

# 基于 iTRAQ 技术分析联合用药作用大鼠肝星状细胞后差异表达的蛋白

李彦<sup>1</sup>, 朱敏<sup>1</sup>, 曹雯<sup>2</sup>, 胡仁统<sup>2</sup>, 张学荣<sup>2</sup>, 廖明<sup>2\*</sup> (1.广西大学图书馆, 广西大学动物科学技术学院, 南宁 530004; 2.广西医科大学医学科学实验中心, 区域性高发肿瘤早期防治研究重点实验室, 南宁 530021)

**摘要:** 目的 筛选联合用药作用大鼠肝星状细胞(HSC-T6)后差异表达的蛋白质, 以探讨联合用药抑制肝星状细胞增殖的机制。方法 以牛磺酸、表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)和三羟基异黄酮三者组成的联合用药作用 HSC-T6 后, 提取细胞总蛋白, 运用同位素标记的 iTRAQ 技术结合高效液相色谱-电喷雾串联质谱(LC-ESI-MS/MS)的定量蛋白质组学方法, 分析和鉴定差异表达的蛋白质, 运用生物信息学分析差异表达的蛋白质功能。结果 质谱共分析鉴定到 727 种蛋白质。3 次实验分别鉴定到的差异表达蛋白质数量分别为 85, 102, 94 个, 在 3 次重复均鉴定到的差异表达蛋白为 52 个, 其中上调蛋白 24 个, 下调蛋白 28 个。生物信息学分析表明, 差异表达的蛋白参与翻译后修饰、转录、重组和信号传导等过程, 在这些蛋白质中既有与肝纤维化发生、发展直接相关的蛋白质如基质金属蛋白酶抑制剂 1、层黏连蛋白、前纤维蛋白 2 等, 也有在蛋白质的相互作用中处于功能网络交叉点的蛋白质如细胞周期素依赖性激酶 4、肝癌衍生生长因子、谷氨酰胺脱氢酶 1 和丝氨酸/精氨酸剪接因子 9 等。结论 联合用药抑制肝星状细胞增殖的作用, 可能是通过调控多种蛋白质的表达来实现, 所获得的差异表达蛋白可能在肝纤维化发生发展和药物抗肝纤维化作用过程中扮演重要角色。

**关键词:** 联合用药; 肝星状细胞; 细胞蛋白; iTRAQ

中图分类号: R963

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2014)11-1302-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.11.002

## Analysis of the Differentially Expressed Proteins on Combination-therapy in Rat Hepatic Stellate Cells by iTRAQ

LI Yan<sup>1</sup>, ZHU Min<sup>1</sup>, CAO Wen<sup>2</sup>, HU Rentong<sup>2</sup>, ZHANG Xuerong<sup>2</sup>, LIAO Ming<sup>2\*</sup> (1. Guangxi University Library, College of Animal Science and Technology of Guangxi University, Nanning 530004, China; 2. Key Laboratory Joint Established by Ministry of Education and Guangxi, Key Laboratory of Guangxi, Medical Scientific Research Center of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To detect protein expression differences after combination-therapy on HSC-T6 and to explore antifibrotic mechanism of combination-therapy based on the protein level. **METHODS** HSC-T6 as target cells, cells proteins were extracted after treated by combination drug of taurine, epigallocatechin gallate (EGCG) and genistein. After equal amount of protein digested by trypsin, the iTRAQ labeled protein peptide, separated by the cation column, LC-ESI-MS/MS used to detect and identify differentially expressed proteins. The functions of proteins were analyzed by bioinformatics. **RESULTS** Total 727 proteins were identified by MS. Three biological replicates identified 85, 102 and 94 differentially expressed proteins respectively. The analysis manifest 52 differentially expressed proteins were identified in three biological replicates simultaneously, of which 24 differentially expressed proteins were up-regulated, 28 differentially expressed proteins were down-regulated. The differentially expressed proteins correlate with post-translational modification, transcription, recombination and signal transduction pathways. **CONCLUSION** Combined drug treatment with taurine, EGCG and genistein can impact HSC protein expression. The antifibrotic effects of this drug combination may be due to regulation of protein expression.

