

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.22.013

实验研究

消癌解毒方对肝癌模型大鼠血清蛋白差异表达的蛋白质组学研究

饶希午¹, 沈卫星², 谭佳妮², 徐长亮², 孙东东², 杨焱², 史丽云², 程海波^{1,2*}

(1. 南京中医药大学第一临床医学院, 江苏省南京市栖霞区仙林大道 138 号, 210023; 2. 江苏省中医药防治肿瘤协同创新中心)

摘要 **目的** 探讨消癌解毒方治疗肝癌的可能作用机制。 **方法** 40 只雄性 SD 大鼠随机分为正常组、模型组和消癌解毒方低剂量组、高剂量组各 10 只。模型组与消癌解毒方低剂量组、高剂量组大鼠自由饮用 0.01% 二乙基亚硝胺 (DEN) 溶液建立肝癌模型。消癌解毒方低剂量组、高剂量组大鼠于造模第 4 周给予剂量为 10.87、21.74 g/(kg·d) 的消癌解毒方溶液灌胃, 模型组给予生理盐水 2 ml/d 灌胃, 每周 6 天, 共 12 周。第 16 周取肝脏组织进行形态学观察, 检测肝脏重量并计算脏器系数; 取血清样本进行蛋白质串联质谱标签 (TMT) 肽段标记, 质谱鉴定, 应用 KOBAS 3.0 软件分析差异表达蛋白质的生物信息学。 **结果** 共鉴定到 1151 个蛋白点。模型组与正常组差异表达明显的蛋白共 234 个, 其中上调蛋白 151 个, 下调蛋白 83 个。消癌解毒方低剂量组与模型组差异表达明显的蛋白共 144 个, 包括上调蛋白 56 个, 下调蛋白 88 个。消癌解毒方高剂量组与模型组差异表达明显的蛋白共 182 个, 包括上调蛋白 94 个, 下调蛋白 88 个。消癌解毒方高剂量组差异表达蛋白主要参与了代谢、炎症反应、免疫调控、热休克、氧化应激、细胞周期与凋亡、细胞生长与分化、血管生成、癌相关、肝再生修复等。信号通路分析涉及谷胱甘肽代谢、过氧化物酶体增殖剂激活受体 (PPAR) 代谢等代谢相关通路, 细胞外基质受体相互作用通路、Toll 样受体 (TLRs) 通路、低氧诱导因子 1 (HIF-1) 通路、核因子 κ B (NF- κ B) 通路、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 通路、p53 通路等。 **结论** 消癌解毒方可对肝癌大鼠发挥多系统、多靶点参与的整体调控作用, 其中调控炎症转变可能是其抑制肿瘤发生发展的主要作用机制。

关键词 消癌解毒方; 肝癌; 蛋白质组学

原发性肝癌是我国高发的恶性肿瘤疾病, 其发病隐蔽, 病情进展较快, 预后差。国医大师周仲瑛教授集多年的中医临床辨治经验, 在恶性肿瘤的发病机理上提出了中医肿瘤病机理论——癌毒学说, 该学说认为肿瘤发病的关键在于癌毒的形成^[1]。消癌解毒方是周仲瑛教授治疗肿瘤的基本验方。前期研究显示, 消癌解毒方配合化疗治疗中晚期恶性肿瘤患者具有更高的有效率, 且毒副反应发生率明显降低^[2], 其机制可能是可对 TLRs/NF- κ B 信号转

导通路产生影响^[3], 促进移植瘤细胞的凋亡有关^[4]。本研究将消癌解毒方对二乙基亚硝胺 (DEN) 诱导的肝癌大鼠进行干预治疗, 拟利用基于蛋白质串联质谱标签 (TMT) 肽段标记与质谱检测的定量蛋白质组学技术检测肝癌大鼠的血清差异表达蛋白, 并进行生物信息学分析, 以期探索消癌解毒方作用机制的研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只, 体质量 190 ~ 210 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物使用许可证号为 SCXK (京) 2016-0011, 饲养室温 20 ~ 22℃, 相对湿度 40% ~ 60%, 明暗各 12 h。

