

归肝经中药作用于人肝癌细胞差异表达蛋白酪氨酸激酶的筛选与分析

田雪飞^{1a} 黄晓蒂^{1b} 周青² 王志琪^{1c} 田莎^{1a} 陈园^{1b}

(1. 湖南中医药大学 ④ 中西医结合学院, ① 研究生学院, ② 药学院, 湖南 长沙 410208 ;

2. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007)

【摘要】 目的 应用蛋白芯片技术筛选归肝经中药作用于人肝癌细胞蛋白酪氨酸激酶(PTKs)系统的特征性差异表达蛋白,并分析不同归肝经中药与 PTKs 调节的差异性。**方法** 选择 40 只 BALB/C 裸小鼠,采用将皮下瘤组织块植入肝左叶实质内的方法复制原位移植瘤模型,模型复制 10 d 确定成瘤后分为 4 组,各组分别腹腔注射相应的中药提取物,归肝经化瘀消癥药对组给予三棱和莪术(给药量为含生药 $4.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),归肝经攻毒散结药对组给予蜈蚣和全蝎(给药量为含生药 $0.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),归脾经对照药对组给予黄芪和白术(给药量为含生药 $6.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),模型组腹腔注射等量 0.9% 生理盐水。药物处理 3 周后处死小鼠取肝癌组织,采用蛋白芯片技术筛选归肝经药对作用于肝癌细胞的差异表达 PTKs 并进行聚类分析。**结果** 实验结束后各组动物数分别为化瘀消癥药对组 6 只,攻毒散结药对组 5 只,对照药对组 5 只,模型组 7 只。蛋白芯片筛选结果显示:以调节倍数大于 1.50 或小于 0.67 判定为差异有统计学意义,与模型组比较,化瘀消癥药对组 42 种表达均为上调[包括 29 种受体酪氨酸激酶(RTKs)和 13 种非受体酪氨酸激酶(nrPTKs)],其中调节倍数大于 5.0 的有促红细胞生成素产生肝细胞受体 B1(EphB1)、表皮生长因子受体(ErbB2、ErbB4)等 3 种 RTKs;调节倍数为 3.0~5.0 的包含 7 种 RTKs,分别为 EphA1、EphA3、EphA7、成纤维细胞生长因子受体 2- α (FGFR2- α)、肝细胞生长因子受体(HGFR)、巨噬细胞集落刺激因子受体(M-CSFR)、血管内皮细胞生长因子 2(VEGFR2);2 种 nrPTKs 分别为非受体酪氨酸激酶 BMX(BMX)、Janus 激酶(JAK1)。攻毒散结药对组表达上调 23 种(RTKs 15 种、nrPTKs 8 种),6 种下调,其中调节倍数为 3.0~5.0 的 RTKs 分别为 ErbB4、M-CSFR,1 种 nrPTKs 为巨核细胞相关酪氨酸激酶(MATK)。对照药对组表达上调 28 种,下调 8 种。聚类分析结果显示,符合筛选条件的 PTKs 差异表达在化瘀消癥药对组有 17 种,其中 9 种 RTKs [受体酪氨酸激酶样孤儿受体(ROR2)、干细胞因子受体(SCFR)、间变性淋巴瘤激酶(ALK)、血小板源性生长因子受体- β (PDGFR- β)、胰岛素样生长因子-IR(IGF-IR)、ErbB2、ErbB3、EphB1、EphA2],1 种 nrPTKs [fps/fes 相关酪氨酸激酶(FER)],7 种 PTKs,包括 3 种 RTKs(M-CSFR、FGFR2- α 、EphA3)和 4 种 nrPTKs [乙胺激酶 1(ACK1)、布鲁顿酪氨酸蛋白激酶(Btk)、非受体酪氨酸激酶 ABL1(ABL1)、BMX];在攻毒散结药对组有 7 种,包括 5 种 RTKs(M-CSFR、FGFR1、ROR2、EphB1、ErbB2)和 2 种 nrPTKs [缺乏 C 端调节与 N 端烷基化位点的 Src 相关激酶(SRMS)、FER]。**结论** 具有攻毒散结作用的蜈蚣和全蝎药对比具有化瘀消癥作用的三棱和莪术药有更好的抗肝癌作用,其机制可能是通过调节 PTKs 信号通路。归肝经活血化癥药对三棱和莪术可能存在独立于 PTKs 信号系统外的抗肝癌效应途径。

【关键词】 肝细胞癌; 肝经; 蛋白酪氨酸激酶; 蛋白芯片

Screening and analysis of Chinese herbs with liver channel tropism acting on human liver cancer cell differential expressed protein tyrosine kinase Tian Xuefei*, Huang Xiaodi, Zhou Qing, Wang Zhiqi, Tian Sha, Chen Yuan. *Hunan University of Chinese Medicine, College of Integrated Chinese and Western Medicine, Changsha 410208, Hunan, China

Corresponding author: Tian Xuefei, Email: windsame@163.com

【Abstract】 Objective To screen the Chinese drugs with liver channel tropism acting on the characteristic differential expressed protein of human liver cancer cell protein tyrosine kinase (PTKs) system by protein chip technology, and to analyze the difference in different Chinese drugs with liver channel tropism in relation to PTKs regulation. **Methods** Forty BALB/C nude mice were chosen; a piece of subcutaneous tumor mass was implanted into the left lobe of liver parenchyma to reduplicate the orthotopically implanted tumor models. After modeling for 10 days, the tumorigenicity was confirmed, and all the nude mice models were divided into four groups; different Chinese medicine extracts were injected intra-peritoneally into corresponding treatment groups respectively, and the methods of treatment in the 4 groups were as follows: In liver channel tropism drug pair of Huayu Xiaozhen group, rhizoma sparganii and curcuma zedoary with dosage containing crude drug $4.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ was given, in liver channel tropism drug pair of

