

# 磷酸化蛋白质组学在药物研究中的应用进展<sup>Δ</sup>

王冬<sup>1\*</sup>, 郑礼胜<sup>2</sup>, 雷勇胜<sup>2</sup>, 钱钧强<sup>1</sup>, 王晨<sup>1#</sup> (1.天津医科大学肿瘤医院/国家肿瘤临床医学研究中心/天津市肿瘤防治重点实验室, 天津 300060; 2.天津药物研究院有限公司, 天津 300193)

中图分类号 R915 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)30-4311-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.30.49

**摘要** 目的:了解磷酸化蛋白质组学在药物研究中的应用现状,为促进其更好地服务于药物研究提供参考。方法:查阅近年来国内外相关文献,对磷酸化蛋白质组学在药物研究中的应用进展进行归纳和总结。结果与结论:磷酸化蛋白质组学虽然是蛋白质组学的一个新分支,但却明显有别于蛋白质组学,主要体现在其调节生命活动方面。药物研究过程中的几个重要方面包括目标识别、作用机制阐明、信号网络构建、药物重新定位和复合分层、药物毒性预测、药效学和目标接触生物标志物识别以及患者的分层等,而在计算机软件分析的帮助下,利用磷酸化蛋白质组学技术有助于以上各个方面研究的顺利开展。磷酸化蛋白质组学技术在药物研究过程中正在发挥越来越重要的作用。

**关键词** 磷酸化蛋白质组学;药物研究;应用;进展

磷酸化蛋白质组学是研究蛋白质磷酸化过程的科学,包括氨基酸残基磷酸化程度及细胞受刺激后动态的蛋白磷酸化事件。蛋白质的磷酸化修饰是生物体内重要的在翻译中或翻

译后进行的共价修饰方式(磷酸化、糖基化、泛素化等)之一,其磷酸化位点主要发生于酪氨酸、丝氨酸和苏氨酸残基侧链的羟基上。蛋白质的磷酸化和去磷酸化这一可逆过程几乎调

格?如何检验?反馈3:应借助各种分析仪器进行操作。带教教师应把重点放在实验步骤、方法和注意事项上,准确示范、规范操作,重点抓动手能力的培养。检验结果出来后,实习生还应根据数据进行分析,并将分析结果反馈给带教教师。

### 3 结果与讨论

从2013年3月开始,我院药学部门采用“问答式”实习带教方式,涉及药学及相关专业实习生共计18人,带教教师10人。笔者就“问答式”实习带教整个轮转过程,进行满意度问卷调查,调查对象包括实习生(18人)、带教教师(10人)、药学各部门(7个)负责人以及患者,结果见表2。

表2 “问答式”实习带教模式满意度调查结果

Tab 2 Satisfaction survey of question-and-answer practice teaching

调查对象	情况反馈	满意度[人(%)]		
		非常满意	满意	不满意
实习生	带着问题有针对性地实习,巩固了理论知识,熟练了实践操作,调动了自身积极性,愿意主动去学习更多的专业知识	14(77.8)	3(16.7)	1(5.5)
带教教师	在带教过程中提高了自己的业务水平,积累了丰富的带教经验	8(80.0)	2(20.0)	0(0)
药学各部门负责人	融合了实习带教及员工岗前培训的经验,对部门业务水平提高有一定的帮助	5(71.4)	2(28.6)	0(0)
患者	实习生勇于大胆交流,使患者用药咨询问题得到及时解决,对患者及临床都有适当的帮助	76(76.0)	24(24.0)	0(0)

从表2中可见,带教教师、药学各部门负责人及患者对于该带教方式的满意度均为100%,实习生仅有1位不满意,原因主要是个人身体状况不能胜任实习工作。

对于药学各部门来说,实习生在整个实习过程中的作用

也是举足轻重的。门急诊药房工作人员直接面对的是患者,实习生从学校带来的理论知识是较新的,结合实际工作,实习生可以给患者提供基本的用药咨询;在制剂室,实习生的一些建议如通过配制制剂时操作上一些细微调整就可能提升制剂质量;在临床药学室,由于实习生的参与,日常点评工作及不良反应收集等首先在“量”上有了突破,不合理用药情况也能及时反馈给医师,做到了临床药学真正服务于临床。

综上所述,“问答式”实习带教方式可以充分调动实习生的积极性和工作热情,不仅加强了其对理论知识的理解,还锻炼了其在药学各部门工作的能力,为毕业后踏入相关岗位奠定了坚实的基础。带教教师在整个带教过程中与实习生一起发现问题、解决问题,并采纳合理的建议,不仅有利于自身业务素质及带教水平的提高,也对各部门总体业务水平提高有所帮助。对于患者来说,实习生可塑性强、勇于交流、具有亲和力,能及时解决患者的用药咨询等问题,也受益匪浅。

### 参考文献

- [1] 邢茂,王琴,胡雪莲,等.药学专题实习带教方法探讨[J].中国药房,2013,24(32):3071.
- [2] 李稻,韩玉慧,蒋益,等.医学基础教育中PBL和CBL两种教学模式的实践与体会[J].中国高等医学教育,2010,21(2):108.
- [3] 李湘宏,刘莉萍,梁光荣,等.学导式教学法结合CAI教学在中药实习带教中的应用研究[J].中国医药指南,2012,10(17):384.
- [4] 钱慕仪.提高药学实习带教质量的实践与思考[J].中国医药导报,2010,7(7):100.
- [5] 陈霞.医院制剂室在实习带教中的作用[J].实用药物与临床,2009,12(5):382.