基金项目: 国家重点研发计划课题 (2017YFC1700602); 国家自然科学基金 (81573910); 江苏省高等学校自然科学研究重大项目 (17KJA360002); 江苏省自然科学基金面上项目 (BK20141467); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD); 江苏省研究生科研创新计划 (KYCX18_1542)

* 通讯作者: nzyehb@163.com

1.2 药物

消癌解毒方组成: 白花蛇舌草 20 g, 半枝莲 20 g, 山慈菇 15 g, 莪术 10 g, 太子参 12 g, 麦冬 10 g, 由南京中医药大学药理教研室将中药煎制为含生药量 1.93、3.86 g/ml 的溶液, 4℃ 冰箱保存备用。

1.3 主要试剂及仪器

DEN (货号: N0756), 美国 Sigma 公司; 苯甲基磺酰氟 (PMSF, 货号: ST505), 碧云天生物技术有限公司; BCA 定量试剂盒 (货号: 23223)、TMT Mass Tagging Kits and Reagents 试剂盒 (货号: 90113CH)、液相色谱-质谱 (LC-MS) 级乙腈 (货号: TS-51101)、LC-MS 级甲酸 (货号: 85170)、LC-级超纯水 (货号: 51140), 均购自赛默飞世尔科技公司; 考马斯亮兰 R-250 (货号: C8430), 北京索莱宝科技有限公司; 氨水 (货号: A112077), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

普通台式离心机 (型号: TD4B), 上海卢湘仪离心机仪器有限公司; 恒温恒湿水浴振荡器 (型号: WHY-2), 常州金坛精达仪器制造有限公司; 分光光度计 (型号: 722), 上海光学仪器五厂有限公司; 血清分级 HPLC (型号: VF-S02-A-02)、液质联用 HPLC (型号: IQLAAAGABH-FAPUMZZZ)、Q Exactive 质谱仪 (型号: 0726042), 均购自赛默飞世尔科技公司; 电子天平 (型号: XB224), 上海精密仪器仪表有限公司; 电泳仪 (型号: GE Multiphor II)、电泳槽 (型号: SE250), 均购自通用电气公司; 涡旋混合器 (型号: VM-10), 大韩 WiseMix 公司; 连续光谱酶标仪 (型号: SpectraMax i3x), 美谷分子 Molecular Devices 公司。

1.4 模型制备、分组与用药

40 只大鼠采用随机数字表法分为正常组、模型组和消癌解毒方低剂量组、高剂量组各 10 只。适应性喂养 1 周后, 参考文献 [5-6] 的造模方法, 从第 2 周开始, 模型组和消癌解毒方低剂量组、高剂量组给予 0.01% DEN 溶液自由饮用 8 周后, 停药 2 周, 期间改为普通喂养, 造模第 11 周再继续给予 0.01% DEN 溶液喂养 6 周。造模期间正常组自由饮水。消癌解毒方低剂量组、高剂量组在造模 4 周后, 分别给予剂量为 10.87、21.74 g/(kg·d) 的消癌解毒方溶液灌胃, 每周 6 天; 模型组给予生理盐水 2 ml/d 灌胃, 每周 6 天, 各组连续给药 12 周。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 大鼠死亡情况 实验期间记录各组大鼠死亡情况及时间。

1.5.2 肝脏组织形态学及重量、脏器系数 各组大鼠给药 12 周后处死称重, 解剖取肝脏, 肉眼观察肝脏组织表面情况; 生理盐水冲洗后称重, 脏器系数为脏器的湿重与单位体重的比值。