**KEY WORDS:** combination-therapy; liver fibrosis; cell proteins; iTRAQ

长期以来, 药物治疗肝纤维化方法在许多离体和动物模型研究中显示了一定的效果, 如采用干扰素<sup>[1]</sup>、抗炎制剂<sup>[2]</sup>、抗氧化剂<sup>[3]</sup>等。但令众多学者困惑的是, 几乎所有的抗肝纤维化药物在动物水平研究中有效而临床效果很差或无效, 这严重限制了抗肝纤维化药物的临床应用。肝纤维化

是一系列复杂的多因素过程, 很多药物由于抗肝纤维化的靶点单一而导致疗效并不理想, 而有些药物的不良反应大于治疗效果。因此, 将作用于肝纤维化发生发展不同靶点、环节的药物联合应用(即联合用药), 以阻断肝纤维化发生、发展, 达到保护肝脏的目的, 可能是抗肝纤维化药物研究

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(81160063); 广西自然科学基金项目(2013GXNSFBA019167); 广西医学科学实验中心开放基金专项项目(KFJJ2010-41)

**作者简介:** 李彦, 女, 博士, 副研究员 Tel: (0771)5358354 E-mail: yan\_01091@sina.com \*通信作者: 廖明, 男, 博士, 副研究员, 硕导 Tel: (0771)5358354 E-mail: lminggx@163.com

的新方向。牛磺酸抑制转化生长因子  $\beta 1$  的表达和阻断 TGF- $\beta 1$ /smad 信号通路<sup>[4-6]</sup>；表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)具有很强的抗氧化作用，并能抑制胶原的形成<sup>[7-8]</sup>；三羟基异黄酮作为酪氨酸激酶抑制剂，可抑制肝纤维化大鼠肝窦内皮细胞的增殖<sup>[9]</sup>。笔者前期的系列研究表明，牛磺酸、EGCG 和三羟基异黄酮三者的联用能抑制肝星状细胞的增殖，比单一用药具有更明显的抗大鼠肝纤维化的作用<sup>[10-13]</sup>。

同位素相对和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)标记结合液相色谱-电喷雾串联质谱(LC-ESI-MS/MS)的方法是研究药物作用的关键蛋白及发现蛋白标志物的强有力工具。该方法对低丰度蛋白检测的灵敏度高，重复性好，最多可对 8 种不同样本同时进行定量分析<sup>[14]</sup>。iTRAQ 技术结合质谱分析，可同时分离和鉴定成百上千蛋白质，最大化的获得蛋白质的“全组信息”<sup>[15-16]</sup>。本实验以 iTRAQ 技术结合 LC-ESI-MS/MS 分析联合用药后大鼠肝星状细胞的差异表达蛋白，以进一步探讨联合用药抑制肝星状细胞增殖的关键蛋白及机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂和仪器

大鼠肝星状细胞 HSC-T6 为永生化细胞，表型为活化的 HSC，具纤维化特性(湖南湘雅医学院)；EGCG(四川省乐山市禹伽茶业科技开发有限公司，批号：20121207)；牛磺酸(批号：20130207)和三羟基异黄酮(2013-0211)均购自 Sigma 公司；DMEM(GIBICO 公司)；胎牛血清(Hyclone 公司)；蛋白提取及电泳分析所用的试剂 RIPA 裂解液、丙酮、过硫酸铵、TEMED、SDS、考马斯亮蓝等均购自 Thermo 公司；iTRAQ Reagents-8plex Chemistry 试剂盒、TEAB 等主要质谱试剂均购自 Applied Biosystems 公司。Mini-PROTEAN 电泳仪(美国 BIO-RAD)；Triple LTQ 5600 质谱仪(美国 Thermo)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养和用药** 将冷冻保存于超低温冰箱中的 HSC-T6 复苏后接种于含 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养液中，37 °C，5%CO<sub>2</sub> 条件下培养。当细胞呈单层致密状时，以 0.25%胰蛋白酶消化后传代。每次试验均在呈指数生长的细胞中进行。试验分为对照组和联合用药组(牛磺酸组 60  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、EGCG 70  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、三羟基异黄酮组

14  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )，将细胞以  $5\times 10^4\cdot\text{mL}^{-1}$  接种于 50 mL 培养瓶中，培养 12 h 后，换药物的培养液继续培养 24 h，详见参考文献[12]。

**1.2.2 细胞总蛋白的提取** 吸掉培养基，用预冷的 PBS 洗 3 次，按 25 cm<sup>2</sup> 的培养瓶中加入 2 mL 裂解液的比例加入强 RIPA 裂解液裂解细胞，置于冰上操作放置 20 min，每隔 5 min 吹打下细胞，收集液体，于 4 °C 条件下 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min，取上清；向上清液中加入 10 mmol·L<sup>-1</sup> DTT，56 °C 水浴 1 h；加入 55 mmol·L<sup>-1</sup> IAM，暗室放置 45 min；5 倍体积的丙酮沉淀剩余上清液 2 h，4 °C 条件下 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min 除上清；简单风干沉淀中残余丙酮，加入适量的 0.5 mol·L<sup>-1</sup> TEAB，冰浴超声 15 min；4 °C 条件下 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min，取上清获得蛋白质。采用 Bradford 方法对提取到的蛋白质进行定量。

