

研究论文

砷药在弥漫性大B细胞淋巴瘤细胞中的蛋白质组学研究

梁雄顺¹, 陈德容¹, 刘小倩¹, 徐万娜¹, 冯里茹¹, 洪文旭^{1*}, 胡绪乔^{1,2*}(¹深圳市慢性病防治中心, 深圳 518020; ²暨南大学第二临床医学院/深圳市人民医院, 深圳 518020)

摘要: 本研究旨在探究砷药对人淋巴瘤细胞蛋白质组的影响。采用液相色谱串联质谱(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS), 对砷药处理后的Daudi细胞进行差异表达蛋白质(differential expression proteins, DEPs)的深入生物信息学分析。GO分析和KEGG分析结果显示, DEPs都在细胞周期信号通路($FDR=7.9\times10^{-5}$)显著性富集。蛋白相互作用网络图按节点数标出前10种枢纽蛋白, 其中MYC、CHK1、CCNB1、CDC45、CDC20和BUB1B六种枢纽蛋白质参与细胞周期信号通路的调控机制。结果表明, 砷药通过调节细胞周期信号通路核心蛋白抑制肿瘤细胞增殖, 其中MYC和CHK1是砷药的潜在作用靶点。

关键词: 数据依赖性采集; 非数据依赖性采集; 砷药; 弥漫性大B细胞淋巴瘤; 蛋白质组学

Proteomic research of arsenic drugs in diffuse large B-cell lymphoma cells

LIANG Xiongshun¹, CHEN Derong¹, LIU Xiaoqian¹, XU Wanna¹, FENG Liru¹,
HONG Wenxu^{1*}, HU Xuqiao^{1,2*}(¹Shenzhen Center for Chronic Disease Control, Shenzhen 518020, China; ²Shenzhen People's Hospital of the Second Clinical Medical College of Ji'nan University, Shenzhen 518020, China)

Abstract: The aim of this work is to explore the effects of arsenic-based drugs on the proteome of human lymphoma cells. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) techniques were employed to conduct a comprehensive bioinformatics analysis of differentially expressed proteins (DEPs) in Daudi cells treated with arsenic-based drugs. The results showed that GO and KEGG analyses revealed significant enrichment of differentially expressed proteins (DEPs) in the cell cyclesignaling pathway ($FDR=7.9\times10^{-5}$). The protein-protein interaction network identified the top 10 hub proteins, including MYC, CHK1, CCNB1, CDC45, CDC20, and BUB1B, all of which regulate the cell cycle. The results indicate that arsenic-based drugs inhibit tumor cell proliferation by modulating core proteins in the cell cycle signaling pathway.

Key Words: data-dependent acquisition; data-independent acquisition; arsenic trioxide; diffuse large B cell lymphoma; proteomic

弥漫性大B细胞淋巴瘤(diffuse large B cell Hodgkin's malignant lymphoma, NHL)中最常见的 lymphoma, DLBCL)是非霍奇金淋巴瘤(non- 亚型, 约占NHL的40%, 具有较高的致死率, 目前

收稿日期: 2024-10-31

基金项目: 国家自然科学基金项目(82204681); 深圳市科技计划项目(JCYJ20210324114008022)

第一作者: E-mail: 675627664@qq.com

*通信作者: 洪文旭, E-mail: szbloodcenter@hotmail.com; 胡绪乔, E-mail: haniahu@hotmail.com

尚未出现有效的靶向治疗方案^[1]。常规治疗如利妥昔单抗配合CHOP方案已得到广泛应用^[2], 但耐药问题凸显, 迫切需要开发新的靶向药物。砷药(arsenic trioxide, As₂O₃, ATO)作为一种源自中药砒霜的天然氧化物类矿物质, 在治疗白血病方面展现出重要临床应用价值^[3]。研究表明, 砷药通过调节多种蛋白质功能及细胞信号通路, 在多种癌症的治疗中发挥作用^[4,5], 但其在DLBCL中的蛋白质组学研究尚未开展。

在癌症治疗领域, 蛋白质组学分析已成为揭示疾病机制和发现治疗靶点的重要工具^[6]。本研究采用数据依赖性采集(data-dependent acquisition, DDA)和数据非依赖性采集(data-independent acquisition, DIA)两种非标记定量技术, 对DLBCL模型中Daudi细胞在砷药作用下的蛋白质组学进行了系统性研究, 初步揭示了砷药对多种蛋白质功能和细胞通路的影响作用, 为新治疗靶点的发现提供了参考资料。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

Daudi细胞(普诺赛生物科技有限公司)在RPMI-1640培养基(Gibco公司)中培养, 培养基中含15%的胎牛血清和100 U/mL的青霉素及100 mg/mL的链霉素(上海博尔森生物科技有限公司)。待细胞状态稳定生长时, 将Daudi细胞分别在含有0 μmol/L(简称D-As0)和8 μmol/L(简称D-As8)砷药的RPMI-1640培养基中继续培养24 h。每种浓度设立三组平行实验。24 h后, 收集细胞, 并使用2 mL预热的PBS洗涤2次。细胞在800 r/min下离心3 min, 弃去上清液。样本分别加入8 mol/L尿素(上海麦克林生化科技股份有限公司)进行细胞裂解。最后, 采用BCA试剂盒(Thermo Scientific公司)对蛋白质浓度进行测定。

1.2 样品制备

取150 μg蛋白质在10 mmol/L二硫苏糖醇(上海安谱实验科技股份有限公司)/25 mmol/LNH₄HCO₃(上海麦克林生化科技股份有限公司)中37 °C孵育1 h, 然后在20 mmol/L碘乙酰胺(上海麦克林生化科技股份有限公司)/50 mmol/L NH₄HCO₃中避光孵育1 h进行还原烷基化。将还原烷基化后的蛋白质

