物高、

中、低剂量组间小鼠的脾重、肾重及胸腺重比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 各组小鼠抑瘤率及脏器指数比较 在抑瘤率方面:准噶尔阿魏醇提取物高、中、低剂量组的抑瘤率分别为(63.82 ± 4.01)%、(38.17 ± 3.78)%、(36.25 ± 3.43)%。准噶尔阿魏醇提取物高剂量组的抑瘤率显著高于准噶尔阿魏醇提取物中、低剂量组($P < 0.05$);准噶尔阿魏醇提取物中、低剂量组间抑瘤率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。准噶尔阿魏醇提取物高剂量组的抑瘤率 > 40%,故选择该组的肿瘤组织进行后续的蛋白质组学分析。

在脏器指数方面:与正常对照组相比,准噶尔阿魏醇提取物高剂量组小鼠的脾指数、胸腺指数明显减小($P < 0.05$),肾指数差异无统计学意义($P > 0.05$);与正常对照组相比,准噶尔阿魏醇提取物中剂量组小鼠的脾指数、肾指数、胸腺指数均明显减小($P < 0.05$);与正常对照组相比,准噶尔阿魏醇提取物低剂量组小鼠的肾指数、胸腺指数明显减小($P < 0.05$),脾指数差异无统计学意义($P > 0.05$);准噶尔阿魏醇提取物高剂量组小鼠的肾指数显著高于准噶尔阿魏醇提取物中、低剂量组($P < 0.05$);准噶尔阿魏醇提取物高、中、低剂量组间小鼠的脾指数、胸腺指数比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 1 各组小鼠体质量、瘤重及脏器重比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体质量(g)	瘤重(mg)	脾重(mg)	肾重(mg)	胸腺重(mg)
正常对照组	10	22.42 ± 2.76	—	79.59 ± 19.2	157.84 ± 34.91	50.18 ± 12.69
模型组	10	22.12 ± 3.90	541.98 ± 356.62	98.10 ± 34.94	161.69 ± 37.82	36.94 ± 14.42
顺铂组	9	13.84 ± 3.73 ^{①②}	19.30 ± 11.50 ^②	26.18 ± 7.73 ^{①②}	93.08 ± 36.53 ^{①②}	8.20 ± 2.00 ^{①②}
准噶尔阿魏醇提取物高剂量组	9	16.53 ± 1.94 ^{①②④}	196.10 ± 139.75 ^{②③④}	42.30 ± 13.27 ^{①②}	119.02 ± 24.61 ^{①②}	6.48 ± 2.05 ^{①②}
准噶尔阿魏醇提取物中剂量组	10	18.11 ± 1.56 ^{①②}	335.13 ± 143.03	37.73 ± 9.65 ^{①②}	107.69 ± 24.32 ^{①②}	10.48 ± 3.14 ^{①②}
准噶尔阿魏醇提取物低剂量组	10	20.06 ± 3.26	345.50 ± 96.33	57.51 ± 24.86 ^{①②}	121.59 ± 39.54 ^{①②}	10.30 ± 3.37 ^{①②}
F		9.928	5.129	10.124	5.423	26.395
P		<0.001	0.002	<0.001	0.001	<0.001

注:与正常对照组比较,^① $P < 0.05$;与模型组比较,^② $P < 0.05$;与准噶尔阿魏醇提取物中剂量组比较,^③ $P < 0.05$;与准噶尔阿魏醇提取物低剂量组比较,^④ $P < 0.05$;—表示无数据。

