

蛋白质组学在细胞信号通路研究中的应用

谭程宁¹, 黄靖涵², 李春红¹, 夏之宁¹, 杨丰庆^{1*}(¹重庆大学化学化工学院, 重庆 401331; ²太极集团有限公司广告公司, 重庆 401147)

摘要 细胞中各种信号转导与生物学过程密切相关, 而蛋白质在信号传导过程中起着至关重要的作用。蛋白质组学从整体水平上研究蛋白质组, 可系统地研究生物体生理生化以及疾病发生发展相关的功能性蛋白的表达, 是研究细胞信号通路的有效方法之一。目前, 蛋白质组学技术已经应用于各种信号通路研究中, 并取得了诸多进展。本文综述了蛋白质组学在肝脏疾病、肿瘤、病原微生物致病机制以及机体代谢相关通路的研究等方面的应用, 以期蛋白质组学在相关领域的进一步应用研究提供参考。

关键词 蛋白质组学; 信号通路; 应用进展

中图分类号 R341 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2017)04-0384-12

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20170402

引用本文 谭程宁, 黄靖涵, 李春红, 等. 蛋白质组学在细胞信号通路研究中的应用[J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(4):384-395.

Cite this article as: TAN Chengning, HUANG Jinghan, LI Chunhong, *et al.* Applications of proteomics in the study of cell signal pathways[J]. *J China Pharm Univ*, 2017, 48(4):384-395.

Applications of proteomics in the study of cell signal pathways

TAN Chengning¹, HUANG Jinghan², LI Chunhong¹, XIA Zhining¹, YANG Fengqing^{1*}¹ School of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University, Chongqing 401331;² Taiji Group Co., Ltd., Chongqing 401147, China

Abstract Various signal transduction pathways in cells are closely related to the biological processes, while the proteins play an important role in the process of signal transductions. Proteomics, which is one of the effective methods for the study of cell signal pathways, can conduct proteomic analysis systematically as well as explore the expression of functional proteins related to the physiological characteristics in organism and in the initiation and progression of diseases. Nowadays, proteomics has been successfully applied in the studies of many kinds of signal pathways. In this paper, proteomic study in signal pathways related to liver disease, tumors, pathogenic mechanism of pathogens and metabolism are reviewed, in order to provide a reference for future research and applications of proteomics in the related fields.

Key words proteomics; signal pathways; application advances

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81202886, No. 21275169)

细胞中各种信号转导分子相互识别、相互作用并将信号进行转换和传递从而构成了信号通路, 细胞内信号传导复杂多样, 且交叉调控相互关联。蛋白质在新陈代谢、生长发育过程以及细胞信号转导通路中发挥着至关重要的作用。例如当细胞凋亡发生时不同的热激蛋白家族成员都广泛参与凋亡

信号通路^[1]; 转化生长因子- β (transforming growth factor, TGF- β) 是信号转导通路中关键的介质, 通过结合细胞表面特异性受体而启动下游的 Smad 蛋白传导信号通路^[2]; 线粒体抗病毒信号蛋白 (MAVS) 作为一种接头蛋白在调节宿主天然免疫信号通路过程中扮演着重要角色^[3]。另一方面, 蛋白质组学从

整体水平上研究蛋白质组,可系统地研究生物体生理生化以及疾病发生发展相关的功能性蛋白的表达,其主要分析方法包括双向凝胶电泳(two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE)、酵母双杂交系统(yeast two-hybrid system)以及同位素标记相对和绝对定量技术(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)等。目前蛋白质组学已成为研究信号通路最有效的方法之一,为此,本文综述了蛋白质组学在肝脏疾病、肿瘤、病原微生物致病机制以及机体代谢相关通路研究等方面的应用,为蛋白质组学在相关领域的进一步应用研究提供参考。

1 蛋白质组学及相关研究技术

1.1 蛋白质组学

蛋白质组(proteome)是指由一种基因组或一个细胞(组织)所表达的全套蛋白质。蛋白质组学即是以蛋白质组为研究对象,分析细胞内动态变化的蛋白质的表达水平,翻译后修饰以及解蛋白质之间的相互作用等,并由此获得蛋白质水平上的关于疾病发生、细胞代谢等过程的整体而全面的认识^[4]。蛋白质组学研究可分为表达蛋白质组学、结构蛋白质组学和功能蛋白质组学3个方面。表达蛋白质组学也被称为差异蛋白质组学,是在整体水平上对细胞或组织中蛋白质表达进行定性或定量研究^[5]。例如 Lin 等^[6]运用定量表达蛋白质组学技术成功鉴定出膜联蛋白-1、膜联蛋白-2 和膜联蛋白-3,并发现这3个蛋白可作为肺腺癌淋巴结转移的分子标记物。结构蛋白质组学,主要是研究蛋白质复合体或一个细胞器内的蛋白质的结构^[7]。例如通过测定 HIV 病毒蛋白酶的精细结构,并以该酶作为靶点设计相应的抑制剂作为治疗药物^[8]。功能蛋白质组学则是研究蛋白质的功能,确定蛋白在亚细胞结构中的定位,蛋白相互作用等。功能蛋白质组学的研究一般是以细胞内的蛋白质群体为主要研究对象,重点是可能涉及到特定功能机制的蛋白质群体上,从中发现重要的蛋白质群体及其相应的活动规律,是蛋白质组学研究的最终目标^[9]。例如 Sohn 等^[10]利用功能蛋白质组学方法对三阴性乳腺癌进行研究,发现磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)信号通路可能成为治疗药物的研发靶点。