**1.2.3 蛋白质酶解和 iTRAQ 标记** 每组样品取 100  $\mu\text{g}$  蛋白，按蛋白-酶(20:1)的比例加入 Trypsin，37 °C 酶解 4 h；重复 1 次，37 °C 再酶解 8 h。用真空离心泵抽干肽段，0.5 mol·L<sup>-1</sup> TEAB 复溶肽段。按照 iTRAQ 标记试剂盒的操作规程进行肽段的标记，114 标记对照组、115 标记用药组，室温培养 2 h。

**1.2.4 蛋白质的液相分离** 采用日本岛津公司的 LC-20AB HPLC 系统、使用 UltremexSCX 分离柱对蛋白样品进行液相分离。用 4 mL 缓冲液 A (25 mmol·L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钠于 25%乙腈中，pH 为 2.7) 复溶标记已抽干的混合肽段。进入分离柱后进行梯度洗脱(1 mL·min<sup>-1</sup>)：先用缓冲液 A 洗脱 10 min，再慢慢混入 5%~35%缓冲液 B(25 mmol·L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钠、1 mol·L<sup>-1</sup> 氯化钾于 25%乙腈中，pH 为 2.7) 洗脱 11 min，最后加入 35%~80% 缓冲液 B 洗脱 1 min。洗脱过程全程进行监测，最后筛选得到 20 个组分。使用除盐柱对组分除盐，冷冻抽干用于下一步分析用。

**1.2.5 蛋白质的 LC-ESI-MS/MS 分析** 纳升级液相系统为 Waters 公司的 NanoAcquity，由 BEH130 C<sub>18</sub> 柱(0.1 mm×100 mm，1.7  $\mu\text{m}$ ) 和 Symmetry C<sub>18</sub> 柱(0.18 mm×20 mm，5  $\mu\text{m}$ )两部分组成。BEH130 C<sub>18</sub> 柱用于分离肽段，Symmetry C<sub>18</sub> 柱用于肽段吸附和除盐。高效液相的流动相 A 液(乙腈-甲酸-水=1.9:0.1:98)和 B 液(乙腈-甲酸-水=98:0.1:1.9)中均加入一定比例的校正液。每次蛋白的上样量为 9  $\mu\text{L}$ (2.30  $\mu\text{g}$ )，以 2  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  流速的 A 液洗脱

15 min, 进行肽段吸附和除盐。然后采用含 5% 的 B 液以  $300 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1}$  流速洗脱 1 min, 开始建立洗脱梯度: B 液 45 min 内以梯度线型从 5% 升至 35%, 经 5 min 从 35% 升至 80%, 后以 80% 持续洗脱 5 min, 最后 3 min 恢复柱料。

使用的质谱为 AB SCIEX 公司的 TripleTOF 5600, 离子源为 Nanospray III source, 以石英材料拉制的喷针为放射器。采集数据时, 仪器的参数设置如下: 氮气压力为 30 psi, 离子源喷雾电压 2.5 kV, 喷雾气压 15 psi, 喷雾接口处温度 150 °C; 反射模式扫描, 分辨率  $\geq 30\,000$ ; 积累 250 ms 的从  $2^+$  到  $5^+$  的离子挑选其中强度每秒积累超过 120 分的离子扫描前 30 个, 一个循环 3.3 s; 设置第 2 个四极杆(Q2)的传输窗口为 100 Da 为 100%; 脉冲射频电的频率为 11 kHz; 检测器的检测频率为 40 GHz; 以 4 个通道分别记录每次扫描的粒子信号, 共 4 次后合并转化成采集数据; 离子碎裂的能量设置为  $(35 \pm 5) \text{ eV}$ ; 母离子动态排除设置为在出峰时间的一半(约 20 s), 相同母离子的碎裂不超过 2 次。