转移至超滤管(Merck Millipore公司), 用50 mmol/L NH₄HCO₃洗涤3次, 加入含3 μg胰酶(Promega公司)的50 mmol/L NH₄HCO₃(pH8.0)缓冲液, 于37 °C反应16 h。酶解完成后, 用50 mmol/L NH₄HCO₃(pH8.0)清洗2次, 即得肽段溶液。肽段溶液中加入甲酸(Thermo Scientific公司)至终浓度为1%终止酶解, 用离心浓缩仪(Labconco公司)抽干液体。

1.3 样本肽段质谱采集

1.3.1 DDA采集方法

各组分肽段加入20 μL 0.1%甲酸复溶, 采用Nanovue(General Electric公司)测定多肽浓度。LC-MS/MS上机前, 将样品稀释至500 ng/μL。肽段样本各取10 μL溶液转入进样管, 经EasynLC1200-Orbitrap Fusion色谱串联质谱系统(Thermo Scientific公司)进行DDA质谱数据采集。液相条件: 色谱柱Acclaim PepMap100 C18, 75 μm×25 cm(Thermo Scientific公司)的流动相A为0.1%甲酸水溶液, 流动相B为0.1%甲酸乙腈溶液。分离梯度: 0~3 min, 3%~8% B; 3~95 min, 8%~28% B; 95~110 min, 28%~32% B; 110~115 min, 32%~95% B; 115~120 min, 95% B。流速300 nL/min。质谱参数设置: 采集时间为120 min, 正离子模式, 喷针电压2.0 kV, 扫描范围350~1500 m/z, 一级质谱分辨率60 000 atm/z200, 二级质谱分辨率1 500 atm/z200, 碰撞能量32%, Top20模式。

1.3.2 DIA采集方法

在实验中, 每个肽段样本取10 μL溶液转移到进样管中, 以便进行反向色谱分离。样本在串联质谱DIA模式下进行分析, 液相色谱的设置与DDA方法相同。质谱参数包括扫描时间、离子模式、喷针电压、扫描范围及碰撞能量等, 均与DDA方法相同。二级质谱设置为固定窗口, 其质荷比(m/z)扫描范围依次为400~1 000。

1.4 蛋白质定性与定量分析

使用Maxquant(2.4.2.0)软件, 将DDA模式采集到的原始谱图数据与UniProt数据库提供的人类蛋白质序列数据库进行比对解析, 以进行蛋白质的搜索和鉴定。主要参数设置如下: 非标定量选择LFQ, 假阳性率(FDR)<0.01; 蛋白酶选择胰蛋白酶, 一级质谱容差设置为10 ppm; 二级质谱容差设置为0.5 Da; 其他参数保持默认设置。使用DIA-

NN软件分析DIA模式采集到的原始谱图数据^[7],主要参数设置:蛋白质序列数据库、假阳性率(FDR)和胰酶选择与Maxquant相同,假阳性率(FDR)<0.01,母离子产生选择基于深度学习的图谱、保留时间预处理,多肽长度范围7~30,母离子扫描范围300~1 800 m/z,其他参数默认。利用Perseus软件,取中值以下高斯分布中的随机值代替缺失值。使用Student's *t*-test进行分析,并选择 $P<0.05$ 且差异倍数(fold change, FC)>1.5的蛋白质作为差异表达蛋白(differentially expressed proteins, DEPs)的筛选标准。利用联川生物云平台(<https://www.omicstudio.cn>)将两种采集模式下鉴定出的差异蛋白绘制火山图。

1.5 数据质量分析

蛋白质鉴定数量、多肽鉴定数量及组内母离子峰强度相对标准偏差(relative standard deviation; CV)采用Microsoft Excel 2016分析^[8]。利用联川生物云平台(<https://www.omicstudio.cn>)生成CV分布密度图、数据缺失矩图及两种技术鉴定到的蛋白质种类Venn交集图。

1.6 DIA鉴定的差异表达蛋白生物信息学分析

基于上述两种非标记定量技术的对比结果,我们采用较优的非标记定量技术数据进行后续的生物信息学分析。利用微生信(<https://www.bioinformatics.com.cn>)在线工具进行基因本体(gene ontology, GO)功能注释和KEGG通路分析。分析涵盖生物学过程、细胞组分和分子功能三个方面,并采用 $P<0.05$ 作为信度阈值。

1.7 差异表达蛋白功能分析

为了深入分析DIA鉴定的差异表达调节蛋白,我们构建了一个蛋白质-蛋白质相互作用网络

(protein-protein interaction, PPI)。使用STRING (11.5)数据库构建基因网络,设定枢纽基因网络的默认最低综合得分为0.4。随后,使用Cytoscape (3.6.1)软件对基因网络进行可视化分析,基于节点数对PPI网络中的枢纽蛋白进行识别,并利用GraphPad Prism 9.0软件对关键靶蛋白的强度数据进行标准化处理,绘制蛋白质相对丰度图。

1.8 细胞凋亡的流式细胞术评估

为了定量评估细胞凋亡,我们收集Daudi细胞并用冰冷的PBS洗涤。使用Annexin V-PE/7-AAD凋亡检测试剂盒,按照生产商的操作说明进行凋亡细胞频率的测定。具体步骤为:将细胞重悬于500 μ L的1 $\times$ 结合缓冲液中,加入5 μ L的Annexin V-PE和5 μ L的7-AAD,混匀后在室温下避光孵育15 min。孵育结束后,使用Attune NxT流式细胞仪(Thermo Fisher公司)对每个样本中的至少10 000个细胞进行流式细胞分析,分析过程在1 h内完成。

