

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.02.003

· 基础研究 ·

## 抗菌肽 mercedin 作用于人肺腺癌 A549 细胞株的磷酸化蛋白质组学分析

杨婷婷, 战仕胜, 王雅蓉, 贾琴琴, 王秀青(宁夏医科大学 临床医学院, 宁夏回族自治区 银川 750004)

**[摘要]** **目的:** 观察抗菌肽 mercedin 作用于人肺腺癌 A549 细胞后其细胞内所有蛋白质的磷酸化水平变化, 探究抗菌肽对 A549 细胞生物学功能的影响以及促进细胞凋亡可能涉及到的信号通路与作用靶点。 **方法:** 9  $\mu\text{mol/L}$  抗菌肽 mercedin 作用于肺腺癌 A549 细胞 6 h 后收集并提取总蛋白, 通过胰酶酶解肽段, 并对肽段进行 TMT 标记和 HPLC 分级, IMAC-Fe 富集磷酸化肽段, 利用高分辨质谱对富集肽段进行检测。利用 MaxQuant 软件对质谱分析得到的磷酸化肽段进行搜库鉴定和定量, 结合生物信息技术分析差异磷酸化蛋白质的功能、通路等信息。 **结果:** 通过对对照组和抗菌肽 mercedin 处理组磷酸化蛋白进行 IPA 分析, 以上调或下调倍数  $\geq 2$  且  $P < 0.05$  的条件鉴定出抗菌肽 mercedin 处理组中差异磷酸化蛋白质共有 753 个, 其中明显上调有 229 个、下调有 417 个; 其中与细胞凋亡相关的差异蛋白质有 RB1、MAPK1、ARAF、PTK2、FOXO、MARCKS 等。生物进程分析结果显示差异磷酸化蛋白主要集中在细胞信号转导、核酸的降解转运以及细胞能量代谢、蛋白质的翻译合成、细胞骨架的形成等, 富集结果显示差异磷酸化蛋白质主要参与凋亡相关信号通路有 MAPK、ErbB、PI3K-Akt 和 Ras 等, 通过蛋白互作分析找出凋亡相关蛋白质 PTK2、PRKCA、MA2PK2、MAPK1、LMNA 等之间有关联。 **结论:** 抗菌肽 mercedin 可能通过影响 RB1、MAPK1、ARAF、PTK2、FOXO、MARCKS 等基因和信号通路诱导肺癌 A549 细胞的凋亡及其他细胞功能的改变。

**[关键词]** 抗菌肽; mercedin; 肺腺癌; A549 细胞; 磷酸化蛋白质组学

**[中图分类号]** R734.2; R730.54; Q71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)02-0115-08

## Phospho-proteomic analysis of antibacterial peptide mercedin act on human lung adenocarcinoma A549 cell line

YANG Tingting, ZHAN Shisheng, WANG Yarong, JIA Qinqin, WANG Xiuqing (Clinical Medical College, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of antimicrobial peptides mercedin on the biological functions of human lung adenocarcinoma A549 cells and the potential signaling pathways and targets that involved in promoting apoptosis, by studying the changes of phosphorylation levels of proteins in A549 cells after mercedin treatment. **Methods:** The antibacterial peptide mercedin (9  $\mu\text{mol/L}$ ) was applied to treat A549 cells for 6 h, and the total protein was collected and extracted. The peptide was digested by trypsin and labeled with TMT, and then fractionated by HPLC. The phosphorylated peptides were enriched with IMAC-Fe, and finally subjected to mass spectrometry analysis. Library identification and quantification of phosphorylated peptides obtained by mass spectrometry were processed using MaxQuant software, to further analyze the functions and pathways of differentially expressed phosphorylated proteins by combining with bioinformatic analysis. **Results:** Through IPA analysis of phosphorylated proteins in the normal control group and the antibacterial peptide mercedin treatment group, 753 differentially phosphorylated proteins in mercedin treatment group were screened out under the conditions of  $|\text{Fold Change}| \geq 2$  and  $P < 0.05$ , including 229 significantly up-regulated genes and 417 down-regulated genes. Among them, the differentially expressed proteins related to apoptosis included RB1, MAPK1, ARAF, PTK2, FOXO, MARCKS and so on. The results of biological process analysis showed that differentially expressed phosphorylated proteins were mainly concentrated in cell signal transduction, degradation and transport of nucleic acid, and cellular energy metabolism, protein translation and synthesis, and cytoskeleton formation etc. The enrichment results showed that the differentially expressed phosphorylated proteins were mainly involved in apoptosis-related MAPK, ErbB, PI3K-Akt, and Ras signaling pathways. Protein-protein interaction analysis

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (No. 81560573; No. 81760661)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81560573; No. 81760661)

**[作者简介]** 杨婷婷 (1993-), 女, 硕士生, 主要从事抗菌肽作用于肿瘤的机制及治疗研究, E-mail: LY8165772@163.com

**[通信作者]** 王秀青 (WANG Xiuqing, corresponding author), 博士, 教授, 硕士生导师, 从事病原微生物与分子诊断学方面的研究, E-mail: xiuqing-wang1979@163.com

indicated the associations among apoptosis-related proteins PTK2, PRKCA, MA2PK2, MAPK1, and LMNA. **Conclusion:** The antibacterial peptide mercedin may induce apoptosis and alteration of other cell functions by affecting a variety of genes and signaling pathways such as RB1, MAPK1, ARAF, PTK2, FOXO and MARCKS etc.

