

论著·基础研究

伴刀豆球蛋白A诱导肝细胞损伤的磷酸化蛋白质组学研究

杨卓一¹, 陈 会¹, 白思益¹, 帕梅拉·帕尔哈提¹, 侯敬丽², 袁运生¹

1. 上海交通大学药学院细胞工程及抗体药物教育部研究工程中心, 上海 200240; 2. 上海交通大学分析测试中心, 上海 200240

[摘要] **目的**·研究伴刀豆球蛋白A (concanavalin A, ConA) 诱导肝细胞损伤过程中全细胞蛋白质的磷酸化修饰水平的变化规律。**方法**·将小鼠肝细胞株 AML12 与 ConA (10 µg/mL) 共培养, 诱导肝细胞损伤模型, 12 h 后提取细胞的总蛋白, 经消化酶解后富集肽段, 并使用高效液相-质谱联用分析仪进行检测。采用非标定量法对磷酸化位点和肽段进行鉴定与相对定量分析。筛选出单位点磷酸化修饰水平差异达到 2 倍以上的蛋白进行生物学功能富集分析和蛋白互作调控网络分析。**结果**·在 ConA 诱导的 AML12 细胞损伤模型中, 共鉴定到磷酸化修饰肽段 11 200 条, 可定位定量的肽段 2 685 条。其中差异性调控的磷酸化修饰肽段 82 条, 对应 77 个蛋白。这 77 个磷酸化蛋白主要与蛋白质结合、酶活动等相关, 且主要通路与细胞凋亡以及 RAS 激酶通路相关。**结论**·AML12 细胞在 ConA 诱导的肝细胞损伤过程中发生了磷酸化修饰变化, 差异磷酸化修饰的蛋白可能与肝细胞凋亡相关。

[关键词] 伴刀豆球蛋白A; AML12 细胞株; 蛋白质组学; 磷酸化修饰

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2021.01.001 **[中图分类号]** R915 **[文献标志码]** A

Phosphoproteomic analysis of concanavalin A-induced hepatocytes injury

YANG Zhuo-yi¹, CHEN Hui¹, BAI Si-yi¹, Pamela PERHATI¹, HOU Jing-li², YUAN Yun-sheng¹

1. Engineering Research Center of Cell and Therapeutic Antibody, Ministry of Education; Shanghai Jiao Tong University School of Pharmacy, Shanghai 200240, China;

2. Instrumental Analysis Center, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

[Abstract] **Objective**·To study the changes of phosphorylation level of whole-cell proteins during the process of concanavalin A (ConA)-induced hepatocyte injury. **Methods**·Mouse hepatocytes of AML12 cells and ConA (10 µg/mL) were co-cultured to induce a hepatocyte injury model. After 12 h, the total proteins were extracted and digested into peptides. The peptides were enriched by metal oxide affinity chromatography and detected by using high performance liquid chromatography-mass spectrometer. Identification and relative quantitative analysis of phosphorylation sites and peptides were performed using the Label free method. Proteins with a difference of more than two times of phosphorylation level of each site were screened. And the biological function enrichment analysis and protein interaction regulation network analysis were performed. **Results**·In the ConA-induced AML12 cell injury model, a total of 11 200 phosphorylated modified peptides and 2 685 localizable and quantifiable peptides were identified. Among them, there were 82 differentially regulated phosphorylated modified peptides, corresponding to 77 proteins. These phosphorylated proteins were mainly related to protein binding and enzyme activities. And the main pathways were related to apoptosis and RAS kinase pathways. **Conclusion**·AML12 cells undergo phosphorylation level change in ConA-induced liver cell injury and these differentially phosphorylated proteins may be related to liver cell apoptosis.

[Key words] concanavalin A (ConA); AML12 cell line; proteomics; phosphorylation modification

蛋白质的翻译后修饰 (post translational modifications, PTM) 广泛存在所有生物体内。人和动物体内的蛋白翻译后修饰, 如蛋白的糖基化、泛素化、乙酰化和磷酸化等对于调控蛋白质的功能、活性和稳定性等方面发挥着重要的作用^[1]。其中, 蛋白的磷酸化修饰是最早发现的蛋白翻译后修饰之一, 通过体内的蛋白激酶和蛋白去磷酸化酶系统进行调控; 蛋白磷酸化水平的改变直接影响细胞内信号转导网络的功能, 并参与调控功能蛋白的泛素化修饰来间接调控蛋白质的稳定性^[2-3]。在人和动物体内, 苏氨酸、丝

氨酸和酪氨酸是最常见的磷酸化氨基酸, 细胞中它们各自被磷酸化的比例分别为 84%、15%、<1%^[4]。肝脏是人体能量代谢、维持生命活动的重要器官^[5], 已有文献^[6]报道蛋白质磷酸化修饰在影响肝功能、肝细胞再生以及肝细胞癌方面具有重要作用。酪氨酸磷酸化在肝再生中对细胞内途径进行调节; 肝部分切除 (partial hepatectomy, PH) 后, 雷帕霉素可降低肝增殖速率^[7]、增加肝细胞凋亡的速率^[8]; 磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase/protein-serine-threonine

[基金项目] 国家科技重大专项 (2019ZX09201001); 国家自然科学基金 (31671388, 81302825); 上海交通大学医工交叉项目 (YG2019QNA50)。