Gongdu Sanjie group, the extract of centipede and scorpion with dosage containing crude drug $0.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ was intra-peritoneally injected, in spleen channel tropism drug pair control group, astragalus and rhizoma atractylodis macrocephalae with dosage containing crude drug $6.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ was given, and in the model group, equal amount of 0.9% normal saline was intra-peritoneally injected. After the drug treatment for 3 weeks, the mice were sacrificed and the liver cancer tissue was obtained; after its total protein was extracted, protein chip technology was applied to screen the Chinese drug pair with liver channel tropism acting on differential expressed PTKs of human liver cancer cells, and the results were analyzed by cluster analysis. **Results** After the end of the experiment, there were 6 animals in Huayu Xiaozhen drug pair group, 5 in Gongdu Sanjie drug pair group, 5 in control drug pair group and 7 in model group. The protein chip screening results showed that the adjusting fold greater > 1.50 or < 0.67 was defined as the difference with statistical significance. Compared with model group, there were 42 up-regulated expressions of PTKs in Huayu Xiaozhen drug pair group, including 29 receptor tyrosine kinases (RTKs) and 13 non-receptor protein tyrosine kinases (nrPTKs) of which the erythropoietin having adjusting fold over 5.0 produced liver cell receptor B1 (EphB1), epidermal growth factor receptor (ErbB2, ErbB4) etc. 3 RTKs; there were 7 RTKs with adjusting fold 3.0 – 5.0 including EphA1, EphA3, EphA7, fibroblast growth factor receptor 2- α (FGFR2- α), hepatocyte growth factor receptor (HGFR), macrophage colony-stimulating factor receptor (M-CSFR) and vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2), and 2 nrPTKs with adjusting fold 3.0 – 5.0 were non-receptor tyrosine kinase BMX (BMX) and Janus kinase 1 (JAK1). In the Gongdu sanjie drug pair group, there were 23 up-regulated expressions: 15 RTKs and 8 nrPTKs, and 6 down-regulated expressions; the RTKs with adjusting fold 3.0 – 5.0 were ErbB4, M-CSFR and 1 nrPTKs that was megakaryocyte-associated tyrosine kinase (MATK). In the control drug pair group, there were 28 up-regulated and 8 down-regulated expressions. The results of cluster analysis showed that in Huayu Xiaozhen drug pair group, there were 17 differential expressed PTKs in accord with the screen criteria of which 9 were RTKs [receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 (ROR2), stem cell factor receptor (SCFR), anaplasia lymphoma kinase (ALK), platelet-derived growth factor receptor β (PDGFR- β), insulin-like growth factor-IR receptor (IGF-IR), ErbB2, ErbB3, EphB1 and EphA2], 1 nrPTKs [fms/fes related tyrosine kinase (FER)] and 7 PTKs 3 RTKs (M-CSFR, FGFR2- α , EphA3) and 4 nrPTKs [acetate kinase 1 (ACK1), bruton tyrosine kinase (Btk), non-receptor tyrosine kinase ABL1 (ABL1) and BMX]. In Gongdu Sanjie drug pair group, there were 7 differential expressed PTKs in accord with the screen criteria 5 RTKs (M-CSFR, FGFR1, ROR2, EphB1, ErbB2) and 2 nrPTKs [src-related kinase lacking C-terminal regulation and N-terminal myristylation sites (SRMS), FER]. **Conclusions** The drug pair of centipede and scorpion with Gongdu Sanjie action possesses a more effective anti-HCC role than the drug pair of rhizoma sparganii and curcuma zedoary with Huayu Xiaozhen action, the mechanism is possibly via the regulation of PTKs signal pathway. The liver channel tropism drug pair of rhizoma sparganii and curcuma with action of promoting blood circulation and removing blood stasis possibly has an independent anti-HCC effective pathway outside the PTKs signal system.

【Key words】 Hepatocellular carcinoma; Liver channel; Protein tyrosine kinase; Protein chip

肝癌的基本病机为本虚标实,本虚为“脾虚”,标实为“血瘀,毒结”,三者互为因果贯穿于肝癌的整个发展过程。本研究采用蛋白芯片技术检测化瘀消癥和攻毒散结中药处理后肝癌细胞中蛋白酪氨酸激酶(PTKs)差异表达的变化,并以归脾经中药作为对照,筛选作用于肝癌细胞的差异表达 PTK 靶点,分析中药作用与 PTKs 调节之间的关系。

1 材料和方法

1.1 实验动物、细胞株与主要试剂:选择 6~8 周龄 SPF 级雄性 BALB/C 裸小鼠,体质量 25~30 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,动物合格证号:SCXK(沪)2007-0005。人肝癌 HCCLM3 细胞株购自中南大学湘雅医学院细胞中心,置于 37℃、5% 二氧化碳(CO₂)及饱和湿度、恒温的培养箱中,用含 10% 胎牛血清的低糖 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基(DMEM,美国 Gibco 公司)培养。胎牛血清、胰蛋白酶(美国 Invitrogen 公司),细胞及组织总蛋白提

取试剂盒、二喹啉甲酸法(BCA)蛋白质定量试剂盒(康成生物工程有限公司),RayBio 人酪氨酸激酶蛋白芯片试剂盒、人酪氨酸激酶磷酸化蛋白芯片系统(美国 RayBiotech 公司)。