**[Key words]** antimicrobial peptides; mercedin; lung adenocarcinoma; A549 cell; phospho-proteomic

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(2): 115-122. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.02.003]

抗菌肽是生物体内由特定DNA片段编码所产生的具有抵御外界微生物、病毒、寄生虫等侵害的一类小分子多肽,其广泛存在于生物体内,一般来源于昆虫、鸟类、动植物,也可从原核生物中分离或人工合成。抗菌肽参与固有免疫,可以进入肿瘤细胞,从而对肿瘤细胞起到杀伤作用。国内研究比较多的天然抗菌肽有天蚕素、防御素及两栖动物体内产生的蛙皮素、蜂毒素等。大多数抗菌肽由少于100个的氨基酸残基组成,它们具有几个共同的特征,如具有阳离子性、疏水性或两亲性分子结构。阳离子抗菌肽对多种肿瘤细胞具有很强的杀伤作用,如宫颈癌、卵巢癌细胞等,可促使肿瘤细胞发生溶解和凋亡。因此,许多研究都在关注抗菌肽对肿瘤细胞的破坏方式及其涉及到的机制。现有研究<sup>[1-3]</sup>表明,抗菌肽LL-37可促进多种肿瘤细胞系的凋亡,如结直肠癌、白血病、膀胱癌等,并在体内外均具有抗肿瘤作用。这表明,抗菌肽是具有抗癌活性的治疗剂,这无疑给新药研发带来了新的希望。因此笔者所在的研究团队以抗菌肽LL-37为先导肽,设计分子量更小、活性更集中更强的抗菌肽mercedin<sup>[4]</sup>。在本研究中,以人肺腺癌细胞株A549为研究对象,通过磷酸化蛋白组学的方法,研究抗菌肽mercedin作用于肺癌细胞后其磷酸化蛋白质的表达变化,并寻找相应靶点来说明抗菌肽mercedin诱导细胞发生凋亡可能涉及的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

人肺腺癌细胞系A549来源于宁夏医科大学总医院干细胞研究所;抗菌肽mercedin来源于抗菌肽LL-37,是LL-37的部分衍生肽,由吉尔生化有限公司通过固相化学法合成,纯度为95%,为冻干粉状态,用ddH<sub>2</sub>O溶解,避光保存于-20℃冰箱。

蛋白酶抑制剂购自德国Calbiochem公司,色谱级试剂乙腈购自美国Fisher Chemical公司,三氟乙酸购自美国Sigma-Aldrich公司,甲酸购自美国Fluka公司,碘代乙酰胺、二硫苏糖醇、三乙基碳酸氢铵均购自美国Sigma公司,BCA试剂盒购自上海碧云天公司、串联质谱标签(tandem mass tag,TMT)标记试剂盒购自美国Thermo公司,磷酸化酶抑制剂购自美国Millipore公司。酶标仪、ACCELA 600 Pump液相色谱仪均购自美国Thermo有限公司,300Extend C18

色谱柱购自美国Agilent公司。

### 1.2 细胞培养和分组处理

A549细胞生长方式为贴壁生长,用含有10%胎牛血清的RPMI(含有 $1 \times 10^5$  μmol/L青、链霉素)在37℃、5% CO<sub>2</sub>的恒温细胞培养箱中培养。每天换液1次,细胞汇合度达80%时进行实验。预实验采用CCK-8法测得本批次mercedin杀伤A549细胞的IC<sub>50</sub>为11.34 μmol/L,细胞存活率达到60%左右时浓度约为9 μmol/L,因此,最终确定mercedin的工作浓度为9 μmol/L。本研究实验分为抗菌肽组和不加抗菌肽的对照组,抗菌肽组细胞用9 μmol/L处理,对照组用正常完全培养基培养,孵育6 h后收集细胞用于后续实验。

### 1.3 磷酸化蛋白组学样本提取

将实验组和对照组细胞用预冷的PBS洗两次,每次振摇数次以尽量去除培养液,将细胞及培养液移至离心管中,500~800×g离心10 min,细胞洗涤后,转至新的预冷的离心管中,加入配制好的预冷细胞裂解液(每1 ml裂解液中加入10 μl磷酸酶抑制剂,1 μl蛋白酶抑制剂和5 μl 100 mmol/L PMSF),随后置于4℃摇床平台上,剧烈振荡30 s,放置冰上4 min,重复5次;最后12 000×g、4℃离心,取上清为全蛋白提取物。利用蛋白定量(Bradford法、BCA法)进行定量,随后进行SDS-PAGE,对提取的蛋白质进行质量评估。

### 1.4 胰酶酶解

在蛋白溶液中加入二硫苏糖醇使其终浓度为5 mmol/L,56℃还原30 min。之后加入碘代乙酰胺使其终浓度为11 mmol/L,室温避光孵育15 min。最后将样品的尿素浓度稀释至低于2 mol/L。以1:50的质量比例(胰酶:蛋白)加入胰酶,37℃酶解过夜。再以1:100的质量比例(胰酶:蛋白)加入胰酶,继续酶解4 h。