(收稿日期:2014-11-09 修回日期:2015-08-17)

(编辑:刘明伟)

Δ 基金项目:天津市中医药管理局科研专项课题(No.13140)

\* 主管药师,硕士。研究方向:药物分析。电话:022-23340123-5104。E-mail:lvn1314@126.com

# 通信作者:主任药师,硕士。研究方向:医院药学。电话:022-23340123-5104。E-mail:jikeyi789@126.com

节着包括细胞的增殖、发育、生长、分化、信号转导、凋亡和神经活动、肌肉收缩及肿瘤发生等所有生命活动<sup>[1]</sup>。目前已知有许多人类疾病是由于某些异常的蛋白质磷酸化修饰所引起,而同样的,某些疾病也会导致细胞内一些蛋白质磷酸化修饰的异常。将高通量的磷酸化蛋白质组学技术与完善的药物基因组学和药物遗传学测量技术相结合,有助于加快药物的研究进度。例如,基因突变引起的磷酸化信号的特异性表达已被证明是几种类型癌症的驱动机制,基于此,Raf激酶抑制剂(如Sorafenib)、间变性淋巴瘤激酶(ALK)抑制剂(如Crizotinib)和表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂(如Erlotinib)才被证明在治疗多种癌症方面具有疗效。通过了解磷酸化信号在癌症、免疫细胞激活等方面的变化,药物开发人员可以选择出更好的靶细胞,以及更好地理解各种治疗方法将如何改变细胞的生命过程。

近年来出现了多种磷酸化蛋白质组学技术<sup>[2-4]</sup>,其已经成为药物开发和生物标记物发现的重要工具。磷酸化蛋白质组学虽然是蛋白质组学的一个新分支,但却明显有别于蛋白质组学,主要体现在其调节生命活动方面。鉴于磷酸化蛋白质组学技术的方法、手段(如磷酸化蛋白质、多肽的富集分离方法,肽段的鉴定及相应计算机软件的开发,蛋白、多肽定量技术等)及其相应的仪器设备等方面的研究进展已有多篇文献综述报道<sup>[5-10]</sup>,本文着重就如何在计算机软件分析的帮助下,利用现代磷酸化蛋白质组学技术帮助实现药物研究过程中的目标识别、作用机制(MOA)阐明、信号网络构建、药物重新定位和复合分层、药物毒性预测、药效学和目标接触生物标志物识别以及患者的分层等方面的研究进展,进行回顾、总结和综述。

## 1 药物靶点的发现和确认(目标识别)

与目标识别相关的磷酸化蛋白质组学研究主要是借助比较正常与病变本来识别与疾病相关的磷酸化信号靶点。通过检查正常和病变细胞或组织中蛋白质磷酸化状态的不同,可以识别疾病特异性表达的蛋白或信号通路。Huang PH等<sup>[11]</sup>通过定量质谱(MS)法分析识别了具有不同程度表皮生长因子受体 III 型突变体(EGFRv III)突变的U87MG胶质母细胞瘤细胞系中的重要酪氨酸磷酸化位点,在相关研究中Chumbalkar V等<sup>[12]</sup>还确定了磷酸化蛋白质组学的变化与另一个经常在胶质母细胞瘤中观察到的EGFR的突变有关。由于MS法对成本和样品的要求,Du JY等<sup>[13]</sup>建议限制测定酪氨酸激酶的磷酸化位点,转而利用复合磁珠方法(Multiplexed bead-based approach)进行靶点的发现和确认。

蛋白质微阵列也被用于目标识别,它们可以在各种实验条件下用于筛选大量的患者组织或细胞系,并揭示正常和病变组织在信号机制方面的关键性差异。Tworokski K等<sup>[14]</sup>报道了商业抗体微阵列被用来筛选25种黑色素瘤细胞菌株并识别潜在的治疗靶点。在另一项研究中,一个定制的反向阶段蛋白质阵列(RPPA)被用来筛选118例预后不良的B细胞前体急性淋巴细胞白血病(BCP-ALL)患者中的92种关键信号蛋白,并识别那些异常激活的蛋白<sup>[15]</sup>。国内学者在此方面也做了较多探索。程娟等<sup>[16]</sup>通过对15例系统性红斑狼疮(SLE)患者和15例健康受试者的外周血单个核细胞(PBMCs)的磷酸化蛋白质组学分析,并进行磷酸化肽段和磷酸化位点鉴定以及生物信息学分析,得到了与正常人存在差异的1 035个磷酸化位