1.5.3 血清差异蛋白表达 1) 血清蛋白质提取。大鼠眼眶采血后将血液样本放入离心管中, 37℃ 水浴锅中静置 15 min, 148000 r/min 离心 15 min 后取上清液。每组选取 4 个样本, 各取 50 μl 混匀, 备用。离心柱放入去除高丰度蛋白试剂盒填料 200 μl, 加 1 × PBS 600 μl, 摇匀后置于套管中。2000 r/min 离心 1 min 后弃滤出液, 重复 1 次。加入 1 × PBS 100 μl 及 50 μl 的血清样品, 充分混匀, 室温孵育 1 h。2000 r/min 离心 1 min 收集滤出液, 加入 1 × PBS 150 μl 清洗 2 次, 共得到 3 次滤出液, 进行合并。加入终浓度 8 mol/L 尿素、0.1 % SDS, 超滤离心浓缩得到低丰度蛋白样品。2) TMT 肽段标记。使用 BCA 定量试剂盒对各样本进行蛋白浓度定量, 取各样本 100 μg 蛋白, 加入尿素 (4 mol/L)、0.1 % SDS、TEAB (45 mmol/L)、TCEP (9.5 mmol/L); 于 55℃ 以 700 r/min 恒温振荡 1 h 后, 冷却至 25℃, 加入碘乙酰胺 (17 mmol/L); 于 25℃、700 r/min 恒温振荡 30 min, 660 μl 丙酮 (-20℃ 预冷), -20℃ 沉淀过夜。30000 r/min 离心 (4℃) 15 min 取沉淀, 加入经 -20℃ 预冷的 90% 丙酮 0.8 ml, 涡旋震荡洗涤沉淀。经 30000 r/min (4℃) 离心 10 min, 取沉淀, 室温风干。以 100 μl TEAB (100 mmol/L) 溶解沉淀, 加胰酶 (1 g/L) 2.5 μl, 37℃ 摇床震荡过夜。取 0.8 mg TMT 标记试剂, 加入 41 μl 乙腈涡旋震荡使之溶解充分。置过夜后的酶切样品 30000 r/min 离心 3 min, 去除沉淀, 然后加入 TMT 标记试剂 41 μl, 置于恒温振荡金属浴中, 700 r/min 反应 2 h (25℃)。TMT 试剂按如下形式对肽段进行标记: 正常组, TMT10-I26; 模型组, TMT10-I27C; 消癌解毒方低剂量组, TMT10-I28C; 消癌解毒方高剂量组, TMT10-I27N; 最后加入 5% 羟氨 8 μl, 25℃、700 r/min 反应 15 min 以终止标记反应。各等质量混合标记后的血清对应样品分别进行后续色谱液相分级。3) 液相色谱-质谱/质谱联用技术 (LC-MS/MS) 分析及蛋白鉴定。TMT 标记后的样品进行合并, 真空浓缩抽干, 运用 C18 色谱柱进行分级; 由缓冲液 A (2% 乙腈、

98% 水, pH = 10) 和缓冲液 B (90% 乙腈、10% 水, pH = 10) 构成流动相。将分级后的样品进样到质谱仪进行二级质谱序列测定, 生成质谱检测原始数据。质谱数据分析选择从 NCBI 数据库下载的大鼠蛋白数据库 (RefSeq) 进行参考。使用 Proteome Discoverer 软件 (Xcalibur Proteome Discoverer Version 1.3 User Guide, May 2011.) 对质谱检测原始数据进行搜库计算分析。胰酶特异性酶切, 可允许 2 个漏切位点, 将甲硫氨酸氧化设定为可变修饰参数, 将半胱氨酸碘乙酰化与 TMT 修饰设定为固定修饰参数, 母离子质量允差为 15 ppm, 子离子质量允差为 0.02 Da。对低于 1% 错误发现率 (FDR) 条件下的多肽进行蛋白质定性鉴定, 倍数变化和 P 值分别设为 1.5 和 0.05。挑选表达差异的特异性多肽进行蛋白质的相对定量分析。4) 生物信息学分析。统计质谱数据的分析结果, 并使用 KOBAS 3.0 软件对差异蛋白对应基因进行生物学作用分析 (GO 富集分析) 和通路分析 (Pathway 富集分析)。

