

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.11.005

· 基础研究 ·

磷酸化蛋白质组学技术分析抗菌肽 mercedin 抑制人肺腺癌 A549 细胞增殖的作用机制

贾琴琴, 杨婷婷, 王雅蓉, 张倩楠, 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:**以磷酸化蛋白质组学技术分析抗菌肽 mercedin 处理人肺腺癌 A549 细胞后细胞内磷酸化蛋白质表达的差异, 探究 mercedin 对肺腺癌 A549 细胞蛋白质活性、功能的影响以及涉及的信号通路。**方法:**采用 9 $\mu\text{mol/L}$ mercedin 处理肺腺癌 A549 细胞 6 h, 收集并提取总蛋白, SDS-PAGE 检验全蛋白提取效果, 加入胰酶来对蛋白质进行酶解。酶解所获肽段用 TMT 标记、采用 HPLC 分级分离、经 IMAC 磷酸化修饰富集以及液相色谱-质谱联用(HPLC-MS/MS)分离肽段。使用 localization probability>0.75 的标准对鉴定数据进行过滤, 利用 GO (Gene Ontology) 数据库、KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 数据库和 STRING 数据库对磷酸化蛋白质组学数据进行分析。**结果:**SDS-PAGE 结果显示, 经 9 $\mu\text{mol/L}$ mercedin 处理后的 A549 细胞全蛋白分离效果清晰、无明显降解, 且实验组与对照组条带差异明显; 质谱共鉴定出位于 3 089 个蛋白上的 10 320 个磷酸化修饰位点, 以 $|\text{Fold change}| > 1.5$ 且 $P < 0.05$ 为阈值从中筛选出差异明显的 753 个蛋白质及其 1 172 个磷酸化位点。蛋白质功能富集显示, 磷酸化水平显著变化的蛋白质功能主要集中在蛋白质分子结合、代谢活性、分子功能调节、细胞进程、生物功能调节等方面; 整合通路生物信息学分析结果显示, 差异蛋白与 Ras、PI3K/AKT、mTOR、AMPK 等多条通路相关联; 经过 COG 数据库筛选, 发现差异性磷酸化蛋白主要集中在细胞信号转导、RNA 转录、翻译后加工和修饰、核糖体合成蛋白质、细胞骨架蛋白形成及细胞内的物质转运和分泌、囊泡运输等多个方面; 蛋白质相互作用层面分析结果显示, mercedin 处理后的 A549 细胞中形成以 MAPK1、RPL23A、SRSF3H、NCBP1 等为关键蛋白的相互作用网, 其中 ATG2B、ULK1 等蛋白显著上调, MAPK1、AKT1 等蛋白显著下调。**结论:**磷酸化蛋白质组学分析结果显示, 抗菌肽 mercedin 可能通过 MAPK、RPL23A、SRSF3H 和 AKT1 等关键蛋白质在多方面生物功能和多条信号通路中发挥作用, 促进肺腺癌 A549 细胞凋亡和自噬, 从而抑制细胞的增殖。

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

[中图分类号] R734.2; R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)11-1229-10

Phosphoproteomics analysis of the mechanism of antimicrobial peptide mercedin inhibiting the proliferation of lung adenocarcinoma A549 cells

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

[Abstract] **Objective:** The phosphoproteomics technique was used to analyze the differential expression of phosphorylated proteins in the human lung adenocarcinoma A549 cells treated with antimicrobial peptide mercedin, and to explore the effect of mercedin on the protein activity and function of lung adenocarcinoma A549 cells and the signal pathway involved. **Methods:** A549 cells were treated with 9 $\mu\text{mol/L}$ mercedin for 6 h. The total protein was collected and extracted, and SDS-PAGE experiment was used to test the total protein extraction efficiency. Pancreatin was added to digest the protein. The peptides obtained by enzymatic hydrolysis were labeled with TMT, fractionated by HPLC, enriching phosphorylated modified peptides by IMAC, and separate peptides by HPLC-MS/MS (liquid chromatography-mass spectrometry) technology. The identified data were screened using the standard of localization probability>0.75, and the phosphoproteomics data were analyzed using GO (Gene Ontology) database, KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) database and STRING database. **Results:** SDS-PAGE results showed that the total protein separation of A549 cells treated with 9 $\mu\text{mol/L}$ mercedin was clear and no obvious degradation, and there was significant difference in protein bands between the experimental group and the control group. A total of 10 320 phosphorylation modification sites on 3 089 proteins were identified by mass spectrometry, of which 753 proteins and 1 172 phosphorylation sites were screened out with $|\text{Fold Change}| > 1.5$ and $P < 0.05$ as the threshold. Protein function enrichment showed that functions of proteins with significant changes in phosphorylation level mainly focused on molecular binding, metabolic activity, molecular

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

[作者简介] 贾琴琴(1989-), 女, 硕士生, 技师, 主要从事抗菌肽作用于肿瘤的机制研究, E-mail:865963166@qq.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:xuqing-wang1979@163.com

function regulation, cell process, biological function and other aspects. Bioinformatics results of integrated pathway showed that differentially expressed proteins were associated with Ras, PI3K/AKT, mTor, AMPK etc. COG database screening showed that the differentially expressed phosphorylated proteins were concentrated in cell signal transduction, processing and modification of RNA transcription and translation, protein synthesis of ribosome, formation of cytoskeleton proteins, intracellular substance transportation, secretion and vesicle transportation etc. At the protein interaction level, after mercedin treatment, an interaction network with MAPK1, RPL23A, SRSF3H, NCBP1, etc. as key proteins was formed in A549 cells; proteins such as ATG2B and ULK1 etc. were significantly up-regulated, while proteins such as MAPK1 and AKT1 etc. were significantly down-regulated. **Conclusion:** Phosphoproteomic analysis shows that the antimicrobial peptide mercedin may play a role in multiple biological functions and multiple signaling pathways through key proteins such as MAPK1, RPL23A, SRSF3H and AKT1, and promote the apoptosis and autophagy of lung adenocarcinoma A549 cells, thereby inhibiting cell proliferation.