1.2 蛋白质组分析

蛋白质组的分析主要分为分离和鉴定两个步骤(图1)。用于分离蛋白质的技术主要有2-DE、亲和色谱和毛细管电泳(CE)等。基于等电点和相对分子质量大小不同而对蛋白进行分离的2-DE是最早也是最主要的方法,但其存在对低丰度和疏水性蛋白的分离能力较差、分辨率低和重复性差等缺点^[11]。在2-DE基础上发展起来的荧光差异凝胶电泳技术(2-D DIGE)是一种多通道分离技术,引入内标消除了凝胶与凝胶之间的实验误差,提高了实验结果的可靠性和重复性。相比于传统的2-DE,利用亲和色谱技术可获得高纯度的活性物质,其最大优点在于能保持生物大分子的天然活性。但所用载体较昂贵,并且只能用于分离具有特定配基的生物分子^[12]。此外,毛细管电泳具有高效、快速、经济和多模式等特点,已成为分离蛋白质等生物大分子的有效技术之一。但对于复杂样品可能存在分离不完全的现象,且重复性和灵敏度都较低。在蛋白鉴定方面,质谱技术(MS)是当前鉴定蛋白最常用、有效的方法。MS能达到蛋白质图谱分析所需的灵敏度、分辨率和速度,是蛋白质组学研究的核心工具之一^[13]。根据获得的肽谱进一步得到准确的肽序列是蛋白质组学数据处理的中心环节,因此许多计算方法以及分析软件已被运用于通过肽谱确定肽序列,大体可将其分为数据库检索、从头测序和“混合”方法等3类^[14]。

1.3 蛋白质组学研究新技术

近年来,iTRAQ、蛋白质芯片技术和酵母双杂交系统等新兴热门技术已经在蛋白组学研究中发挥着越来越重要的作用。iTRAQ技术可同时比较多达8个样品之间的蛋白表达量,该技术通常与质谱技术连用,并以其独特的优势在生命科学的各个领域得到了比较广泛的应用。例如 Deng 等^[15]采用 iTRAQ 技术分析低血糖大鼠和正常大鼠大脑中的蛋白,发现 DJ-1 蛋白在体内低血糖状态时表达上升,该蛋白能激活糖缺乏诱导的自噬。Cheng 等^[16]采用 iTRAQ 分析不同时间低温处理后杨树叶片的蛋白质组,共鉴定出114个可能与杨树对寒冷应激响应机制相关的蛋白,其中参与NO信号通路的蛋白表达发生上调,而NO能激活抗氧化酶和S-亚硝基谷胱甘肽还原酶的活性,从而减少活性氧和活性氮的毒性。Mok 等^[17]采用 DIGE 和 iTRAQ

两种方法来分析病毒模拟物 Poly I:C 转染后澳大利亚大蝙蝠狐蝠肾细胞的蛋白质组, DIGE 筛选得到 42 个蛋白, 而 iTRAQ 共获得了 104 个蛋白。另一方面, 蛋白质芯片技术亦是蛋白质研究的热门技术之一, 主要包括蛋白质微阵列、微孔板蛋白质芯片和三维凝胶块芯片等技术^[18]。例如 Shan 等^[19]应用蛋白质微阵列技术筛选非小细胞肺癌患者肿瘤睾丸抗原(cancer/testis antigens, CTAs)的自身抗体, 发现将 CTA 家族成员 NY-ESO-1、X 抗原家族成员 1(X antigen family, member 1, XAGE-1)、去整合素与金属蛋白酶 29(A disintegrin and metalloproteinase, ADAM)和黑色素瘤相关抗原 C1(melanoma-associated antigen C1, MAGEC1)的自身抗体集合在一个测试集来进行检测效果最佳。肖雪媛等^[20]应用表面增强激光解析电离飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS)蛋白质芯片技术检测不同病程的肺癌病人及正常人血清中的蛋白质组, 最终筛选出 15 个肺癌标志分子, 为肺癌研究提供了信息参

考。此外, 酵母双杂交系统是研究蛋白质间相互作用的简便有效方法, 同时又被称为“相互作用的陷阱”^[21]。Liu 等^[22]用酵母双杂交技术分析辣椒细胞中丝裂原活化蛋白激酶的激酶(MAPKK)-丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)相互作用, 结果显示一个 MAPKK 可以和多个 MAPK 发生作用, 一个 MAPK 也可以和多个 MAPKK 发生作用, 从而构成了协调的上下游信号传导的 MAPK 信号网络, 研究结果有助于进一步研究辣椒细胞中 MAPK 信号通路的功能特性。Park 等^[23]利用酵母双杂交筛选法确定 DnaJ homolog subfamily B member1(DNAJB1)是一种新型的可与丝裂原诱导基因 6(mitogen-inducible gene 6, MIG6)相互作用的蛋白。进一步研究发现, DNAJB1 可以作用于 MIG6 来调节表皮生长因子受体(EGFR)的信号通路。该研究为调节 EGFR 信号通路提供了一种新的分子机制, 即通过 DNAJB1 与 MIG6 相互作用来对 EGFR 信号通路进行调控。