2 结果

2.1 各组大鼠死亡情况

正常组大鼠无死亡。模型组大鼠在第 5 周死亡 1 只, 消癌解毒方低剂量组、高剂量组均在第 6 周各死亡 1 只。第 16 周模型组累计死亡 5 只, 消癌解毒方低剂量组累计死亡 5 只, 消癌解毒方高剂量组累计死亡 4 只。

2.2 各组大鼠肝组织形态学结果

正常组大鼠肝组织表面光滑。模型组大鼠肝脏表面粗糙, 出现较多的大小不一的灰白色或暗红色瘤块, 伴不同程度的出血坏死, 其中 4 只大鼠出现肿瘤转移。消癌解毒方高剂量组、低剂量组与模型组相比较, 肝组织表面弥散性肿瘤形态较小, 出血坏死病变较轻, 肉眼未见明显的肿瘤转移。

2.3 各组大鼠肝脏重量与脏器系数比较

表 1 示, 与正常组比较, 模型组大鼠肝脏重量和脏器系数明显增加 ($P < 0.01$)。与模型组比较,

表 1 各组大鼠肝脏重量和脏器系数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	肝脏重量 (g)	脏器系数 (g/100 g)
正常组	10	12.95 $\pm$ 0.78	2.53 $\pm$ 0.31
模型组	5	27.93 $\pm$ 10.25*	8.45 $\pm$ 2.71*
消癌解毒方低剂量组	5	23.24 $\pm$ 6.71 Δ	7.55 $\pm$ 2.49 Δ
消癌解毒方高剂量组	6	20.33 $\pm$ 8.14 $\Delta\Delta$	6.91 $\pm$ 2.54 $\Delta\Delta$

注: 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与消癌解毒方低剂量组比较, $\Delta\Delta P < 0.05$

消癌解毒方低剂量组、高剂量组大鼠肝脏重量和脏器系数均降低 ($P < 0.05$)。消癌解毒方高剂量组肝脏重量和脏器系数较消癌解毒方低剂量组降低 ($P < 0.05$)。

2.3 各组大鼠血清差异蛋白表达情况

四组样本共鉴定到 1151 个蛋白点。模型组与正常组相比, 差异表达明显的蛋白共 234 个, 其中上调蛋白 151 个, 下调蛋白 83 个。消癌解毒方低剂量组与模型组相比, 差异表达明显的蛋白共 144 个, 包括上调蛋白 56 个, 下调蛋白 88 个。消癌解毒方高剂量组与模型组相比, 差异表达明显的蛋白共 182 个, 包括上调蛋白 94 个, 下调蛋白 88 个。消癌解毒方高剂量组与消癌解毒方低剂量组相比, 差异表达明显的蛋白共 87 个, 包括上调蛋白 68 个, 下调蛋白 19 个。各组功能明确的差异表达蛋白详见表 2、表 3。

对所有差异表达蛋白对应基因于 PubMed 数据库逐一进行检索, 发现这些差异表达蛋白主要参与了代谢、炎症反应、免疫调控、热休克、氧化应激、细胞周期与凋亡、细胞生长与分化、血管生成、癌相关、肝再生修复等。其中与脂类代谢相关涉及 Apon 等蛋白; 葡萄糖代谢涉及 Khk 等蛋白; 能量代谢涉及 Ckm、Rgn、Abcc10 等蛋白; 谷胱甘肽代谢涉及 Gpx3 等蛋白; 免疫调控涉及 Lbp、C4bpa、Pigr 等蛋白; 炎症反应涉及 Pf4、Pla2g2a、Mug1、S100a8 等蛋白; 热休克涉及 Hsp90aa1 等蛋白; 氧化应激涉及 Sod1 等蛋白; 细胞周期与凋亡涉及 A2m、Timp3 等蛋白; 细胞生长分化涉及 Tgfb1、Msln 等蛋白; 血管生成涉及 Cyr61、Ang 等蛋白; 癌相关涉及 Mcam、Afp、Bhmt、Fap 等蛋白; 肝再生涉及 Dmbt1 等蛋白。