1.2 实验动物分组及肝癌裸鼠肝原位移植瘤模型的复制:将 40 只 BALB/C 裸小鼠按随机数字表法分为化瘀消癥药对组、攻毒散结药对组、对照药对组、模型组,每组 10 只。复制裸鼠皮下移植瘤,反复传代至第 5 代时的皮下瘤作为原位移植瘤的瘤源^[1]。肝癌裸鼠肝原位移植瘤模型制备^[2]:将 BALB/C 裸鼠麻醉后沿腹部正中纵行切开 0.8 cm,用穿刺针将皮下瘤组织块植入肝左叶实质内,明胶海绵压迫止血,逐层缝合关腹,术后继续饲养,自由饮水、进食,逐日观察生长情况。该方法成瘤率达 100%。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.3 归肝经药对的药物选择、药物制备及处理方法:根据肝癌“血瘀、毒结”的标实基本病机^[3],归

肝经的药对选用化瘀消癥中药三棱和莪术定义为化瘀消癥药对组;攻毒散结中药全蝎和蜈蚣定义为攻毒散结药对组;同时根据肝癌“脾虚”的基本病机^[4],选用补脾中药黄芪和白术定义为对照药对组。中药均购自湖南中医药大学第一附属医院药剂科。参照文献[5]方法采用水提沉醇法提取三棱、莪术提取物干燥粉末,参照文献[6]方法提取挥发油,临用前混合配制成含生药量 0.270 g/mL;黄芪、白术为水提沉醇法提取的干燥粉末,临用前配制成生药量 0.378 g/mL;蜈蚣、全蝎提取物制备参照本课题组前期已建立的方法^[7]提取,临用前配制成含生药量 0.180 g/mL。提取物均在 4℃ 条件下保存备用,临用前以生理盐水配制。

制备肝癌裸鼠原位移植瘤模型成功后 10 d 开始腹腔注射给药,注射剂量以临床等效剂量按人—小鼠体表面积换算后确定。给药剂量分别为化瘀消癥药对组 4505.0 mg·kg⁻¹·d⁻¹,攻毒散结药对组 300.3 mg·kg⁻¹·d⁻¹,对照药对组 6307.0 mg·kg⁻¹·d⁻¹。模型组腹腔注射等量 0.9% 生理盐水。

1.4 检测指标及方法:药物处理 3 周时处死小鼠,完整分离癌组织,液氮保存用于受体酪氨酸激酶(RTKs)抗体蛋白质芯片检测。

1.4.1 肝癌组织总蛋白质提取:取分离肝癌组织研碎,加入含蛋白酶抑制剂的冷蛋白质提取试剂提取总蛋白,−80℃ 保存备用。采用 Bradford 法,按照说明书进行操作,以梯度稀释的牛血清白蛋白(BSA)标准品在波长 562 nm 处检测待测样品蛋白浓度。

1.4.2 酪氨酸激酶蛋白芯片检测:RayBio 人酪氨酸激酶蛋白芯片膜可同时检测 71 种 PKTs,包括 41 种 RTKs、20 种非受体酪氨酸激酶(nrPTKs)。蛋白芯片膜封闭后加 1 mL 样品,室温孵育;洗膜,生物素标记一抗,室温孵育;洗膜后加入 1:1000 稀释的辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗链霉—生物素抗体,室温孵育后洗膜;蛋白芯片膜置膜反应液中室温孵育 2 h 后, X 线片曝光,图像扫描后以 ScanAlyze 软件分析得出标准化灰度值,再将各组标准化灰度值进行比较,得出表达上调或下调倍数,比值>1.5 倍者为阳性结果。

1.5 统计学方法:使用 SPSS 16.0 统计软件处理数据,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多样本均数的比较采用单因素方差分析,组间比较方差齐采用 SNK 法、方差不齐采用 Games-Howell 法;蛋白芯片检测的数据采用 Cluster 3.0 软件进行聚类分析,Java Treeview 软件生成聚类树状图。

2. 结果

2.1 动物一般情况:实验过程中共死亡 17 只裸鼠,其中 13 只于制模开始到制模后 3 d 内死亡,4 只(化瘀消癥药对组 1 只,攻毒散结药对组 2 只,对照药对组 1 只)因腹腔注射给药过程中造成出血导致死亡。治疗结束后动物数:化瘀消癥药对组 6 只,攻毒散结药对组 5 只,对照药对组 5 只,模型组 7 只。

2.2 蛋白芯片检测各药对组干预后裸鼠肝癌组织 RTKs 表达(表 1):与模型组比较,化瘀消癥药对组的阳性表达均为上调(包括 42 种);而攻毒散结药对组除 23 种上调外,还包括 6 种下调;对照药对组 RTKs 阳性表达中有 28 种上调,8 种下调。

2.2.1 化瘀消癥药对组的阳性表达:42 种表达上调者中共有 29 种 RTKs 和 13 种 nrPTKs。上调的 RTKs 包括 Eph 家族有 9 种,血小板源性生长因子受体(PDGFR)家族 4 种,表皮生长因子受体(EGFR)家族 4 种,成纤维细胞生长因子受体(FGFR)家族 2 种,血管内皮生长因子受体(VEGFR)家族 2 种,其余 8 个家族均有 1 种。上调的 nrPTKs 包括 Src 家族、TEC 家族均有 3 种,Janus 激酶(JAK)家族 2 种,其余 3 个家族均有 1 种。调节倍数大于 5.0 的有促红细胞生成素产生肝细胞受体(EphB1)、表皮生长因子受体(ErbB2、ErbB4)等 3 种 RTKs,调节倍数 3.0~5.0 的包含 7 种 RTKs、2 种 nrPTKs。