### 1.5 TMT标记

胰酶酶解的肽段用Strata X C18(Phenomenex)除盐后真空冷冻干燥。以0.5 mol TEAB溶解肽段,根据TMT试剂盒操作说明标记肽段。操作如下:标记试剂解冻后用乙腈溶解,与肽段混合后室温孵育2 h,标记后的肽段混合后除盐,加入2%甲酸以及98%收集洗脱液,进行真空浓缩和冷冻干燥。

### 1.6 HPLC分级

标记后的肽段用高pH反向HPLC分级,色谱柱

为 Agilent 300Extend C18 (采用的规格为 5  $\mu\text{m}$  粒径、4.6 mm 内径、250 mm 长)。将肽段的分级梯度设置为 8%~32% 乙腈、pH 9, 60 min 时间分离 60 个组分, 随后肽段合并为 4 个组分, 合并后的组分经真空冷冻干燥后进行后续操作。

### 1.7 固定化金属亲和色谱 (immobilized metal-chelating affinity chromatography, IMAC) 修饰富集

将肽段溶解在富集缓冲溶液 (50% 乙腈/6% 三氟乙酸) 中, 转移上清液至提前洗涤好的 IMAC 材料中, 放置于旋转摇床上温和摇晃孵育。孵育结束后依次使用缓冲溶液 50% 乙腈/6% 三氟乙酸和 30% 乙腈/0.1% 三氟乙酸洗涤树脂 3 次, 最后使用 10% 氨水洗脱修饰肽段, 收集洗脱液并且真空冷冻抽干。抽干后按照 C18 ZipTips 试剂盒进行除盐, 真空冷冻抽干后供液质联用分析。

### 1.8 液相色谱-质谱联用分析

将纯化后的肽段用液相色谱流动相 A 相 (0.1% 甲酸水溶液) 溶解后继续使用 EASY-nLC 1000 超高效液相系统进行分离。流动相 A 为含 0.1% 甲酸和 2% 乙腈的水溶液, 流动相 B 为含 0.1% 甲酸和 90% 乙腈的水溶液。液相梯度设置: 4%~22% B 持续 40 min, 22%~35% B 持续 40 min, 35%~80% B 持续 56 min, 80% B 继续持续作用 60 min; 流速维持在 400 nL/min。洗脱后的肽段经由超高效液相系统分离后被注入 NSI 离子源中进行电离, 然后以 Q Exactive Plus 质谱进行分析。离子源电压设置为 2.0 kV, 肽段母离子及其二级碎片都使用高分辨的 Orbitrap 进行检测和分析。一级质谱扫描范围设置为 350~1 800 m/z, 扫描分辨率设置为 70 000; 二级质谱扫描范围则固定起点为 100 m/z, 二级扫描分辨率设置为 35 000。使用数据依赖型扫描 (data dependent acquisition, DDA) 程序, 即在一级扫描后选择信号强度最高的前 10 肽段母离子依次进入 HCD 碰撞池, 使用 31% 的碎裂能量进行碎裂; 同样依次进行二级质谱分析。为了提高质谱的有效利用率, 自动增益控制 (automatic gain control, AGC) 设置为 1E5, 信号阈值设置为 20 000 ion/s, 最大注入时间设置为 100 ms, 串联质谱扫描的动态排除时间设置为 30 s, 避免母离子的重复扫描。

### 1.9 磷酸化蛋白质的鉴定及生物信息学分析

使用数据库 Maxquant (v1.5.2.8) 处理质谱数据原始文件和检索, 并进行针对来自 UniProt 的人蛋白质序列数据库搜索序列。检索参数设置: 数据库为 Swissprot\_Human (20422 条序列), 添加反库以计算随机匹配造成的阳性错误率 (false discovery rate, FDR), 并且在数据库中与嵌入的标准污染物数据库

相结合, 用于消除鉴定结果中一部分污染蛋白的影响。FDR 值设定为 0.01, 酶切方式设置为 Trypsin/P, 并且酶最大漏切位点数设为 2, 肽段最小长度设置为 7 个氨基酸残基, 肽段最大修饰数设为 5; First search 和 Main search 的一级母离子质量误差容忍度分别设为  $20 \times 10^{-6}$  和  $5 \times 10^{-6}$ , 二级碎片离子的质量误差容忍度为 0.02 Da。将半胱氨酸烷基化设置为固定修饰, 可变修饰包括甲硫氨酸的氧化, 蛋白 N 端的乙酰化, 脱酰胺化 (NQ), 丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸的磷酸化。在第一次搜索时, 前体离子的质量耐受性设定为  $20 \times 10^{-6}$ , 对于主要搜索, 质量前体离子的耐受性设定为  $6 \times 10^{-6}$ 。碎片离子的质量耐受性设定为 0.5 Da。对于无标记定量, 蛋白质表达水平使用 iBAQ (基于强度的绝对定量) 算法, 通过计算蛋白质表达水平峰值强度之和 (用理论上可观察到的数量归一化与相应蛋白质匹配的所有肽段的磷酸肽)。iBAQ 主要是反映对照组磷酸化蛋白质相对于抗菌肽处理组的相对表达水平。进一步规范了通过将每个原始 iBAQ 值除以中值来表示每个样品的表达水平值。定量方法设置为 TMT-6plex, 蛋白鉴定、PSM 鉴定的 FDR 都设置为 1%。差异磷酸化蛋白质利用建立火山图以更好地将差异蛋白可视化 and 识别, 使用 Cluster3.0 软件进行了分层聚类分析, 用树状图描绘蛋白质表达的相似程度样本。为了表征这些基因, 进一步通过 GO 功能、KEGG 途径和蛋白质结构域的功能富集分析对细胞生物学过程、细胞成分和分子生物学功能分析, 利用 DAVIDs 和 IPA 进行功能注释, 并使用 Cytoscape 构建具有相关蛋白质的网络。