**1.2.6 蛋白质鉴定和定量** 应用 Mascot 2.3.02 软件(Matrix Science)进行蛋白质的鉴定。所使用数据库为 IPI 大鼠蛋白数据库, 以 mgf 文件[主要包含了二级质谱(MS/MS)图谱]为原始文件, 进行数据库搜索。各参数选择如下: 搜索类型: MS/MS Ion search, 酶: Trypsin, 数据库: IPI 大鼠蛋白数据库[IPI\_3.87(39925 sequences)], 仪器类型: Triple TOF 5600。依据蛋白质丰度水平, 当差异倍数达到 1.2 倍以上, 且经统计检验其  $P$  值  $< 0.05$  时, 视为差异表达蛋白质。

**1.2.7 生物信息学分析及统计学处理** 通过 GO 分析数据库(<http://www.geneontology.org/>)对鉴定出的所有差异蛋白进行 GO 功能注释分析, 分别从生物学进程(biological process, BP)、细胞成分 cellular component, CC)和分子功能(molecular-function, MF)这 3 方面进行分析。通过蛋白相互作用的 STRING 数据库(<http://www.string-db.org/>)对差异表达的蛋白质进行蛋白质间的相互作用网络分析。实验数据的结果用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析, 数据处理使用 SPSS 软件, 以  $P < 0.05$  为具有生物学意义。

## 2 结果

### 2.1 蛋白质的质谱定量分析及鉴定结果

本实验基于 iTRAQ 标记结合 LC-ESI-MS/MS

对牛磺酸、EGCG 和三羟基异黄酮组成的联合用药作用于 HSC-T6 后, 对细胞内蛋白质表达的影响进行了差异分析, 总共鉴定到 727 种蛋白质。以报告离子为 114 的不加药物 HSC-T6 细胞培养组为对照, 药物组标记为 115, 设定蛋白丰度差异达到  $> 1.2$  倍(上调)或  $< 0.7$  倍(下调), 且经统计检验其  $P$  值  $< 0.05$  的为差异蛋白。3 次实验分别鉴定到的差异蛋白质数量分别为 85, 102, 94 个, 在 3 次重复均鉴定到的差异蛋白为 52 个, 其中上调蛋白 24 个, 下调蛋白 28 个, 具体见表 1。采用 Mascot 软件对蛋白质进行搜库鉴定, 3 次重复均鉴定到的上调和下调的蛋白分见表 2 和表 3。

表 1 差异表达蛋白总数

Tab. 1 Summary of protein quantification

次数	上调蛋白数量	下调蛋白数量	总差异蛋白数量
第 1 次	39	46	85
第 2 次	46	56	102
第 3 次	43	51	94
3 次重复	24	28	52

表 2 联合药物作用 HSC-T6 后表达上调的蛋白质

Tab. 2 The up-regulated proteins in HSC-T6 after treatment with combined drug

登记号	鉴定的蛋白质	比率 (115 : 114)
IPI00392875	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶	1.870
IPI00210920	线粒体谷草转氨酶	1.365
IPI00207390	膜联蛋白 A3	1.259
IPI00230907	巨噬细胞移动抑制因子	1.771
IPI00203690	$\gamma$ -氨基丁酸醛脱氢酶	3.410
IPI00200601	硫氧还原类似蛋白 1	1.223
IPI00231229	谷胱甘肽 S-转移酶	1.284
IPI00391791	蛋白酶体抑制剂 PI31 亚基	1.384
IPI00231920	肌动蛋白-2	1.512
IPI00204738	乙酰乙酰辅酶 A 合成酶	1.336
IPI00188158	羟甲基戊二酰辅酶 A 合成酶	1.704
IPI00464532	吡咯啉-5-羧酸还原酶 2	1.463
IPI00206626	血红素合酶 1	1.458
IPI00480766	乙酰辅酶 A	1.564
IPI00194085	液泡修饰蛋白 36	1.481
IPI00231196	转凝蛋白	1.465
IPI00195160	硫酸化糖蛋白 1	1.423
IPI00371124	丝氨酸/精氨酸剪接因子 9	1.515
IPI00324986	GDP 解离抑制因子	1.372
IPI00206712	肌醇单磷酸酶 1	1.274
IPI00194130	胸苷激酶	1.407
IPI00365286	组蛋白	1.246
IPI00188921	胶原 I	1.331
IPI00324633	谷氨酸脱氢酶 1	1.205

注: 114-对照; 115-联合用药。

Note: 114-control; 115-Combined drug.