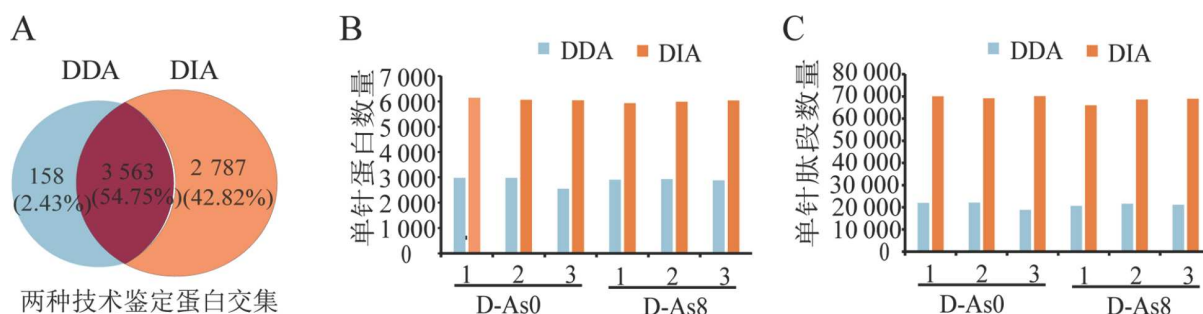
2 结果

2.1 DDA和DIA鉴定数据比较

为确保蛋白质组学数据分析结果的可靠性与精确性,本文通过比较两种常见的非标记定量技术,评估它们在Daudi细胞中的应用优劣,选取了表现更优的数据作为后续研究的基础。

2.1.1 通量对比

在相同液相色谱条件下,经过数据清洗后DDA技术鉴定到3 721种蛋白质,DIA技术鉴定到6 350种蛋白质。通过Venn图分析,发现3 563种蛋白质在两种方法中均得到鉴定,158种仅在DDA方法中鉴定到,2 887种仅在DIA中鉴定到(图1A)。使用DIA方法对6个样本进行单针鉴定,比DDA平均



A: DDA与DIA鉴定得到的蛋白质交集; B: DDA与DIA单针蛋白质鉴定量对比; C: DDA与DIA单针多肽鉴定量对比

图1 DDA与DIA鉴定通量对比

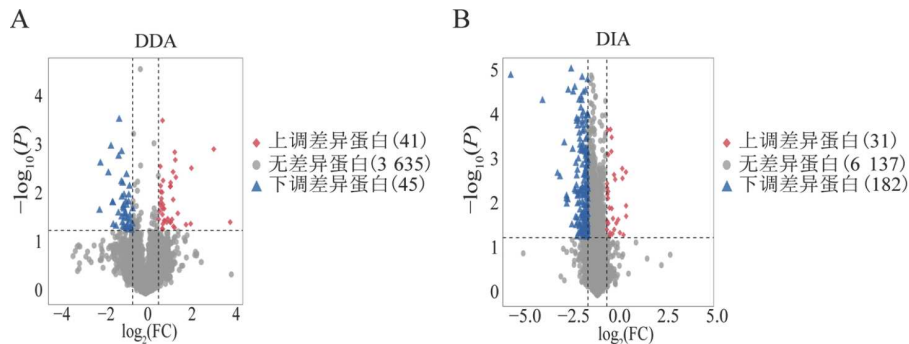
提升约110%(图1B), 单肽段量平均提升约228%(图1C)。

2.1.2 差异表达蛋白对比

比较DDA与DIA鉴定的差异表达蛋白情况, 将两个砷药浓度数据之间作Student's *t*-test两两比较, 取 $P < 0.05$ 且 $FC > 1.5$ 作为差异表达蛋白的筛选标准。结果显示, 在DDA方法中鉴定到3 721种蛋白质, 其中有41种上调蛋白, 有45种下调蛋白(图2A); 在DIA方法中鉴定到6 350种蛋白质, 其中有31种上调蛋白质, 182种下调蛋白质(图2B)。两种方法中鉴定到的上调差异蛋白数量接近, 而DIA鉴定到的下调差异蛋白是DDA的4倍。

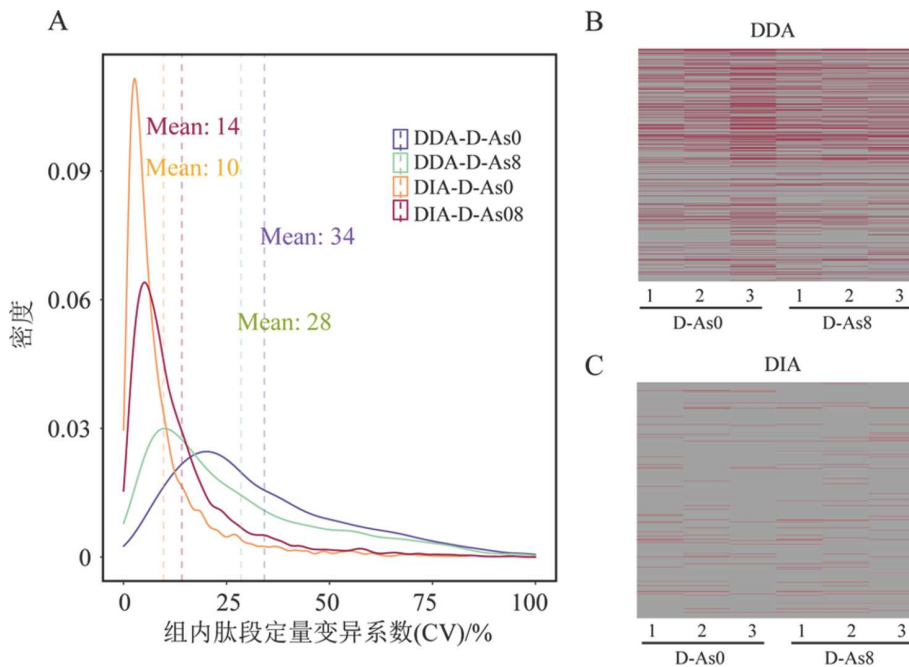
2.1.3 数据质量评估

本研究对各组内重复的肽段离子峰强度的变异系数(coefficient of variation, CV)进行统计分析, DDA结果中2个组内平均CV值分别为34%、28%, CV值小于20%的肽段仅占总鉴定肽段的32%、49%; 在DIA结果中, 平均CV值分别为10%、14%, CV值小于20%的肽段占总鉴定肽段的比例高达89%、80%(图3A)。这些结果表明, DIA方法采集的数据重复性显著高于DDA方法。统计各组内的数据缺失率发现, DDA技术的两组内数据缺失比例分别为24%和22%, DIA技术仅为4%和6%。如图3B和图3C所示, 数据矩阵直观呈现了缺失数