### 1.10 统计学处理

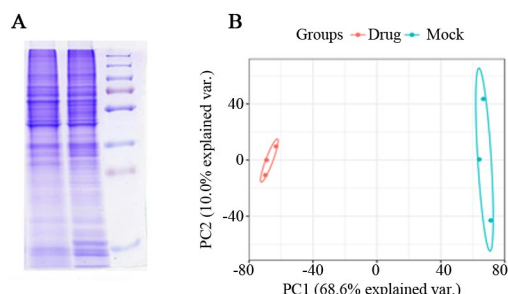
采用 SPSS17.0 软件进行分析, 正态分布的计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 所有差异蛋白定量数据均进行正态分布和方差齐性检验, 组间两两比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 磷酸化蛋白质提取分离以及效果验证

将对照组和抗菌肽处理组的总蛋白量分别定为 2.8 和 4.8 mg 样品进行磷酸化蛋白质组学研究时, 通过预先使用 SDS-PAGE 评估蛋白分离效果与差异性。结果表明 (图 1A), 蛋白条带清晰、均一, 组间电泳行为有差异, 可继续用于后续实验。使用数据库 Maxquant (v1.5.2.8) 对质谱数据进行主成分 (PCA) 分析, 其可以最大程度区分 6 个样本 (1 个实验组, 1 个对照组, 每组包含 3 个重复样本) 的两类特征, 绘制出样本的修饰定量主成分, 分析结果 (图 1B) 显示, 横轴 PC1

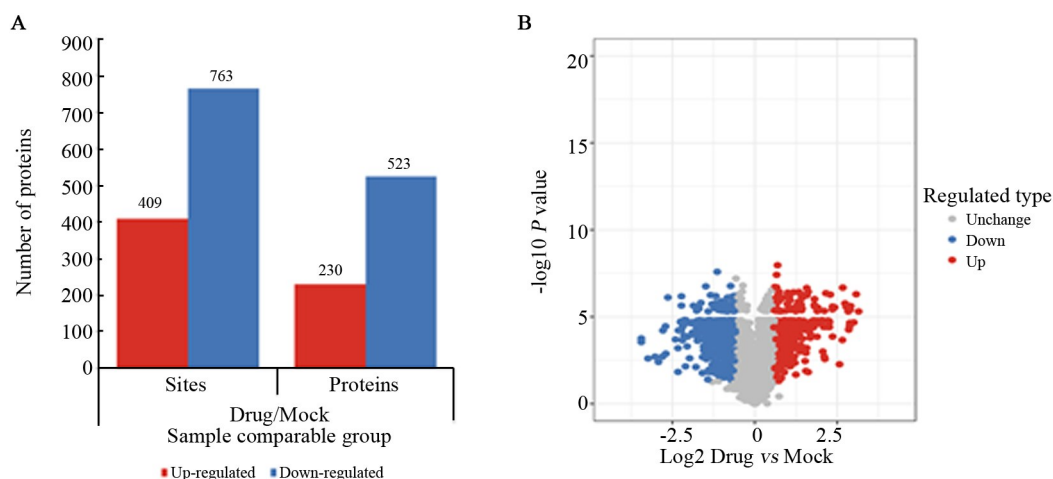
为一类特征、纵轴PC2为一类特征,以此将6个样本区分为两大类,分别用蓝色圈和红色圈表示,图中重复样本之间的聚集程度越好代表定量重复性越好。结果表明,提取的蛋白样本具有良好的分离效果和重复性,可以用于后续试验。



A: SDS-PAGE map of differentially expressed phosphorylated proteins in control group (Mock) and antimicrobial peptide mericidin treatment group (Drug); B: Two-dimensional scatter plot of repeated sample-to-sample quantitative principal component analysis; PC1 and PC2: respectively represent two types of characteristics of principal component analysis; Red circle indicates three repetitions in the control group, and blue circle indicates three repetitions in the antimicrobial peptide treatment group

图1 磷酸化蛋白质样本本质控合格

Fig.1 Qualified protein samples



A: Phosphorylated protein and site changes in the antibacterial peptide mericidin treated group and control group;

B: Volcano map of up-regulated and down-regulated differentially phosphorylated proteins

图2 抗菌肽 mericidin 处理后磷酸化差异蛋白质的定量分析结果

Fig.2 Quantitative analysis of differentially phosphorylated proteins after treatment with the antimicrobial peptide mericidin