表 2 各组小鼠抑瘤率及脏器指数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	脾指数(mg/g)	肾指数(mg/g)	胸腺指数(mg/g)	抑瘤率(%)
正常对照组	10	3.58 ± 0.79	6.97 ± 0.7	2.25 ± 0.54	—
模型组	10	4.60 ± 1.13	7.29 ± 0.97	1.66 ± 0.51	—
顺铂组	9	1.83 ± 0.44 ^{①②}	6.62 ± 1.05	0.50 ± 0.18 ^{①②}	96.44 ± 2.12
准噶尔阿魏醇提取物高剂量组	9	2.43 ± 0.52 ^{①②}	7.22 ± 1.32 ^{③④}	0.42 ± 0.16 ^{①②}	63.82 ± 4.01 ^{③④}
准噶尔阿魏醇提取物中剂量组	10	2.06 ± 0.42 ^{①②}	5.92 ± 1.09 ^{①②}	0.60 ± 0.26 ^{①②}	38.17 ± 3.78
准噶尔阿魏醇提取物低剂量组	10	2.75 ± 0.89 ^②	5.94 ± 1.17 ^{①②}	0.47 ± 0.17 ^{①②}	36.25 ± 3.43
F		5.895	2.954	20.929	4.836
P		<0.001	0.021	<0.001	0.008

注:与正常对照组比较,^① $P < 0.05$;与模型组比较,^② $P < 0.05$;与准噶尔阿魏醇提取物中剂量组比较,^③ $P < 0.05$;与准噶尔阿魏醇提取物低剂量组比较,^④ $P < 0.05$;—表示无数据。

2.3 蛋白质组学分析结果

2.3.1 差异蛋白的鉴定与表达分析 共鉴定到 7 804 个蛋白,以 $\text{Fold change} \geq 1.2$ 或 $\text{Fold change} \leq 0.83$ 倍, $P < 0.05$ 为条件筛选差异表达蛋白。与模型组比较,准噶尔阿魏醇提取物组共有 642 个差异蛋白,其中上调蛋白 166 个、下调蛋白 476 个,结果以火山图的形式展示(图 1)。排名前 10 的差异表达蛋白见表 3。

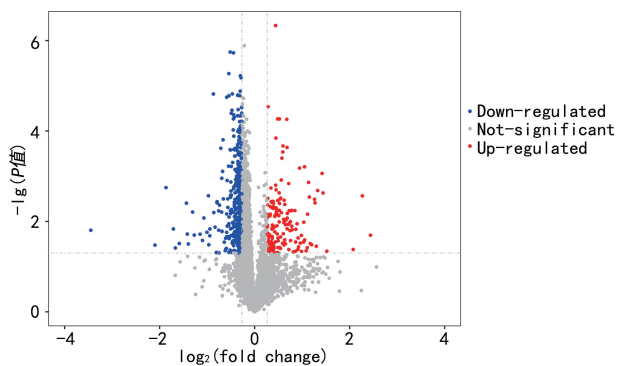


图 1 差异蛋白火山图

表 3 差异表达蛋白 TOP10(准噶尔阿魏醇提取物组 vs. 模型组)

基因名称	蛋白	P	Fold change
PLEC	Q9QXS1	0.002 87	0.812 3
FLNC	Q8VHX6	0.016 95	1.343 5
FN1	P11276	0.023 73	0.793 3
C3	P01027	0.033 05	1.535 3
FBN1	Q61554	0.009 03	1.563 9
MUG1	P28665	0.005 76	1.799 2
ACTA1	P68134	0.047 11	1.772 5
HSP90AA1	P07901	0.000 18	0.797 5
HSPH1	Q61699	0.001 13	0.790 0
IMMT	Q8CAQ8	0.003 77	1.283 9

2.3.2 差异蛋白 COG 聚类分析 COG 分析结果显示:差异蛋白共参与了 582 个生物功能,主要涉及翻译后修饰及蛋白转运(15.8%)、信号转导机制(15.1%)、转录(9.1%)、细胞内运输和囊泡运输(6.2%)、细胞骨架(5.7%)翻译及核糖体结构与生物发生(5.5%)、氨基酸的转运与代谢(4.5%)等。

2.3.3 差异蛋白亚细胞定位分析 通过亚细胞定位分析能直观了解差异蛋白发挥功能的场所,结果显示:共富集到 642 个位置信息,差异蛋白在各个细胞器均有分布,主要在细胞质(28.66%)、细胞核(28.04%)、外泌体(24.30%)、质膜(6.54%)、线粒体(4.21%)、内质网膜(2.96%)中。

2.3.4 差异蛋白 KEGG 富集分析 将差异蛋白进行 KEGG 富集分析(可视化前 25 条,见图 2),结果显示差异蛋白参与的信号通路主要涉及 PI3K-Akt 信号