[Key words] lung adenocarcinoma; antimicrobial peptide; mercedin; A549 cell; phosphoproteomic

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(11): 1229-1238. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.11.005]

据《2018 全球癌症报告》^[1]显示, 2018 年将新增 1 810 万例癌症病例和 960 万例癌症死亡病例, 其中肺癌的发病率(11.6%)和病死率(18.4%)均居首位。虽然目前手术、放疗、化疗等综合疗法已被广泛应用, 但是肺癌患者 5 年生存率仍较低。因此迫切需要研发抗癌活性高、毒副作用小的药物。抗菌肽(antimicrobial peptide, AMP)是机体天然免疫系统抵御病原微生物侵害的重要效应肽。从真菌、细菌、高等植物、哺乳动物^[2-3]等生物体内均可分离得到 AMP, 因其具有广谱抗菌特性且不易引起耐药的优势, 受到越来越多学者的关注和研究。LL-37 是目前唯一被发现的人体抗菌肽, 表达于机体的多个部位, 如睾丸、皮肤^[4]、鼻黏膜^[5]、唾液^[6]和胃肠道等, 可由单核细胞^[7]、中性粒细胞^[8-9]等多种细胞表达。LL-37 是一种多功能肽, 具有抗菌、抑癌、参与适应性免疫调节等作用^[10-12], 其 α -螺旋结构结合细胞膜脂质可能会在细胞膜上形成孔道或诱导细胞内分子泄漏^[13], 增加细胞膜的渗透性^[14], 从而导致细胞死亡^[15], 且可抑制细菌胞膜的形成^[16-17]。研究^[18]发现, 使用 LL-37 处理结肠癌细胞可引起癌细胞凋亡; 同时, LL-37 在胃癌^[19]、急性髓细胞白血病^[20]和淋巴细胞白血病^[21]中都发挥抑癌作用。Mercedin(又名 17BIPHE2)是抗菌肽 LL-37 的衍生肽, 氨基酸序列为 GBKRLVQRLKDBLRNLV, 相对分子质量为 2 561.866^[22]; 其溶血活性更低, 对人体毒性更小, 在免疫调节、抑制各种病菌方面均优于亲本 LL-37^[23]。本课题组前期研究发现 mercedin 可促进肺腺癌 A549 细胞凋亡^[24-26], 抑制金黄色葡萄球菌以及铜绿假单胞菌生物被膜的形成^[27-28]。本研究是以抗菌肽 mercedin 处理人肺腺癌 A549 细胞后进行磷酸化蛋白质组分析, 从蛋白质功能、信号通路和蛋白质相互作用等 3 个层面探究抗菌肽 mercedin 对 A549 细胞的抑制作用的机制。

1 材料与与方法

1.1 材料与试剂

人肺腺癌细胞株 A549 由宁夏医科大学总医院干细胞研究所提供。抗菌肽 mercedin 由吉尔生化有限公司

通过固相化学法合成, 纯度大于 95%, 干粉状态储存于 -20 °C, 使用时用 ddH₂O 溶解。蛋白酶抑制剂购自德国 Calbiochem 公司, 胰酶购自美国 Promega 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, 考马斯亮蓝染液、碘代乙酰胺、尿素、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, 凝胶成像仪购自美国伯乐公司。

1.2 Mercedin 处理 A549 细胞实验

A549 细胞贴壁生长, 在含有 10% 胎牛血清的 RPMI(含有 1×10^5 $\mu\text{mol/L}$ 青、链霉素)培养基于 37 °C、5% CO₂ 的恒温细胞培养箱中, 每天换液 1 次, 待细胞汇合度达 80% 时进行实验。根据 CCK-8 法预实验测得本批次 mercedin 抑制 A549 细胞的 IC₅₀ 值, 最终确定 mercedin 处理细胞的浓度为 9 $\mu\text{mol/L}$ 。本实验分为抗菌肽处理组(实验组)和未处理组(对照组), 处理组细胞培养液中加入 9 $\mu\text{mol/L}$ 抗菌肽, 对照组只加正常完全培养基培养, 孵育 6 h 后收集细胞用于后续实验。实验独立重复 3 次。

1.3 A549 细胞裂解和蛋白质提取

将实验组和对照组细胞用预冷的 PBS 洗 2 遍, 弃去上清液, 随后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)消化 1 min, 将细胞悬浮液转移至新的预冷离心管中, 置于振荡器剧烈振荡 30 s, 放置冰上 5 min, 如此重复 5 次; 最后 12 000 \times g、4 °C 离心 30 min, 取上清即为全蛋白提取物, 置于 -80 °C 保存。利用 BCA 法进行蛋白质定量分析。

1.4 SDS-PAGE 检验 A549 细胞全蛋白提取效果

全蛋白提取物分为对照(Mock)组和实验(Drug)组, 各组均以每孔 30 μg 蛋白上样, 用 10% SDS-PAGE

分离蛋白,浓缩胶 75 V、30 min,随后分离胶 120 V、50 min,观察到溴酚蓝泳动至胶底部时取出凝胶置于一个大的玻璃容器中,加入提早配置好的考马斯亮蓝染液,于摇床上摇动 2 h 后回收染料,加入适量的脱色液置摇床上孵育 8~10 h,弃去脱色液,用凝胶成像仪曝光显影。实验独立重复 3 次。

1.5 全蛋白提取物胰酶消化

于全蛋白提取溶液中加入二硫苏糖醇使其终浓度为 5 mmol/L,56 °C 还原 30 min。随后加入碘代乙酰胺使其终浓度为 11 mmol/L,避光室温孵育 15 min。最后将样品的尿素浓度稀释至低于 2 mol/L。以胰酶:蛋白=1:50 的质量比例加入胰酶,37 °C 酶解过夜,再以 1:100 的质量比例加入胰酶,继续酶解 4 h。

1.6 TMT 标记酶解肽段

胰酶酶解的肽段用 Strata X C18 (购自 Phenomenex 公司)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。操作方法: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。

1.7 HPLC 分级分离肽段

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 μ m 粒径、4.6 mm 内径、250 mm 长度)。将肽段的分级梯度设置为 8%~32% 乙腈、pH=9,1 h 时间分离 60 个组分。随后将肽段合并为 4 个组分,合并后的组分经真空冷冻干燥后进行后续操作。

1.8 特殊亲和层析富集磷酸化修饰肽段

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固定化金属螯合亲和层析 (immobilized metal-chelating affinity chromatography, 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(含 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,收集洗脱液并真空冷冻抽干。抽干后使用 C18 ZipTips 试剂盒进行除盐。

1.9 液相色谱质谱联用(HPLC-MS/MS)分离肽段

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 1 000 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:0-40 min,4%~22%B; 41-52 min, 22%~35%B; 53-56 min, 35%~80%B; 57-60 min, 80%B,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 质谱仪进行分析。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 个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。