A: DDA鉴定的差异表达蛋白质; B: DIA鉴定的差异表达蛋白质。红色表示上调蛋白质, 蓝色表示下调蛋白质

图2 两种方法鉴定的差异表达蛋白质



A: 母离子峰强度变异系数(CV)密度分布图; B: DDA和DIA鉴定蛋白质缺失值矩阵, 红线为缺失值。Mean: 组内平均CV值

图3 蛋白质组学数据质量分析

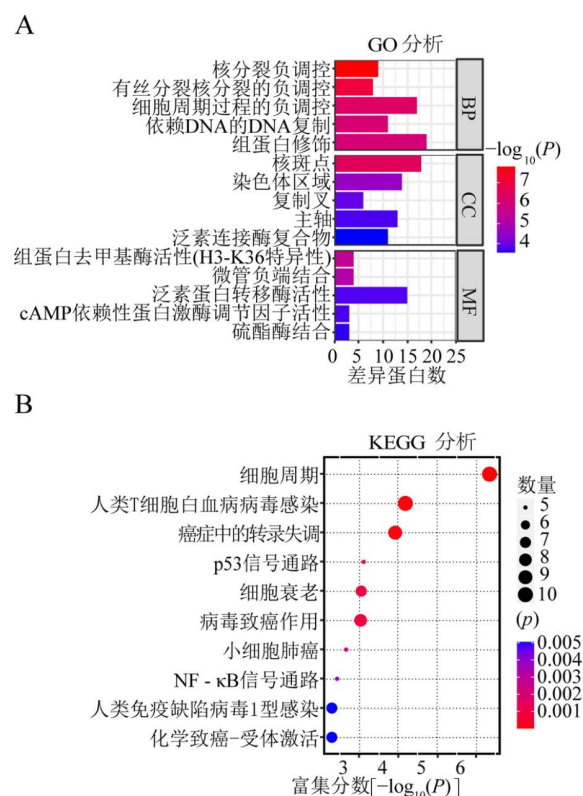
据的分布,红色代表数据缺失,DIA的数据缺失值明显少于DDA,即DIA的数据完整度明显高于DDA。

2.2 DIA鉴定的差异蛋白生物信息学分析

基于DDA和DIA技术的对比结果发现,DIA数据的完整性较高,因此选择DIA方法鉴定的蛋白质组学数据用于后续的生物信息学分析。为了探讨砷药处理对Daudi细胞蛋白质组及其相关信号通路的影响,我们利用在线生信分析工具(<https://www.bioinformatics.com.cn>)对DIA方法鉴定出的差异表达蛋白进行注释、富集分析。结果表明,差异蛋白的生物过程主要富集于核分裂负调控($FDR=4.2\times 10^{-5}$)、有丝分裂核负调控($FDR=1.1\times 10^{-4}$)、细胞周期过程的负调控($FDR=3.8\times 10^{-4}$);差异蛋白的细胞定位主要富集于核斑点($FDR=8.9\times 10^{-5}$)、染色体区域($FDR=3.4\times 10^{-3}$)、复制叉($FDR=9.9\times 10^{-3}$);差异蛋白的细胞定位主要富集于去甲基酶活性(H3-K36特异性)($FDR=1.1\times 10^{-3}$)、微管负端结合($FDR=1.3\times 10^{-3}$)、泛素蛋白转移酶活性($FDR=1.2\times 10^{-2}$)(图4A,表1)。为了探索砷药给药后对Daudi细胞蛋白质组相关的信号通路的影响,我们将砷药处理样品与未处理样品的差异调控基因映射到KEGG通路数据库进行了富集分析。结果发现,前5项信号通路分别为细胞周期($FDR=7.9\times 10^{-5}$)、人类T细胞白血病病毒感染($FDR=5.7\times 10^{-3}$)、癌症中的转录失调($FDR=7.0\times 10^{-3}$)、p53信号通路($FDR=2.7\times 10^{-2}$)、细胞衰老($FDR=2.7\times 10^{-2}$)(图4B,表2)。然而,基于富集分析确定得到的这些通路,需要进一步的研究来验证它们在Daudi和砷药背景下的功能相关性。

2.3 蛋白质-蛋白质相互作用网络分析

为了解砷调节蛋白质的相互作用,使用STRING数据库(11.5)对DIA方法检测到的213种砷调节蛋白进行蛋白质-蛋白质相互作用网络分析。我们构建了一个包含138个节点和365条边的基因网络,选择高可信度为0.4(图5A);然后利用Cytoscape软件(版本3.6.1)基于节点数对PPI网络中的枢纽基因进行识别,筛选节点度 ≥ 15 的前10种枢纽蛋白(图5B)分别为:原癌基因蛋白(Myc proto-oncogene protein, MYC)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(Serine/threonine-protein kinase, CHK1)、DNA修



A: 差异表达蛋白质GO富集分析。横轴表示通路中的基因数,纵轴表示名称。色标表示 p 值的富集分数; B: 差异表达蛋白质KEGG通路富集分析。横轴表示通路中的富集分数,纵轴表示通路名称。色标表示 p 值的不同阈值,点的大小表示每项对应的基因数。BP: 生物过程(biological process); CC: 细胞定位(cellular component); MF: 分子功能(molecular function)