通路、细胞外基质-受体相互作用、癌症中的蛋白聚糖、补体和凝血级联反应、TNF 信号通路、AMPK 信号通路、甘氨酸丝氨酸和苏氨酸代谢等。

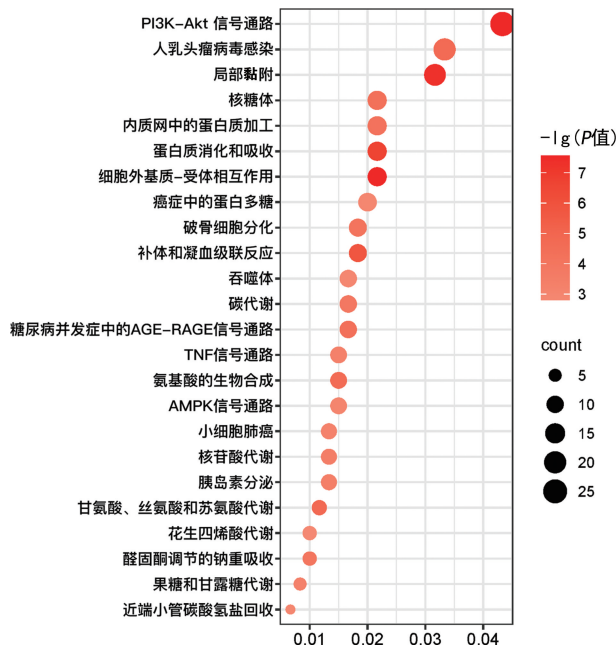


图 2 前 25 名 KEGG 富集分类气泡图

2.3.5 差异蛋白 GO 分析 将差异蛋白进行 GO 分析,结果显示:差异蛋白共参与了 1 497 条生物过程,主要涉及有机物代谢过程、细胞代谢过程、含氮化合物代谢过程、对应激的响应、生物质量调控等;差异蛋白共参与了 231 条分子功能,主要涉及蛋白质结合、细胞外基质结构成分、结构分子活性、黏合物、结构分子活性、催化活性等;差异蛋白共参与了 207 条细胞组成,主要涉及细胞液、细胞质、蛋白复合体、细胞外基质、细胞核等。

3 讨论

天然抗肿瘤药物的体内药效学研究通常通过动物荷瘤模型实验,即将肿瘤细胞接种于动物体内进行建模,评估建模成功后给予受试药物干预,以此来考查药物对肿瘤的体内抑制效果。根据《抗肿瘤药物药效学指导原则》中的要求,天然植物药物对肿瘤的抑瘤率大于 40%时,可初步判定该药物具有一定的抗肿瘤作用,具有进一步的研究价值。通过体内研究发现,对于结肠癌 CT26 荷瘤模型小鼠,准噶尔阿魏醇提取物高剂量组的抑瘤率为 $(63.82 \pm 4.01)\%$,符合指导原则中抑瘤率 $> 40\%$ 的要求,表明准噶尔阿魏醇提取物高剂量组有较好的体内抗结肠癌效果。

动物的脏器指数是评价受试药物对靶器官药理及毒性作用的重要生物学指标,能在一定程度上反映机体免疫功能的强弱^[21]。化疗药物常会抑制机体的免疫功能^[22]。胸腺及脾脏是机体的免疫器官,本研究结果显示,顺铂组及准噶尔阿魏醇提取物高、中、低剂量组小鼠的胸腺指数、脾指数均较模型组降低,故推测

给药后出现了一定的免疫抑制现象,其原因有待进一步研究。

肾脏是药物不良反应的主要靶器官,对外源性毒物的损害非常敏感^[23],因此通过研究肾重、肾指数的变化可快速判断药物的毒理作用。本研究结果显示,与模型组相比,顺铂组及准噶尔阿魏醇提物高、中、低剂量组小鼠的肾重均出现下降,准噶尔阿魏醇提物中、低剂量组小鼠的肾指数明显下降,提示准噶尔阿魏醇提物中、低剂量组有导致肾功能损伤的风险,实验结果与顺铂在临床使用中表现出的肾损伤不良反应一致。但本实验中仅进行了肾指数的评估,评价指标相对单一,还需结合胱抑素 C、血肌酐等肾损伤敏感指标以及肾脏标本病理切片进行综合评估。