点,与标注蛋白对应的基因有618个;共筛选出12条代谢通路,其中丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)通路包含的差异磷酸化位点最多。并据此得出,SLE患者PBMCs具有差异的磷酸化蛋白质及肽段,与代谢通路一并可作为SLE发病机制研究的参考,并可作为药物治疗的靶点进行验证。高彩云<sup>[17]</sup>通过深入研究轴突生长锥的磷酸化蛋白质组学,运用生物信息学软件GPS2.1和Scansite 3预测了CDK5激酶的磷酸化位点,并绘制了CDK5在轴突生长锥的底物图谱,而且对预测的CDK5重要底物位点进行了体外激酶反应验证。该研究为系统揭示核心激酶CDK5在神经元轴突调节中的分子机制提供了依据,为全面理解CDK5对神经元轴突的调节机制奠定了基础,为解决神经损伤和神经系统退行性疾病提供了新的药物治疗靶点,为开发和设计有利于神经再生的药物提供了新思路。

## 2 了解药物的MOA

高通量磷酸化蛋白质组学技术的应用关键是通过确定磷酸化蛋白质对一些细胞和患者样本的信号网络的影响来阐明药物如何影响信号活动。不少研究组已用定量MS技术详细研究了ABL激酶抑制剂(如Dasatinib,Imatinib等)对某些相关细胞的磷酸化蛋白质组的影响<sup>[18-20]</sup>。同样,一些学者也在磷酸化蛋白质组学技术帮助下研究了热休克蛋白90(Hsp90)和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)抑制剂的MOA<sup>[21-22]</sup>。

基于xMAP<sup>®</sup>或蛋白质阵列技术的磷酸化蛋白质技术可以用来识别药物诱导的细胞信号机制的改变。例如,xMAP<sup>®</sup>技术已经被用于比对不同的抗肿瘤药物是如何影响经不同的生长因子和细胞因子处理时肝癌细胞株的信号网络<sup>[23-26]</sup>。Huang JG等<sup>[27]</sup>采用磷酸化蛋白质组学方法,利用双向电泳和质谱分析鉴定了雌激素调节的细胞核磷酸化蛋白质,在雌激素处理24 h后,鉴定出7个表达上调的蛋白质,这些蛋白质涉及翻译起始因子、三磷酸鸟苷(GTP)结合的核蛋白、热休克蛋白、泛素-蛋白酶体系统,从而揭示了雌激素影响奶牛乳腺上皮细胞核磷酸化蛋白质的MOA,为进一步研究牛乳合成的分子机制提供一个新的途径。

## 3 信号网络的建设

了解细胞信号网络有助于针对信号网络失调疾病及相关药物的研究,并且可以帮助研究者实现目标识别以及了解药物的MOA。传统认为,信号网络是从通过挖掘文献及筛选路径数据库中获得,然而,磷酸化蛋白质组学技术的最新研究显示,文献来源的信号通路和实验验证的信号活动之间存在着显著差异<sup>[28-29]</sup>。在这方面,计算工具已经通过使用逆向工程或模型训练的方法建立磷酸化蛋白质组学数据模型,并将其应用于构建信号通路的过程中去。这些技术通常需要在特定的小分子激酶抑制剂存在的条件下,并受多个激活因子刺激(如细胞因子和生长因子等),然后收集细胞中的磷酸化蛋白质数据,再通过统计学方法推断蛋白质信号之间的联系,或通过选择最优的网络(从标准的信号网络推导出一套可能的网络数据或蛋白质相互作用数据),来构建一个磷酸化蛋白质数据网络<sup>[29-33]</sup>。源于这些方法构建的信号通路均具有可靠的磷酸化蛋白质组学的实验验证,并且可以特定于一种疾病或细胞类型。由于这种应用程序需要测量许多样品中一组特定的磷酸化蛋白质,因此xMAP<sup>®</sup>或RPPA技术则被用来测量经过细胞因子等处理的细胞中的这些动态激活位点<sup>[24]</sup>,然后通过逆向工程算法<sup>[33-34]</sup>或一个基于逻辑框架<sup>[23,26,29-30,35]</sup>的优化程序来推断信

号网络。如果根据已知的数据表明它们没有功能,假设信号将被删除,从而所查询的特定细胞类型的网络预测信号机制也将失效。

尿毒症是慢性肾功能衰竭进入终末期阶段时出现的一系列临床表现所组成的综合征,具有很高的致死率,然而目前其病理学机制仍不十分清楚。张扬<sup>[36]</sup>采用TiO<sub>2</sub>磁珠富集技术结合LTQ-Orbitrap XL质谱装置,对11名行维持性血液透析的尿毒症患者和11名健康志愿者的PBMCs进行磷酸化蛋白质组学研究。通过生物信息学分析,一共鉴定出458个特异非冗余的差异磷酸化修饰位点,以及相对应的480个基因。通过对差异磷酸化位点的对应基因进行基因本体分析发现,在尿毒症患者PBMCs中细胞的组成、核酸的代谢和运输以及多细胞有机体的发育是重要的过程;细胞质基质、细胞骨架和质膜等细胞组分中含有较多的差异磷酸化位点对应基因;而酶催化作用的激活以及蛋白质、核苷酸和核酸之间的粘连也与磷酸化修饰作用密切相关。与基因本体分析类似,将差异基因使用GenMAPP v2.1软件向“京都基因和基因组百科全书”(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数据库映射,并对代谢通路做统计检验,以 $P < 0.05$ 为标准,共筛选到32个代谢通路和135个包含差异磷酸化位点的基因。结果表明,肌动蛋白细胞骨架调控通路、MAPK信号通路、剪接体、黏着斑等是尿毒症患者PBMCs中重要的代谢通路,可能与差异基因的表达有关。同时整合3种不同的相互作用关系:(1)KEGG数据库中基因之间的蛋白互作、基因调控、蛋白修饰等关系;(2)已有的高通量试验(如酵母双杂交试验等)证实的蛋白-蛋白相互作用;(3)已有文献报道中提到的基因之间的相互作用。然后通过综合考虑以上3种数据结果,将其整合为基因间的相互关系网络,网络中连接度高的基因,称为中心基因。得到的基因网络图中,Src激酶、丝氨酸/精氨酸相关核基质蛋白1抗体(Serine/arginine repetitive matrix 1, SRRM1)和重组人组蛋白去乙酰化酶1(Recombinant Human Histone Deacetylase 1, HDAC1)具有高连接度,可以认为是中心基因。这些基因与尿毒症患者PBMCs的磷酸化修饰作用密切相关,可能对尿毒症病情的加剧具有一定的调控作用。