2.2.2 攻毒散结药对组的阳性表达:23 种表达上调者中有 15 种 RTKs 和 8 种 nrPTKs。上调的 RTKs 包括 Eph 家族 3 种,EGFR 家族 2 种,PDGFR 家族 2 种,受体酪氨酸激酶样孤儿受体(ROR)家族 2 种,VEGFR 家族 2 种,其余 3 种家族均有 1 种;上调的 nrPTKs 包括 Src 家族 2 种,其余 5 种家族均有 1 种。6 种下调者中有 5 种 RTKs 和 1 种 nrPTKs,下调的 RTKs 包括间变性淋巴瘤激酶(LTK)、Axl 受体酪氨酸激酶(Axl)、胰岛素受体(INSR)、L-Ros 原癌基因受体酪氨酸激酶(ROS)、上皮生长因子样域酪氨酸激酶(Tie)等;下调的 nrPTKs 为 JAK 家族的 1 种。调节倍数 3.0~5.0 的包含 2 种 RTKs、2 种 nrPTKs。

2.2.3 对照药对组的阳性表达:28 种表达上调者中有 18 种 RTKs 和 10 种 nrPTKs,上调的 RTKs 包括 Eph 家族 8 种,EGFR 家族 2 种,VEGFR 家族 2 种,其余 6 个家族均有 1 种;上调的 nrPTKs 包括 Src 家族 4 种,JAK 家族 3 种,其余 4 个家族均 1 种;下调的 RTKs 包括 EGFR 家族 2 种,Eph 家族 2 种,其余 3 个家族均 1 种。7 种 RTKs 和 1 种 nrPTKs 下调,下调的 1 种 nrPTKs 为 TEC 家族的。调节倍数

表 1 归肝经药对处理后裸鼠肝癌组织 PTKs 差异表达蛋白调节倍数

PTKs 名称	所属 家族	类型	化瘀消癥 药对组 / 模型组	攻毒散结 药对组 / 模型组	对照 药对组 / 模型组	PTKs 名称	所属 家族	类型	化瘀消癥 药对组 / 模型组	攻毒散结 药对组 / 模型组	对照 药对组 / 模型组
ALK	LTK	RTKs	1.52 ↑	0.66 ↓	0.77	MUSK	MUSK	RTKs	1.21	1.78 ↑	1.74 ↑
Axl	Axl	RTKs	1.38	0.54 ↓	1.31	ROR1	ROR	RTKs	1.40	2.37 ↑	2.14 ↑
Dtk	Axl	RTKs	1.98 ↑	0.96	1.98 ↑	ROR2	ROR	RTKs	2.36 ↑	1.75 ↑	0.35 ↓
EGFR	EGFR	RTKs	2.21 ↑	0.77	1.80 ↑	ROS	ROS	RTKs	1.01	0.55 ↓	0.84
EphA1	Eph	RTKs	3.48 ↑	1.28	1.65 ↑	RYK	RYK	RTKs	1.17	0.96	0.65 ↓
EphA2	Eph	RTKs	2.37 ↑	0.94	0.41 ↓	Tie-1	Tie	RTKs	1.14	0.57 ↓	0.91
EphA3	Eph	RTKs	3.00 ↑	1.40	0.96	Tie-2	Tie	RTKs	1.54 ↑	0.73	1.01
EphA4	Eph	RTKs	1.21	0.75	1.53 ↑	TRKB	TRK	RTKs	1.77 ↑	1.61 ↑	1.49
EphA5	Eph	RTKs	1.30	0.80	1.64 ↑	VEGFR2	VEGFR	RTKs	3.05 ↑	2.43 ↑	2.03 ↑
EphA6	Eph	RTKs	1.50 ↑	0.94	1.33	VEGFR3	VEGFR	RTKs	2.22 ↑	1.84 ↑	1.54 ↑
EphA7	Eph	RTKs	4.36 ↑	2.99 ↑	4.02 ↑	ABL1	ABL	nrPTKs	2.74 ↑	1.08	0.93
EphA8	Eph	RTKs	2.25 ↑	1.42	1.25	ACK1	ACK	nrPTKs	2.33 ↑	1.22	1.18
EphB1	Eph	RTKs	5.04 ↑	1.58 ↑	0.33 ↓	Fyn	Src-A	nrPTKs	2.56 ↑	1.97 ↑	1.89 ↑
EphB2	Eph	RTKs	1.92 ↑	1.46	2.34 ↑	Blk	Src-B	nrPTKs	1.84 ↑	1.14	1.87 ↑
EphB3	Eph	RTKs	1.32	0.81	1.79 ↑	Hck	Src-B	nrPTKs	1.07	1.79 ↑	1.87 ↑
EphB4	Eph	RTKs	1.44	0.73	1.51 ↑	LCK	Src-B	nrPTKs	1.68 ↑	1.22	1.52 ↑
EphB6	Eph	RTKs	2.19 ↑	2.37 ↑	3.59 ↑	BMX	TEC	nrPTKs	4.12 ↑	1.34	1.02
ErbB2	EGFR	RTKs	5.29 ↑	1.53 ↑	0.60 ↓	Btk	TEC	nrPTKs	2.92 ↑	1.17	0.95
ErbB3	EGFR	RTKs	2.75 ↑	0.94	0.64 ↓	Itk	TEC	nrPTKs	1.58 ↑	1.32	1.26
ErbB4	EGFR	RTKs	5.86 ↑	3.38 ↑	3.17 ↑	Tec	TEC	nrPTKs	0.82	0.92	0.49 ↓
FGFR1	FGFR	RTKs	1.28	2.63 ↑	0.92	FAK	FAK	nrPTKs	1.43	0.74	1.55 ↑
FGFR2	FGFR	RTKs	2.19 ↑	1.34	1.30	PYK2	FAK	nrPTKs	1.58 ↑	2.08 ↑	1.43
FGFR2-α	FGFR	RTKs	3.30 ↑	0.73	0.97	FER	FES	nrPTKs	2.06 ↑	1.54 ↑	1.01
FRK	FRK	RTKs	1.52 ↑	1.23	1.50 ↑	JAK1	JAK	nrPTKs	3.42 ↑	3.43 ↑	4.09 ↑
HGFR	HGFR	RTKs	3.03 ↑	2.23 ↑	2.64 ↑	JAK2	JAK	nrPTKs	1.41	1.42	1.55 ↑
IGF-1R	INSR	RTKs	2.28 ↑	0.68	0.89	JAK3	JAK	nrPTKs	1.66 ↑	1.49	2.07 ↑
INSR	INSR	RTKs	1.00	0.54 ↓	0.40 ↓	Tyk2	JAK	nrPTKs	1.19	0.49 ↓	0.90
M-CSFR	PDGFR	RTKs	4.25 ↑	3.39 ↑	1.22	MATK	CSK	nrPTKs	1.44	3.43 ↑	2.15 ↑
PDGFR-α	PDGFR	RTKs	1.60 ↑	2.69 ↑	1.82 ↑	SRMS	FRK	nrPTKs	2.03 ↑	2.09 ↑	1.33
PDGFR-β	PDGFR	RTKs	2.19 ↑	1.22	0.86	ZAP70	SYK	nrPTKs	1.44	2.72 ↑	2.74 ↑
SCFR	PDGFR	RTKs	1.58 ↑	0.87	0.81						