蛋白质组学的发展极大推动了包括 CRC 在内的各种肿瘤的病变机制、早期发现和临床精准诊治的研究。本研究基于蛋白质组学鉴定出一些关键差异蛋白,主要包括 FN1、FLNC、HSPH1 及 HSP90AA1,这些蛋白与 CRC 的恶性进程紧密相关。细胞外基质是肿瘤微环境的重要部分,作为细胞直接生存的内环境,与 CRC 的发生、发展密切相关。FN1 是一种大分子糖蛋白,是构成细胞外基质的主要成分,参与各种细胞的黏附、迁移和运动^[24]。有研究显示, FN1 是一种促癌基因,在胃癌及结直肠癌中出现高表达^[25]。贾蓉等^[26]研究发现 SLC16A8 通过上调 FN1 的表达促进 CRC 细胞增殖、迁移和血管生成。XIE 等^[27]的研究显示, IRE1 α 通过抑制 FN1 的表达发挥抗结肠癌细胞的转移潜力。本研究结果与上述报道一致,与模型组相比较,准噶尔阿魏醇提物组小鼠肿瘤组织中的 FN1 表达下调,KEGG 结果提示差异蛋白参与了细胞外基质-受体相互作用,故推测准噶尔阿魏可能通过下调 FN1 的表达抑制细胞外基质间的异常转化从而发挥抗结肠癌的作用。FLNC 是细丝蛋白家族中的一员,在细胞外基质中起重要作用,可促进癌细胞的迁移和侵袭。严成^[28]的研究发现,敲低 FLNC 可以靶向抑制 GTP-Rac1 活性进而抑制结肠癌 EMT 改变并抑制癌细胞增殖、侵袭和迁移,敲低 ZBTB4 后下调 FLNC 的表达,可抑制裸鼠皮下种植瘤的生长和增殖。HSPH1 编码热休克蛋白 70 蛋白家族的成员,它与 HSP90AA1 共同隶属热休克蛋白家族,是一种细胞在应激条件下诱导表达的分子伴侣。已有研究表明, HSP90 α 不仅与肿瘤细胞的生存、增殖和迁移有关,还参与了肿瘤微环境的调控,其高表达与多种癌症类型的不良预后显著相关^[29]。有研究报道, HSP90 小分子靶向抑制剂 SNX2112 能过下调 HSP90 相关信号蛋白 STAT3/AKT,调节磷酸化水平,发挥抑制 CRC 细胞迁移及促进细胞凋亡的作用^[30]。这与本研究的蛋白质组学分析结果一致,故推测准噶尔阿魏也

有类似的作用。这些蛋白与抑制肿瘤细胞增殖和转移、促进凋亡相关,提示其可能参与准噶尔阿魏治疗结肠癌的生物过程,但其具体机制需进一步研究。

本研究结合 CT26 荷瘤小鼠模型,利用 TMT 标记定量技术,基于蛋白质谱检测平台进行蛋白质组学数据分析。综合分析结果显示:差异蛋白可能在细胞质、细胞核、外泌体等细胞器内,作用于关键蛋白 FN1、FLNC、HSPH1、HSP90AA1,参与通过调控细胞内信号转导、抑制细胞外基质间的异常转化、调节氨基酸代谢等,发挥抗结肠癌的药理学作用。

综上所述,动物实验显示准噶尔阿魏醇提物有较好的抗结肠癌活性。此外,本研究通过蛋白质组学和生物信息学技术,初步探讨了准噶尔阿魏治疗结肠癌可能的关键靶标及分子机制,为结肠癌的治疗提供新的切入点,为新疆特色中药准噶尔阿魏的开发和利用提供新的思路。