张媛媛<sup>[37]</sup>利用生物信息学研究方法,构建了猪精子磷酸化蛋白调控网络并进行了关键磷酸化蛋白生物学功能预测,通过蛋白质间相互作用构建了包括精子运动及酶活性的涵盖100多种蛋白质信号的网络图,成功建立了猪精子磷酸化蛋白质组学平台技术,首次得到猪获能精子磷酸化蛋白质组学及差异酪氨酸磷酸化蛋白数据,有利于确定参与精子获能过程信号转导途径新的关键成员,为哺乳动物精子受精的分子机制及获能过程相关信号通路研究奠定了理论基础及技术方法,为进一步开展哺乳动物精子磷酸化蛋白质重要信号分子调节通路及受精分子机制研究提供了科学依据。

为了筛选鼻咽癌EGFR信号通路中磷酸化激活的信号分子,揭示EGFR在鼻咽癌发病中的MOA,阮林<sup>[38]</sup>进行了鼻咽癌EGFR信号通路的磷酸化蛋白质组学研究,在鼻咽癌CNE2细胞中鉴定了16个EGFR活化相关的酪氨酸磷酸化蛋白质;发现并证实ANXA3、KRT8和KRT18为EGFR信号通路相关的酪氨酸磷酸化蛋白质;基于鉴定的酪氨酸磷酸化蛋白质,构建了鼻咽癌细胞EGFR相关的酪氨酸磷酸化蛋白质的信号通路网络。在此基础上,利用磷酸基团金属亲和纯化技术

(PMAC)、二维荧光差异凝胶电泳技术(2-D DIGE)、磷酸化蛋白特异性荧光染色和磷酸化修饰位点分析软件预测等方法,鉴定了32个鼻咽癌细胞EGFR信号通路相关的磷酸化蛋白质,发现了27个新的EGFR信号通路相关的磷酸化蛋白质;基于鉴定的EGFR信号通路相关的磷酸化蛋白质,建立了EGFR信号通路相关磷酸化蛋白质的信号网络。其研究结果不仅丰富了EGFR信号通路网络,而且为揭示EGFR在鼻咽癌发生发展中的MOA提供了新的依据。

#### 4 药物重新定位和复合分层

药物重新定位的过程是指识别新的或其他疾病适应证的药物,该药物已被证明是安全的,但在临床中不一定是有效的。因此,药物重新定位也可以应用到复活某些由于功效问题而淘汰的药物。在这些情况下,磷酸化蛋白质组学可以用来针对疾病的MOA匹配药物和靶点。例如,Weber C等<sup>[39]</sup>采用MS技术证明了Erlotinib和Gefitinib对Src激酶家族和Bruton's酪氨酸激酶(Btk)家族的活性,这些药物对急性髓系白血病患者具有意想不到的效果。如果需要更高的样品处理量(即从药物库中重新定位),相应的研究方法可以采用xMAP<sup>®</sup>或RPPA平台进行。

磷酸化蛋白质组学技术也可以用于药物的复合分层。在这些应用中,药物的分子结构和其对磷酸化蛋白质组的影响之间的关系是确定的。Christensen GL等<sup>[40]</sup>采用MS方法确定了选择性和非选择性的G-蛋白-偶联受体(GPCR)激动剂(如血管紧张素II 1型受体激动剂等)影响的差异,以及利用血细胞计数来比较几个JAK抑制剂对经过12种细胞因子刺激后的14种不同PBMCs类型的14个磷酸化位点的影响<sup>[41]</sup>。

#### 5 药物毒性预测

药物毒性特别是肝、肾毒性是药物发现过程中的主要问题,也是药物退出市场的常见原因。磷酸化蛋白质组学技术可以补充标准的临床前和临床毒性研究,评估生物标志物(细胞色素P<sub>450</sub>、乳酸脱氢酶、转氨酶等)的释放,并以此判断哪些信号模式可以进行药物毒性预测。在这方面,xMAP<sup>®</sup>磷酸化蛋白质组学技术已被用来生成磷酸化反应特征,以便预估标准的临床前实验难以预测的特殊毒性<sup>[42]</sup>。同样,磷酸化蛋白质组学技术最近也被用来确定毒性生物标志物(与肝毒性有关的差异表达蛋白、氧化应激通路、内质网应激途径、炎症反应通路、肝癌形成和肝纤维化等),以便在进行更广泛的临床试验之前筛选出在药物发现过程中具有潜在毒性的候选化合物<sup>[43-44]</sup>。Hiyoshi M等<sup>[45]</sup>用磷酸化蛋白质组学技术研究了四氯化碳对肝脏的毒理作用,发现了一个具有肝脏保护作用的关键蛋白——左旋多巴变位酶(D-dopachrome tautomerase)。