[作者简介] 杨卓一 (1993—), 女, 硕士生; 电子信箱: yangzhuoyi@sjtu.edu.cn。

[通信作者] 袁运生, 电子信箱: yunsheng@sjtu.edu.cn。

[Funding Information] National Science and Technology Major Project (2019ZX09201001); National Natural Science Foundation of China (31671388, 81302825); Shanghai Jiao Tong University Medical-Engineering Joint Project (YG2019QNA50)。

[Corresponding Author] YUAN Yun-sheng, E-mail: yunsheng@sjtu.edu.cn。

kinase, PI3K/AKT) 途径在肝癌中被广泛研究。上述这些都说明蛋白质磷酸化修饰在肝病研究中的重要意义。

小鼠静脉内注射植物凝集素伴刀豆球蛋白 A (concanavalin A, ConA) 是广泛使用的急性免疫介导的肝炎模型^[9], ConA 可以通过激活 T 淋巴细胞诱导特定的急性肝损伤。由于 T 细胞免疫^[10-11] 的参与, 且与人类自身免疫性肝炎的相似性, 该模型也被认为是人类自身免疫性肝炎的良好模型。近年来已有很多研究者采用 ConA 诱导的肝损伤模型对肝细胞再生等进行研究, 但 ConA 诱导的肝损伤模型的蛋白质磷酸化组学研究还未见报道。本研究建立 ConA 诱导的肝实质细胞 AML12 细胞的损伤模型, 通过液相-质谱联用的方式, 采用非标定量法检测模型细胞中发生磷酸化修饰的蛋白, 并寻找差异性调控的磷酸化修饰位点, 以期肝脏疾病的研究提供相关通路以及靶标信息。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

小鼠正常肝细胞 AML12 细胞株 (中国科学院细胞库)。DME/F12 细胞培养基 (HyClone, 美国), 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、青霉素-链霉素双抗 (Gibco, 美国)。尿素、碳酸氢铵、二硫苏糖醇、碘乙酰胺、苯甲基磺酰氟 (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)、丙酮、脱氧胆酸钠 (Na-deoxycholate)、3-[(3-胆酰胺丙基)-二甲氨基]-丙磺酸 {3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate, CHAPS} 均购自美国 Sigma 公司。甲酸、乙腈、C18 微量层析柱 (Thermo Fisher Scientific, 美国)。支原体检测试剂盒 (南京诺唯赞, 中国), Bradford 蛋白定量试剂盒 (上海碧云天, 中国), 10 kD 超滤离心管 (Sartorius, 德国), 胰蛋白酶 (Promega, 美国), 二氧化钛 (岛津, 日本), 脱氧胆酸钠 (上海麦克林, 中国), 硒酸钠 (中国医药集团, 中国), 转铁蛋白 (上海源叶, 中国), 胰岛素 (苏州礼来, 中国), 地塞米松 (安徽丰原, 中国)。接触式超声波破碎仪 (Bio-Rad, 美国), 高速冷冻离心机和离心浓缩仪、纳升液相-四极杆超高分辨轨道阱质谱联用仪 (Thermo Fisher Scientific, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 AML12 细胞培养及分组 AML12 细胞培养在含有 10% FBS 的 DME/F12 培养基中, 添加 1% 青霉素-链霉素双抗、0.005 mg/mL 胰岛素、0.005 mg/mL 转铁蛋白、

5 ng/mL 硒元素、40 ng/mL 地塞米松。培养条件为 37 °C、5% CO₂、饱和湿度。建立肝损伤模型时, 将细胞按每皿 1×10⁶ 个接种于 6 个 10 cm 培养皿, 设置为对照组和 ConA 组, 每组 3 个培养皿。于培养箱培养 3 d, 取 20 μL 培养基上清, 用支原体检测试剂盒并按照说明书步骤进行检验。确认细胞无污染后, 每盘 ConA 组细胞中加入 10 μg/mL ConA, 对照组添加等体积的磷酸缓冲盐溶液, 继续培养 12 h 后消化收集细胞至 15 mL 离心管, 每管细胞数约为 2×10⁷ 个。将细胞转移至 1.5 mL 离心管, 冻存于 -80 °C 冰箱备用。

1.2.2 蛋白质组样品制备 自细胞裂解液提取蛋白, 每 100 mL 添加 4 mL Tris-HCl (1 mol/L, pH 7.4)、64 g 尿素、4 g CHAPS、1 mL 乙二醇四乙酸 (100 mmol/L)、5 mL 乙二醇双 (2-氨基乙基醚) 四乙酸 (10 mmol/L)。使用前按 1 : 100 加入磷酸酶抑制剂 A 和磷酸酶抑制剂 B、6.5 mL 二硫苏糖醇 (1 mol/L)、1 mL 苯甲基磺酰氟 (1 mol/L)。每管细胞样品加 1 mL 细胞裂解液, 于冰上用接触式超声波破碎仪低温裂解 15 min。细胞破碎后于 4 °C 离心机 13 800×g 离心 20 min 后取 200 μL 上清液, 向其中加入 5 倍体积的蛋白沉淀剂, 混合均匀, 于 -20 °C 沉淀过夜。次日取出样品于 4 °C、13 800×g 离心 1 h, 沉淀用 90% 丙酮洗 3 遍后继续离心 10 min。将蛋白沉淀于室温晾干 10~15 min。沉淀干燥后加入 100 mmol/L NH₄HCO₃、8 mol/L 尿素溶液重新溶解蛋白, 并用 Bradford 试剂盒测定蛋白浓度。取 400 μg/200 μL 蛋白, 每个样品 3 管, 总蛋白共 1.2 mg, 加入 8 μL 1 mol/L 二硫苏糖醇, 于 37 °C 孵育 1 h 后, 每管加入 40 μL 1 mol/L 碘乙酰胺, 室温下避光孵育 40 min。将蛋白转移到 10 kD 超滤管中, 13 800×g、4 °C 离心 30 min 后弃滤液。往超滤管中加入 100 μL 50 mmol/L NH₄HCO₃, 13 800×g、4 °C 离心 20 min 后弃滤液, 重复 3 次。得到的蛋白按照酶和蛋白质量比 1 : 25 加入胰蛋白酶, 于 37 °C 酶解过夜。酶解的蛋白于 4 °C、13 800×g 离心 20 min 后收集滤液, 加入 50 μL 50 mmol/L NH₄HCO₃, 13 800×g、4 °C 离心 20 min, 并与上步滤液合并后, 于 35 °C 离心浓缩仪中干燥。3 管酶解的肽段分别用 50 μL 上样缓冲液溶解并合并成 1 管。