### 2.3 磷酸化蛋白质的差异修饰位点对应的功能分析

利用GO注释、亚细胞结构定位及COG/KOG分类对差异蛋白分布进行统计。从细胞生物进程和分子功能等不同角度阐释蛋白质的生物学作用。从生物进程分析(图4)可以看到,差异磷酸化蛋白质主要参与蛋白质及大分子的代谢、细胞组成和生物调节及细胞的发生发展。亚细胞结构定位(图5)可以看到,

### 2.2 磷酸化差异蛋白定量分析结果

利用质谱仪器对磷酸化蛋白质磷酸肽和残基的分析和鉴定,通过IPA软件分析,对对照组和抗菌肽加药组磷酸化蛋白进行比较,共鉴定出753个表达水平不同的磷酸化蛋白质以及260个磷酸化位点,随后以基因表达差异倍数(fold change)上调或下调倍数 $\geq 2$ 倍且 $P < 0.05$ 为标准鉴定出646个差异蛋白(图2),这些差异蛋白质中上调229个、下调417个。其中与细胞凋亡相关的差异蛋白有成视网膜细胞瘤蛋白(retinoblastoma-associated protein, RB1)、细胞外信号调节激酶(mitogen-activated protein kinase 1, MAPK1)、丝氨酸/苏氨酸-蛋白激酶A (serine/threonine-protein kinase A-Raf, ARAF)、蛋白酪氨酸激酶2(focal adhesion kinase 1, PTK2)、叉形头转录因子(forkhead box protein, FOXO)、人豆蔻酰化富丙氨酸C激酶底物蛋白(myristoylated alanine-rich C-kinase substrate, MARCKS)等。这些蛋白的磷酸化水平发生变化,推测是抗菌肽作用后诱导细胞发生凋亡的结果(表1)。其中差异比较明显的蛋白为MAPK1,其上下游蛋白关联如图3。

差异磷酸化蛋白主要集中在细胞核和细胞质。抗菌肽 mericidin 处理细胞后对鉴定到的含有修饰位点蛋白的注释以及差异修饰位点对应蛋白的筛选,再进行GO分类、KEGG通路和蛋白结构域三个层面的富集分析。富集检验(此处运用Fisher's exact test,即费希尔精确检验)得到的结果(图6、7)展现了差异修饰蛋白显著富集( $P < 0.05$ )的功能分类,其主要集中在



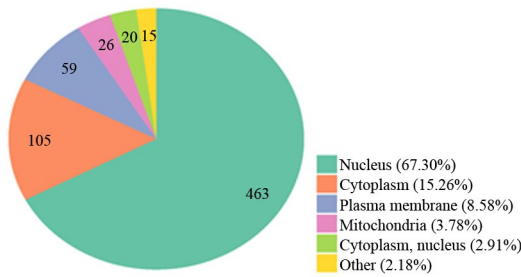


图5 差异磷酸化修饰位点对应蛋白的亚细胞结构定位分布  
Fig.5 Subcellular structure localization map of the corresponding protein of differential phosphorylation modification site

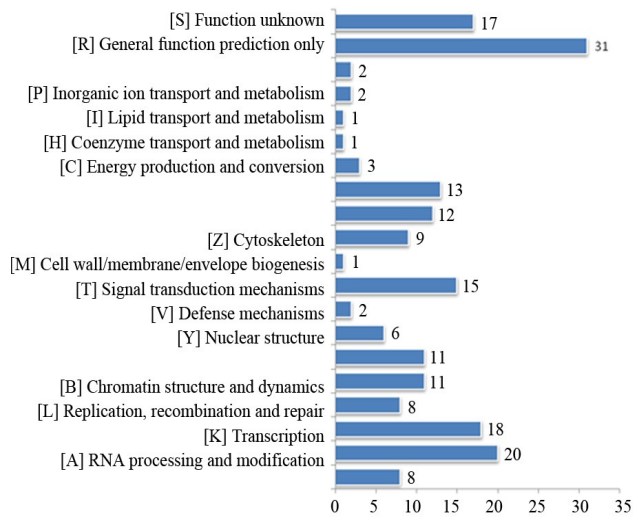


图6 抗菌肽 mercedin 处理后磷酸化差异蛋白分布及功能分析  
Fig.6 Distribution and functional analysis of differentially expressed phosphorylated proteins after treatment with antimicrobial peptide mercedin

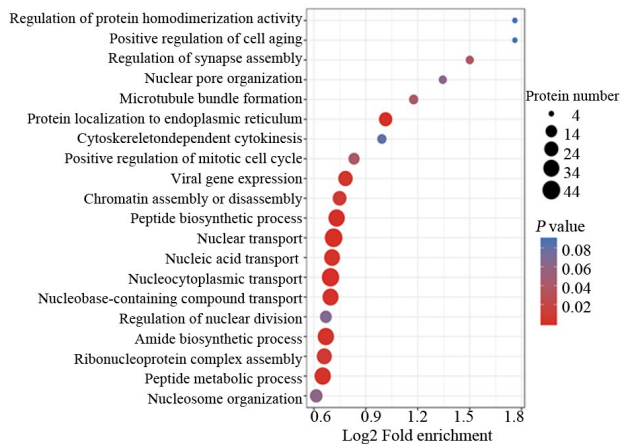


图7 抗菌肽 mercedin 处理后差异磷酸化修饰位点对应蛋白在 GO 功能分类中富集分布气泡图  
Fig.7 Enrichment and distribution bubble map of the corresponding protein of differential phosphorylation modification site after treatment with antimicrobial peptide mercedin