注：↑表示上调，调节倍数大于 1.50 倍；↓表示下调，调节倍数小于 0.67 倍；Dtk 为 Dtk 受体酪氨酸激酶；FRK 为 Fyn 相关酪氨酸激酶；HGFR 为肝细胞生长因子受体；IGF-1R 为胰岛素样生长因子-1R；MUSK 为肌肉特异性酪氨酸激酶；RYK 为 RYK 受体酪氨酸激酶；TRKB 为酪氨酸激酶受体 B；Fyn 为非受体酪氨酸激酶 Fyn；Blk 为 B 淋巴细胞激酶；Hck 为造血细胞激酶；LCK 为淋巴细胞蛋白酪氨酸激酶；BMX 为非受体酪氨酸激酶 BMX；Itk 为白细胞介素 2 诱导 T 细胞激酶；Tec 为蛋白酪氨酸激酶 Tec；PYK2 为丙酮酸激酶 2；Tyk2 为酪氨酸激酶 2；MATK 为巨核细胞相关酪氨酸激酶；SRMS 为缺乏 C 端调节与 N 端烷基化位点的 Src 相关激酶；ZAP70 为 Zeta 链 (TCR) 相关蛋白激酶 70

3.0 ~ 5.0 的包含 3 种 RTKs 与 1 种 nrPTKs。

2.3 聚类分析结果初步筛选差异表达 PTKs：采用聚类分析首先对数据进行初步筛选，剔除化瘀消癥药对组、攻毒散结药对组、对照药对组中与模型组比较调节倍数小于 1.5 倍与大于 0.67 倍的所有 PTKs 种类，筛选得到 49 种 PTKs。

图 1 结果显示，首先以化瘀消癥药对组 / 模型

组、化瘀消癥药对组 / 对照药对组、对照药对组 / 模型组的调节倍数为变量，采用 Cluster 3.0 分析软件对以平均连锁聚类法对数据进行处理。化瘀消癥药对组干预后裸鼠肝癌组织 PTKs 表达水平的聚类分析结果可分为 5 类，符合筛选条件的为第 4 类与第 5 类。第 4 类特征为化瘀消癥药对组 / 模型组、化瘀消癥药对组 / 对照药对组的调节倍数在 1.5 ~ 15.2，

对照药对组 / 模型组的调节倍数在 0.3 ~ 1.0, 第 5 类特征为化瘀消癥药对组 / 模型组、化瘀消癥药对组 / 对照药对组的调节倍数在 2.0 ~ 4.3, 对照药对组 / 模型组的调节倍数在 1.0 ~ 1.2。第 4 类 10 种 PTKs 中, 包括 9 种 RTKs [ROR2、干细胞因子受体 (SCFR)、ALK、PDGFR- β 、IGF-IR、ErbB2、ErbB3、EphB1、EphA2] 和 1 种 nrPTKs [fps/fes 相关酪氨酸激酶 (FER)]; 第 5 类 7 种 PTKs 包括 3 种 RTKs [EphA3、FGFR2- α 、巨噬细胞集落刺激因子受体 (M-CSFR)] 和 4 种 nrPTKs [乙酸激酶 (ACK1)、布鲁顿酪氨酸蛋白激酶 (Btk)、非受体酪氨酸激酶 ABL1 (ABL1)、BMX]。

图 2 结果显示, 以攻毒散结药对组 / 模型组、攻毒散结药对组 / 对照药对组、对照药对 / 模型组的调节倍数为变量, 采用 Cluster 3.0 分析软件对以平均连锁聚类法对数据进行处理。攻毒散结药对组干预后裸鼠肝癌组织 PTKs 表达水平的聚类分析结果可分为 4 类, 符合筛选条件的为第 4 类, 特征为攻毒散结药对组 / 模型组、攻毒散结药对组 / 对照药对组的调节倍数在 1.1 ~ 5.0 之间, 对照药对组 / 模型组的调节倍数在 0.3 ~ 1.2 之间。以 1.5 倍为变量筛选条件进一步筛选后符合条件有 7 种 PTKs, 包括 5 种 RTKs (EphB1、ErbB2、FGFR1、ROR2、M-CSFR) 和 2 种 nrPTKs (FER、SRMS)。