1.10 磷酸化蛋白质的鉴定及其生物信息学分析

使用数据库 Maxquant(v1.5.2.8)检索质谱原始数据。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假阳性错误率(false positive rate, FDR),用于消除鉴定结果中污染蛋白的影响。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 20×10^{-6} 和 5×10^{-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,可变修饰为甲硫氨酸的氧化、蛋白 N 端的乙酰化和脱酰胺化以及丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸的磷酸化。定量方法设置为 TMT-6plex,蛋白鉴定、PSM 鉴定的 FDR 都设置为 1%。差异磷酸化蛋白质通过建立火山图以可视化和识别蛋白差异。为了表征这些蛋白质,进一步通过 GO 功能、KEGG 途径和蛋白质结构域的功能富集,分析其细胞生物学过程、细胞成分和分子生物学功能。利用 GO 进行功能注释,以 COG/KOG 数据库进行功能分类统计,并使用 Cytoscape 构建具有相关蛋白质的网络。

1.11 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件,所有差异蛋白定量数据均进行 3 次重复实验,正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间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。

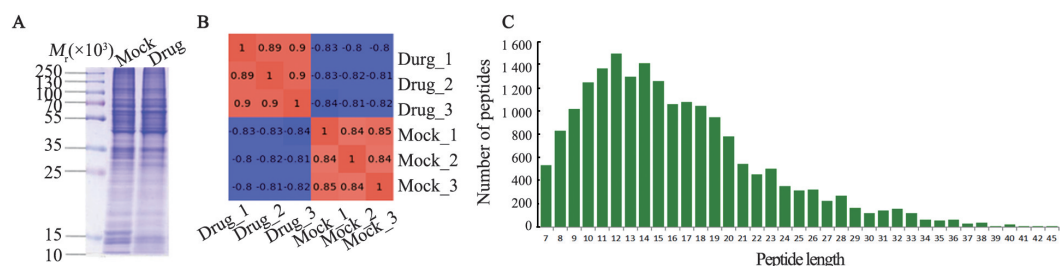
2 结果

2.1 A549 细胞全蛋白磷酸化蛋白组质控合格

利用 SDS-PAGE 检验细胞全蛋白提取效果,结果显示蛋白分离效果清晰、无明显降解,且实验组与对照组

条带差异明显(图1A);对实验组与对照组各个样品中磷酸化肽段丰度行皮尔森相关性(Pearson's correlation coefficient)分析,评估磷酸化蛋白组学实验样品平行性,

发现实验组与对照组各自组内相关性高,重复性较好(图1B);肽段长度分布的结果(图1C)显示酶切正常。



A: SDS-PAGE map of differentially expressed phosphorylated proteins in control group (Mock) and antimicrobial peptide mericidin treatment group (Drug); B: Pearson's correlation coefficient was evaluated for mass spectrum data (as shown in the analysis results, this coefficient is a value measuring the degree of linear correlation between two sets of data: the closer Pearson's coefficient to -1 or 1 indicated positive correlation, and the closer to 0 indicated irrelevant correlation); C: Peptide length distribution (the number of small pieces of peptide accounted for the most)

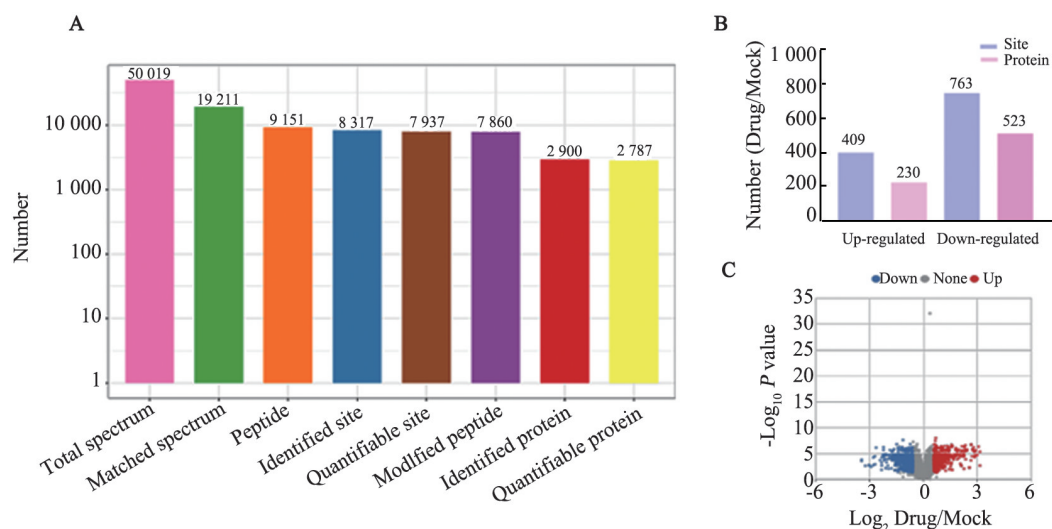
图1 磷酸化蛋白质样本本质控评估

Fig.1 Quality evaluation of phosphorylated protein samples

2.2 Mericidin 对 A549 细胞中蛋白磷酸化修饰的影响

TMT 标记磷酸化蛋白质组学分析总共鉴定到位于 3 089 个蛋白质上的 10 320 个磷酸化修饰位点,其中 9 094 个位点包含定量信息。为确保结果的高度可信,使用定位概率(localization probability)>0.75 的标准对鉴定数据进行了过滤,最终确定了定位于

2 900 个蛋白上的 8 317 个磷酸化修饰位点,其中 2 787 个蛋白的 7 937 个位点包含定量信息(图 2A)。按|Fold Change|>1.5、P<0.05 筛选出 230 个上调磷酸化蛋白质、523 个下调磷酸化蛋白质,分别对应 409 和 763 个磷酸化位点(图 2B),对差异蛋白进行火山图分析(图 1C)显示修饰蛋白差异表达明显。



A:Statistical diagram of results of mass spectrum detection;

B: Phosphorylated proteins and sites changed of the antibacterial peptide mericidin treated group (Drug);