表 3 联合药物作用 HSC-T6 后表达下调的蛋白质

Tab.3 The down-regulated proteins in HSC-T6 after treatment with combined drug

登记号	鉴定的蛋白质	比率 (115 : 114)
IPI00358600	核糖体蛋白质 L27a	0.492
IPI00207050	网钙蛋白 3(EF 手钙结合域)	0.608
IPI00197173	载脂蛋白 80	0.681
IPI00205805	基质金属蛋白酶抑制剂 1	0.629
IPI00211895	谷胱甘肽合成酶	0.597
IPI00192246	线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 5A	0.594
IPI00480820	膜相关受体组分 1 黄体酮	0.686
IPI00210945	原肌球蛋白 $\alpha 1$ 链 C	0.526
IPI00464535	纤溶酶原激活物抑制蛋白 1	0.579
IPI00194222	细胞色素 C 氧化酶亚基 1	0.595
IPI01016575	环指蛋白 2	0.659
IPI00363550	转铁蛋白受体蛋白 1	0.579
IPI00567828	SKP1 抑制蛋白	0.514
IPI00198619	腺苷酸转移酶	0.605
IPI00199448	半乳糖结合蛋白	0.592
IPI00192880	干扰素-诱导的 GTP 结合蛋白	0.404
IPI00393595	前胸腺素 $\alpha$	0.389
IPI00363849	层粘连蛋白 $\gamma$	0.676
IPI00371178	2'-5'寡腺苷酸合成酶 1	0.602
IPI00205389	纤维蛋白原 $\beta$ 链	0.170
IPI00324168	糖合成酶激酶 3	0.658
IPI00372499	跨膜蛋白 109	0.516
IPI00326566	肝癌衍生生长因子	0.423
IPI00391633	肝癌衍生生长因子相关蛋白 2	0.667
IPI00203574	热激蛋白 70 结合蛋白 1	0.659
IPI00464735	细胞生长调节核仁蛋白	0.613
IPI00214461	白介素 1 受体拮抗蛋白	0.548
IPI00198608	细胞周期素依赖性激酶 4	0.684

注: 114-对照; 115-联合用药。

Note: 114-control; 115-Combined drug.

## 2.2 蛋白质的生物信息学分析

对差异表达蛋白进行 GO 分析,研究这些蛋白的功能。BP 分析发现,差异表达蛋白大多参与信号传导、代谢合成和外界刺激压力反应; MF 分析揭示,这些蛋白大多结合核苷酸或受体、水解代谢反应、转录活性等功能; CC 分析得出差异蛋白主要分布在细胞质内和细胞膜上,见图 1。运用 STRING 9.0 检索蛋白质相互作用见图 2; 细胞周期素依赖性激酶 4(cyclin-dependent kinase 4, CDK4)、肝癌衍生生长因子(hepatoma-derived

growth factor, Hdgf)、谷氨酸脱氢酶 1 (Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial, Glud1)和丝氨酸/精氨酸剪接因子 9 蛋白(serine/arginine-rich splicing factor 9, Sfrs9)在网图中处于功能网络交叉点,他们可能在蛋白相互作用及肝纤维化的发生发展过程中扮演重要角色。