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] 刘宗超,李哲轩,张阳,等. 2020 全球癌症统计报告解读[J/CD]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2021, 7(2): 1-14.
- [3] 朱云峰,沈永洲,白卿长,等. 1977—2018 年浙江省海宁市结直肠癌流行趋势分析[J]. 中国肿瘤, 2020, 29(11): 5.
- [4] 郑莹,王泽洲. 全球结直肠癌流行数据解读[J]. 中华流行病学杂志, 2021, 42(1): 149-152.
- [5] LIU J, MAO J J, WANG X S, et al. Evaluation of traditional Chinese medicine herbs in oncology clinical trials [J]. Cancer J, 2019, 25(5): 367-371.
- [6] SIRIZI M A G, ALIZADEH GHALENOEI J, ALLAH-TAVAKOLI M, et al. Anticancer potential of Ferula assafoetida and its constituents, a powerful plant for cancer therapy[J]. World J Biol Chem, 2023, 14(2): 28-39.
- [7] OH B S, SHIN E A, JUNG J H, et al. Apoptotic effect of galbanic acid via activation of caspases and inhibition of Mcl-1 in H460 non-small lung carcinoma cells[J]. Phytother Res, 2015, 29(6): 844-849.
- [8] ALILOU M, DIBWE D F, SCHWAIGER S, et al. Anti-austerity activity of secondary metabolites from the roots of ferula hezarlalehzarica against the PANC-1 human pancreatic cancer cell line[J]. J Nat Prod, 2020, 83(4): 1099-1106.
- [9] GHOLAMI O, JEDDI-TEHRANI M, IRANSHAHI M, et al. Umbelliprenin from ferula szowitsiana activates both intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis in Jurkat T-CLL cell line[J]. Iran J Pharm Res, 2013, 12(3): 371-376.
- [10] ZHANG L J, SI J Y, LI J Z. Umbelliprenin and laricires-

- inol isolated from a long-term-used herb medicine *Ferula sinkiangensis* induce apoptosis and G0/G1 arresting in gastric cancer cells[J]. *Rsc Advances*, 2015, 5(110): 91006-91017.
- [11] 张柏生,郭萍萍,叶晨雨,等. 基于细胞和动物实验的新疆 5 种阿魏抗结肠癌的作用研究[J]. *中国比较医学杂志*, 2022, 32(11): 26-33.
- [12] 王德玺,孙佳楠,伊丽米热·阿布都外力,等. 5 种新疆香阿魏对结肠癌细胞增殖抑制、促凋亡及逆转耐药作用的研究[J]. *化学与生物工程*, 2023, 40(5): 30-37.
- [13] 刘巧赞,张海英,赵生俊,等. 新疆 5 种臭阿魏对小鼠宫颈癌 U14 细胞的体内外抑制作用研究[J]. *新疆医科大学学报*, 2023, 46(11): 1432-1437.
- [14] 马若婷,孙佳楠,赵生俊,等. 新疆 4 种阿魏乙醇提取物抗宫颈癌细胞活性的研究[J]. *新疆医科大学学报*, 2022, 45(11): 1341-1347.
- [15] 伊丽米热·阿布都外力,张海英,赵生俊. 新疆 5 种香阿魏醇提物抗胃癌作用初步研究[J]. *中国药业*, 2023, 32(8): 29-34.
- [16] 邓海滨,王中奇,蔡玥娇,等. 蛋白质组学技术在恶性肿瘤中医辨证及诊治中的研究进展[J]. *中医肿瘤学杂志*, 2022, 4(1): 36-42.
- [17] 吴傲,张丽军. 蛋白质组学在结肠癌研究中的进展[J]. *中国生物制品学杂志*, 2023, 36(2): 224-229.
- [18] 邵营宽,徐凯伦,董琦,等. 临床蛋白质组学与结直肠癌精准诊治研究进展[J/OL]. *科学通报*, [2024-06-20]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1784.n.20240521.1124.008.html>.
- [19] KIRK R G W. Recovering The principles of humane experimental technique; the 3Rs and the human essence of animal research[J]. *Sci Technol Human Values*, 2018, 43(4): 622-648.
- [20] 魏伟,吴希美,李元建. *药理学实验方法学*[M]. 北京:人民卫生出版社,2010.
- [21] BAILEY S A, ZIDELL R H, PERRY R W. Relationships between organ weight and body/brain weight in the rat: what is the best analytical endpoint? [J]. *Toxicol Pathol*, 2004, 32(4): 448-466.
- [22] 肖孟勇,骆亚莉,齐晓风,等. 敦煌方大补肺汤联合顺铂对 Lewis 肺腺癌荷瘤小鼠的干预作用及分子机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(17): 95-104.
- [23] 岳丽红,程广东,朱德全,等. 西藏灵菇酸奶对人工衰老小鼠肝肾指数的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2009, 29(21): 2767-2769.
- [24] QU P, XIE X, CHI J, et al. Circulating exosomal miR-144-3p from Crohn's disease patients inhibits human umbilical vein endothelial cell function by targeting FN1[J]. *Dis Markers*, 2022, 2022: 8219557.
- [25] LI J, CHEN C, CHEN B, et al. High FN1 expression correlates with gastric cancer progression [J]. *Pathol Res Pract*, 2022, 239: 154179.
- [26] 贾蓉,彭明沙,田云鸿,等. SLC16A8 通过正调控 FN1 促进结直肠癌细胞增殖、迁移及血管生成[J]. *西部医学*, 2024, 36(7): 980-986.
- [27] XIE Y, LIU C, QIN Y, et al. Knockdown of IRE1 α suppresses metastatic potential of colon cancer cells through inhibiting FN1-Src/FAK-GTPases signaling [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2019, 114: 105572.
- [28] 严成. FLNC 通过 Rac1 诱导结肠癌细胞 EMT 形成并促进结肠癌侵袭转移的机制研究及生物信息学分析[D]. 大连:大连医科大学,2022.
- [29] YUAN Z, WANG L, CHEN C. Analysis of the prognostic, diagnostic and immunological role of HSP90 α in malignant tumors[J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 963719.
- [30] 万月,文庆莲. 小分子靶向药物 SNX2112 对结肠癌细胞的作用研究[J]. *遵义医科大学学报*, 2020, 43(6): 722-727.