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

图2 磷酸化蛋白质组学分析结果

Fig.2 Results of phospho-proteomics analysis

2.3 磷酸化蛋白质基序分析

为了解鉴定到的修饰蛋白以及蛋白的功能、特征等,首先采用蛋白质基序分析对样品中所有磷酸

化修饰位点前后氨基酸序列的规律进行统计,计算出发生磷酸化修饰位点区域内氨基酸序列的规律趋势。此类分析可发现修饰的位点序列特征,从而推

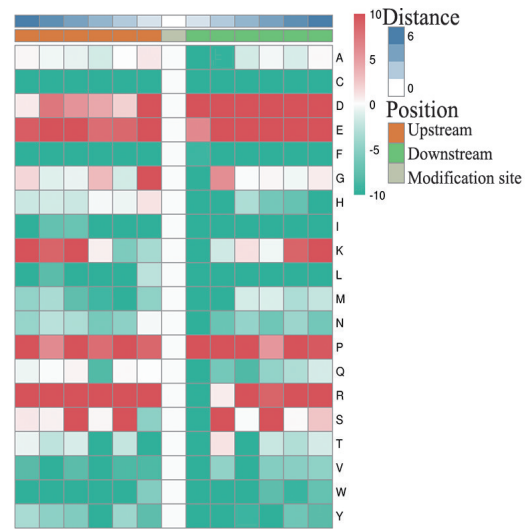
测或者确定与修饰相关的酶。分析结果(图3)显示, 氨基酸在修饰位点附近聚集明显。

进一步通过蛋白注释对差异修饰位点对应蛋白在 GO 二级注释中的生物进程、细胞组成和分子功能的分布进行了统计, 从不同角度阐释蛋白的生物学作用。结果(图4A)显示, 磷酸化蛋白主要分布于细胞进程、生物学调节, 细胞及细胞器组成, 分子结合、催化活性等多个方面; 差异修饰蛋白的亚细胞结构预测和分类统计结果(图4B)显示, 差异性蛋白定位主要集中在细胞核和细胞质。

2.4 差异磷酸化蛋白质功能的富集

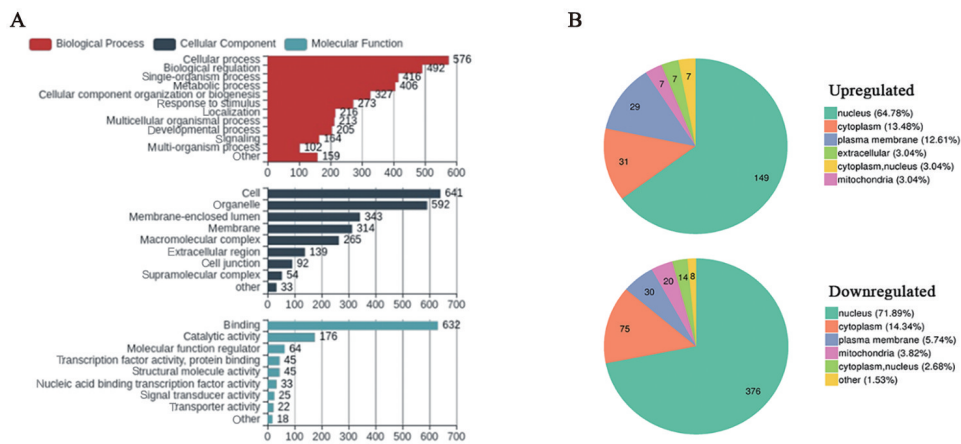
差异性蛋白的功能富集主要通过 GO 分类、KEGG 通路和蛋白结构域 (domain) 三个层面的富集分析进行, 目的是检测差异修饰是否在某些功能类型有显著性的富集趋势。对于富集检验(此处运用 Fisher's exact test 即费希尔精确检验)得到的 P 值通过气泡图方式展现了差异修饰蛋白显著富集 ($P < 0.05$) 的功能分类和通路。差异磷酸化修饰位点对应蛋白在 GO 分类功能富集从分子功能(图5A)、生物学进程(图5B)、细胞组成(图5C)三个层面进行分析, 可得知差异显著性蛋白参与细胞信号转导、核酸的降解转运以及细胞能量代谢、蛋白质的合成、细胞骨架的形成等; 差异磷酸化修饰位点对应蛋白在蛋白结构域的分类(图5D)主要涉及 RNA 识别基序域、蛋白质合成后修饰等。另外, KEGG 是连接已知分子

间相互作用的信息网络, 如代谢通路、复合物、生化反应。KEGG 途径主要包括: 代谢、遗传信息处理、环境信息处理、细胞过程、人类疾病、药物开发等。本研究中通路富集部分展示(图6)有 Ras、PI3K/AKT、mTor、AMPK 等通路。



The red indicates that this amino acid is significantly enriched near the modification site, and the green indicates that this amino acid is significantly reduced near the modification site

图3 所有鉴定到的磷酸化修饰位点蛋白基序富集热图
Fig.3 Motif enrichment heat map of upstream and downstream amino acids at all identified phosphorylation sites



A: The distribution of biological process, cell composition and molecular function in the GO secondary annotation of length distribution; B: Prediction and classification statistics of subcellular structure of differentially modified proteins