#### 6 药效学(PD)和目标接触生物标志物识别

PD生物标志物在指导临床前及临床研究的化合物选择过程中正变得越来越重要,因为其连接着药物与细胞中的生物靶点。在实践中,近端PD生物标记物(即目标接触生物标志物)用以衡量药物与其生物靶点的直接交互作用,而远端PD生物标记物则用以捕捉疾病治疗过程中的药物依赖性<sup>[46]</sup>。对激酶类药物的发现,蛋白质底物磷酸化位点经常作为PD生物标志物的候选者。在某些情况下,目标激酶本身的自体磷酸化位点是理想的近端PD候选位点<sup>[47]</sup>。

#### 7 患者的分层

磷酸化蛋白质测量技术作为可以针对特定亚群患者对药

物反应的预测工具,已经越来越多地被肿瘤学研究所采用,并在基因和基因组的研究工作中得到印证,主要的目标是了解药物如何影响患者特定的细胞以及磷酸化生物标记物是否可以被识别,以便于预测患者应用特定药物的疗效。如RPPA已经被用于证明磷酸肌醇3激酶(PI3K)通路在不同亚型乳腺癌中的活性差异,表明其特殊路径疗法具有潜在的抗肿瘤功效<sup>[48]</sup>。Andersen JN等<sup>[49]</sup>使用基于MS的磷酸化分析技术详细描述了药物-激酶目标的相互作用。通过这些研究显示,人类癌症通路的磷酸化表征可以作为生物标志物的发现和临床试验发展的基础,并促进个体患者使用适合特定路径的药物治疗决策的发展。

## 8 总结

磷酸化蛋白质组学正逐步成为药物发现过程中重要的研究方法。目前,磷酸化蛋白质组学技术尚难以实现临床样本(如血清或血浆)分析<sup>[50]</sup>,尽管该技术可提供高质量的信息,但主要的缺点是试验过程复杂,这涉及到细胞分离、细胞破碎以及相关的ELISA或MS分析。这些复杂程序增加了实验的误差和可信度,可能会阻碍磷酸化蛋白质组学技术成为临床试验中的主流工具<sup>[50]</sup>。至于作为对患者分层诊断的工具,磷酸化蛋白质组学数据需要向社会证明其优势(如克服了复杂的检测过程等)<sup>[7]</sup>。因此,磷酸化蛋白质组学技术当前的应用领域主要集中在早期阶段,如指导PD的剂量、靶点衔接、筛选化合物库、药物重新定位、MOA和通路阐明等。

磷酸化蛋白质组学技术明显增加了数据量,需要使用系统生物学<sup>[51]</sup>和生物信息学算法<sup>[52]</sup>对大量数据进行处理。遗憾的是,目前还没有达成关于磷酸化蛋白质组学数据标准化的共识,因此需要商定通用的数据采集、分析、存储和共享的方法<sup>[53]</sup>。还需要专业的计算机知识,以便确定合适的药物发现的计算工具。例如,对于基于集群的“数据驱动”的方法,在没有事先假设要求的情况下偏最小二乘回归(PLSR)法可以选用<sup>[54]</sup>;当磷酸化蛋白质识别标志是从分类数据(如有或无应答者,正常或病理样本,安全或有毒药物,成功或失败的临床试验)中获得时,监督学习机(如支持向量机等)方法通常被认为是首选的方法;最后,当数据用于机器训练或验证计算模型(例如文献衍生途径、常微分方程模型)时,优化算法是最佳选择<sup>[23,29-31]</sup>。更进一步要求,这些计算模型应该不仅要能够处理从其他技术中获得的数据集,也应该可以处理从文献中或研究者的实践中得到的多样化数据。

确定新的目标、构建正常和病理通路、患者的分层、MOA阐明、重新定位药物以及预测疗效和毒性是拓宽药物发现渠道的主要标志。磷酸化蛋白质组学技术的进步使得药物发现过程有了新的方法,重要的决定可以依赖信号活动的测量结果作出。虽然实验和计算方法还相对不成熟,磷酸化蛋白质组学测定技术的重要性却在药物研究过程中被广泛接受。随着其样本和信号处理量的进一步发展,以及功能强大并能够分析不同数据集的计算方法的不断开发,磷酸化蛋白质组学技术必将成为药物研究的宝贵工具。

## 参考文献

[1] 熊继先.磷酸化蛋白质组学新方法的研究与应用[D].长沙:湖南师范大学,2010.  
[2] Kettenbach AN, Sano H, Keller SR, et al. SPECHT-single-stage phosphopeptide enrichment and stable-isotope

chemical tagging: quantitative phosphoproteomics of insulin action in muscle[J]. *J Proteomics*, 2015, 114(1):48.