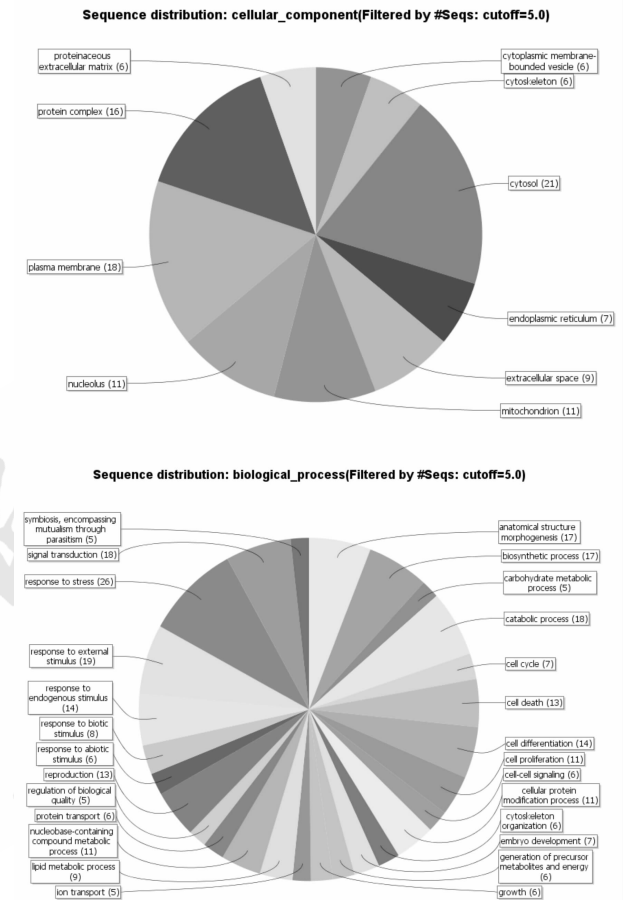


图 1 差异表达蛋白的 Gene Ontology 分析

Fig.1 Gene Ontology annotations of differentially expressed proteins

## 3 讨论

本次定量蛋白质组学分析质谱共鉴定到 727 种蛋白质,其中重复鉴定到的差异蛋白为 52 个,其中上调蛋白 24 个,下调蛋白 28 个。经分析发现部分差异蛋白如基质金属蛋白酶抑制剂 1、层粘连蛋白、前纤维蛋白 2 等已经有大量的报道直接与肝纤维化的发生、发展有关,这些蛋白表达变化与前期报道的研究结果一致。同时,本研究也发现 CDK4 蛋白、Hdgf 蛋白、Glud1 蛋白和 Sfrs9 蛋白在蛋白质的相互作用中处于功能网络交叉点,他们可能在蛋白相互作用、肝纤维化发生发展、药物抗肝纤维化作用过程中扮演重要角色。

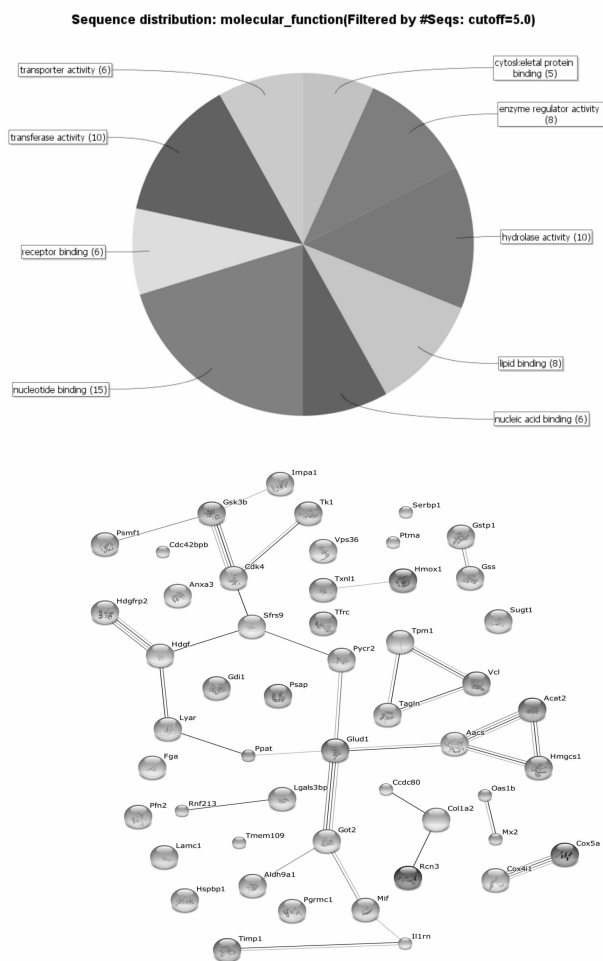


图2 差异表达蛋白的相互作用分析  
**Fig. 2** Interaction of differentially expressed proteins

有报道HSC的增殖受到包括CDK4在内的多种细胞周期依赖性激酶的调控,并证实CDK4是HSC细胞周期重要的调节蛋白和依赖性蛋白激酶<sup>[17-18]</sup>。药物PD98059(细胞增长特异性抑制剂)能阻止HSC的G1-S期转化,其抑制机制与CDK4表达下调,降低I型胶原的分泌有关<sup>[19-21]</sup>。本研究结果与前面的报道一致,联合药物作用肝星状细胞后,促使CDK4表达下降,推断进一步调控HSC增殖,从而促进肝星状细胞的凋亡。

HDGF是1994年Nakamura等<sup>[22]</sup>在人肝癌细胞系(HuH-7)无血清培养的上清液中分离得到的一种生长因子,HDGF在体内广泛分布,具有与DNA结合功能,参与细胞分化、增殖,组织器官的生长、发育;HDGF与肿瘤细胞异常增殖有关,在肿瘤中表达增加。有研究发现肝脏纤维化过表达的HDGF主要定位在血管周围肝细胞胞质,过表达HDGF能促进纤维化因子(COL I、COL II、