图4 差异表达蛋白质生物信息学分析

复蛋白RAD51(DNA repair protein RAD51 homolog 1)、特异性细胞周期蛋白B1(G_2 /mitotic-specific cyclin-B1, CCNB1)、周期素A2抗体(cyclin-A2, CCNA2)、细胞分裂控制蛋白45同源物(cell division control protein 45 homolog, CDC45)、细胞分裂周期蛋白20同源物(cell division cycle protein 20 homolog, CDC20)、苏氨酸蛋白激酶(threonine-protein kinase, BUB1B)、胸腺嘧啶酸合酶(thymidylate synthase, TYMS)和驱动蛋白家族成员2C(kinesin-like protein 2C, KIF2C)(图5C)。

2.4 砷药诱导Daudi细胞凋亡

为了验证砷药是否通过诱导凋亡抑制Daudi细胞增殖,我们采用流式细胞术配合Annexin V-PE/7-AAD染色法评估了细胞的凋亡情况。如图1A和图1B所示,通过对比对照组与处理组的结果,发现砷药能够有效诱导Daudi细胞的凋亡。在处理组

表1 差异表达蛋白质生物进程、细胞组分及分子功能显著性富集前5项

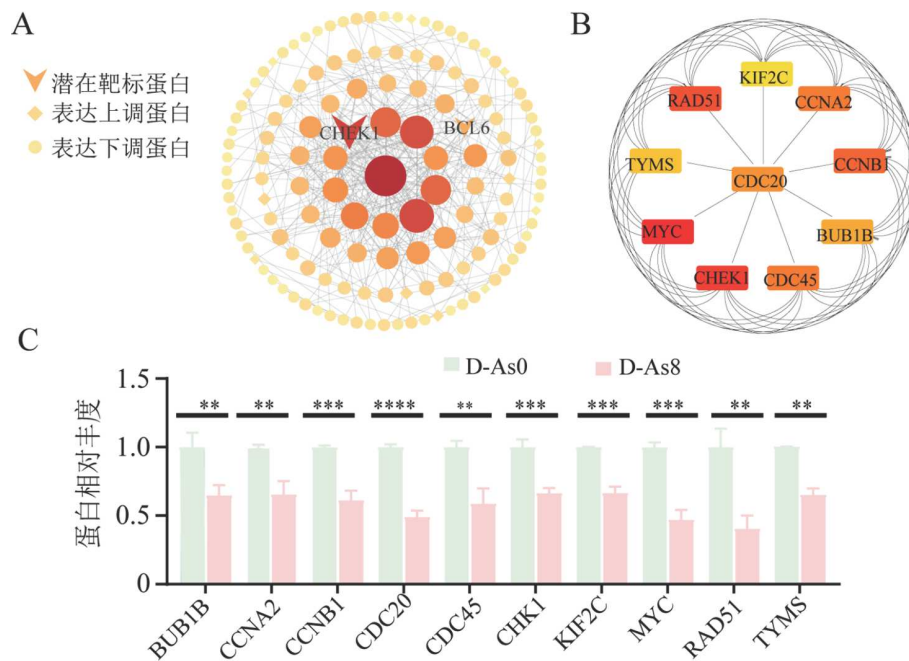
Description	FDR	geneID	Count	BgRatio	Category
核分裂的负调控(negative regulation of nuclear division)	4.2×10 ⁻⁵	BMP7/BUB1B/CCNB1/CDC20/CHK1/GEN1/PRKAR1A/RGCC/XRCC3	9	60/18866	BP
有丝分裂核分裂的负调控(negative regulation of mitotic nuclear division)	1.1×10 ⁻⁴	BMP7/BUB1B/CCNB1/CDC20/CHK1/GEN1/RGCC/XRCC3	8	52/18866	BP
细胞周期过程的负调控(negative regulation of cell cycle process)	3.8×10 ⁻⁴	BCL6/BMP7/BUB1B/CCNB1/CDC20/CDC25C/CHK1/EHMT1/GEN1/GTSE1/JADE1/PINX1/PRKAR1A/RAD51/RGCC/TFAP4/XRCC3	17	359/18866	BP
依赖DNA的DNA复制(DNA-dependent DNA replication)	4.9×10 ⁻⁴	ALYREF/BCL6/CDC45/GEN1/NUGGC/ORC6/POLD4/POLE/RAD51/RECQL5/TIPIN	11	151/18866	BP
组蛋白修饰(histone modification)	4.9×10 ⁻⁴	BCL6/BRD1/CCNA2/CCNB1/CHK1/CXXC1/EHMT1/JADE1/KDM2A/KDM4A/KDM4C/KPNA7/MSL1/MSL2/NSD2/PHF8/SATB1/USP22/USP3	19	468/18866	BP
核斑点(nuclear speck)	8.9×10 ⁻⁵	ALYREF/AP5Z1/ATP6V0A1/BNIP3L/BRD1/CDC25C/CXXC1/EAF2/HAUS6/JADE1/MBD1/MEF2C/MSL1/NUGGC/SRSF8/THOC3/TMEM179B/VPS72	18	401/19559	CC
染色体区域(chromosomal region)	3.4×10 ⁻³	ALYREF/BUB1B/CCNB1/CHAMP1/CHK1/KDM4C/KIF2C/NLRP2/PINX1/RAD51/SETX/SKA2/THOC3/XRCC3	14	350/19559	CC
复制叉(replication fork)	9.9×10 ⁻³	BCL6/CDC45/POLD4/RAD18/TIPIN/XRCC3	6	71/19559	CC
主轴(spindle)	1.1×10 ⁻²	BUB1B/CCNB1/CDC20/CHAMP1/HAUS6/HAUS7/KIF2C/KPNA7/PINX1/SKA2/TUBGCP5/TUBGCP6/XIAP	13	367/19559	CC
泛素连接酶复合物(ubiquitin ligase complex)	1.2×10 ⁻²	ANKRD39/BUB1B/CDC20/DCAF16/DCAF6/DDA1/MARCHF6/RAD18/RNF14/UBR3/ZER1	11	287/19559	CC
组蛋白去甲基酶活性(H3-K36特异性)[histone demethylase activity (H3-K36 specific)]	1.1×10 ⁻³	KDM2A/KDM4A/KDM4C/PHF8	4	10/18352	MF
微管负端结合(microtubule minus-end binding)	1.3×10 ⁻³	HAUS7/MACF1/TUBGCP5/TUBGCP6	4	12/18352	MF
泛素蛋白转移酶活性(ubiquitin-protein transferase activity)	1.2×10 ⁻²	ANKRD39/BIRC3/FBXO3/FBXO30/MARCHF6/MSL2/OBI1/RAD18/RNF14/TRAFA5/TRIM27/TRIM32/TRIM59/UBR3/XIAP	15	435/18352	MF
cAMP依赖性蛋白激酶调节因子活性(cAMP-dependent protein kinase regulator activity)	1.2×10 ⁻²	PKIG/PRKAR1A/PRKAR1B	3	10/18352	MF
硫酯酶结合(thioesterase binding)	1.2×10 ⁻²	HAUS7/TRAFA1/TRAFA5	3	11/18352	MF