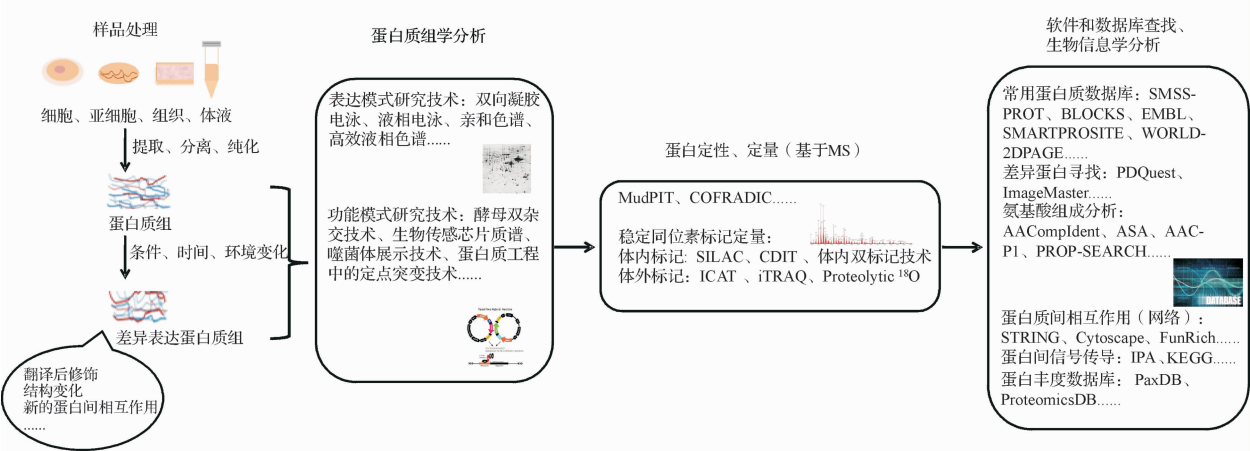


图 1 蛋白质组分析实验流程示意图

2 蛋白质组学在信号通路研究中的应用

蛋白质组学方法应用于信号转导研究, 主要表现在靶蛋白的寻找和确定、信号蛋白的定量、翻译后修饰的识别、蛋白之间相互作用等方面。一般分为两个步骤: 首先, 利用蛋白质组学技术对不同样品蛋白进行分析; 其次, 通过分析比较不同状态下差异表达蛋白并找出特异性蛋白质分子介导的信号通路及生物学功能, 从而绘制相关复杂网络信号通路。

2.1 在肿瘤研究中的应用

2.1.1 肿瘤发病机制研究 蛋白质组学为研究肿瘤的发病机制起了推动作用, 目前该技术已被广泛应用于研究肿瘤疾病的发病机制中。Hadweh 等^[24]采用酵母双杂交技术筛选能与肿瘤坏死因子受体相关因子 2 (TRAF2) 相互作用的蛋白, 结果发现丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶 4 (PP4) 的亚基 PP4R1 能与其发生作用, 并通过实验证明 TRAF6 也能与 PP4R1 发生作用。后续实验发现 PP4R1 抑制肿瘤坏死因子(TNF)激活的 NF- κ B 通路与其介

导 TRAF2 的 Ser11 去磷酸化相关,同时也证明 PP4R1 抑制潜伏膜蛋白 1 (latent membrane protein 1, LMP1) 激活 NF- κ B 与 PP4R1 干扰 TRAF6 泛素化相关。该实验确定了一个基于 PP4R1 与 TRAF2、TRAF6 相互作用的调节 NF- κ B 信号通路的新机制。另外,为研究无功能性垂体腺瘤 (NFPA) 的发病机制,Wang 等^[25]应用 2-DE 结合 MS 技术分析人体促卵泡激素 (follicle stimulating hormone, FSH) 呈阳性的 NFPA 患者垂体腺瘤组织中的蛋白质组,结果发现与糖异生、糖酵解、氧化应激、MAPK 信号通路、免疫系统信号通路、TP53 (tumor protein p53) 通路、血管内皮生长因子 (VEGF) 信号通路以及炎症通路等相关的多个蛋白的表达发生了显著变化,为治疗 NFPA 提供了相关基础。Wu 等^[26]通过 iTRAQ 定量蛋白质组学技术分析内生型 (I 型) 和外生型 (II 型) (依照骨侵袭程度分型) 斜坡脊索瘤患者组织中蛋白质组,最终共筛选得到 250 个与斜坡脊索瘤骨侵袭程度相关的蛋白。通过结合软件和进一步实验分析目标蛋白发现转化生长因子- β (TGF- β) 可能在斜坡脊索瘤的骨侵袭过程中发挥重要作用。作用机制可能与其介导的炎性细胞反应增高及细胞骨架蛋白表达下降有关,另外,PI3K-Akt-mTOR 通路可能与脊索瘤的骨侵袭发生机制有关,但 mTOR 蛋白可能与脊索瘤的骨侵袭程度无关。同时,还发现斜坡脊索瘤骨侵袭程度也与第 10 号染色体同源缺失性磷酸酶-张力蛋白 (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN) 的表达水平相关。

与良性肿瘤相比,恶性肿瘤生长速度快,呈浸润性生长,更易发生出血、坏死、溃疡等,并常有远处转移,造成人体消瘦无力、贫血、发热以及严重的脏器功能受损等,最终造成患者死亡。Peng 等^[27]利用 2-DE 在蛋白质水平研究膀胱尿路上皮癌病人和正常人的蛋白,发现磷酸甘油酸变位酶 1 (phosphoglyceromutase, PGAM1) 蛋白表达变化最为显著,进一步研究发现 PGAM1 表达减少时会导致细胞 3-磷酸甘油酸浓度增加和 2-磷酸甘油酸浓度减少,并因此抑制与肿瘤细胞增殖相关的有氧糖酵解通路和氧化戊糖磷酸通路,说明 PGAM1 有可能成为该肿瘤的一个潜在的治疗靶点。Li 等^[28]结合 iTRAQ 和 MS 研究高转移性癌细胞系和原代乳腺