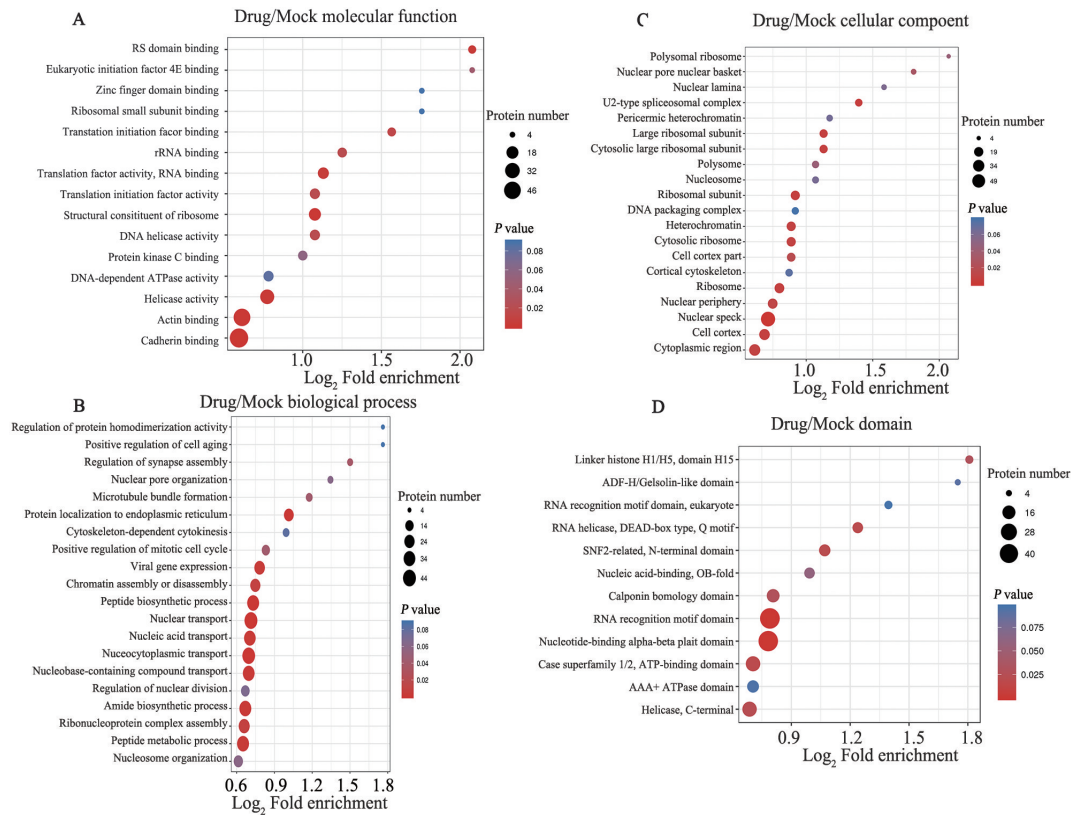
图4 差异磷酸化修饰位点对应蛋白在 GO 二级分类中统计分布图

Fig.4 Statistical distribution of proteins corresponding to the differential phosphorylation sites in the GO secondary classification

2.5 差异磷酸化蛋白质的功能分类

COG (clusters of orthologous groups of proteins) 是 NCBI 的数据库。COG 的中文释义即“同源蛋白”, 本研究将所得数据与数据库比对分析, 进行差异修饰蛋白 COG/KOG 功能分类统计, 结果(图6)发现, 差

异性磷酸化蛋白主要集中在细胞信号转导, RNA 转录、翻译后加工、蛋白合成后结构修饰、核糖体、细胞骨架蛋白形成和细胞内的物质转运、分泌和囊泡运输等多个方面。



The size of the bubble represents the amount of protein and the color represents the *P* value
 A: Molecular function; B: Biological process; C: Cellular component; D: KEGG pathway

图5 差异磷酸化蛋白质功能富集分析

Fig.5 Functional enrichment analysis of differential phosphorylated proteins

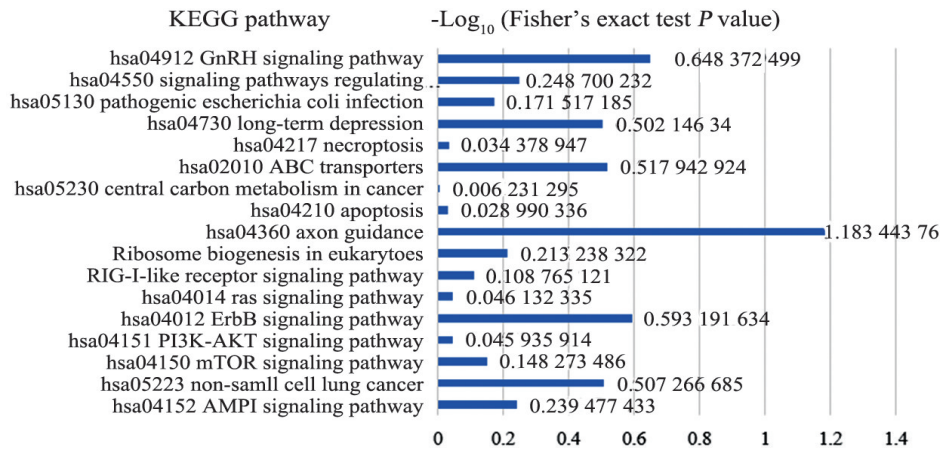


图6 差异磷酸化蛋白KEGG通路富集分析

Fig.6 KEGG pathway analysis of differential phosphorylated proteins

2.6 差异磷酸化蛋白质互作网络分析获得关键蛋白质
 将不同组中筛选得到的所有差异修饰蛋白数据编号,通过与 STRING(v.10.5)蛋白网络互作数据库比对后,按照置信度(confidence score)>0.7(高置信度)提取得到差异蛋白,选取其中 50 个进行互作关系分析(图8)。从蛋白网络互作关系发现,整个蛋白网络呈现主要以 MAPK1、RPL23A、SRSF3H 和 NCBP1 为核心蛋白质的相互作用网。经过结果对比分析发

现,自噬相关蛋白 2B (autophagy-related protein 2 homolog B, ATG2B)、自噬相关蛋白 13(ATG13)、unc-51 样自噬激活激酶(unc-51 like autophage activating kinase, ULK1)、Ras 相关蛋白 Rab-7a (Ras-related protein Rab-7a, RAB7a)、ATG9A 等蛋白表达上调显著,丝裂原激活的蛋白激酶 1 (mitogen-activated protein kinase 1, MAPK1)、真核翻译起始因子 4B (eukaryotic translation initiation factor 4B)、表皮生长

因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)、结节性硬化复合物 2 (tuberous sclerosis complex 2, TSC2)、人丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 PAK4、RAC- α 丝