1.2.3 TiO₂ 富集磷酸化肽段 多肽冻干后用 100 μL 上样缓冲液 (65% 乙腈、2% 三氟乙酸) 溶解于 1.5 mL 离心管中。金属氧化物亲和色谱 (metal oxide affinity chromatography, MOAC) 珠 (TiO₂ beads), 用 1 mL 上样缓冲液室温涡旋孵育 20 min (多肽 : beads 的质量比为 1 : 2~1 : 8)。4 °C、1 000×g 离心, 弃去上清液, 加入第 1 份新鲜的 1 mL 活化的 beads 溶液, 室温涡旋 30 min, 收

集上清液和beads。上清液加入第2份新鲜的1 mL活化的beads溶液,室温涡旋30 min, 4 °C、1 000×g离心,弃去上清液,收集beads,并与上步收集的beads合并。用800 μL冲洗缓冲液1(65%乙腈、0.5%三氟乙酸)洗涤beads,室温涡旋15~30 min, 4 °C、1 000×g离心,弃上清液;加入800 μL冲洗缓冲液2(65%乙腈、0.1%三氟乙酸)洗涤beads,室温涡旋15~30 min, 4 °C、1 000×g离心,弃上清液;加入300 μL洗脱缓冲液1(300 mmol/L NH₄OH、50%乙腈),室温涡旋15~30 min, 4 °C、1 000×g离心,取上清液;加入300 μL洗脱缓冲液2(500 mmol/L NH₄OH、60%乙腈),室温涡旋15~30 min, 1 000×g离心取上清液,并与上步骤的上清液合并。合并的上清液于4 °C、15 000×g下离心10 min后,于离心浓缩仪室温干燥,再用20 μL 0.1%甲酸水溶液重溶、脱盐、干燥。

1.2.4 纳升液相-四极杆超高分辨轨道阱质谱联用仪分析 富集的磷酸化样品用NanoLC-Oribtrap-MS进行检测。脱盐后的样品用10 μL 0.1%甲酸溶液复溶,取9 μL上机测试。液相色谱仪型号为Easy-nLC1200,色谱柱为75 μm×150 mm, 3 μm particle C18 column自制柱。流动相A为0.1%甲酸水溶液;流动相B为含0.1%甲酸的80%乙腈水溶液,流速为300 nL/min。采用120 min梯度洗脱样品:0~3 min, 2%~6% B; 3~98 min, 6%~22% B; 98~108 min, 22%~32% B; 108~110 min, 32%~100% B; 110~120 min, 100% B。

四极杆超高分辨轨道阱质谱仪型号为Q-Exactive Plus。离子源为nano-ESI,喷雾电压1.8 kV,毛细管温度275 °C。一级扫描的质荷比(*m/z*)范围为350~1 800,最大注入时间(maximum ion injection time, MIT) 50 ms。选取丰度前20的肽段进行二级碎裂(loop count=20, MSX count=1, TopN=20),碎裂模式为高能碰撞解离(high energy collisional dissociation, HCD),碰撞能量(normalized collision energy, NCE)设置为28。离子排除(charge exclusion):排除电荷数为1、7、8以及大于8的离子。动态排除时间30 s。

1.2.5 蛋白质数据库 原始数据用Proteome Discoverer 2.3(Thermo Fisher Scientific, 美国)软件进行搜库分析,搜索引擎为SEQUEST。小鼠的蛋白数据库下载自UniProt 2019_11(<https://www.uniprot.org/>)。搜库参数采用固定修饰为“Carbamidomethyl(C)”,可变修饰为“Oxidation(M)、Deamidation(NQ)、Acetyl(N terminal)、Phosphorylation(STY)”。母离子质量容差(precursor mass tolerance)为 1×10^{-5} ,二级谱图质量容差(fragment mass tolerances)为0.050,允许最大漏切位点

(max missed cleavages)为2,肽段和蛋白的错误发现率(false discovery rate, FDR)均≤1%。

1.2.6 肽段和蛋白的定量和分析方法 本实验采用非标定量法,以蛋白和肽段的峰面积对蛋白和肽段进行相对定量分析,满足差异倍数为2以及多肽和蛋白的FDR≤1%的蛋白确定为表达差异蛋白。蛋白的鉴定通过对多个不同肽段与数据库中蛋白质序列预测的碎片离子的比对得到,肽段的序列主要通过b离子和y离子的捕获进行鉴定^[12]。利用String 11.0(<https://string-db.org/>)软件进行基因本体数据库(Gene Ontology, GO)分析,方法和P值计算参考文献[13],结果从String 11.0软件导出。通过String 11.0软件对鉴定到的77个磷酸化蛋白进行蛋白互作网络构建,并使用Cytoscape 3.7.2软件使互作网络可视化。热图由Proteome Discoverer 2.3软件导出。