癌细胞系中的蛋白质组,结果发现线粒体膜呼吸链 NADH 脱氢酶 (复合物 1) 的一个辅基——NDUFB9 [NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta sub-complex, 9.22 kD] 在高转移癌细胞系中的表达与其在原代乳腺癌细胞系中的表达相比发生下调。后续研究发现抑制 NDUFB9 的表达可以诱导激活与细胞自噬和凋亡相关的 AKT/mTOR/p70S6K (protein kinase B/mammalian target of rapamycin/ribosomal protein S6 kinase 70 kD) 信号通路,该研究结果证实了 NADH 脱氢酶的活性失调可以增强人乳腺癌细胞的侵袭这一假设。此外,为了研究皮肤瘤发展机制,Zanivan 等^[29]利用另一种蛋白质组学定量方法-稳定同位素标记技术 (SILAC) 对不同时期的皮肤瘤进行磷酸化蛋白组学分析,与之前不同的是标记物是在样品处理前引入,属于体内标记,使其标记效率不受裂解液的影响。整合磷酸化蛋白质组学结果并结合对激酶活性的预测结果发现 p21 蛋白活化激酶 4-蛋白激酶 C/原型致癌基因酪氨酸蛋白激酶 (PAK4-PKC/SRC) 信号在鳞状细胞癌中发生了变化,但其在皮肤乳头状瘤中却无变化,这些结果有助于皮肤瘤发展机制的进一步研究。

2.1.2 肿瘤治疗药物作用机制研究 蛋白质组学技术亦被用于研究治疗肿瘤药物的作用机制。Ying 等^[30]采用 iTRAQ 技术寻找肿瘤组织中与硒结合蛋白 1 (SBP1) 介导抗肿瘤作用相关的蛋白,最终发现 132 个蛋白表达发生变化,并采用 Western blot 对目标蛋白质进行验证。结果发现与脂质和糖代谢相关的许多蛋白表达发生变化,同时与糖酵解、MAPK、Wnt、Notch 和 NF- κ B、上皮间质转化 (EMT) 信号转导通路相关的一些蛋白丰度也发生了变化。这些结果揭示了一个新的 SBP1 抗肿瘤机制。土贝母皂苷甲 (TBMS1) 具有抗肿瘤作用,为研究其抗肿瘤机制,Lin 等^[31]用 SILAC 定量蛋白质组学技术分析 TBMS1 作用 NCI-H460 肺癌细胞后引起蛋白质组的变化,结果发现共有 439 个蛋白的表达发生了显著差异,结合生物信息学分析结果显示 TBMS1 主要影响一些核仁应激反应相关蛋白的表达,而核仁应激反应一般与 p53 及其相应的信号通路激活相关。此外,进一步实验证实 TBMS1 作用与 p53/鼠双微体 2 (MDM2) 通路以及和 p53 通路相关的 mTOR、NF- κ B 信号通路相关。2,5-双乙烯亚胺基-3(羟甲基)-6-甲基-1,4 苯醌 (RH1) 是

一种新型的抗肿瘤药物。为了研究肿瘤细胞对 RH1 产生获得性耐药的分子机制, Ger 等^[32]采用 nano-LC-MS 分析比较 RH1 耐药型和敏感型小鼠肝癌 MH22a 细胞系的蛋白质组, 共检测到 400 多个蛋白的表达发生显著差异。进一步用生物信息学分析丰度发生变化蛋白, 结果发现可能与 RH1 获得性耐药的相关生物学过程有细胞周期、细胞应激反应、脂肪酸代谢、糖代谢、G 蛋白耦合受体信号通路、蛋白分解代谢、异物代谢等。该研究揭示了 RH1 耐药的潜在生物标志物, 并为进一步寻找联合 RH1 用药相关的潜在靶点提供参考。

综上, 肿瘤蛋白质组学的研究对揭示肿瘤疾病发病机制和寻找肿瘤生物标志物等方面起到了积极作用, 但仍面临许多问题: 第一, 肿瘤组织中细胞种类繁多, 使得获取单一的肿瘤细胞以及制备纯化的肿瘤细胞蛋白比较困难; 第二, 即便只经短暂的体外培养, 肿瘤细胞内的关键蛋白质也可发生明显改变; 第三, 蛋白组学技术及蛋白组数据库还不成熟。因此, 进一步发展蛋白组学技术和建立完整的蛋白质数据库是今后研究的重点工作。

2.2 在肝脏疾病研究中的应用

肝病蛋白质组学研究的主要过程是描绘生理和病理条件下组织、细胞或亚细胞蛋白质复合物及体液中蛋白质表达的改变, 寻找用于早期诊断的生物标志物及药物靶标, 探索疾病发生的作用机制等。2006 年 Diamond 等^[33]对蛋白组学技术应用于研究肝功能和肝脏疾病进行了综述, 这为进一步更加深入的研究肝脏蛋白质组提供了依据。近年来, 蛋白质组学技术运用于肝脏疾病的研究逐渐增多, 它已广泛运用于肝损伤、非酒精性脂肪肝、肝细胞癌等肝脏疾病的研究当中, 同时它也逐渐成为认识肝病本质的重要手段。

2.2.1 一般性肝脏疾病研究 Vildhede 等^[34]采用蛋白组学技术分析人肝组织和从肝组织新鲜分离的肝细胞的膜蛋白质组, 结果发现在离体肝细胞中有许多质膜蛋白的表达较低, 并发现其中表达下调的蛋白主要与氧化磷酸化和线粒体功能障碍相关。而表达上调的蛋白则主要参与受氧化应激等刺激调节的真核细胞翻译起始因子 2 (eukaryotic initiation factor 2, eIF2) 信号通路、核转录因子 Nrf2 介导的氧化应激反应、蛋白降解相关的泛素化通路以及细胞的存活和增殖相关的 mTOR 信号通路。