氨酸/苏氨酸蛋白激酶(RAC-alpha serine/threonine-protein kinase,AKT1)等蛋白表达下调显著(表1)。

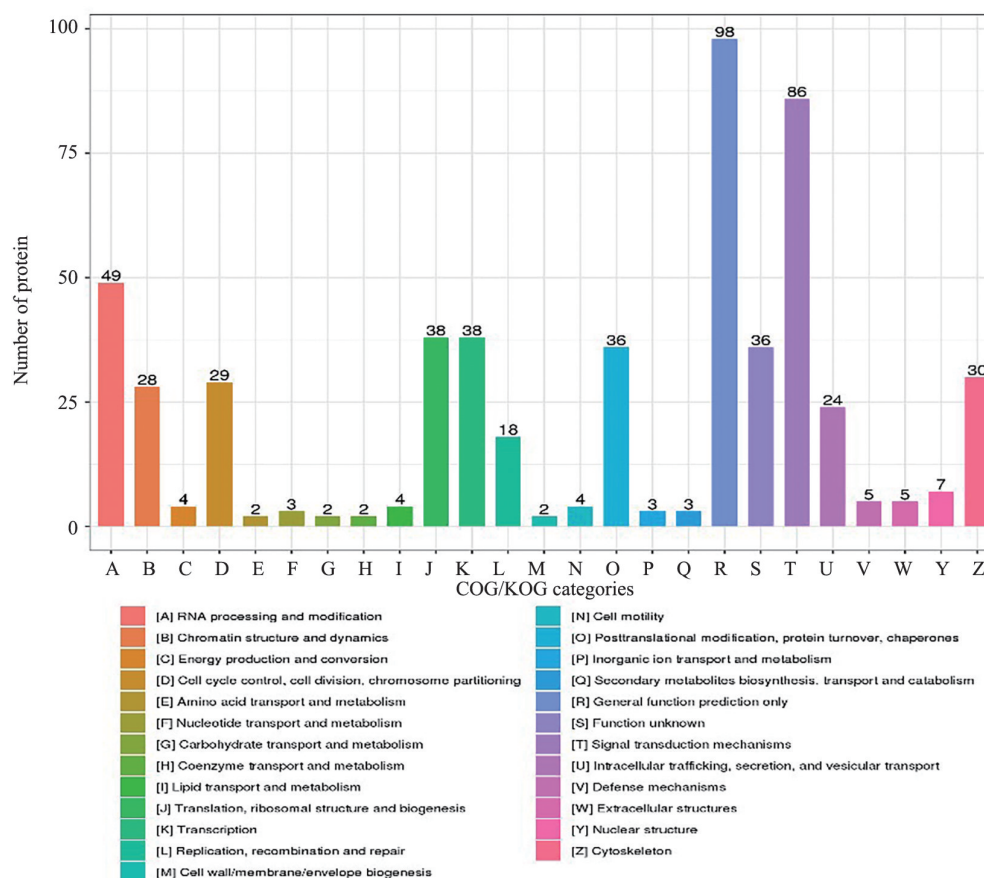


图7 差异磷酸化修饰位点对应蛋白质的COG/KOG功能分类分布图

Fig.7 The COG/KOG functional distribution map of proteins corresponding to differential phosphorylation modification sites

3 讨论

ATG2B是一种脂质转移蛋白,主要参与自噬体的形成,在降解前与溶酶体融合^[29]。ATG9A是一种具有折叠的同源三聚体,在营养丰富的条件下通过反式高尔基体网络和核内体系统,并在自噬诱导下短暂定位于自噬体。通过回收核内体来运输ATG9A是自噬体形成的重要步骤^[30]。作为自噬体的唯一穿膜蛋白,ATG9A是自噬体形成和成熟过程中形成磷脂转运管道机制的一部分^[31]。ATG13主要参与自噬因子形成^[32],且是mTOR激酶信号通路的靶标,通过控制ATG13和ULK1的磷酸化状态以及ATG13-ULK1-RB1CC1复合物的调控来调节自噬。ULK1是自噬的重要调节因子,ULK复合物在控制自噬小体生物发生的信号通路早期处于关键位置^[33],接收并整合来自mTOR和AMP活化蛋白激酶AMPK上游营养传感器机制靶点的信息。RAB7a是溶酶体运输的关键调节剂,作为FOXO1/RAB7信号通路中的重要蛋白,可以通过上调RAB7表达诱导细胞自

噬^[34]。分析发现,MAPK1、EIF4B、EGFR、TSC2、PAK4和AKT1表达显著下调。MAPK1是细胞外信号调节激酶^[35],是多种信号的整合点,参与多种细胞过程,如增殖、分化、和发育等,上游激酶磷酸化激活MAPK1/ERK2后转移到受刺激的细胞核,通过抑制MAPK1磷酸化^[36-37]激活自噬。EIF4B(又称帽结合蛋白),是eIF4F复合物的重要组成因子之一,其高表达会导致肿瘤的扩散、侵袭和转移。研究^[38]发现通过抑制EIF4B表达可增强细胞自噬性死亡。EGFR表达下调可通过抑制EGFR信号转导并同时激活自噬^[39],抑制EGFR表达后能够导致细胞自噬性死亡^[40]。关于TSC2,AKT无法在Ser981处将短的TSC2同工型磷酸化,从而导致ESCC中TSC2的持续活化;活性的TSC2通过RHEB抑制mTOR,导致ESCC细胞自噬^[41]。研究^[42-43]发现通过激活TSC2/mTOR信号途径可激活自噬。PAK4是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在多种肿瘤组织和细胞中高表达,与细胞增殖、周期、迁移等细胞学行为相关;通过下调PAK4表达可上调p53、抑制mTOR或AKT/mTOR、下调PAK4/MEK/ERK信号

通路,从而激活细胞自噬^[44]。AKT1 参与调节代谢、增殖、细胞存活、生长和血管生成等多个过程,可通过激活 AKT1/Foxo3a^[45]、PI3K/AKT/mTOR^[46]等信号通路促

进细胞自噬。综上,所述差异磷酸化蛋白质几乎一致地促进细胞自噬的发生,因此推测以 mercedin 处理肺癌 A549 细胞可能会诱导细胞自噬。



The circles in the figure represent the differentially modified protein, and different colors represent the differentially modified protein (blue represents the down-regulated protein and red represents the up-regulated protein). The circle size represents the number of differentially modified proteins interacting with it. The larger circle is, the more proteins it interacts with and the more important the protein is in the network. In order to clearly demonstrate the protein-protein interaction relationship, we selected the top 50 proteins with the closest interaction relationship and drew the protein interaction network

图8 STRING 数据库磷酸化蛋白质相互作用网

Fig.8 Protein-protein interaction network of phosphorylated proteins by searching STRING database

表1 抗菌肽 mercedin 处理 A549 细胞后差异表达显著的关键蛋白质及磷酸化位点

Tab.1 Phosphorylated key proteins and phosphorylated sites with significant differences in A549 cells after the treatment with antimicrobial peptide mercedin

Gene	Protein description	Regulation	PS	PT	PY	Phospho-site count
ATG2B	Autophagy-related protein 2 homolog B	Up	7	0	0	7(S240/S255)
ULK1	Serine/threonine-protein kinase	Up	6	1	0	7(S479/477)
MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1	Down	0	1	1	2 (T185/Y187)
EIF4B	Eukaryotic translation initiation factor 4B	Down	10	0	0	10(S579)
RAB7A	Ras-related protein Rab-7a	Up	1	0	0	1(S72)
EGFR	Epidermal growth factor receptor	Down	11	4	0	15(S104/1064 /1039)
TSC2	Tuberlin	Down	5	0	0	5(S1132/1452)
PAK4	Serine/threonine-protein kinase PAK	Down	5	1	0	6(S104)
ATG13	Autophagy-related protein 13	UP	1	0	0	1(S738/735)
ATG9A	Autophagy-related protein 9A	UP	3	0	0	3(S656/738/735)
AKT1	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase	Down	1	0	0	1(S124)