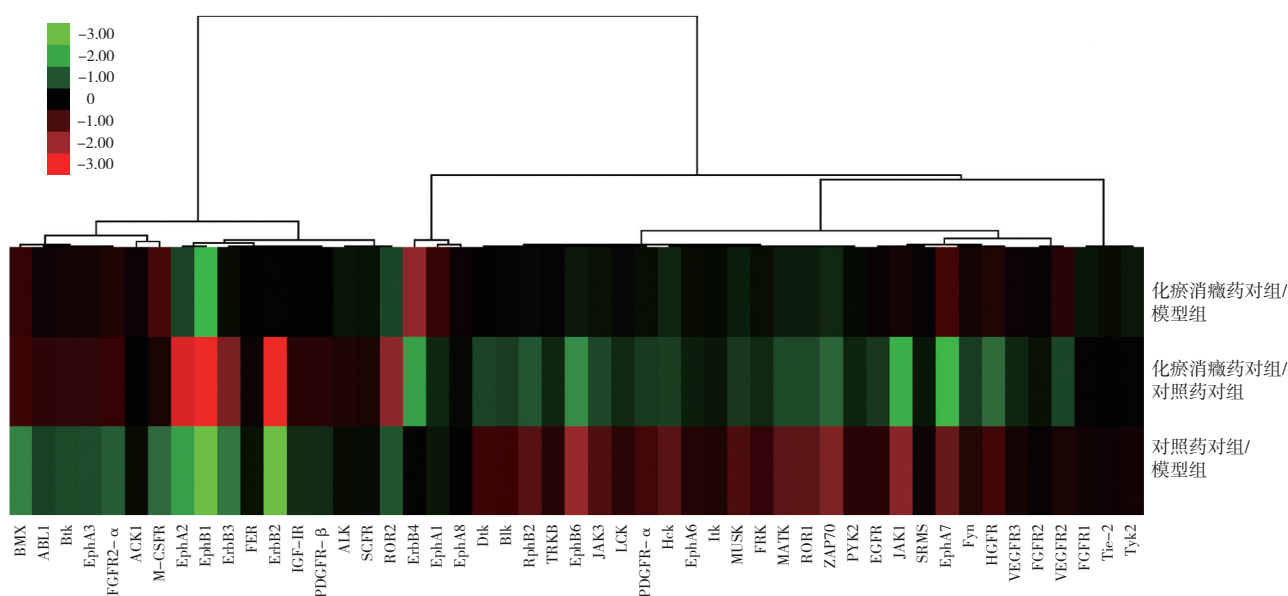


图 1 化瘀消癥药对组聚类分析树状图

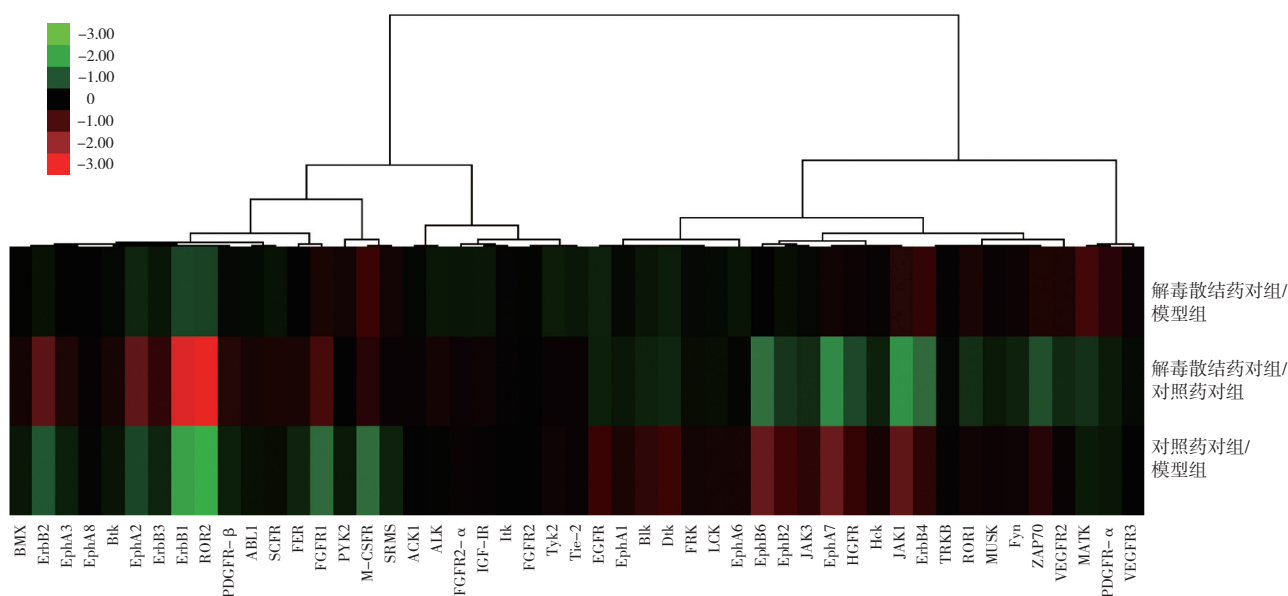


图 2 解毒散结药对组聚类分析树状图

3 讨论

PTKs 作为关键的信号分子影响了细胞生物学过程,有证据表明 PTKs 过度激活与过表达导致下游信号激活,在肿瘤发生发展、转移和转归中起重要作用^[8]。人类基因组中已鉴定的 90 余种 PTKs 可分为两类,一类为 nrPTKs (32 种),在细胞生长、存活和迁移过程中起着关键的信号转导作用^[9-10],如 JAK、Src、点状黏附激酶 (FAK)、Abl 等在多种肿瘤组织中可检测到过表达或组成性激活^[11-13];另外一类为 RTKs (58 种),是接受细胞外信号并传递至细胞内启动反应信号应答的跨膜受体蛋白。RTKs 在不同类型肿瘤中表达紊乱,致使其细胞内信号激活导致细胞转化、不断增殖,抵抗细胞凋亡,并促进肿瘤的发生发展。目前调节靶向 PTKs 信号途径已成为重要的抗肿瘤策略^[14],这些分子靶标包括表皮生长因子家族的 EGFR/ErbB1 和 ErbB2/Her2、胰岛素样生长因子受体 (IGF-R1)、VEGFR 及 HGFR 等^[15-19]。在肝癌治疗中,运用多靶点激酶抑制剂索拉非尼,进行分子靶向治疗已成为原发性肝癌患者的新选择。但有关 PTKs 与肝癌的相关研究报道仍较少,且多集中在已开发出靶向性抑制剂的 PTKs 研究中^[20-21]。

鉴于 PTKs 信号途径的复杂性,本研究用蛋白芯片技术对归肝经中药干预后的原位移植裸鼠肝癌组织 PTKs 差异表达蛋白进行筛选。结果显示,无论是归肝经的活血化癥药对三棱和莪术或攻毒散结药对蜈蚣和全蝎,还是归脾经的健脾对照药对黄芪和白术,都能调节多种 PTKs 表达。通过分析差异表达数据发现,三棱和莪术药对表现为上调趋势,涉及 20 个家族共 42 种 PTKs;蜈蚣和全蝎药对则表现出双向调节趋势,涉及 22 个家族共 23 种 PTKs。

归肝经三棱和莪术药对的单向上调趋势与其抗肿瘤特性不完全符合,在这些差异表达的 PTKs 中,上调倍数大于 3.0 的主要有 Eph、EGFR、PDGFR、VEGFR、HGFR 家族的 10 种 RTKs 及 BMX、JAK1 2 种 nrPTKs;调节倍数大于 5.0 的有 3 种,其中 2 种为 EGFR 家族成员 ErbB2、ErbB4。Eph 家族成员多存在抑/促癌争议,如 A 群的 EphA3 和 EphA7 及 B 群中的 EphB1、EphB2、EphB4 等具有抑癌作用^[22-23],其余报道多为 PTKs 在恶性肿瘤组织中高表达、促进侵袭转移、复发等,尤以 EGFR、PDGFR、VEGFR、HGFR 等家族与恶性肿瘤的血管生成密切相关。

与三棱和莪术药对不同,归肝经蜈蚣和全蝎药对表现出双向调节趋势,调节倍数大于 3.0 的 PTKs

数量仅为 5 种,且小于 5.0 倍。除已明确 JAK1 过度激活与肝癌发病机制有关外,其余 4 种 EphA7、ErbB4、MATK、M-CSFR 与肝癌的关系仍不清楚。此外,有 6 种 PTKs 下调,包括与增殖信号传递、恶性转化相关的白细胞酪氨酸激酶 (LTK)^[24],对新血管生成有促进作用的 Tie 家族成员^[25],与肿瘤增殖、耐药密切相关的 INSR、Src 家族的 ROS 激酶等。

上述结果表明,即使同为具有抗肝癌作用的归肝经中药,对于 PTKs 信号系统的作用差别很大,攻毒散结的蜈蚣和全蝎药对比化癥消癥的三棱和莪术药对更能通过调节 PTKs 发挥出抗肝癌作用。但由于 PTKs 信号系统的网络特点,以及中药成分的多靶点特性,很难清晰阐明多成分、多信号途径构成的复杂网络。此外,本研究结果提示,归肝经活血化癥药对三棱和莪术可能存在独立于 PTKs 信号系统以外的抗肝癌效应途径。

参考文献

- [1] 肖春丽,陶中华,万金良,等. 磺化异麦芽寡聚糖对人肝癌细胞株 HCCLM3 移植瘤生长的影响[J]. 中国临床医学, 2011, 18(5): 575-577.