表2 差异表达蛋白质KEGG富集分析前5项显著性信号通路

Description	FDR	geneID	Count	BgRatio
细胞周期(cell cycle)	7.9×10 ⁻⁵	BUB1B/CCNA2/CCNB1/CCND3/CDC20/CDC25C/CDC45/CHK1/MYC/ORC6	10	127/8223
人类T细胞白血病病毒1感染(human T-cell leukemia virus 1 infection)	5.7×10 ⁻³	BUB1B/CCNA2/CCND3/CDC20/CHK1/CREB1/HLA-B/MYC/NFATC3/XIAP	10	222/8223
癌症中的转录失调(transcriptional misregulation in cancer)	7.0×10 ⁻³	BCL6/BIRC3/CCNA2/ITGB7/MEF2C/MLLT3/MYC/NSD2/TRAFA1	9	193/8223
p53信号通路(p53 signaling pathway)	2.7×10 ⁻²	CCNB1/CCND3/CHK1/GTSE1/SESN2	5	73/8223
细胞衰老(cellular senescence)	2.7×10 ⁻²	CCNA2/CCNB1/CCND3/CHK1/HLA-B/MYC/NFATC3	7	156/8223

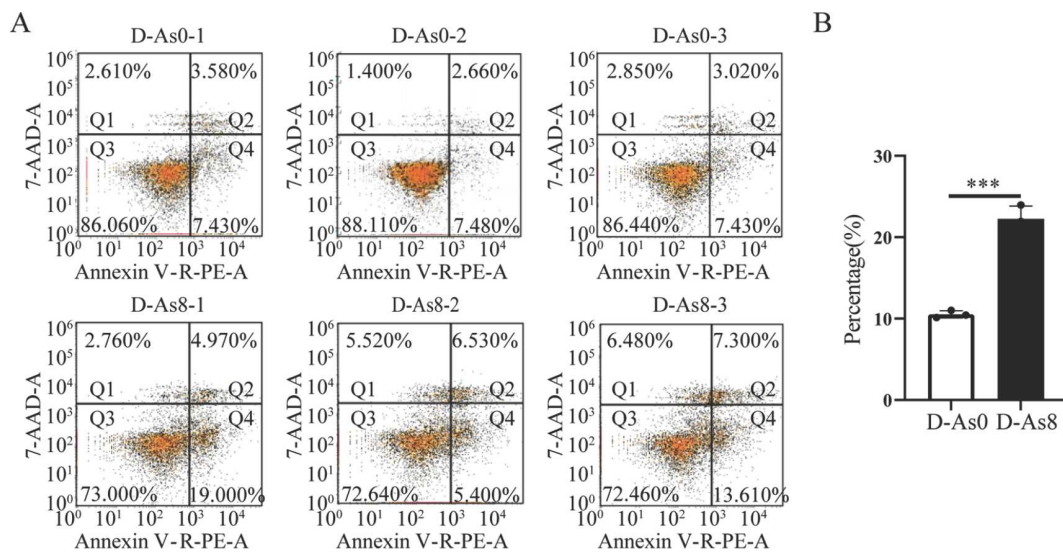
(8 μmol/L)中, 晚期凋亡细胞的比例显著增加, 从对照组(0 μmol/L)中的10.433%上升至15.173%。这

表明, 凋亡在砷药处理后Daudi细胞存活率下降中起到关键作用。



A: 差异表达蛋白质相互作用网络。蛋白质根据其在网络中的不同性质用不同形状标识, 上调蛋白质用菱形标识, 下调蛋白质用圆圈表示, 枢纽蛋白质用箭头表示, 颜色越深, 蛋白质互作分数越高; B: 10个枢纽蛋白质; C: 10个枢纽蛋白质的DIA定量结果。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图5 蛋白质-蛋白质相互作用网络分析



A: Annexin V-PE/7-AAD检测ATO(0、8 $\mu\text{mol/L}$)处理Daudi细胞24 h后的细胞凋亡情况; B: 分析细胞凋亡率。细胞凋亡率等于早期和晚期凋亡细胞的比例(Q1: 细胞碎片; Q2: 晚期凋亡; Q3: 活细胞; Q4: 早期凋亡)。纵坐标表示细胞凋亡率(Q2+Q4)

图6 ATO诱导Daudi细胞凋亡

3 讨论

近年来, 传统中药在提高肿瘤患者的生存率及生活质量方面的潜力逐渐受到医学界的关注。多种具有抗肿瘤作用的中草药已被报道, 这些中药

涵盖多种类型的活性成分, 包含多糖类、萜类、皂苷类、生物碱、黄酮类等^[9]。以砷为基础的矿物药物也展现出了显著的抗肿瘤效果, 其中主要成分为三氧化二砷的砷剂已被纳入急性早幼粒细胞白血病治疗的一线药物^[10]。然而, 砷药治疗