PS: Phosphorylated serine; PT: Phosphorylated threonine; PY: Phosphorylated tyrosine

综上所述,本研究发现抗菌肽 mercedin 抑制肺腺癌 A549 细胞增殖可能是通过蛋白磷酸化影响蛋白功能、亚细胞结构分布、细胞代谢、信息传递以及调节 AMPK、PI3K/AKT 等信号途径完成。同时分析结果显示 mercedin 可能诱导 A549 细胞自噬,这为后续实验进一步探究 mercedin 的抗癌功能奠定了基础。

[参考文献]

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA: A Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424. DOI:10.3322/caac.21492.
- [2] WANG G S, LI X, WANG Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design[J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(Suppl_1): D933-D937. DOI: 10.1093/nar/gkn823.
- [3] WANG G S, KEIFER P A, PETERKOFKY A. Short-chain diacyl phosphatidylglycerols: which one to choose for the NMR structural determination of a membrane-associated peptide from *Escherichia coli*? [J]. *Spectroscopy*, 2004, 18(2): 257-264. DOI: 10.1155/2004/719137.
- [4] LÜTHJE P, WALKER S, KAMOLVIT W, et al. Statins influence epithelial expression of the anti-microbial peptide LL-37/hCAP-18 independently of the mevalonate pathway[J]. *Clin Exp Immunol*, 2019, 195(2): 265-276. DOI:10.1111/cei.13217.
- [5] CHEN P H, FANG S Y. The expression of human antimicrobial peptide LL-37 in the human nasal mucosa[J]. *Am J Rhinol*, 2004, 18(6): 381-385. DOI:10.1177/194589240401800608.
- [6] GRANT M, KILSGÅRD O, ÅKERMAN S, et al. The human salivary antimicrobial peptide profile according to the oral microbiota in health, periodontitis and smoking[J]. *J Innate Immun*, 2019, 11(5): 432-444. DOI:10.1159/000494146.
- [7] HE Y, YANG X, YUAN Z, et al. Regulation of MSC and macrophage functions in bone healing by peptide LL-37-loaded silk fibroin nanoparticles on a titanium surface[J]. *Biomater Sci*, 2019, 7(12): 5492-5505. DOI:10.1039/c9bm01158g.
- [8] SVENSSON D, AIDOUKOVITCH A, ANDERS E, et al. The host defense peptide LL-37 is detected in human parotid and submandibular/sublingual saliva and expressed in glandular neutrophils[J]. *Eur J Oral Sci*, 2018, 126(2): 93-100. DOI:10.1111/eos.12407.
- [9] GÖKÇİNAR N B, KARABULUT A A, ONARAN Z, et al. Elevated tear human neutrophil peptides 1-3, human beta defensin-2 levels and conjunctival cathelicidin LL-37 gene expression in ocular Rosacea[J]. *Ocul Immunol Inflamm*, 2019, 27(7): 1174-1183. DOI: 10.1080/09273948.2018.1504971.
- [10] BUCKI R, LESZCZYŃSKA K, NAMIOT A, et al. Cathelicidin LL-37: a multitask antimicrobial peptide[J]. *Arch Immunol Ther Exp*, 2010, 58(1): 15-25. DOI:10.1007/s00005-009-0057-2.
- [11] CHIEOSILAPATHAM P, IKEDA S, OGAWA H, et al. Tissue-specific regulation of innate immune responses by human cathelicidin LL-37[J]. *Curr Pharm Des*, 2018, 24(10): 1079-1091. DOI:10.2174/1381612824666180327113418.
- [12] DA SILVA B R, DE FREITAS V A, NASCIMENTO-NETO L G, et al. Antimicrobial peptide control of pathogenic microorganisms of the oral cavity: a review of the literature[J]. *Peptides*, 2012, 36(2): 315-321. DOI:10.1016/j.peptides.2012.05.015.
- [13] WANG G S, NARAYANA J L, MISHRA B, et al. Design of antimicrobial peptides: progress made with human cathelicidin LL-37[M]//*Advances in Experimental Medicine and Biology*. Singapore: Springer Singapore, 2019: 215-240. DOI: 10.1007/978-981-13-3588-4_12.
- [14] LEE C C, SUN Y, QIAN S, et al. Transmembrane pores formed by human antimicrobial peptide LL-37[J]. *Biophys J*, 2011, 100(7): 1688-1696. DOI:10.1016/j.bpj.2011.02.018.
- [15] WANG G, MISHRA B, EPAND R F, et al. High-quality 3D structures shine light on antibacterial, anti-biofilm and antiviral activities of human cathelicidin LL-37 and its fragments[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1838(9): 2160-2172. DOI:10.1016/j.bbamem.2014.01.016.
- [16] Mishra B, Wang G S. Individual and combined effects of engineered peptides and antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms[J]. *Pharmaceuticals*, 2017, 10(4): 58. DOI:10.3390/ph10030058.
- [17] MISHRA B, WANG G S. Titanium surfaces immobilized with the major antimicrobial fragment FK-16 of human cathelicidin LL-37 are potent against multiple antibiotic-resistant bacteria[J]. *Biofouling*, 2017, 33(7): 544-555. DOI:10.1080/08927014.2017.1332186.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] AN L L, MA X T, YANG Y H, et al. Marked reduction of LL-37/hCAP-18, an antimicrobial peptide, in patients with acute myeloid leukemia[J]. *Int J Hematol*, 2005, 81(1): 45-47. DOI:10.1532/ijh97.a10407.
- [21] PODAZA E, PALACIOS F, CROCI D O, et al. Expression and function of cathelicidin hCAP18/LL-37 in chronic lymphocytic leukemia[J/OL]. *Haematologica*, 2020, 105(9): e465-e469[2020-09-02]. <https://haematologica.org/article/view/9869>. DOI: 10.3324/haematol.2019.227975.
- [22] WANG G S, HANKE M L, MISHRA B, et al. Transformation of human cathelicidin LL-37 into selective, stable, and potent antimicrobial compounds[J]. *ACS Chem Biol*, 2014, 9(9): 1997-2002. DOI:10.1021/cb500475y.
- [23] YAMASAKI KENSHI, SCHAUBER JÜRGEN, CODA ALVIN, et al. Kallikrein-mediated proteolysis regulates the antimicrobial effects of cathelicidins in skin. [J]. *FASEB J*, 2006, 20(12): 2068-2080. DOI: 10.1096/fj.06-6075com.
- [24] 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.
- [25] 李军, 战仕胜, 回丽媛, 等. 抗菌肽 17BIPHE2 通过阻滞肺腺癌 A549 细胞周期促进其凋亡[J]. *现代预防医学*, 2018, 45(2): 314-318, 351.
- [26] 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: 10.3969/j.issn.1001-6325.2019.04.005.