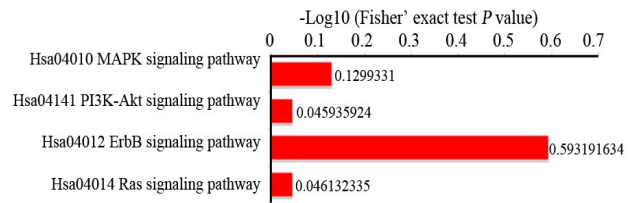


图8 抗菌肽 mercedin 处理后磷酸化差异蛋白分布凋亡相关信号通路  
Fig.8 Apoptosis-related signaling pathways of differentially expressed phosphorylated proteins treated by antimicrobial peptide mercedin

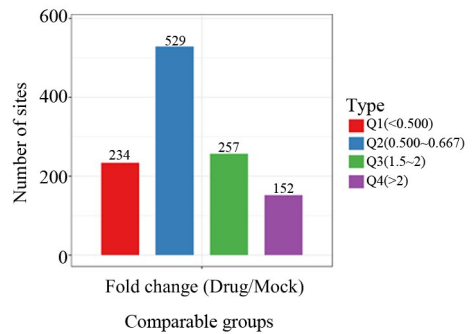


图9 根据磷酸化修饰位点差异倍数对蛋白分组  
Fig.9 Classification of proteins by fold change in phosphorylation site

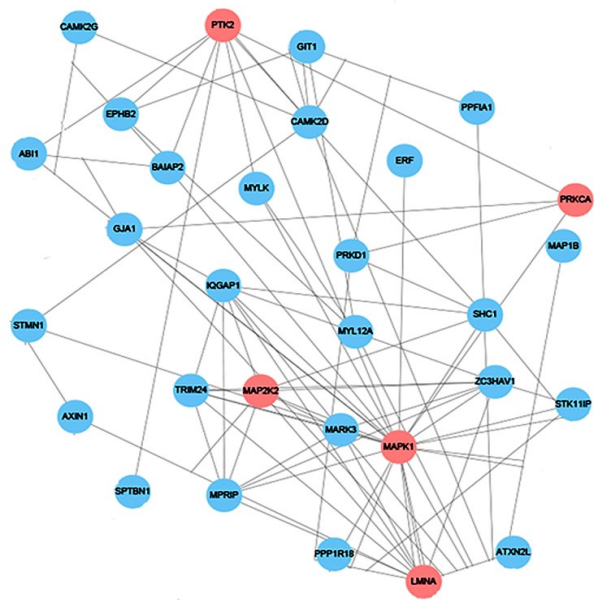


图10 部分凋亡相关蛋白的互相作用  
Fig.10 Interactions of partial apoptosis-related proteins

### 3 讨论

肺癌是一种预后差、发病率和病死率较高的恶性肿瘤, 是全世界癌症死亡最常见的原因, 每年新病例超过 180 万, 5 年生存率也低于 15%。目前临床上

应用的放化疗及手术方式疗效均有限,因此寻找新的治疗方法更为迫切。近年来,有研究<sup>[5]</sup>证明抗菌肽对肿瘤具有杀伤作用。本课题组前期以抗菌肽 LL-37 为先导肽设计合成抗菌肽 mercedin,它是 LL-37 第 14~32 个氨基酸残基形成的短肽,其对肿瘤、微生物、病毒都具有很强的抑制及杀伤作用<sup>[4]</sup>。LL-37 主要来源于中性粒细胞、单核细胞、肥大细胞和树突状细胞中,是先天性免疫反应的主要作用分子,其作为人体中唯一存在的导管素,与肿瘤的发展有着密切关联。LL-37 作用于肿瘤细胞时,具有两种不同且相互矛盾的作用:促进或抑制肿瘤生长。LL-37 对不同来源肿瘤发挥的作用是不同的。LL-37 过表达可以促进前列腺癌<sup>[6]</sup>和和乳腺癌<sup>[7]</sup>的增殖,但在胃癌、结肠癌、白血病和膀胱癌的肿瘤发展中起抑制作用<sup>[8-9]</sup>,因为其具有较小的分子量,可以很容易地穿透肿瘤细胞,抑制肿瘤血管生成从而促进细胞凋亡,目前已成为肿瘤治疗研究的热门话题。磷酸化蛋白质组学技术在药物作用于肿瘤方面的研究已经普遍应用,通过将 TMT 标记、高效液相色谱分级技术、磷酸化修饰肽段的富集技术以及基于质谱的定量蛋白质组学技术等一系列前沿技术的有机结合,对样本中的磷酸化修饰定量组学进行研究,可以更好地反映抗菌肽作用于肺癌 A549 后细胞生物学进程及细胞功能等的变化。