TGF-β1)过表达,导致肝脏的胶原基质沉积,表示HDGF的过表达与肝纤维化病理过程关联,TGF-β1可通过与HDGF相互作用促进肝纤维化进展<sup>[23]</sup>。本研究显示HDGF蛋白在肝星状细胞受到联合药物作用后,表达明显下降,推测联合用药可能与前面的研究一样,通过降低HDGF的表达,抑制TGF-β1、COL I、COL II等促纤维化相关蛋白的表达,阻断肝纤维化的进程。

Glut1为线粒体谷氨酸脱氢酶,作为三羧酸循环的重要中间体,有报道可能参与神经递质谷氨酸的学习和记忆的反应<sup>[24]</sup>。Ding等<sup>[25]</sup>曾采用HBV-Tg小鼠(含有HBV全基因)和HBs-Tg小鼠(部分HBV基因转入的)进行研究,双向电泳发现在HBV-Tg小鼠血清中,参与氨基酸代谢的Glut1等线粒体蛋白,与HBV慢性感染过程中变化的免疫反应有关。Tang等<sup>[26]</sup>采用2-DE-TOF-TOF-MS分别对正常组和DBDCT染毒组大鼠肝脏膜蛋白和核蛋白表达谱进行分析,鉴定出6个膜蛋白和10个核蛋白,其中Glut1为上升蛋白。本研究显示联合药物作用肝星状细胞后Glut1的表达上升,推测药物作用后Glut1参与了肝纤维化的恢复过程。

Sfrs9具有对蛋白质的剪接调节的作用,可以调节剪接位点的选择,抑制MAPT/Tau外显子的剪接。Tong等<sup>[27]</sup>利用iTRAQ联合质谱技术,通过比较HepG2和HepG2.2.15细胞蛋白的差异表达谱,发现Sfrs9表达上调,同时在mRNA水平得到相同的结果。本研究显示联合药物作用肝星状细胞后Sfrs9的表达上升,推测Sfrs9的表达升高,可能通过调节各种蛋白的剪接位点,进而形成不同功能的蛋白质,以影响肝星状细胞的各种生理过程。

总之,本研究通过iTRAQ技术结合质谱初步分析联合药物抑制肝星状细胞增殖的机制,得到一系列与肝纤维化有关的差异表达蛋白,表明该技术用于药物抗肝纤维化蛋白质组学研究具有良好的前景。但这些蛋白在肝纤维化发生、发展中的作用尚未完全清楚,需要进一步评价这些差异蛋白作为诊断肝纤维化的候选标志物的可靠性。

## REFERENCES

[1] WENG H, MERTENS P R, GRESSNER A M, et al. IFN-gamma abrogates profibrogenic TGF-beta signaling in liver by targeting expression of inhibitory and receptor Smads