(收稿日期:2024-06-30 修回日期:2024-09-12)

(上接第 2912 页)

- 现代医学与健康研究电子杂志, 2022, 6(18): 97-100.
- [15] 高锋,马肖龙,吕家瑜. 慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者肺部感染的病原菌及危险因素分析[J]. *中国现代医学杂志*, 2021, 31(12): 18-22.
- [16] 虞燕霞,陈世祺. 临床药师参与一例呼吸衰竭患者并肺部感染及血流感染治疗的病例分析[J]. *国际医药卫生导报*, 2018, 24(10): 1563-1565.
- [17] 陈栋玉,何磊,周亮亮,等. 有创机械通气-高流量氧疗序贯治疗慢性阻塞性肺疾病所致急性呼吸衰竭的临床研究[J/CD]. *中华重症医学电子杂志*, 2019, 5(3): 219-224.
- [18] 张丽,范忠杰,周凡. 慢性阻塞性肺疾病急性加重期肺部感染患者的病原菌分布、耐药性及危险因素分析[J]. *中国病原生物学杂志*, 2019, 14(12): 1456-1459.
- [19] BETTS K S, SOARES MAGALHÃES R J, ALATI R. The role of neonatal pulmonary morbidity in the longitudinal patterns of hospitalisation for respiratory infection during the first year of life[J]. *Epidemiol Infect*, 2018, 146(9): 1130-1137.
- [20] WIEDERMANN C J. Hypoalbuminemia as surrogate and culprit of infections[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(9): 4496.
- [21] 赵美芳,宋昱晨,王月花. 慢性阻塞性肺疾病并发肺部感染的影响因素与病原学检测分析[J]. *中国预防医学杂志*, 2017, 18(4): 303-306.
- [22] LUGG S T, SCOTT A, PAREKH D, et al. Cigarette smoke exposure and alveolar macrophages: mechanisms for lung disease[J]. *Thorax*, 2022, 77(1): 94-101.

(收稿日期:2024-03-20 修回日期:2024-08-08)