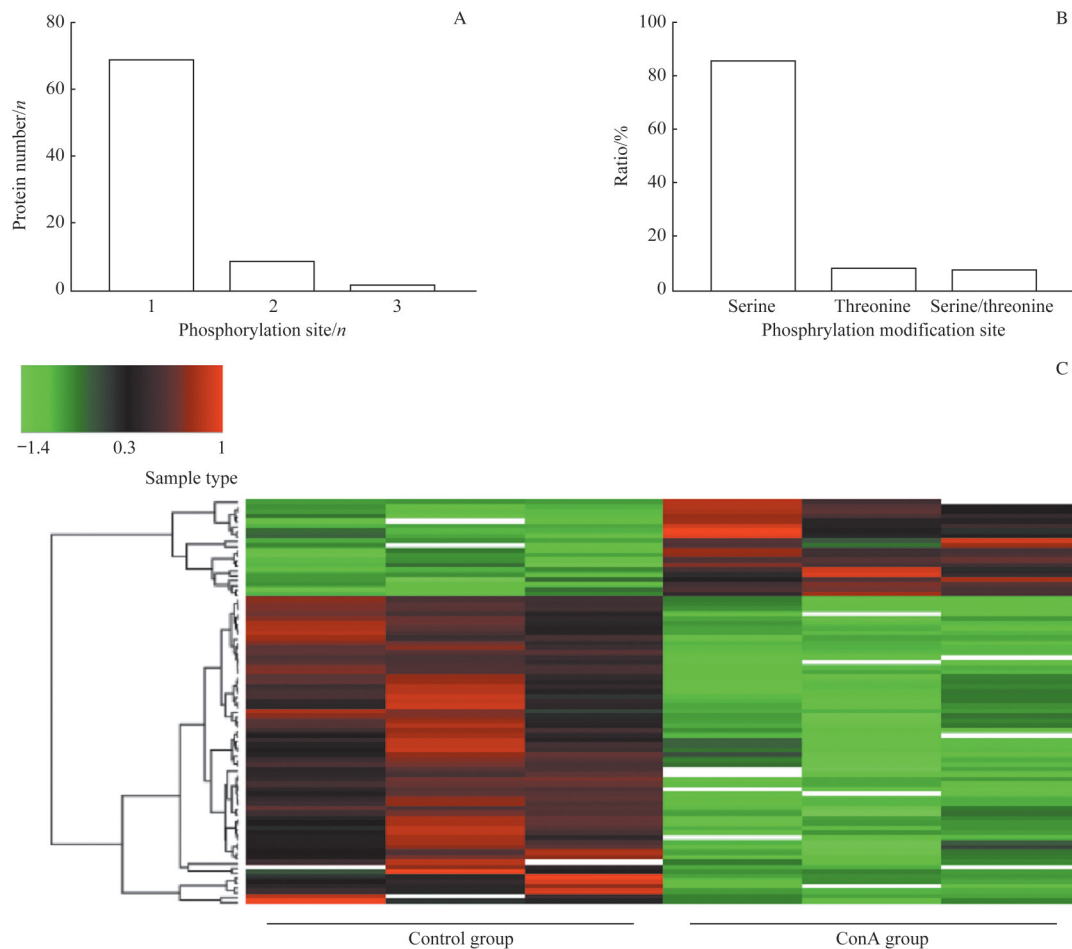
1.3 统计学分析

采用GraphPad Prism 7.0软件对研究数据进行统计分析。样本间关系采用Spearman相关性分析,肽段间关系采用Pearson相关性分析的方式,以及采用聚类后缩放(complete算法)的聚类方法,对磷酸化修饰肽段进行聚类分析,颜色比对范围从-1.5~2.0。通过非配对的双侧Student's *t*检验,统计2组哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)磷酸化肽段含量间的差异。 $P<0.05$ 表示差异具有统计意义。

2 结果

2.1 差异磷酸化蛋白质组学肽段和蛋白质分析

从细胞表型上看,加入10 μg/mL ConA作用12 h后的AML12细胞生长间隙较对照组变大,细胞干瘪、光亮度降低,并出现少量死亡细胞漂浮的现象。经过细胞蛋白裂解、酶解、肽段富集、脱盐、质谱检测后共收集到磷酸化修饰肽段11 200条,根据ConA组与对照组肽段的峰面积值和2组间峰面积比值的P值筛选出可定位定量的肽段2 685条,其中差异性调控的磷酸化修饰肽段共83条,去除种属来源非小鼠的1条,对应磷酸化蛋白77个。82条肽段中上调的磷酸化肽段20条,下调的磷酸化肽段62条。磷酸化位点在蛋白上的分布结果及各种磷酸化修饰的比例统计结果如图1A、B所示。磷酸化修饰蛋白中有1个磷酸化修饰位点的有68个,2个磷酸化修饰位点的有8个,3个磷酸化修饰位点的有1个蛋白。而这些磷酸化修饰86%发生在丝氨酸位点,7%发生在苏氨酸修饰位点。热图结果如图1C所示,ConA组与对照组的3个样品



Note: A. Results of the distribution of phosphorylation sites in proteins. B. Phosphorylation modification ratio histogram. C. Heatmap of differentially phosphorylated peptides.