该研究为获得与体内更加接近的体外模型提供了信息, 有助于提高肝细胞实验中对体内结果的预测。非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是一种临床病理综合征, 是发达国家和地区最常见的肝脏疾病之一, 其病变主体在肝小叶, 病理特征为弥漫性肝细胞大泡性脂肪变性和脂肪贮积。近年来, 随着人们生活水平的提高和饮食结构的改变, NAFLD 的发病率呈逐年上升趋势^[35], 然而至今仍无法得知其确切的发病机制。因此, 越来越多的研究人员致力于利用蛋白质组学方法来对 NAFLD 进行研究。Calvert 等^[36]首次对 NAFLD 病人的脂肪组织进行磷酸化蛋白质组学研究, 采用 RPPA 技术分析细胞内信号传导发现患者脂肪组织胰岛素信号通路紊乱或改变, 且相比于非酒精性脂肪性肝炎患者, 非酒精性单纯性脂肪肝患者脂肪组织胰岛素通路中蛋白质磷酸化程度更显著。Thomas 等^[37]利用 2-DDIGE 结合 nano-HPLC-MS/MS 分析患 NAFLD 小鼠的炎症和纤维化发生之前的肝脏蛋白质组的早期变化, 共检测到 49 种蛋白表达发生变化, 主要与能量代谢、蛋氨酸循环、单碳代谢、聚胺合成以及尿素循环的代谢通路相关, 为在患病早期对其进行治疗从而防止该病进一步发展提供参考。虽然脂肪肝被认为是良性病变, 但未经治疗的脂肪肝会逐渐发展为炎症细胞浸润、坏死、纤维化, 甚至可能引发肝细胞癌 (hepatocellular cancer, HCC)。

2.2.2 肝细胞癌研究 蛋白质组学也可用于研究 HCC 的发生机制。目前已报道的 HCC 病理机制的信号通路较多, 如细胞分化相关的 Wnt、Hedgehog 通路, 细胞增殖相关的 EGF、IGF、HGF、RAS 通路等 (图 2)。微小 RNA (micro RNA, miR)-17-5p 是 miR-17-92 基因簇的重要成员, 研究发现在 HCC 组织中表达较高^[38], Yang 等^[39]通过 DIGE 结合 MS 技术比较了在人肝癌 Huh-7 细胞系中 miR-17-5p 正常表达和过度表达对蛋白质表达的影响, 结果发现 miR-17-5p 过度表达会造成热休克 HSP27 蛋白表达发生上调。另外, 前期研究显示 HSP27 是 p38MAPK 的最终底物, p38MAPK 活化后可通过增加基质金属蛋白酶 2 (MMP-2) 的表达来促进癌细胞的转移^[40]。因此, 进一步对 HSP27 和 p38MAPK 的磷酸化水平以及细胞中 MMP-2 水平进行测定, 结果显示 miR-17-5p 过度表达会使细胞中 MMP-2

分泌以及 HSP27 和 p38MAPK 的磷酸化水平升高,说明 p38MAPK-HSP27 信号通路与 HCC 发生相关。研究发现 RN181 (一个 C3HC4 型锌指蛋白)可能与 HCC 发病机制相关。Wang 等^[41]通过 2-DE 和 LC-MS 技术分析 RN181 对人肝癌 SMMC-7721 细胞系蛋白表达水平的影响。结果发现与空白对照组相比,参与 MAPK 通路的蛋白表达发生变化,进一步实验发现 RN181 通过抑制肝脏细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK)/MAPK 信号通路来抑制 HCC 的发生。表皮生长因子 (EGF) 可以诱导 HCC 的发生,为了提高对 EGF 诱导的 HCC 的分子发病机制的认识,Borlak 等^[42]通过 2-DE 和 MALDI-TOF/TOF-MS 分析 EGF 过度表达的转基因小鼠和健康非转基因小鼠肝脏中的蛋白,结果共确定了 96 个受 EGF 过度表达影响的差异蛋白,其中 82 个表达发

生显著变化的蛋白参与 40 个不同的信号传导过程,包括血小板活化和聚集相关信号通路、脂蛋白信号通路、MAPK 信号转导通路、糖酵解和糖异生信号通路、氨基酸 (精氨酸和脯氨酸) 代谢信号通路和 EGFR1 信号通路。该结果为 HCC 发病机制的研究提供了新的思路并有助于研发新的治疗策略。此外,Xing 等^[43]利用 iTRAQ 定量蛋白质组学方法来研究经根治性切除手术后多发性 (multiple lesions, MC) 和单发性 (single lesion, SC) HCC 细胞总蛋白变化,结果发现分别与对应的非肿瘤组织细胞相比,MC 细胞中差异表达蛋白多集中在多聚泛素-C (polyubiquitin-C, UBC) 和 NFκB 信号通路中,而 SC 细胞中表达发生变化的蛋白多集中在 ERK 和 NF-κB 信号通路中。这些结果显示单发性和多发性 HCC 发生的分子机制可能存在不同。