在本课题组的前期研究<sup>[10]</sup>中发现,抗菌肽 mercedin 可以通过非 caspase 途径诱导肺癌 A549 细胞凋亡。经 mercedin 作用后,A549 细胞中 BAX 的表达量随药物浓度升高而增加,而抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达量降低。本研究中对磷酸化蛋白的检测结果也印证了这一点(表 1)。本研究是对抗菌肽 mercedin 作用于肺癌 A549 后细胞内磷酸化蛋白质组学的研究,其结果显示,差异磷酸化蛋白的细胞功能主要集中在细胞进程、细胞生物学调控以及细胞信号转导。磷酸化差异蛋白分布数据图以及 GO 功能气泡分布图表明,发生差异的磷酸化位点主要集中在细胞核,其次是细胞质。在抗菌肽 mercedin 作用于肺癌 A549 细胞后,功能发生改变主要集中在能量代谢、脂质转运和代谢、细胞信号转导、细胞骨架和核骨架生成及 RNA 代谢等进程中。蛋白定量检测结果表明,RB1、MAPK1、ARAF、PTK2、FOXO、MARCKS 等的磷酸化水平发生变化,说明抗菌肽主要是通过这些蛋白质的磷酸化影响到肺癌 A549 细胞的生物学功能,从而促进其发生凋亡。另外,和凋亡相关的磷酸化蛋白差异比较大的主要集中在 MAPK、PI3K-AKT、ErbB 以及 Ras 信号通路。通过聚类分析以及蛋白互作分析找出了差异比较大的蛋白以及部分与凋亡相关的蛋白其之间相互作用的关系。

RB1 是人类第一个分离克隆的抑癌基因,主要抑制靶基因的转录以及限制细胞增殖所需基因的表达,RB1 的功能与肿瘤的发生密切相关<sup>[11]</sup>,可以抑制卵巢癌,肺癌、膀胱癌等,通过 RB1/P16 途径<sup>[12]</sup>,RB1 可以直接诱导细胞凋亡,通过激活 E2F 靶基因编码的促凋亡蛋白来完成<sup>[13]</sup>,磷酸化蛋白质组学数据(表 1)显示,抗菌肽 mercedin 作用后其 S811 位点磷酸化水平呈明显下调。MAPK1 也称为 ERK2,与肿瘤的增殖、分化、侵袭相关,其表达上调与多种肿瘤的发生发展有着密切联系,可以促进卵巢癌细胞增殖、晶状体上皮细胞增殖,诱导乳腺癌、结直肠癌细胞发生凋亡<sup>[14-15]</sup>。本研究中,抗菌肽 mercedin 诱导肺癌细胞 A549 凋亡,其作用可能与靶向抑制 ERK 基因相关;磷酸化蛋白质组学数据中显示,其磷酸化位点 T185/Y187 下调。另外,癌基因 ARAF 的下调也会引起肿瘤细胞凋亡<sup>[16]</sup>。抗菌肽 mercedin 作用后 ARAF 的 T253 磷酸化位点表达下调。PTK2 是细胞核骨架蛋白,其异常表达具有致癌作用<sup>[17]</sup>,在本研究中磷酸化蛋白质组学检测结果显示其 Y576 位点在抗菌肽 mercedin 作用后呈下调趋势。另外,有研究<sup>[18]</sup>表明,抗菌肽对肿瘤的细胞的抑制作用与其对细胞骨架的不可逆损伤相关。FOXO1 属于 FOXO 家族蛋白基因,能够通过 C 末端的 FOXO 识别原件结合相应的信号分子,诱导肿瘤细胞发生增殖或凋亡<sup>[19]</sup>。研究<sup>[20]</sup>表明,FOXO 作为一个抑癌分子可以抑制抑制乳腺癌、结直肠癌和食管癌的增殖。本研究中,抗菌肽作用于 A549 后其磷酸化蛋白组明显呈上调表达;另外,KI67 作为细胞增殖蛋白标志物,其在抗菌肽作用后 S538, S374、S648 位点磷酸化水平呈下调趋势,也进一步验证了本课题组前期研究的结果<sup>[21]</sup>。MARCKS 也是细胞骨架蛋白,是蛋白激酶 C(protein kinase C,PKC)的主要底物,通过 PKC 磷酸化 MARCKS 导致其从质膜转位到细胞质,在细胞质中起肌动蛋白细胞骨架重构的作用。研究<sup>[22-23]</sup>表明,MARCKS 作为一种致癌基因,在癌症的发生、发展和转移过程中发挥着关键作用。在本研究中其磷酸化蛋白在抗菌肽 mercedin 作用后,S27、S167、S163 以及 T150 位点磷酸化水平呈表达下调趋势。

综上所述,本研究通过磷酸化蛋白质组学技术,在蛋白质层面为抗菌肽 mercedin 作用于肺癌 A549 细胞寻找新的分子靶点奠定了实验基础,也为肺癌的治疗提供了新的研究方向,为今后研究抗菌肽杀伤肿瘤细胞的作用机制起引导作用。

#### [参 考 文 献]

- [1] 董冀欣. 抗菌肽及其功能研究[J]. 山西农经, 2019(7): 128. DOI: 10.16675/j.cnki.cn14-1065/f.2019.07.082.