DLBCL的相关文献报道尚且有限, 且药物的确切作用靶点尚未明确。本研究旨在利用两种非标记定量质谱技术(DDA与DIA)探究砷药对人淋巴瘤细胞差异表达蛋白质组的影响。通过对两种技术的比较与应用, 我们全面解析了砷药通过调控Daudi细胞内的生物进程及关键生物通路对DLBCL的潜在影响。通过蛋白质组学分析的非标记定量技术, 系统性全面鉴定了细胞中受调控的蛋白质组, 本研究的组学结果为深入理解砷药抑制DLBCL的生物学机制提供了重要线索, 并为实现砷药就DLBCL的临床应用提供了理论参考。

质谱蛋白组学技术通过分析蛋白质的组成和功能, 为中药的应用提供了更为可靠的科学依据。非标记技术因其灵活性、准确性及更好的生物相容性的特性, 成为挖掘中药的药理作用、有效成分及其作用机制的关键技术^[11]。本研究从鉴定数量、一致性、数据重复性等方面对比了两种非标记技术的数据。结果表明, 与DDA相比, DIA鉴定的蛋白质数量更多, 显示了其更为强大的分析复杂生物样本的能力。鉴定一致性上, 两种技术有显著交集, 共同鉴定的蛋白质达3 563个, 表明DIA技术在增加蛋白质鉴定数量的同时, 仍能够维持与DDA的一致性。在DIA技术中, 两组数据中CV值低于20%的肽段占比分别高达89%和80%。相比之下, 在DDA技术中, 相应肽段的占比显著降低, 分别为32%和49%, 表明DIA技术在实验重复性和数据的稳定性方面具有显著优势。这些结果与袁劫人等^[8]和Collins等^[12]的研究互相吻合, 突显了DIA技术在深入分析复杂生物样本方面的巨大潜力, 为未来中药药效分子药理机制研究提供了新的工具和视角。

GO和KEGG富集分析的结果表明, 砷药处理后的DEPs在细胞周期过程中显著富集, 砷药可能通过抑制细胞周期蛋白的活性从而遏制肿瘤细胞的增殖, 如CCNB1通过在肿瘤中调节G₂/M期的细胞周期进程, 从而影响肿瘤细胞的增殖与发展^[13], 与Kong等^[14]、张雪莲等^[15]的报道一致。PPI网络分析鉴定了10种枢纽蛋白, 其中MYC、CHK1、CCNB1、CDC45、CDC20和BUB1B蛋白都直接参与了细胞周期通路的调控机制, 进一步强调了砷药对细胞周期调控的影响。例如, MYC能调节细

胞从G₁到S期的转换, 影响细胞周期蛋白依赖性激酶的活性, 进而控制细胞周期的进程; 在S期, MYC参与DNA复制和损伤修复, 确保遗传信息的完整性。同时, 它还影响细胞周期检查点的活性, 帮助细胞在受损或压力下暂停增殖^[16]。CHK1的激活触发细胞周期检查点, 导致S期晚期和G₂/M期的细胞周期停滞, 从而促进DNA修复并可能引起细胞死亡^[17]。未来的研究可以进一步构建和分析这些蛋白质之间的相互作用网络, 尝试识别可能的“关键控制节点”, 如调控DNA损伤反应、细胞存活、增殖、凋亡等多重生物学过程的蛋白质复合物。

流式细胞术实验表明, 砷药能够显著诱导Daudi细胞的凋亡, 可能通过调控细胞周期机制从而抑制肿瘤细胞的增殖。ATO可能通过氧化应激途径调节细胞周期蛋白的表达, 进而影响细胞增殖。具体而言, ATO通过激活活性氧(reactive oxygen species, ROS)的生成, 并降低还原型谷胱甘肽的水平, 直接干扰线粒体功能, 破坏线粒体膜电位, 最终导致细胞凋亡^[18,19]。此外, 蛋白质组学分析表明, 14-3-3 ϵ 质在ATO诱导的多发性骨髓瘤细胞凋亡过程中发挥关键作用。ATO还能够促进热休克蛋白的表达, 进一步增强其抗肿瘤作用^[20]。值得注意的是, 砷药还可以与突变型p53蛋白结合, 恢复其正常功能, 从而调节下游细胞周期蛋白的表达, 最终引发细胞周期阻滞及凋亡^[21]。综合这些分析结果, 我们认为, 砷药可能通过多条信号通路发挥作用, 这之前报道的砷药的多靶点特性相印证^[22]。其中, 通过激活活性氧诱导细胞凋亡被认为是肿瘤治疗中的关键作用途径之一。在未来的研究中, 可以探索砷药与抗氧化剂或ROS清除剂联合使用的效果, 进一步验证氧化应激反应是否为砷药抗肿瘤作用的核心机制。

本研究仍有一定的局限性。首先, 基于质谱的定性定量结果尚需通过细胞生物学方法进行下游验证, 未来研究应着重基于质谱-热蛋白组学对DIA结果进行进一步验证, 或综合化学生物学、分子生物学等方法对重点目标进行分析, 并深入探究砷药在DLBCL细胞中的潜在作用靶标。其次, 该研究仅限于在DLBCL细胞系的Daudi细胞株中开展, 鉴于DLBCL的细胞异质性, 为了进一步提高

砷药的临床应用效果,未来的研究应当侧重于通过多中心的临床实验、动物模型和临床样本,验证砷药在不同类型DLBCL中的疗效和安全性。尽管仍需更深入的研究支撑,当前的研究为砷药在DLBCL中的抗肿瘤作用研究提供了一定的蛋白质组学数据支撑,并对未来该领域的研究有一定的启示意义。