- [27] 回丽媛. 抗菌肽 17BIPHE2 抑制金黄色葡萄球菌及铜绿假单胞菌生物被膜作用的研究[D]. 银川: 宁夏医科大学, 2017.
- [28] 王雅蓉, 朱明星, 张帆, 等. c-di-GMP 的磷酸二酯酶 PA4781 在抗菌肽 Merecoidin 抑制铜绿假单胞菌生物被膜中的作用[J]. 微生物学通报, 2020, 47(3): 868-879. DOI: 10.13344/j.microbiol.china.190754.
- [29] LIN X T, ZHENG X B, FAN D J, et al. MicroRNA-143 targets ATG2B to inhibit autophagy and increase inflammatory responses in Crohn's disease[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2018, 24(4): 781-791. DOI:10.1093/ibd/izx075.
- [30] GUARDIA C M, TAN X F, LIAN T F, et al. Structure of human ATG9A, the only transmembrane protein of the core autophagy machinery[J]. *Cell Rep*, 2020, 31(13): 107837. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.107837.
- [31] JUDITH D, JEFFERIES H B J, BOEING S, et al. ATG9A shapes the forming autophagosome through Arfaptin 2 and phosphatidylinositol 4-kinase III β [J]. *J Cell Biol*, 2019, 218(5): 1634-1652. DOI:10.1083/jcb.201901115.
- [32] ALERS S, WESSELBORG S, STORK B. ATG13[J]. *Autophagy*, 2014, 10(6): 944-956. DOI:10.4161/auto.28987.
- [33] HUANG F, CHEN W, PENG J, et al. LncRNA PVT1 triggers cytoprotective autophagy and promotes pancreatic ductal adenocarcinoma development via the miR-20a-5p/ULK1 axis[J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 98. DOI:10.1186/s12943-018-0845-6.
- [34] 田舍, 江建新, 喻超, 等. SIRT1 通过调节 FOXO1/RAB7 信号通路促进低氧诱导的胰腺癌细胞自噬[J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(9): 1545-1550. DOI:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.09.002.
- [35] LI Q, WANG Y, PENG W J, et al. MicroRNA-101a regulates autophagy phenomenon via the MAPK pathway to modulate Alzheimer's -associated pathogenesis[J]. *Cell Transplant*, 2019, 28(8): 1076-1084. DOI:10.1177/0963689719857085.
- [36] ZHU Y, YANG T R, DUAN J L, et al. MALAT1/miR-15b-5p/MAPK1 mediates endothelial progenitor cells autophagy and affects coronary atherosclerotic heart disease via mTOR signaling pathway[J]. *Aging*, 2019, 11(4): 1089-1109. DOI:10.18632/aging.101766.
- [37] CAO L, ZHANG X, YUAN S, et al. Autophagy induced by enterovirus 71 regulates the production of IL-6 through the p38MAPK and ERK signaling pathways[J]. *Microb Pathog*, 2019, 131: 120-127. DOI: 10.1016/j.micpath.2019.03.028.
- [38] JIANG Q, LI F, SHI K, et al. ATF4 activation by the p38MAPK-eIF4E axis mediates apoptosis and autophagy induced by selenite in Jurkat cells[J]. *FEBS Lett*, 2013, 587(15): 2420-2429. DOI:10.1016/j.febslet.2013.06.011.
- [39] YU J J, ZHOU D D, CUI B, et al. Disruption of the EGFR-SQSTM1 interaction by a stapled peptide suppresses lung cancer via activating autophagy and inhibiting EGFR signaling[J]. *Cancer Lett*, 2020, 474: 23-35. DOI:10.1016/j.canlet.2020.01.004.
- [40] 庞歆桥, 曹邦伟. 细胞自噬与 EGFR 抑制剂在肿瘤治疗中的研究进展[J]. 临床与病理杂志, 2016, 36(5): 681-689. DOI:10.3978/j.issn.2095-6959.2016.05.029.
- [41] CHEN Y S, LU Y, REN Y L, et al. Starvation-induced suppression of DAZAP1 by miR-10b integrates splicing control into TSC2-regulated oncogenic autophagy in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Theranostics*, 2020, 10(11): 4983-4996. DOI:10.7150/thno.43046.
- [42] ZHU B, ZHOU Y, XU F, et al. Porcine circovirus type 2 induces autophagy via the AMPK/ERK/TSC₂/mTOR signaling pathway in PK-15 cells[J]. *J Virol*, 2012, 86(22): 12003-12012. DOI: 10.1128/jvi.01434-12.
- [43] WANG Y, LIU J, ZHOU J S, et al. mTOR suppresses cigarette smoke-induced epithelial cell death and airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *J Immunol*, 2018, 200(8): 2571-2580. DOI:10.4049/jimmunol.1701681.
- [44] ZENG B, SHI W, TAN G. miR-199a/b-3p inhibits gastric cancer cell proliferation via down-regulating PAK4/MEK/ERK signaling pathway[J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 34. DOI: 10.1186/s12885-017-3949-2.
- [45] YU Y, YANG L, HAN S, et al. MIR-190B alleviates cell autophagy and burn-induced skeletal muscle wasting via modulating PHLPP1/AKT/FoxO3A signaling pathway[J]. *Shock*, 2019, 52(5): 513-521. DOI:10.1097/shk.0000000000001284.
- [46] ZHU J, DOU S, JIANG Y, et al. Apelin-36 exerts the cytoprotective effect against MPP⁺-induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells through PI3K/AKT/mTOR autophagy pathway[J]. *Life Sci*, 2019, 224: 95-108. DOI:10.1016/j.lfs.2019.03.047.

[收稿日期] 2020-05-19

[修回日期] 2020-09-12

[本文编辑] 黄静怡