- [2] Hause RJ, Kim HD, Leung KK, et al. Targeted protein-omic methods are bridging the gap between proteomic and hypothesis-driven protein analysis approaches [J]. Expert Rev Proteomics, 2011, 8(5): 565-575.
- [3] 邓欣,杨大国,吴其恺,等. 正肝方及其拆方影响人肝癌细胞增殖及端粒酶活性的体外实验研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2005, 12(6): 338-340.
- [4] 吕修臣,刘俊莉,张琼霞,等. 中西医结合强化综合治疗原发性肝癌临床研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2001, 8(5): 306-308.
- [5] 李英辉,张晶,孙莹,等. 莪术提取液体外抗肿瘤作用的实验研究[J]. 实用肿瘤学杂志, 2010, 24(4): 393-396.
- [6] 邓丽梅,史克莉. 温莪术挥发油的最佳提取工艺研究[J]. 湖北中医药大学学报, 2011, 13(2): 37-39.
- [7] 田雪飞,肖竺,郭永良,等. 归肝经中药对肝癌 HepG2 细胞增殖抑制及凋亡诱导作用的研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2009, 16(4): 199-202.
- [8] Hojjat-Farsangi M. Small-molecule inhibitors of the receptor tyrosine kinases: promising tools for targeted cancer therapies [J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(8): 13768-13801.
- [9] Rana A, Ali GM, Ali S, et al. Breakpoint cluster region-c-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase signaling: current patterns of the versatile regulator revisited [J]. J Cancer Res Ther, 2013, 9(1): 3-5.
- [10] 翁立新,李秀霞,付小兵. 酸性成纤维细胞生长因子及其受体研究进展[J]. 中华危重病急救医学, 2004, 16(4): 253-256.
- [11] Ren Y, Zhang Y, Liu RZ, et al. JAK1 truncating mutations in gynecologic cancer define new role of cancer-associated protein tyrosine kinase aberrations [J]. Sci Rep, 2013, 3: 3042.
- [12] Zhang S, Huang WC, Zhang L, et al. SRC family kinases as novel therapeutic targets to treat breast cancer brain metastases [J]. Cancer Res, 2013, 73(18): 5764-5774.
- [13] 刘辉,姚咏明. Janus 激酶细胞信号转导及转录活化因子通路抑制剂的研究进展[J]. 中华危重病急救医学, 2003, 15(2): 123-126.
- [14] Takeuchi K, Ito F. Receptor tyrosine kinases and targeted cancer