2.4 差异蛋白功能富集分析结果

使用基于 KEGG Ortholog 注释系统的 KOBAS 3.0 软件进行功能富集分析。以消癌解毒方高剂量组为例, 其中蛋白的表达较接近于正常组蛋白的生物学作用, 我们将这些蛋白做了 GO 分类, 此分类方法包括细胞组分、生物学过程、分子功能三部分。消癌解毒方高剂量组中的恢复蛋白在细胞组分分类中大部分位于细胞质; 在生物学过程分类中 10.6% 的蛋白属于细胞过程, 10.4% 的蛋白属于单有机体过程, 8.8% 的蛋白属于代谢过程; 在分子功能分类中居前 5 位的分别是连接功能 (46.6%)、催化活性 (28.4%)、酶调节活性 (6.17%)、分子功能调节 (6.17%)、转运体活性 (3.7%)。

表 2 模型组下调、消癌解毒方组上调且功能明确的差异表达蛋白

名称	描述	倍数变化		
		模型组/ 正常组	消癌解毒方低剂量组/ 模型组	消癌解毒方高剂量组/ 模型组
ApoA	apolipoprotein A precursor	0.452	1.993	3.895
Rgn	regucalcin	0.659	1.382	7.913
PF4	platelet factor 4 precursor	0.293	4.520	4.565
Pla2g2a	phospholipase A2, membrane associated precursor	0.250	3.055	4.020
Cyr61	protein CYR61 precursor	0.448	4.282	3.691
Thbs1	thrombospondin-1 precursor	0.364	2.899	2.746
Crp	C-reactive protein precursor	0.357	2.333	2.711
Timp3	metalloproteinase inhibitor 3 precursor	0.366	2.274	2.660
Cd63	CD63 antigen	0.700	2.345	2.530
Khk	ketohexokinase isoform X3	0.364	4.658	2.414
Ang	angiogenin precursor	0.369	1.806	2.375
Mug1	murinoglobulin-1 precursor	0.432	1.834	2.328
Pvrig	transmembrane protein PVRIG isoform X3	0.453	1.158	2.296
Abcc10	multidrug resistance-associated protein 7	0.978	3.201	2.294
Sod1	superoxide dismutase [Cu-Zn]	0.759	1.085	2.189
Tgfb1	transforming growth factor beta-1 precursor	0.485	2.239	2.186
Fap	prolyl endopeptidase FAP	0.592	1.677	2.098
Vtn	vitronectin precursor	0.409	2.187	2.032
Gpx3	glutathione peroxidase 3 precursor	0.371	1.903	2.007
Clip1	CAP-Gly domain-containing linker protein 1 isoform	0.387	2.422	2.592
Lrp6	low-density lipoprotein receptor-related protein 6	0.795	1.827	2.082
Angpt1	PREDICTED: angiopoietin-1 isoform X1	0.536	2.193	2.078