- [3] Weber C, Schreiber TB, Daub H. Dual phosphoproteomics and chemical proteomics analysis of erlotinib and gefitinib interference in acute myeloid leukemia cells [J]. *J Proteomics*, 2012, 75(4):1 343
- [4] Huang ZL, Ichihara S, Oikawa S, et al. Hippocampal phosphoproteomics of F344 rats exposed to 1-bromopropane [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2015, 282(2):151.
- [5] 衣泰龙,田苗苗,杨晓明,等.磷酸化蛋白质组学的新进展及其在肝脏生理和病理机制中的应用[J]. *生物工程学报*, 2014, 30(7):1 004.
- [6] 程功,王志刚,刘彦琳,等.基于纳米结构材料的磷酸化蛋白/多肽富集和分析[J]. *化学进展*, 2013, 25(4):620.
- [7] 徐长亮,刘志红.磷酸化蛋白质组学在生命科学研究中的机遇与挑战[J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2012, 21(6):551.
- [8] 段朝军,陈主初.磷酸化蛋白质组学方法在信号网络解析中的应用[J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2008, 28(6):465.
- [9] 刘洁琼,贺智敏.磷酸化蛋白质组学技术及其在肿瘤研究中的应用[J]. *中南大学学报:医学版*, 2008, 33(7):559.
- [10] 隋少卉,王京兰,蔡耘,等.磷酸化蛋白质组学分析和定量技术的研究进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2007, 34(3):240.
- [11] Huang PH, Mukasa A, Bonavia R, et al. Quantitative analysis of EGFRv III cellular signaling networks reveals a combinatorial therapeutic strategy for glioblastoma [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(31):12 867.
- [12] Chumbalkar V, Latha K, Hwang Y, et al. Analysis of phosphotyrosine signaling in glioblastoma identifies STAT5 as a novel downstream target of EGFR [J]. *J Proteome Res*, 2011, 10(3):1 343.
- [13] Du JY, Bernasconi P, Clauser KR, et al. Bead-based profiling of tyrosine kinase phosphorylation identifies SRC as a potential target for glioblastoma therapy [J]. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(1):77.
- [14] Tworkoski K, Singhal G, Szpakowski S, et al. Phosphoproteomic screen identifies potential therapeutic targets in melanoma [J]. *Mol Cancer Res*, 2011, 9(6):801.
- [15] Accordi B, Espina V, Giordan M, et al. Functional protein network activation mapping reveals new potential molecular drug targets for poor prognosis pediatric BCP-AL-L [J]. *PLoS ONE*, 2010, 5(10):e13 552..
- [16] 程娟,马华林,戴勇.系统性红斑狼疮外周血单个核细胞磷酸化蛋白质组学研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(7):962.
- [17] 高彩云.小鼠神经元轴突生长锥CDK5相关磷酸化蛋白质组学分析[D].武汉:华中科技大学,2012.
- [18] Li JN, Rix U, Fang B, et al. A chemical and phosphoproteomic characterization of dasatinib action in lung cancer [J]. *Nat Chem Biol*, 2010, 6(4):291.