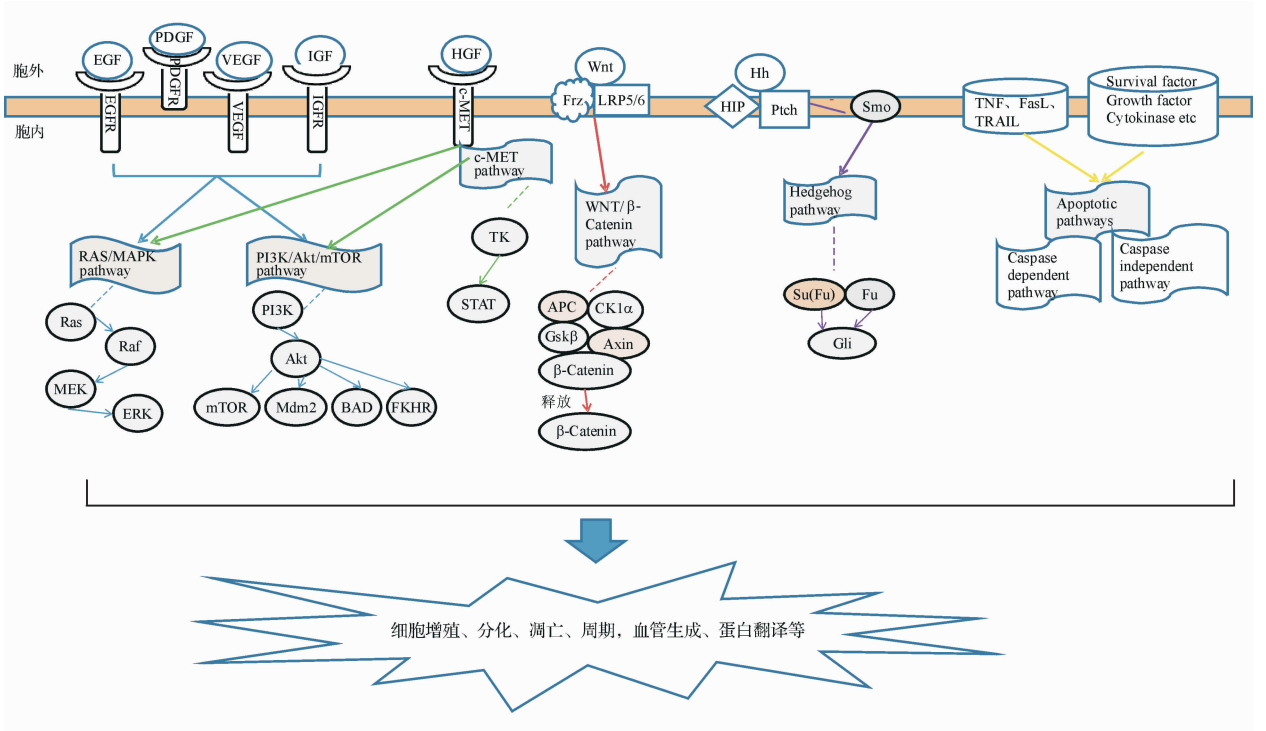


图 2 肝细胞癌发病相关的主要信号通路^[44]

2.2.3 肝脏疾病治疗药物作用机制研究 为了探究惹卓碱 (RTS, 可抑制内源性肝细胞的增生而用于肝细胞移植) 引发肝窦阻塞综合征 (HSOS) 的分子机制,Li 等^[45]采用 2-DE 结合 MS 研究口服灌胃 RTS 并引发 HSOS 初期病变后的大鼠肝组织中蛋白的表达,发现与对照组 (生理盐水) 相比,17 个蛋白表达上调,31 个蛋白表达下调,这些蛋白主要参

与细胞增殖、脂代谢、分子转运等生物学过程。生物信息学分析表明,表达下调蛋白中氨基甲酰磷酸合成酶 (carbamoyl phosphate synthetase, CPS1) 和 ATP 合酶 β 亚基 (ATP synthase subunit beta) ATP5B 及其相关通路 (尿素循环等) 可能与 RTS 的作用相关,该研究为深入探讨吡咯里西啶类生物碱作用导致 HSOS 的机制提供参考。肝癌是我国高

发且危害极大的恶性肿瘤。Liu 等^[46]研究发现番荔枝属醇提物能够减少 HepG2 肝癌细胞系存活和诱导其凋亡,通过 2-DE 结合 MS 分析显示 HepG2 细胞系中 14 个蛋白在番荔枝属醇提物的作用下发生表达变化,它们主要参与内质网应激和雌激素通路。蛋白激酶 R 样内质网激酶 (PERK) 通路是内质网应激 3 条通路之一,进一步通过 Western blot 实验证明番荔枝属醇提物作用能促进 PERK 和真核细胞翻译起始因子 2 α (eukaryotic initiation factor 2 α , eIF2 α) 磷酸化以及重链结合蛋白 (heavy-chain binding protein, BiP) 与 C/EBP 环磷酸腺苷反应元件结合转录因子同源蛋白 (C/EBP homologous protein, CHOP) 的表达上调,从而表明其可能是通过 Bip-PERK-eIF2 α -CHOP 信号通路来调节内质网应激反应。落叶松树脂醇 (LA) 也能诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡, Ma 等^[47]采用 2-DE 结合 MS 技术分析 LA 对 HepG2 细胞蛋白表达的影响,最终确定 8 个差异表达蛋白,其中 3-磷酸甘油醛、尿苷二磷酸葡萄糖 4-表异构酶、膜联蛋白 A1 表达上调,而热休克蛋白 27、结合珠蛋白、原肌球蛋白 2、微管蛋白 1A 链、BASP1 (brain acid soluble protein 1) 蛋白表达下调,这些蛋白主要参与细胞代谢、细胞增殖、细胞骨架和细胞运动。进一步对差异表达蛋白进行 STRING 蛋白网络分析发现 LA 作用与泛素通路相关。