质谱蛋白质组技术在中药药理研究中的应用日益广泛,为中药现代化提供了新的视角和方法。本研究利用DDA与DIA技术对中药砷剂作用下的Daudi细胞进行了蛋白质组学分析。研究表明,DIA技术在数据覆盖、重复性和准确性方面优于DDA。砷药处理后,细胞周期通路显著富集,提示砷药可能通过调节多个细胞周期的关键蛋白,包括MYC、CHK1、CCNB1、CDC45、CDC20和BUB1B等,进而抑制肿瘤细胞的增殖。这一调控机制为DLBCL的治疗提供了重要启示,也为新靶点的开发奠定了基础。这些发现强调了砷药作为中药在癌症治疗中的潜在价值,不仅为DLBCL的治疗指明了新的方向,也为砷药在其他癌症治疗中的应用提供了有力的数据支持。

作者贡献声明:

梁雄顺:设计论文框架,进行实验,实验分析,起草论文,修订论文,论文最终版本修订;
陈德容:进行实验,绘制图谱;
刘小倩:承担两种非标技术开发,文献调研与整理;
徐万娜:整理与分析数据;
冯里茹:文献调研与整理,参与论文修订;
胡绪乔、洪文旭:提出概念,基本框架,提出研究方向,设计论文框架,设计研究思路,设计研究方案,审核论文,论文最终版本修订。

利益冲突声明: 本文不存在任何利益冲突。

参考文献

- [1] Andrea P, Gianluca G. Investigational drugs for the treatment of diffuse large B-cell lymphoma. *Expert Opin Investig Drugs*, 2021, 30(1): 25-38
- [2] Feng Y, Zhong M, Tang Y, et al. The role and underlying mechanism of exosomal CA1 in chemotherapy resistance in diffuse large B cell lymphoma. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 21: 452-463
- [3] El-Ghiaty MA, Alqahtani MA, El-Kadi AOS. Down-regulation of hepatic cytochromes P450 1A1 and 1A2 by arsenic trioxide (ATO) *in vivo* and *in vitro*: a role of heme oxygenase 1. *Chem Biol Interact*, 2022, 364: 110049
- [4] Hatzi K, Melnick A. Breaking bad in the germinal center: how deregulation of BCL6 contributes to lymphomagenesis. *Trends Mol Med*, 2014, 20(6): 343-352
- [5] Ranuncolo SM, Polo JM, Melnick A. BCL6 represses CHEK1 and suppresses DNA damage pathways in normal and malignant B-cells. *Blood Cells Molecules Dis*, 2008, 41(1): 95-99
- [6] Mani DR, Krug K, Zhang B, et al. Cancer proteogenomics: current impact and future prospects. *Nat Rev Cancer*, 2022, 22(5): 298-313
- [7] Demichev V, Messner CB, Vernardis SI, et al. DIA-NN: Neural networks and interference correction enable deep proteome coverage in high throughput. *Nat Methods*, 2020, 17(1): 41-44
- [8] 袁劫人, 柴伟国, 周历萍, 等. 两种非标记定量技术在筛选草莓雌蕊发育差异表达蛋白中的应用与比较. *农业生物技术学报*, 2020, 28(8): 1331-1342
- [9] 毕启瑞, 李运, 高敏, 等. 抗肿瘤中药研究进展. *中医肿瘤学杂志*, 2021, 3(4): 1-11
- [10] Wang ZY, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood*, 2008, 111(5): 2505-2515
- [11] Jiang Y, Sun A, Zhao Y, et al. Proteomics identifies new therapeutic targets of early-stage hepatocellular carcinoma. *Nature*, 2019, 567(7747): 257-261
- [12] Collins BC, Hunter CL, Liu Y, et al. Multi-laboratory assessment of reproducibility, qualitative and quantitative performance of SWATH-mass spectrometry. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 291-302
- [13] Wang FJ, Chen X, Yu XB, et al. Degradation of CCNB1 mediated by APC11 through UBA52 ubiquitination promotes cell cycle progression and proliferation of non-small cell lung cancer cells. *Am J Transl Res*, 2019, 11(11): 7166-7185
- [14] Kong Q, Deng H, Li C, et al. Sustained high expression of NRF2 and its target genes induces dysregulation of cellular proliferation and apoptosis is associated with arsenite-induced malignant transformation of human bronchial epithelial cells. *Sci Total Environ*, 2021, 756: 143840
- [15] 张雪莲, 杨如意, 张晓兰, 等. 砷类药物抗癌机制的研究现状. *临床医学进展*, 2022, 12(10): 9465-9469
- [16] Solvie D, Baluapuri A, Uhl L, et al. MYC multimers shield stalled replication forks from RNA polymerase. *Nature*, 2022, 612(7938): 148-155
- [17] Ronco C, Martin AR, Demange L, et al. ATM, ATR, CHK1, CHK2 and WEE1 inhibitors in cancer and cancer

- stem cells. [MedChemComm](#), 2017, 8(2): 295-319
- [18] He X, Yang K, Chen P, et al. Arsenic trioxide-based therapy in relapsed/refractory multiple myeloma patients: a meta-analysis and systematic review. [Onco Targets Ther](#), 2014, 7: 1593-1599
- [19] 文柏清, 康亚妮, 毛建华. 砷剂抗肿瘤作用机制的研究进展. [肿瘤研究与临床](#), 2021, 33(2): 146-149
- [20] Ge F, Lu XP, Zeng HL, et al. Proteomic and functional analyses reveal a dual molecular mechanism underlying arsenic-induced apoptosis in human multiple myeloma cells. [J Proteome Res](#), 2009, 8(6): 3006-3019
- [21] Hu X, Li H, Ip TKY, et al. Arsenic trioxide targets Hsp60, triggering degradation of p53 and survivin. [Chem Sci](#), 2021, 12(32): 10893-10900
- [22] Shen S, Li XF, Cullen WR, et al. Arsenic binding to proteins. [Chem Rev](#), 2013, 113(10): 7769-7792