- therapeutics [J]. Biol Pharm Bull, 2011, 34(12): 1774-1780.
- [15] Moody TW, Chan DC, Mantey SA, et al. SR48692 inhibits non-small cell lung cancer proliferation in an EGF receptor-dependent manner [J]. Life Sci, 2014, 100(1): 25-34.
- [16] Zheng D, Golubovskaya V, Kurenova E, et al. A novel strategy to inhibit FAK and IGF-1R decreases growth of pancreatic cancer xenografts [J]. Mol Carcinog, 2010, 49(2): 200-209.
- [17] Tang Z, Niu S, Liu F, et al. Synthesis and biological evaluation of 2,3-diaryl isoquinolinone derivatives as anti-breast cancer agents targeting ERalpha and VEGFR-2 [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2014, 24(9): 2129-2133.
- [18] You WK, McDonald DM. The hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway as a therapeutic target to inhibit angiogenesis [J]. BMB Rep, 2008, 41(12): 833-839.
- [19] 刘文忠, 付小兵, 张宝林. 血管内皮细胞生长因子及其受体与血管形成的研究进展 [J]. 中华危重病急救医学, 2003, 15(4): 251-253.
- [20] Jeyakumar A, Younis T. Trastuzumab for HER2-Positive Metastatic Breast Cancer: Clinical and Economic Considerations [J]. Clin Med Insights Oncol, 2012, 6: 179-187.
- [21] Ren W, Zhang R, Wu B, et al. Effects of SU5416 and a vascular endothelial growth factor neutralizing antibody on wear debris-induced inflammatory osteolysis in a mouse model [J]. J Inflamm Res, 2011, 4: 29-38.
- [22] Oricchio E, Nanjangud G, Wolfe AL, et al. The Eph-receptor A7 is a soluble tumor suppressor for follicular lymphoma [J]. Cell, 2011, 147(3): 554-564.
- [23] Kumar SR, Seehnet JS, Ley EJ, et al. Preferential induction of EphB4 over EphB2 and its implication in colorectal cancer progression [J]. Cancer Res, 2009, 69(9): 3736-3745.
- [24] Roll JD, Reuther GW. ALK-activating homologous mutations in LTK induce cellular transformation [J]. PLoS One, 2012, 7(2): e31733.
- [25] Chan B, Yuan HT, Ananth KS, et al. Receptor tyrosine kinase Tie-1 overexpression in endothelial cells upregulates adhesion molecules [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 371(3): 475-479.

(收稿日期: 2015-03-30)

(本文编辑: 李银平)

• 消息 •

中国科技信息研究所 2014 年版《中国科技期刊引证报告》(核心版) ——临床医学综合类期刊影响因子和综合评价总分前 10 位排序表

期刊名称	影响因子	排位	期刊名称	综合评价总分	排位
中华危重病急救医学	1.512	1	中华危重病急救医学	68.1	1
中国中西医结合急救杂志	1.076	2	实用医学杂志	61.3	2
中国全科医学	0.899	3	中国全科医学	61.1	3
中华全科医学	0.866	4	中国中西医结合急救杂志	48.7	4
中国疼痛医学杂志	0.862	5	中华急诊医学杂志	44.1	5
中国血液净化	0.803	6	中国血液净化	42.6	6
中华急诊医学杂志	0.763	7	中国临床医学	42.5	7
临床血液学杂志	0.746	8	中国急救医学	41.8	8
中国输血杂志	0.736	9	中华全科医学	41.5	9
实用医学杂志	0.676	10	中国疼痛医学杂志	41.4	10

中国科技信息研究所 2014 年版《中国科技期刊引证报告》(核心版) ——中西医结合医学类期刊影响因子和综合评价总分前 10 位排序表

期刊名称	影响因子	排位	期刊名称	综合评价总分	排位
中国中西医结合急救杂志	1.076	1	中国中西医结合杂志	76.2	1
中国中西医结合杂志	0.978	2	Journal of Intergerative Medicine	53.4	2
Journal of Intergerative Medicine	0.640	3	现代中西医结合杂志	52.8	3
中西医结合肝病杂志	0.584	4	中国中西医结合急救杂志	45.7	4
中国中西医结合肾病杂志	0.583	5	中国中西医结合心脑血管病杂志	39.1	5
中国中西医结合心脑血管病杂志	0.547	6	世界中西医结合杂志	36.8	6
现代中西医结合杂志	0.503	7	中西医结合肝病杂志	34.3	7
世界中西医结合杂志	0.482	8	中国中西医结合外科杂志	33.8	8
中国中西医结合外科杂志	0.377	9	中国中西医结合肾病杂志	29.4	9
中国中西医结合皮肤性病学杂志	0.332	10	中国中西医结合消化杂志	27.2	10