2.3 在机体代谢研究中的应用

利用蛋白组学技术研究参与物质代谢的蛋白,可以帮助了解物质发挥作用的途径以及参与信号传导相关的酶,从而为预测药物在体内的代谢过程和深入研究其作用机制提供基础。蛋白质组学的目的是了解蛋白质功能和更全面了解蛋白质及它们的修饰和相互作用网络,而代谢组学则是要挖掘物质相关代谢途径,因此,将蛋白质组学和代谢组学技术结合起来研究代谢是未来的一个研究方向。

2.3.1 代谢性疾病研究 蛋白质是一种信号传导分子,在体内信号蛋白之间的相互作用构成了高度有序的调控网络,从而影响细胞的活动与代谢。Guo 等^[48]通过 iTRAQ 和 2D-LC-MS/MS 技术研究不同阶段糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 病人的尿糖蛋白质组,发现急性期反应蛋白、高密度脂蛋白和低密度脂蛋白组成发生了改变,该结果提示炎症反应和脂质代谢异常与 DN 的发病机制有

关。Arrabal 等^[49]用 2-DE 结合 MALDI-TOF/LC-ESI-MS 技术研究药物阻断大麻素受体 1 (cannabinoid receptor-1, CB1) 后对因饮食导致肥胖的大鼠腹部肌肉中蛋白质组表达的影响,最后确定了受饮食与 CB1 受体活性两者调控的蛋白是与糖酵解途径和三羧酸循环相关的 7 个关键酶。Chiu 等^[50]通过注射尿酸钠 (monosodium urate, MSU) 晶体来构造小鼠气囊炎症模型,采用 iTRAQ 结合 2D-LC-MS/MS 技术分析不同时间 MSU 作用后小鼠皮下气囊的蛋白。结果共定量检测到 951 个蛋白,并且与正常对照组中小鼠蛋白相比,筛选出 317 个差异表达蛋白。对这些差异表达蛋白进行分析得知其主要参与和免疫相关的补体系统以及三羧酸循环,并且深入研究发现丙酮酸羧化支路可能是抗痛风治疗的潜在代谢靶标。

2.3.2 肝代谢研究 肝脏是代谢的主要器官,是机体进行生物转化的主要场所,也是代谢研究的首选场所,而蛋白质组学是研究肝脏中物质代谢的热点之一。Ahmad 等^[51]采用 2D-DIGE 结合 MALDI TOF/TOF 研究母体饲养时缺乏维生素 B₁₂ 对出生 12 个月的大鼠的肝蛋白表达的影响。结果显示,过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR) 信号通路相关蛋白和涉及氨基酸、脂类和碳水化合物代谢的蛋白表达发生变化。PPAR 是一种核受体,能调控细胞分化、碳水化合物、脂类和氨基酸 (特别是精氨酸) 代谢的基因的表达,从而影响三大代谢^[52]。该研究说明母体缺乏维生素 B₁₂ 时通过对 PPAR 信号通路的调控影响仔鼠代谢,为进一步探究其通过调节 PPAR 的详细信号转导通路提供了基础。六溴环十二烷 (HBCD) 可影响肝功能和甲状腺激素 (TH) 状态。为了探究其对肝脏的影响,Miller 等^[53]利用 2D-DIGE 和 MS 技术探究食物中含有 HBCD 对甲状腺功能良好和减退的雌性大鼠肝脏蛋白的影响。通过比较两种状态下雌性大鼠肝脏蛋白凝胶图谱,发现 HBCD 能够影响参与糖异生、糖酵解、脂和氨基酸等代谢过程以及氧化应激反应的蛋白的表达。

在代谢研究中,将蛋白组学技术应用于肝脏药物代谢研究也是当今的一个热门领域和发展趋势。Ilavenil 等^[54]分析服用不同剂量的对乙酰氨基酚 (APAP) 对 Wistar 大鼠的影响,并分离肝组织中的蛋白质进行 2DE-MS 检测。结果显示,与正常剂量

和零剂量大鼠相比,服用高剂量 APAP 的大鼠中与氧化应激通路、尿素循环和三羧酸循环、免疫相关蛋白的表达发生上调,说明药物过量会改变肝脏中代谢和分子途径。近年来,减肥药行业发展尤为迅速,而蛋白质组学技术也越来越多的应用于研究减肥药对代谢的影响。由八味中药组成的太阴调味汤(taemjowi-tang, TH)能够对肥胖和高脂血症产生疗效,为探究其抗肥胖的作用机制, Kim 等^[55]利用 2-DE 结合 MS 技术研究高脂肪食物中包含 TH 对小鼠肝脏蛋白质组的影响,对差异表达蛋白进行分析,发现 TH 通过调节脂肪酸代谢相关蛋白质/基因发挥抑制肥胖的作用,并主要是通过腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)信号通路产生作用。松萝酸可作为具有减肥作用的膳食补充剂,但其能引发肝毒性。为研究其作用机制, Liu 等^[56]采用 2-DE 和 MS 分析大鼠口服灌胃松萝酸后肝组织中蛋白表达的变化,结果表明,差异表达蛋白大多与氧化应激、脂质代谢、NF- κ B 信号通路相关,为松萝酸引发肝毒性作用机制提供参考。Wang 等^[57]采用 iTRAQ 技术结合 2D-LC-MS/MS 分析分别服用温热中药附子、干姜、花椒 21 d 后对 SD 雌雄大鼠的影响,与空白对照相比,发现在肝脏中共有 50 个蛋白差异表达,这些蛋白主要分布在与能量代谢相关的通路中,主要途径有:丙酮酸代谢、TCA 循环、淀粉-蔗糖代谢、糖酵解/糖异生、脂肪酸代谢、类固醇激素生物合成、PPAR 通路、花生四烯酸代谢、氨基酸代谢、N-聚糖生物合成、脂肪酸生物合成、胰岛素信号通路。