- [2] SIERRA J M, FUSTÉ E, RABANAL F, et al. An overview of antimicrobial peptides and the latest advances in their development[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2017, 17(6): 663-676. DOI: 10.1080/14712598.2017.1315402.
- [3] KANG H K, KIM C, SEO C H, et al. The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review[J]. *J Microbiol*, 2017, 55(1): 1-12. DOI:10.1007/s12275-017-6452-1.
- [4] CHEN X, ZOU X, QI G, et al. Roles and mechanisms of human cathelicidin LL-37 in cancer[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47(3): 1060-1073. DOI: 10.1159/000490183.
- [5] FABISIAK A, MURAWSKA N, FICHNA J. LL-37: Cathelicidin-related antimicrobial peptide with pleiotropic activity[J]. *Pharmacol Rep*, 2016, 68(4): 802-808. DOI:10.1016/j.pharep.2016.03.015.
- [6] HENSEL J A, CHANDA D, KUMAR S, et al. LL-37 as a therapeutic target for late stage prostate cancer[J]. *Prostate*, 2011, 71(6): 659-670. DOI:10.1002/pros.21282.
- [7] PAN W L, WANG Y, HAO Y, et al. Overexpression of CXCR4 synergizes with LL-37 in the metastasis of breast cancer cells[J]. *Biochim Et Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*, 2018, 1864(11): 3837-3846. DOI:10.1016/j.bbadis.2018.09.008.
- [8] WU W K, SUNG J J, TO K F, et al. The host defense peptide LL-37 activates the tumor-suppressing bone morphogenetic protein signaling via inhibition of proteasome in gastric cancer cells[J]. *J Cell Physiol*, 2010, 223(1): 178-186. DOI:10.1002/jcp.22026.
- [9] REN S X, CHENG A S, TO K F, et al. Host immune defense peptide LL-37 activates caspase-independent apoptosis and suppresses colon cancer[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(24): 6512-6523. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-12-2359.
- [10] 战仕胜, 李军, 杨婷婷, 等. 抗菌肽 mercedin 诱导人肺腺癌细胞系 A549 凋亡[J]. *基础医学与临床*, 2019, 39(4): 473-477. DOI: 10.16352/j.issn.1001-6325.2019.04.004.
- [11] DYSON N J. RB1: a prototype tumor suppressor and an enigma[J]. *Genes Dev*, 2016, 30(13): 1492-1502. DOI:10.1101/gad.282145.116.
- [12] 贺小威, 徐玲. 细胞周期相关基因 CDKN2A、TP53、RB1 和 BRCA2 在恶性肿瘤中的研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2018, 26(1): 153-157. DOI:10.3969/j.issn.1672-4992.2018.01.040.
- [13] 刘双虎, 王守志, 张慧, 等. 视网膜母细胞瘤基因 1(RB1)研究进展[J]. *遗传*, 2010, 32(11): 1097-1104.
- [14] LEI Y Y, WANG W J, MEI J H, et al. Mitogen-activated protein kinase signal transduction in solid tumors[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(20): 8539-8548. DOI:10.7314/apjcp.2014.15.20.8539.
- [15] 张志谦, 张广星, 彭小东. miR-143-3p 靶向 MAPK1 对人结肠癌细胞增殖、凋亡和侵袭的调节作用[J]. *中国临床解剖学杂志*, 2019, 37(3): 292-298. DOI:10.13418/j.issn.1001-165x.2019.03.011.
- [16] MALLIKARJUNA S E, DHARMESH S M. Swallow root (*Decalepis hamiltonii*) pectic oligosaccharide (SRO1) induces cancer cell death via modulation of galectin-3 and survivin[J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 186: 402-410. DOI:10.1016/j.carbpol.2018.01.053.
- [17] PUTHANVEETIL P. FoxO1-miRNA interacting networks as potential targets for mitochondrial diseases[J]. *Drug Discov Today*, 2019, 24(1): 342-349. DOI:10.1016/j.drudis.2018.10.011.
- [18] 王金兰. 抗菌肽研究概况(续完)[J]. *国外畜牧学(猪与禽)*, 2013, 33(12): 98-99.
- [19] 时军利, 王磊, 王春青, 等. miR-9-5p 通过靶向 FOXO1 基因调控食管癌细胞增殖、侵袭和迁移[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2019, 28(6): 644-649.
- [20] DENG Y C, WANG F J, HUGHES T, et al. FOXOs in cancer immunity: knowns and unknowns[J/OL]. *Semin Cancer Biol*, 2018, 50: 53-64[2019-10-16]. <https://www.karger.com/Article/FullText/490183>. DOI:10.1016/j.semcancer.2018.01.005.
- [21] 李军. 抗菌肽 17BIPHE2 对肺腺癌 A549 细胞抑制作用及机制的研究[D]. 银川: 宁夏医科大学, 2018.
- [22] FONG L W R, YANG D C, CHEN C. Myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS): a multirole signaling protein in cancers[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2017, 36(4): 737-747. DOI:10.1007/s10555-017-9709-6.
- [23] HARTL M, SCHNEIDER R. A unique family of neuronal signaling proteins implicated in oncogenesis and tumor suppression[J/OL]. *Front Oncol*, 2019, 9: 289[2019-10-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6478813/>. DOI:10.3389/fonc.2019.00289.

[收稿日期] 2019-10-20

[修回日期] 2020-02-16

[本文编辑] 黄静怡