表 3 模型组上调、消癌解毒方组下调且功能明确的差异表达蛋白

名称	描述	倍数变化		
		模型组/ 正常组	消癌解毒方低剂量组/ 模型组	消癌解毒方高剂量组/ 模型组
Cd44	CD44 antigen isoform X7	2.236	0.605	0.498
Lamc1	laminin subunit gamma-1 precursor	2.025	0.548	0.494
Dmbt1	deleted in malignant brain tumors 1 protein isoform X1	2.182	0.514	0.468
Fn1	fibronectin isoform X3	3.332	0.488	0.460
Spp1	osteopontin precursor	2.439	0.555	0.460
Lbp	lipopolysaccharide-binding protein precursor	2.860	0.578	0.450
Hsp90aa1	heat shock protein HSP 90- α	3.014	0.410	0.448
Bhmt	betaine--homocysteine S-methyltransferase 1	9.182	0.224	0.445
PsmA6	proteasome subunit α type-6	2.214	0.519	0.440
Hspa4	heat shock 70 kDa protein 4	2.092	0.510	0.429
Msln	mesothelin precursor	2.691	0.495	0.425
Ckm	creatine kinase M-type	1.935	0.249	0.421
S100a8	protein S100-A8	2.367	0.572	0.420
Mcam	cell surface glycoprotein MUC18 isoform 2 precursor	2.503	0.510	0.400
C4bpa	C4b-binding protein α chain	1.743	0.695	0.400
Bbc3	bcl-2-binding component 3	1.369	0.641	0.396
Vwf	von Willebrand factor precursor	2.469	0.451	0.384
Pigr	polymeric immunoglobulin receptor precursor	8.393	0.475	0.335
A2m	α -2-macroglobulin precursor	9.940	0.216	0.142
Afp	α -fetoprotein precursor	22.908	0.198	0.059
Eno3	beta-enolase	1.759	0.290	0.462
Aldoa	fructose-bisphosphate aldolase A	1.527	0.436	0.447
Tfrc	transferrin receptor protein 1	1.556	0.590	0.485

对消癌解毒方高剂量组差异蛋白对应基因进行 Pathway 注释、富集、分析。其中富集度最高的信号通路分析涉及谷胱甘肽代谢、过氧化物酶体增殖剂激活受体 (PPAR) 代谢等代谢相关通路, 细胞外基质受体相互作用 (ECM-受体相互作用) 通路, Toll 样受体 (TLRs) 通路、低氧诱导因子 1 (HIF-1) 通路、核因子 κ B (NF- κ B) 通路、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 通路、p53 通路等。具体通路请见图 1。

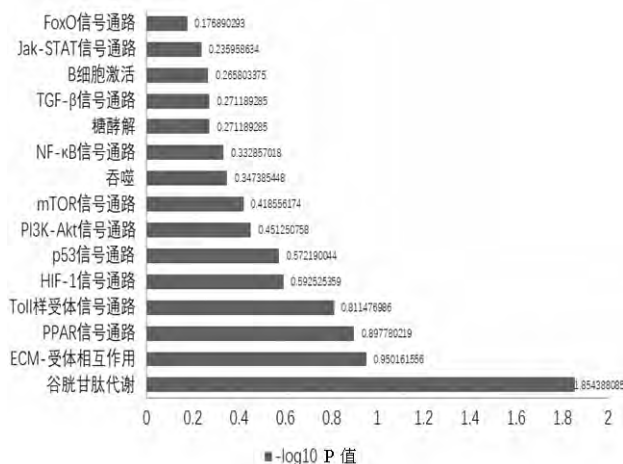


图 1 消癌解毒方高剂量组差异蛋白涉及的通路分析

3 讨论

消癌解毒方是在癌毒理论的指导下设计组成的抗癌验方。组方针对了毒、痰、虚、瘀四大病机要素而进行了配伍, 其中白花蛇舌草、半枝莲清热解毒, 山慈菇、莪术化痰祛瘀, 太子参、麦冬益气养阴以扶正。本研究结果显示, 与正常组相比, 模型组大鼠肝脏表面粗糙, 出现较多大小不一的灰白色或暗红色瘤块, 肝脏重量和脏器系数明显增加。而相比于模型组, 消癌解毒方低、高剂量组大鼠肝组织表面弥散性肿瘤形态较小, 出血坏死病变较轻, 肝脏重量和脏器系数均降低, 且消癌解毒方高剂量组可能具有更好的治疗效应。由此可以说明消癌解毒方具有可靠的抗癌疗效。