- [19] Bantscheff M, Eberhard D, Abraham Y, *et al.* Quantitative chemical proteomics reveals mechanisms of action of clinical ABL kinase inhibitors[J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(9):1 035.
- [20] Breitkopf SB, Oppermann FS, Keri G, *et al.* Proteomics analysis of cellular imatinib targets and their candidate downstream effectors[J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(11): 6 033.
- [21] Sharma K, Vabulas RM, Macek B, *et al.* Quantitative proteomics reveals that Hsp90 inhibition preferentially targets kinases and the DNA damage response [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2012, 11(3):M111.014654.
- [22] Huber A, Bodenmiller B, Uotila A, *et al.* Characterization of the rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that Sch9 is a central coordinator of protein synthesis [J]. *Genes Dev*, 2009, 23(16):1 929.
- [23] Hall DA, Ptacek J, Snyder M. Protein microarray technology [J]. *Mech Ageing Dev*, 2007, 128(1):161.
- [24] Wolf-Yadlin A, Sevecka M, MacBeath G. Dissecting protein function and signaling using protein microarrays [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2009, 13(4):398.
- [25] Saez-Rodriguez J, Alexopoulos LG, Zhang MS, *et al.* Comparing signaling networks between normal and transformed hepatocytes using discrete logical models [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(16):5 400.
- [26] Melas IN, Mitsos A, Messinis D, *et al.* Construction of large signaling pathways using an adaptive perturbation approach with phosphoproteomic data[J]. *Mol Biosyst*, 2012, 8(5):1 571.
- [27] Huang JG, 南雪梅. 雌激素处理的奶牛乳腺上皮细胞核磷酸化蛋白质组学分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2013, 40(2): 142.
- [28] Klamt S, Saez-Rodriguez J, Gilles ED. Structural and functional analysis of cellular networks with CellNetAnalyzer [J]. *BMC Syst Biol*, 2007, 1(1):2.
- [29] Saez-Rodriguez J, Alexopoulos LG, Epperlein J, *et al.* Discrete logic modelling as a means to link protein signaling networks with functional analysis of mammalian signal transduction [J]. *Mol Syst Biol*, 2009, 5(1):331.
- [30] Morris MK, Saez-Rodriguez J, Clarke DC, *et al.* Training signaling pathway maps to biochemical data with constrained fuzzy logic: quantitative analysis of liver cell responses to inflammatory stimuli [J]. *PLoS Comput Biol*, 2011, 7(3): e1 001 099.
- [31] Mitsos A, Melas IN, Morris MK, *et al.* Non linear programming (NLP) formulation for quantitative modeling of protein signal transduction pathways [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(11): e50 085.
- [32] Kholodenko B, Yaffe MB, Kolch W. Computational approaches for analyzing information flow in biological networks [J]. *Sci Signal*, 2012, 5(220):1.
- [33] Sachs K, Perez O, Pe'er D, *et al.* Causal protein-signaling networks derived from multiparameter single-cell data [J]. *Science*, 2005, 308(5 721):523.
- [34] Bansal M, Belcastro V, Ambesi-Impombato A, *et al.* How to infer gene networks from expression profiles[J]. *Mol Syst Biol*, 2007, 3:78.
- [35] Melas IN, Mitsos A, Messinis D, *et al.* Combined logical and data-driven models for linking signalling pathways to cellular response[J]. *BMC Syst Biol*, 2011, 5:107.
- [36] 张扬. 尿毒症患者外周血单个核细胞的磷酸化蛋白质组学研究[D]. 桂林: 广西师范大学, 2013.
- [37] 张媛媛. 猪获能精子磷酸化蛋白质组学鉴定及蛋白互作网络分析[D]. 上海: 上海交通大学, 2013.
- [38] 阮林. 鼻咽癌表皮生长因子受体信号通路的磷酸化蛋白质组学研究[D]. 长沙: 中南大学, 2010.
- [39] Weber C, Schreiber TB, Daub H. Dual phosphoproteomics and chemical proteomics analysis of erlotinib and gefitinib interference in acute myeloid leukemia cells[J]. *J Proteomics*, 2012, 75(4):1 343.
- [40] Christensen GL, Kelstrup CD, Lyngsø C, *et al.* Quantitative phosphoproteomics dissection of seven-transmembrane receptor signaling using full and biased agonists [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2010, 9(7):1 540.
- [41] Bodenmiller B, Zunder ER, Finck R, *et al.* Multiplexed mass cytometry profiling of cellular states perturbed by small-molecule regulators[J]. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(9):858.
- [42] Cosgrove BD, Alexopoulos LG, Hang T, *et al.* Cytokine-associated drug toxicity in human hepatocytes is associated with signaling network dysregulation [J]. *Mol Biosyst*, 2010, 6(7):1 195.
- [43] Amacher DE. The discovery and development of proteomic safety biomarkers for the detection of drug-induced liver toxicity [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010, 245(1):134.
- [44] Van Summeren A, Renes J, van Delft JHM, *et al.* Proteomics in the search for mechanisms and biomarkers of drug-induced hepatotoxicity[J]. *Toxicol In Vitro*, 2012, 26(3):373.
- [45] Hiyoshi M, Konishi H, Uemura H, *et al.* D-Dopachrome tautomerase is a candidate for key proteins to protect the rat liver damaged by carbon tetrachloride [J]. *Toxicology*, 2009, 255(1/2):6.
- [46] Wagner JA. Strategic approach to fit-for-purpose biomarkers in drug development[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2008, 48:631.
- [47] Paweletz CP, Andersen JN, Pollock R, *et al.* Identification of direct target engagement biomarkers for kinase-targeted therapeutics[J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(10):e26 459.
- [48] Creighton CJ, Fu XY, Hennessy B, *et al.* Proteomic and transcriptomic profiling reveals a link between the PI3 K pathway and lower estrogen-receptor (ER) levels and activity in ER+ breast cancer[J]. *Breast Cancer Res*, 2010,

# 文冠果的化学成分和药理作用研究进展

商庆辉\*, 孙妍(呼伦贝尔市人民医院静脉用药调配室, 内蒙古 呼伦贝尔 021000)

中图分类号 R282.71;R931.71 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)30-4316-05  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.30.50

**摘要** 目的:为文冠果的深入研究和应用提供参考。方法:系统查阅国内、外文献并进行整理和归纳,对文冠果的化学成分和药理作用研究进展进行综述。结果与结论:文冠果中含有多种类型化学成分,主要有黄酮类、三萜皂苷类、甾类、香豆素类等,并具有抗炎、抗肿瘤、抑制人类免疫缺陷病毒蛋白酶、改善学习记忆功能、抑菌、抗氧化等多方面的药理作用。进一步深入开展文冠果化学成分和药理作用的研究,对全方位综合利用文冠果这一植物资源具有重要意义。