图1 差异磷酸化蛋白质组学的鉴定及定量结果

Fig 1 Results of identification and quantification of differentially phosphorylated proteomics

组间聚类趋势相同, ConA 组的磷酸化肽段大部分被下调, 少部分被上调。

2.2 磷酸化修饰位点的确定

本研究获得了 ConA 诱导肝细胞损伤的所有差异性调控的磷酸化肽段的序列、对应的蛋白、磷酸化修饰方式和个数、磷酸化修饰位点在蛋白上的位置等信息。磷酸化变化最大的前 10 个蛋白的信息见表 1。在 ConA 诱导 AML12 细胞损伤过程中, 磷酸化修饰变化最大的 10 个蛋白分别是过氧化物还原酶 5 (peroxiredoxin 5, Prdx5)、mTOR、真核细胞翻译起始因子 4E (eukaryotic translation initiation factor 4E, eIF4E)、RNA 输出磷酸化适配器 (phosphorylated adaptor for RNA export, Phax)、具有序列相似性的家族蛋白 76 成员 B (family with sequence similarity 76, member B, Fam76b)、磷酸葡萄糖突变酶 1 (phosphoglucosyltransferase 1, Pgm1)、丝氨酸/精氨酸重复基

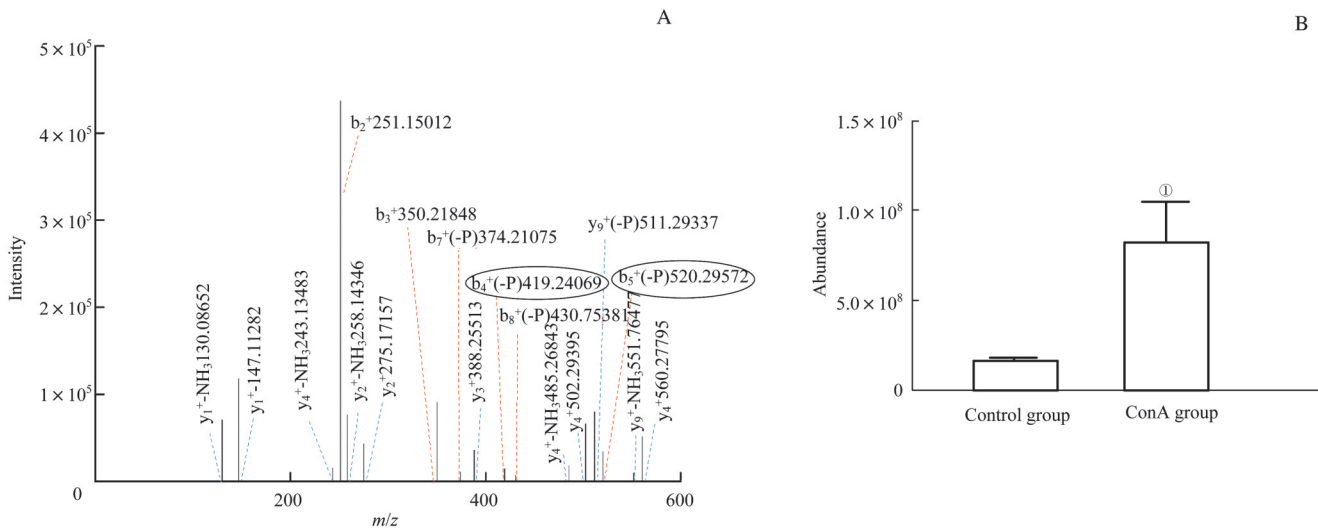
蛋白 1 (serine/arginine repetitive matrix 1, Srrm1)、真核细胞翻译起始因子 5B (eukaryotic translation initiation factor 5B, eIF5B)、AMP 激活的 $\beta 1$ 非催化亚基蛋白激酶 (protein kinase, AMP-activated, beta 1 non-catalytic subunit, Prkab1)、膜联蛋白 A13 (annexin A13, Anxa13)。

mTOR 可响应激素、生长因子、营养素、能量和应激多种信号, 是细胞代谢、生长和存活的主要调节剂^[14-15], 直接或间接调节至少 800 种蛋白的磷酸化^[16-17]。已知在动物模型中, 雷帕霉素通过抑制淋巴细胞活化来预防 ConA 引起的肝损伤^[18]。在本实验模型中 mTOR 发生磷酸化修饰的肽段序列为 [K].LHVSTINLQK.[A], 磷酸化发生在肽段序列的第 4 个丝氨酸位点上, 二级质谱图见图 2A。从二级质谱图可以看出, $b_4^+(-P)419.24069$ 和 $b_5^+(-P)520.29572$ 均发生了磷酸化。而从 mTOR 2 组间磷酸化肽段的含量比较 (图 2B) 可以看出, mTOR 的磷酸

表1 前10个差异磷酸化修饰肽段序列和修饰位点信息

Tab 1 Top ten differentially phosphorylated peptide sequences and modification site information