现代研究发现, 在肿瘤发生发展进程中, 炎症因子如白细胞介素 6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 等可激活炎症转变的相关传导通路, 这些信号通路激活后, 又可相互作用, 促进炎症因子的释放, 以此促进肿瘤的发展, 成为癌变发生的关键节点^[4]。转录因子 NF- κ B 在由炎症激活的所有信号传导途径中是最重要的组成部分, 参与了先天性免疫/炎症反应, NF- κ B 的激活可以上调许多基因的表达, 如信号转导和转录激活因子 3

(STAT3) 等, 促进细胞恶变^[5]。而 STAT3 可介导线粒体的有氧三羧酸循环功能下调, 促进了肿瘤的无氧能量代谢方式——糖酵解, 缺氧诱导因子 (HIF-1 α) 的上调亦介导了这个过程^[6-8]。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号传导通路可调控细胞的生长增殖、代谢, 免疫细胞的分化等^[9]。有研究表明, 缺氧激活 mTOR 信号传导途径, 增加 HIF-1 α 的表达和活性, 调控血管新生和缺氧反应引起的内皮细胞增殖^[10]。血管内皮生长因子 (VEGF) 是促进肿瘤血管新生的重要因子, 其表达受 HIF-1 α 的调节^[11]。HIF-1 α 活性受 mTORC1 调节, 且 mTOR 激酶复合物 mTORC1 和 mTORC2 的双重抑制可降低异种移植肿瘤的生长和 VEGF 的表达^[12]。通过 Pathway 富集分析发现, 本次实验研究结果的差异表达蛋白中均有涉及上述的多条通路。如 Lbp、Spp1 蛋白的下调与 TLRs/NF- κ B 通路相关; Eno3、Aldoa、Tfrc 的下调, Angpt1 的上调与 HIF-1 α 通路相关; Clip1、Lrp6 的上调与 mTOR 通路相关; 同时还有 Thbs1 的上调, Bbc3 的下调提示与抑癌基因 P53 的调控相关; Cd44、Spp1、Vwf、Fn1、Lamc1 的下调, Thbs1、Vtn 的上调, 与细胞外基质受体相互作用相关等等。

综上所述, 消癌解毒方作用于肝癌大鼠治疗效应明确, 并发现高剂量的消癌解毒方具有更好的治疗效应, 可实现多通路、多靶点参与的整体调控作用。本课题组后期将继续围绕实验结果进行深入的验证与探索。

参考文献

- [1] 程海波. 癌毒病机理论探讨 [J]. 中医杂志, 2014, 55 (20): 1711-1715.
- [2] 李栋, 程海波, 周红光, 等. “癌毒”学说内涵探讨及“消癌解毒方”抗癌生物学机制研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38 (12): 2360-2361.
- [3] 李栋, 吴勉华. 消癌解毒方加入 LPS 及 CD284 对人肝癌细胞 SMMC-7721 的 TLRs/NF- κ B 信号转导通路等关键基因表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31 (11): 4693-4698.
- [4] 陈海彬, 沈波, 李黎, 等. 消癌解毒方抑制肝癌 H22 移植瘤的生长及其机制 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2011, 18 (1): 28-32.
- [5] TOLBA R, KRAUS T, LIEDTKE C, et al. Diethylnitrosamine (DEN)-induced carcinogenic liver injury in mice [J]. Lab Anim, 2015, 49 (1 Suppl): 59-69.
- [6] SHOU Q, CHEN F, CAI Y, et al. Inhibition of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in mice by a