**关键词** 文冠果;化学成分;药理作用;研究进展

文冠果(*Xanthoceras sorbifolia*)又名木瓜、文登阁、崖木瓜等,为无患子科(Sapindaceae)文冠果属(*Xanthoceras*)植物,一属一种,系落叶小乔木或灌木<sup>[1-2]</sup>。文冠果原产于我国北方,分布于秦岭、淮河以北,内蒙古以南,东起辽宁、西至青海、南至河南及江苏北部,生于海拔52~2 260米处的荒山坡、沟谷间和丘陵地带<sup>[3]</sup>。文冠果适应性强,抗旱耐寒,易繁殖,种仁含油55%,是我国特有的珍稀木本油料作物及防风固沙、治理荒漠化的优良树种。其叶片、茎枝、果壳、种仁、种皮均可入药,曾列入1977年版《中国药典》,且作为蒙药列入1984年版《中国民族药志》,主要用于治疗风湿病。文冠果仁民间多用于治疗小儿遗尿症<sup>[4]</sup>,疗效显著;同时也可提取得到质量很好的食用油,该油含有丰富的亚油酸、亚麻酸、二十碳烯酸,是人体本身不能合成的,人体缺少时则可能发生脱发及各种皮肤病等。文冠木含有的黄酮类化合物具有抗炎、抗风湿的作用<sup>[5]</sup>。文冠果叶片中含有的杨梅树皮苷具有杀菌、杀精子、稳定毛细管、止血、降胆固醇等作用<sup>[6]</sup>。文冠果花萼中含有的岑皮苷具有解热、安眠、抗痉等作用。文冠果果壳含有的文冠果皂苷E具有明显的改善学习记忆功能的作用<sup>[7]</sup>。文冠果果皮可提取糠醛,种皮和外果皮还可制活性炭。大量研究表明,文冠果提取物具有重要的药用价值和广阔的应用前景。本文拟对文冠果的化学成分和和药理作用研究进展进行综述,以期对文冠果的深入研究和应用提供参考。

## 1 化学成分

### 1.1 黄酮类

黄酮为酚酸类化合物,具有很强的抗氧化活性和保护心脑血管系统的作用。黄酮类化合物存在于文冠果叶和茎枝中,主要有黄酮醇类、二氢黄酮醇类、黄烷醇类、二氢黄酮类以及黄酮苷类化合物。研究者<sup>[8-12]</sup>分别从文冠木、文冠果壳中分离得到二氢黄酮醇类化合物2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -双氢杨梅树皮素(1)、2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -双氢槲皮素(2)、dl-白藜素(3),黄烷醇类化合物表儿茶精(4)、表没食子儿茶精(5)、表阿夫儿茶精(6)、表儿茶精-(4 $\beta$ →8,2 $\beta$ →O-7)-表儿茶精(7)和表没食子儿茶精-(4 $\beta$ →8,2 $\beta$ →O-7)-表儿茶精(8),其中化合物7是新化合物,黄酮醇类化合物<sup>[9-13]</sup>槲皮素(9)、杨梅树皮素(10)、3-O-甲基槲皮素(11),二氢黄酮类化合物柚皮素(12)、圣草素(13),黄酮苷类化合物<sup>[14-16]</sup>杨梅树皮苷(14)、芦丁(15)、山柰酚-3-O- $\alpha$ -L-吡喃鼠李糖苷(16)、山柰酚-3-O- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷(17)、异槲皮苷(18)、杨梅素-3-O-芸香糖苷(19)、槲皮素-3-O-鼠李糖苷(20),其中槲皮素-3-O-鼠李糖苷是首次从文冠果中分离得到,山柰酚-3-O- $\alpha$ -L-吡喃鼠李糖苷、山柰酚-3-O- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷、异槲皮苷、杨梅素-3-O-芸香糖苷为首次从文冠果属植物中分离得到。

### 1.2 三萜皂苷类

文冠果三萜皂苷类化合物母核多以齐墩果烷型五环三萜为主,主要存在于果实及茎枝中。文冠果中三萜皂苷类化合物具有改善东莨菪碱引起的记忆获得障碍和亚硝酸钠引起的记忆巩固障碍的作用,与含有相同剂量文冠果壳苷的文冠果果壳提取物相似,提示文冠果壳苷是其改善学习记忆功能的主要

12(3):R40.

- [49] Andersen JN, Sathyanarayanan S, Bacco AD, *et al.* Pathway-based identification of biomarkers for targeted therapeutics: personalized oncology with PI3K pathway inhibitors [J]. *Sci Transl Med*, 2010, 2(43): 43ra55.
- [50] Iliuk AB, Tao WA. Is phosphoproteomics ready for clinical research? [J]. *Clin Chim Acta*, 2013, 420(1): 23.
- [51] Bunyavanich S, Schadt EE. Systems biology of asthma and allergic diseases: a multiscale approach [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2015, 135(1): 31.
- [52] Díaz D, Esteban FJ, Hernández P, *et al.* Parallelizing

and optimizing a bioinformatics pairwise sequence alignment algorithm for many-core architecture [J]. *Parallel Comput*, 2011, 37(4/5): 244.

- [53] Saez-Rodriguez J, Alexopoulos LG, Stolovitzky G. Setting the standards for signal transduction research [J]. *Sci Signal*, 2011, 4(160): pe10.
- [54] Janes KA, Yaffe MB. Data-driven modelling of signal-transduction networks [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(11): 820.

(收稿日期:2015-01-28 修回日期:2015-09-07)

(编辑:周 箐)

\* 副主任药师, 硕士。研究方向:中药药理。电话:0470-3997662