No.	Uniprot ID	Protein name	Sequence of peptide	Modification site	Position on protein
1	P99029	Prdx5	[K].RFSMVIDNGIVK.[A]	[S3]	[S178]
2	Q9JLN9	mTOR	[K].LHVSTINLQK.[A]	[S4]	[S1 261]
3	Q9EST3	eIF4E	[R].APSPPMQVFR.[T]	[S3]	[S563]
4	Q9JIT9	Phax	[K].CHNTPPKPEPFPGSGQK.[T]	[T4]	[T80]
5	Q80XP8	Fam76b	[K].VSSLSPQEQLWK.[Q]	[S3]	[S191]
6	Q9D0F9	Pgm1	[K].AIGGILTASHNPGGPNDFGIK.[F]	[S10]	[S117]
7	Q52K18	Srrm1	[R].HRPSSPATPPPK.[T]	[S5; T8]	[S401; T404]
8	Q05D44	eIF5B	[R].DGSEEDDNSKR.[S]	[S3]	[S165]
9	Q9R078	Prkab1	[R].SQNNFVAILDLPEGEHQYK.[F]	[S1]	[S108]
10	Q99JG3	Anxa13	[K].ERSHHHGFDADR.[D]	[S3]	[S10]



Note: A. Secondary mass spectrum of mTOR phosphorylation modified peptides. B. Comparison of total mTOR phosphorylated peptides. ① $P=0.0495$, compared with the control group.

图2 mTOR磷酸化修饰肽段二级质谱和2组间含量比较结果

Fig 2 Secondary mass spectrum of mTOR phosphorylation modified peptides and comparison between the two groups

化水平在 ConA 诱导的 AML12 细胞损伤过程中被上调 ($P=0.0495$)。

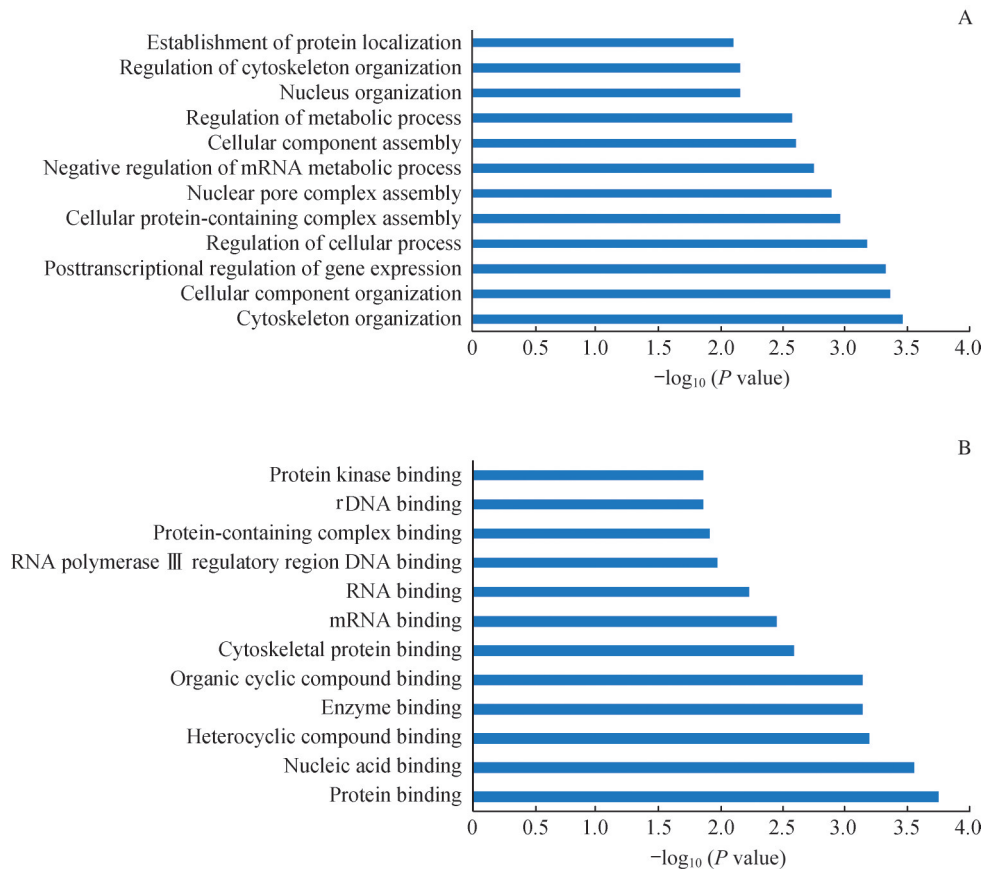
见在肝损伤过程中磷酸化修饰参与了细胞中众多的细胞内结合和细胞内成分的调节过程。

2.3 差异磷酸化修饰蛋白质功能分析

根据前述条件筛选出的磷酸化修饰肽段，通过 UniProt 2019_11 找到对应的磷酸化蛋白的官方基因代码，在 String 11.0 上对这 77 个蛋白进行生物进程、分子功能的 GO 分析，结果如图 3 所示，图中罗列了筛选的前 12 位结果。分析结果发现，在 ConA 诱导的 AML12 细胞损伤过程中，差异磷酸化修饰的蛋白主要与蛋白质结合、杂环化合物结合、DNA 结合、RNA 结合、酶结合等细胞功能相关。另外这 77 个磷酸化修饰蛋白主要参与肝细胞损伤过程中细胞的蛋白质定位，细胞骨架、细胞核、细胞成分组织，以及 mRNA 代谢、细胞代谢过程的调节。可