- high dietary protein intake [1]. *Nutr Cancer*, 2015, 67(7): 1151-1158.
- [7] PIKARSKY E, PORAT RM, STEIN I, et al. NF- κ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer [J]. *Nature*, 2004, 431(7007): 461-466.
- [8] KARIN M. Nuclear factor- κ B in cancer development and progression [J]. *Nature*, 2006, 441(7092): 431-436.
- [9] MACCIO A, MADEDDU C. The role of interleukin-6 in the evolution of ovarian cancer: clinical and prognostic implications: a review [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2013, 91(12): 1355-1368.
- [10] GURI Y, NORDMANN TM, ROSZIK J. mTOR at the transmitting and receiving ends in tumor immunity [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 578. doi: 10.3389/fimmu.2018.00578.
- [11] TONG RT, BOUCHER Y, KOZIN SV, et al. Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(11): 3731-3736.
- [12] ZHU H, ZHANG S. Hypoxia inducible factor-1 α /vascular endothelial growth factor signaling activation correlates with response to radiotherapy and its inhibition reduces hypoxia-induced angiogenesis in lung cancer [J]. *J Cell Biochem*, 2018; 15. doi: 10.1002/jcb.27120.
- [13] FALCON BL, BARR S, GOKHALE PC, et al. Reduced VEGF production, angiogenesis, and vascular regrowth contribute to the antitumor properties of dual mTORC1/mTORC2 inhibitors [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(5): 1573-1583.

Proteomic Analysis Study on Effects of *Xiaoai Jiedu Decoction* (消癌解毒方) on Expressions of Serum Differential Proteins in Liver Cancer Model Rats

RAO Xiwu¹, SHEN Weixing², TAN Jiani², XU Changliang², SUN Dongdong², YANG Ye², SHI Liyun², CHENG Haibo^{1,2}

(1. The First Clinical Medical College of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023; 2. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Traditional Chinese Medicine Prevention and Treatment of Tumor)

ABSTRACT Objective To observe the effects and probable mechanism of *Xiaoai Jiedu Decoction* (消癌解毒方) in treating liver cancer rat. **Methods** A total of 40 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal group, model group, *Xiaoai Jiedu Decoction* low and high dose groups, with 10 rats in each group. The rats in the low and high *Xiaoai Jiedu Decoction* dose groups and model group were treated with 0.01% diethylnitrosamine (DEN) solution for free drinking to establish liver cancer models. The *Xiaoai Jiedu Decoction* low dose group and high dose group respectively received 10.87 g/(kg·d) and 21.74 g/(kg·d) *Xiaoai Jiedu Decoction* solution for gavage administration at the 4th week while the model group received 2 ml/d normal saline, 6 days a week for 12 weeks. Liver tissues of all rats were taken for morphological observation at the end of the 16th week. The liver weight was measured, and the organ coefficient was calculated. The samples were labeled with protein tandem mass tag (TMT) peptide segment, identified by the mass spectrometry, and the bioinformatics was analyzed by KOBAS 3.0 software.

Results A total of 1151 protein spots were identified. Compared with the normal group, there were 234 proteins which differentially expressed in the model group, including 151 up-regulated proteins and 83 down-regulated proteins. Compared with the model group, there were 144 differentially expressed proteins in the *Xiaoai Jiedu Decoction* low-dose group, including 56 up-regulated proteins and 88 down-regulated proteins. Compared with the model group, there were 182 differentially expressed proteins in the *Xiaoai Jiedu Decoction* high-dose group, including 94 up-regulated proteins and 88 down-regulated proteins. These differentially expressed proteins in *Xiaoai Jiedu Decoction* high-dose group mainly involved in metabolism, inflammation, immune regulation, heat shock, oxidative stress, cell cycle and apoptosis, cell growth and differentiation, angiogenesis, cancer-related and liver regeneration repair. Signaling pathway analysis involved metabolic pathways, such as glutathione metabolism, peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) metabolism, extracellular matrix receptor interaction (ECM-receptor-interaction) pathway, Toll-like receptors (TLRs) pathway, hypoxia-inducible factors-1 (HIF-1) pathway, nuclear factor- κ B (NF- κ B), mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway, and p53 pathway. **Conclusion** *Xiaoai Jiedu Decoction* can play a multi-system, multi-target participation in the overall regulation of liver cancer model rats, regulation to inflammation-cancer transmission may be the main mechanism of its inhibition of tumorigenesis and development.

Keywords *Xiaoai Jiedu Decoction*; liver cancer; proteomics

(收稿日期: 2018-05-10; 修回日期: 2018-07-23)

编辑: 邓媛