- [1] J. J Hepatol, 2007, 46(2): 295-303.
- [2] COMPORTI M, SIGNORINI C, AREZZINI B, et al. Isoprostanes and hepatic fibrosis [J]. Mol Aspects Med, 2008, 29(1/2): 43-49.
- [3] DUMONT J M, MAIGNAN M F, JANIN B, et al. Effect of malotiate on chronic liver injury induced by carbon tetrachloride in the rat [J]. Hepatology, 1986, 3(2): 260-268.
- [4] CHEN Y X, ZHANG X R, XIE W F, et al. Effects of taurine on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells *in vitro* [J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2004, 3(1): 106-109.
- [5] KATO J, IDO A, HASUIKE S, et al. Transforming growth factor-beta-induced stimulation of formation of collagen fiber network and anti-fibrotic effect of taurine in an *in vitro* model of hepatic fibrosis [J]. Hepatology Res, 2004, 30(1): 34-41.
- [6] DENG X, LIANG J, HUANG B, et al. Effects of natural taurine on TGF- $\beta$ 1/Smad signaling pathway in rats of hepatic fibrosis [J]. J Dalian Med Univ(大连医科大学学报), 2007, 29(4): 336-338.
- [7] NAKAMUTA M, HIGASHI N, KOHJIMA M, et al. Epigallo-catechin-3-gallate a polyphenol component of green tea, suppresses both collagen production and collagenase activity in hepatic stellate cells [J]. Int J Mol Med, 2005, 16(4): 677-681.
- [8] ZHEN M C, WANG Q, HUANG X H, et al. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits oxidative damage and preventive effects on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis [J]. J Nutr Biochem, 2007, 18(12): 795-805.
- [9] LIU X J, HUANG M H, CHENG N, et al. Effects of genistein on the fenestrae, proliferation and nitric oxide synthesis of liver sinusoidal endothelial cells from carbon tetrachloride-induced experimental hepatic fibrosis rats [J]. Clin J Hepatol(中华肝病杂志), 2002, 10(3): 200-203.
- [10] LIAO M, LI Y, SHU W, et al. Effect of cocktail therapy on proliferation and Collagem-1 and TIMP-1 mRNA expression in rat hepatic stellate cells [J]. World Chin J Digestol(世界华人消化杂志), 2010, 18(9): 932-936.
- [11] LIAO M, LIN X, CHEN Z N, et al. Effect of cocktail-therapy on TGF- $\beta$ 1, COLI and COLIII in liver tissues of rat with liver fibrosis [J]. World Chin J Digestol(世界华人消化杂志), 2010, 18(18): 1867-1872.
- [12] LIAO M, ZH Y, HE M, et al. Alteration of cocktail-therapy on gene and proteomic expression profile in rat hepatic stellate cells [J]. World Chin J Digestol(世界华人消化杂志), 2011, 19(17): 1780-1784.
- [13] LIAO M, MO C F, ZHOU Y, et al. Effect of the combination-therapy of liver fibrosis in rats and differentially expressed proteins in liver tissue determined by SELDI-TOF-MS [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2012, 21(14): 1668-1671.
- [14] WU W W, WANG G, BAEK S J, et al. Comparative study of three proteomic quantitative methods, DIGE, cICAT, and iTRAQ, using 2D gel- or LC-MALDI TOF/TOF [J]. J Proteome Res, 2006, 5(3): 651-658.
- [15] WANG L Q, DAI Y, TU Z G. iTRAQ labeling and biomarker discovery in comparative proteomic studies [J]. Chem Life(生命的化学), 2010, 30(1): 135-140.
- [16] BOUCHAL P, ROUMELIOTIS T, HRSTKA R, et al. Biomarker discovery in lowgrade breast cancer using isobaric stable isotopetags and two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry (iTRAQ-2DLC-MS/MS) based quantitative proteomic analysis [J]. J Proteome Res, 2009, 8(1): 362-373.
- [17] UEBERHAM E, LOW R, UEBERHAM U, et al. Conditional tetracycline regulated expression of TGF-beta1 in liver of transgenic mice leads to reversible intermediary fibrosis [J]. Hepatology, 2003, 37(5): 1067-1078.
- [18] CZOCHRA P, KLOPCIC B, MEYER E, et al. Liver fibrosis induced by hepatic over expression of PDGF-B in transgenic mice [J]. J Hepatol, 2006, 45(3): 419-428.
- [19] KHETANI S R, BHATIA S N. Microscale culture of human liver cells for drug development [J]. Nat Biotechnol, 2008, 26(1): 120-126.
- [20] DOUGLASS A, WALLACE K, PARR R, et al. Antibody-targeted myofibroblast apoptosis reduces fibrosis during sustained liver injury [J]. J Hepatol, 2008, 49(1): 88-98.
- [21] SATO Y, MURASE K, KATO J, et al. Resolution of liver cirrhosis using vitamin A-coupled liposomes to deliver siRNA against a collagen specific chaperone [J]. Nat Biotechnol, 2008, 26(4): 431-442.
- [22] NALAMURA H, IZUMOTO Y, KAMBE H, et al. Molecular cloning of complementary DNA for a novel human hepatoma-derived growth factor. Its homology with high mobility group-1 protein [J]. J Biol Chem, 1994, 269(40): 25143-25149.
- [23] KAO YH, CHEN C L, JAWAN B, et al. Upregulation of hepatoma derived growth factor is involved in murine hepatic fibrogenesis [J]. J Hepatol, 2010, 52(1): 96-100.
- [24] CAVALLARO S, MEIRI N, YI C L, et al. Late memory-related genes in the hippocampus revealed by RNA fingerprinting [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(10): 9669-9673.
- [25] DING C, WEI H, SUN R, et al. Hepatocytes proteomic alteration and seroproteome analysis of HBV-transgenic mice [J]. Proteomics, 2009, 9(1): 87-105.
- [26] TANG L, LI Y L, GE R, et al. Oxidative stress indi-n-butyl-di-(4-chlorobenzohydroxamato)tin (IV)-induced hepatotoxicity determined by proteomic profiles [J]. Toxicol Lett, 2012, 213(2): 167-173.
- [27] TONG S W, YANG Y X, HU H D, et al. Proteomic investigation of 5-fluorouracil resistance in a human hepatocellular carcinoma cell line [J]. J Cell Biochem, 2012, 113(5): 1671-1680.

收稿日期: 2014-01-07