2.4 ConA 诱导的 AML12 细胞损伤中差异磷酸化蛋白网络构建

通过 String 11.0 对鉴定到的 77 个差异磷酸化蛋白进行蛋白互作网络构建，并使用 Cytoscape 3.7.2 软件使互作网络可视化，结果如图 4 所示。从蛋白互作关系网络可以发现该模型所鉴定到的磷酸化蛋白中，与凋亡相关的 mTOR、Crebbp、Bcl2L11、Prkab1、Snip、Taok1 等蛋白处于一个大家族通路上，mTOR 蛋白与多个蛋白具有相互作用关系，处于一个相对重要的位置。而与 RAS 激酶通路相关的 Ksr1、Ptk2b、Sorbs2、Rab12 等蛋白在另一个家族通路上。mTOR 相关通路和 RAS 激酶通路在细胞



Note: A. Differentially phosphorylated protein-related biological processes. B. Differentially phosphorylated protein-involved molecular interactions.

图3 差异磷酸化修饰蛋白GO分析结果

Fig 3 Results of GO analysis of differentially phosphorylated modified proteins

凋亡的调节中起着重要作用。mTOR是促细胞存活因子，在细胞凋亡中起着抑制剂的作用。细胞在压力应激下，随着mTOR的消耗，抑制细胞生长和增殖，并增加细胞自噬和凋亡的发生^[19-21]。RAS蛋白可能同时具有促凋亡和抗凋亡功能，具体取决于RAS效应子途径和凋亡的机制^[22]。研究结果发现ConA诱导肝细胞损伤过程中磷酸化蛋白的主要相互作用与凋亡和RAS激酶通路相关，这一结果的发现为研究肝损伤药物的通路机制提供了参考。

3 讨论

肝脏磷酸化蛋白质组学的研究方法近年来已趋于成熟，本研究建立了ConA诱导的肝实质细胞损伤的细胞模型，定位、定量在ConA诱导的肝损伤过程中发生差异磷酸化修饰的蛋白以及挖掘潜在的磷酸化修饰位点，为肝脏疾病的研究提供新的研究靶点以及通路信息。ConA是一种多克隆有丝分裂原，可通过激活T淋巴细胞诱导特定的急性肝损伤。许多小鼠谱系易受ConA影响而产生肝

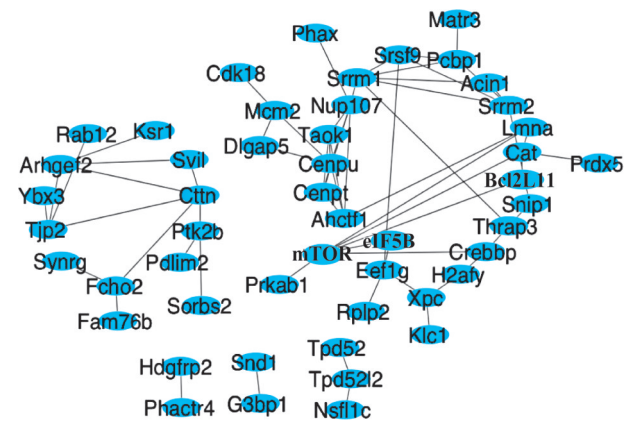


图4 差异磷酸化修饰蛋白质相互作用网络图

Fig 4 Interaction network of differentially phosphorylated modified proteins

炎。单次注射ConA可引起肝实质细胞中CD4⁺淋巴细胞、巨噬细胞和其他炎症细胞浸润，导致多种细胞因子和炎症介质的释放，并通过特定的炎症介质诱导肝细胞损伤^[23-24]。mTOR作为关键的能量传感器和细胞生长调节剂，通过形成功能独特的复合物mTORC1和mTORC2来控制蛋白质的合成、自噬和许多重要的细胞过程^[25-26]。在ConA诱导的肝损伤动物模型中，mTOR通过抑制促炎

细胞因子 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的产生抑制肝脏内淋巴细胞的增殖^[18],达到保护肝损伤的效果。本研究发现在ConA诱导的AML12细胞损伤过程中,mTOR的磷酸化水平被上调,猜测该过程可能参与了保护ConA引起的肝细胞损伤,具体机制有待进一步的研究。

肝损伤过程中包括cAMP依赖性蛋白激酶(protein kinase A, PKA)、PI3K/AKT/mTOR、蛋白激酶C异构体(protein kinase C, PKC)、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、Jun激酶(Jun kinase, JNK)和p38激酶(p38 kinase, p38K)等在内的蛋白可以通过可逆的磷酸化和去磷酸化过程来调节细胞的增殖、凋亡和自噬^[27]。对蛋白质功能调控相关的磷酸化修饰进行研究,可以发现细胞在受到ConA刺激之后的信号转导和功能蛋白活性发生改变;该发现对于进

一步研究ConA诱导的肝损伤动物模型具有重要参考价值。从富集到的差异磷酸化修饰蛋白的互作网络可以看出肝细胞损伤过程中差异磷酸化修饰主要发生在凋亡通路以及RAS激酶通路上,提示我们在对肝损伤保护药物的开发研究中可以参考该蛋白互作关系进行针对性研究。mTOR蛋白在该蛋白互作关系网络中处于关键的位置,且在ConA动物模型中对肝损伤具保护作用,提示可以在将来的研究中将mTOR蛋白以及凋亡通路中其上下游蛋白列为重点研究对象。由于非标定量法未对靶点进行标记,存在定量上的缺陷,未来的研究中我们将采用靶向蛋白定量的方法对结果进行进一步的验证。

本研究提供了肝实质细胞在肝损伤过程中发生差异磷酸化修饰的蛋白的分子功能、生物进程、相互作用关系网络以及磷酸化修饰位点的信息,可为肝脏疾病的研究提供靶点信息。

参·考·文·献

- [1] Singh V, Ram M, Kumar R, et al. Phosphorylation: implications in cancer[J]. *Protein J*, 2017, 36(1): 1-6.
- [2] Ardito F, Giuliani M, Perrone D, et al. The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review)[J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40(2): 271-280.
- [3] Tomasi ML, Ramani K. SUMOylation and phosphorylation cross-talk in hepatocellular carcinoma[J]. *Transl Gastroenterol Hepatol*, 2018, 3: 20.
- [4] Humphrey SJ, James DE, Mann M. Protein phosphorylation: a major switch mechanism for metabolic regulation[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2015, 26(12): 676-687.
- [5] Gordillo M, Evans T, Gouon-Evans V. Orchestrating liver development[J]. *Development*, 2015, 142(12): 2094-2108.
- [6] Pagano MA, Tibaldi E, Gringeri E, et al. Tyrosine phosphorylation and liver regeneration: a glance at intracellular transducers[J]. *IUBMB Life*, 2012, 64(1): 27-35.
- [7] Jiang YP, Ballou LM, Lin RZ. Rapamycin-insensitive regulation of 4E-BP1 in regenerating rat liver[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(14): 10943-10951.
- [8] Palmes D, Zibert A, Budny T, et al. Impact of rapamycin on liver regeneration[J]. *Virchows Arch*, 2008, 452(5): 545-557.
- [9] Cavada B, Pinto-Junior V, Osterne V, et al. ConA-like lectins: high similarity proteins as models to study structure/biological activities relationships[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 20(1): 30.
- [10] Sakamoto T, Ezure T, Lunz J, et al. Concanavalin A simultaneously primes liver hematopoietic and epithelial progenitor cells for parallel expansion during liver regeneration after partial hepatectomy in mice[J]. *Hepatology*, 2000, 32(2): 256-267.
- [11] Erhardt A, Biburger M, Papadopoulos T, et al. IL-10, regulatory T cells, and Kupffer cells mediate tolerance in concanavalin A-induced liver injury in mice[J]. *Hepatology*, 2007, 45(2): 475-485.
- [12] 董洪霜, 张静娴, 胡青, 等. 基于纳升高效液相色谱-四极杆-线性离子阱-静电场轨道阱高分辨质谱技术研究广西地龙的蛋白质[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(2): 324-331.
- [13] Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D607-D613.
- [14] Jacinto E, Facchinetti V, Liu D, et al. SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity[J]. *Cell*, 2006, 127(1): 125-137.
- [15] Brugarolas J. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex[J]. *Genes Dev*, 2004, 18(23): 2893-2904.
- [16] Hsu PP, Kang SA, Rameseder J, et al. The mTOR-regulated phosphoproteome reveals a mechanism of mTORC1-mediated inhibition of growth factor signaling[J]. *Science*, 2011, 332(6035): 1317-1322.
- [17] Di Conza G, Trusso Cafarello S, Loroch S, et al. The mTOR and PP2A pathways regulate PHD2 phosphorylation to fine-tune HIF1 α levels and colorectal cancer cell survival under hypoxia[J]. *Cell Rep*, 2017, 18(7): 1699-1712.
- [18] Zhang YQ, Xiao X, Li XC, et al. Rapamycin prevents concanavalin A-induced liver injury by inhibiting lymphocyte activation[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 24(8): 1457-1462.
- [19] Yan XT, Sun YS, Ren S, et al. Dietary α -mangostin provides protective effects against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice via Akt/mTOR-mediated inhibition of autophagy and apoptosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(5): 1335.
- [20] Xia J, Luo Q, Huang SB, et al. Alisol B₂₃-acetate-induced HepG2 hepatoma cell death through mTOR signaling-initiated G₁ cell cycle arrest and apoptosis: a quantitative proteomic study[J]. *Chin J Cancer Res*, 2019, 31(2): 375-388.
- [21] Liu GB, Pei F, Yang FQ, et al. Role of autophagy and apoptosis in non-small-cell lung cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(2): 367.
- [22] Pylyayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(11): 761-774.
- [23] Wetzel CC, Leonis MA, Dent A, et al. Short-form Ron receptor is required for normal IFN- γ production in concanavalin A-induced acute liver injury[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, 292(1): G253-G261.
- [24] Schümann J, Wolf D, Pahl A, et al. Importance of kupffer cells for T-cell-dependent liver injury in mice[J]. *Am J Pathol*, 2000, 157(5): 1671-1683.
- [25] Jiang X, Feng S, Chen YL, et al. Proteomic analysis of mTOR inhibition-mediated phosphorylation changes in ribosomal proteins and eukaryotic translation initiation factors[J]. *Protein Cell*, 2016, 7(7): 533-537.
- [26] Hresko RC, Mueckler M. mTOR·RICTOR is the Ser⁴⁷³ kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(49): 40406-40416.
- [27] Song BJ, Akbar M, Abdelmegeed MA, et al. Mitochondrial dysfunction and tissue injury by alcohol, high fat, nonalcoholic substances and pathological conditions through post-translational protein modifications[J]. *Redox Biol*, 2014, 3: 109-123.

[收稿日期] 2020-02-14

[本文编辑] 徐 敏