2.4 在病原微生物致病机制研究中的应用

抗病毒药物和抗生素的出现可以缓解病原微生物引起的疾病,但随着一些病原微生物产生抗药性和耐药性,以及新的病原微生物不断出现,使得对病原微生物致病机制的探索仍在继续。通过对病原微生物感染的细胞、组织或对其本身的蛋白进行分析有利于了解其毒性因子及致病机制。相比于简单的免疫沉淀、pull down、同位素标记等方法,蛋白质组学方法能够更加全面深入的对引起致病的相关蛋白进行研究。

2.4.1 病毒感染研究 许多病毒感染会诱发严重的致命疾病,但研究发现蝙蝠却很少受其影响。Mok 等^[17]利用蛋白质组学技术对病毒模拟物 Poly I: C 转染澳大利亚大蝙蝠狐蝠肾细胞进行蛋白质组

学分析,结果发现与能量代谢相关的蛋白表达发生上调,而与核糖体相关的蛋白表达发生下调,原因可能是对能量的需求以及对病毒复制的抑制,免疫检测也进一步证明与能量产生相关的蛋白表达提高,该研究提供了蝙蝠细胞抗病毒反应的新见解,并突出了糖酵解代谢在蝙蝠抗病毒过程中的重要性。Sun 等^[58]采用 iTRAQ 技术分析猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)感染 Vero E6 细胞引发蛋白表达的变化,最终得到 126 个差异表达蛋白。对差异蛋白的功能进行分析发现 PEDV 感染可能与一个激酶/信号传感器和转录激活因子(JAK/STAT)信号通路相关。为了进一步研究 PEDV 潜在的作用机制并区分致命性毒性的 PEDV CH/YNKM-8/2013 和 CV777 弱毒疫苗株样感染的差异, Guo 等^[59]对两种 PEDV 感染的 Vero 细胞株进行 iTRAQ 定量蛋白质组学研究。结果显示 PEDV CH/YNKM-8/2013 通过下调 mTOR 通路和其下游靶点——相对分子质量为 70 kD 核糖体蛋白 S6 激酶(ribosomal protein S6 kinase 70 kD, p70S6K)以及真核细胞翻译起始因子 4E 结合蛋白 1(eIF4E binding protein1, 4EBP1)的活性来抑制 Vero 细胞蛋白的合成。此外,相比于 CV777 弱毒疫苗株样感染, PEDVCH/YNKM-8/2013 更易使 NF- κ B 通路激活,并引起炎症反应。这些结果促进了对 PEDV 感染的发病机制、区分不同类型感染和宿主反应的研究,同时为治疗方案的研究提供基础。Du 等^[60]结合 iTRAQ 和 2D-LC-MS/MS 技术分析马传染性贫血病病毒(EIAV)致病菌株 EIA-VDLV34(DLV34)感染马单核细胞源性巨噬细胞后引起的蛋白质组变化。结果发现这些蛋白主要涉及的信号传导过程包括:氧化磷酸化、蛋白质折叠、RNA 剪接和蛋白泛素化。Sun 等^[61]也选用 iTRAQ 对传染性法氏囊病病毒(IBDV)感染细胞后的蛋白组进行分析,结果发现与 mTOR 信号通路、PI3K/Akt 通路和干扰素信号通路的部分蛋白表达发生了变化,为进一步研究 IBDV 的感染机制提供了研究基础。

同样,蛋白质组学技术也应用于研究病毒感染人类的作用机制。Berard 等^[62]利用 SILAC 方法研究 1 型单纯疱疹病毒(HSV1)感染宿主细胞 4、10 和 24 h 后引起的蛋白表达变化,并对目标蛋白进行研究,发现这些蛋白主要参与炎症信号通路、基

因表达、基因复制、细胞运动、细胞死亡、转录后修饰等生物过程。Abraham 等^[63]采用 LC-MS/MS 法分析基孔肯雅病毒 (CHIKV) 感染人胚肾细胞 (HEK293) 后对细胞蛋白质组表达的影响, 结果共得到 1 047 个差异表达蛋白。其中表达量显著上调的 209 个蛋白主要参与转录、翻译、细胞凋亡和细胞应激反应等过程, 表达量显著下调的 45 个蛋白则与碳水化合物和脂质代谢相关, 并推测 CHIKV 作用于 HEK293 细胞的主要途径是通过影响细胞能量代谢和细胞应激反应。

2.4.2 其他微生物感染研究 除病毒感染外, 细菌和真菌感染也会引发一系列疾病。为研究引起人上呼吸道感染的一种常见病原菌——不可分型流感嗜血杆菌 (non-typeable haemophilus influenza,

NTHi) 的感染机制, Preciado 等^[64]用 SDS-PAGE、线性离子阱-质谱 (LTQ-MS/MS) 分析 3 个独立批次 NTHi 裂解液的蛋白组成, 共得到 793 个 NTHi 蛋白, 发现许多蛋白能激活 Toll 样受体 2 (toll-like receptor 2, TLR-2) 和 NF- κ B 等上皮的炎症信号通路 (图 3)。另外, 机会性真菌病原体新型隐球菌会诱发威胁生命的脑膜炎, 其致病因子的表达受环磷酸腺苷/蛋白激酶 A (cyclic AMP /protein kinase A, cAMP/PKA) 信号转导通路的调控。Geddes 等^[66]利用 LC-MS/MS 研究调节 cAMP/PKA 信号通路时引起该真菌蛋白质组的变化。结果显示细菌中泛素蛋白水解酶复合体通路 (UPP) 相关蛋白的表达发生变化, 通过后续研究证实了 UPP 也参与该菌的致病过程。

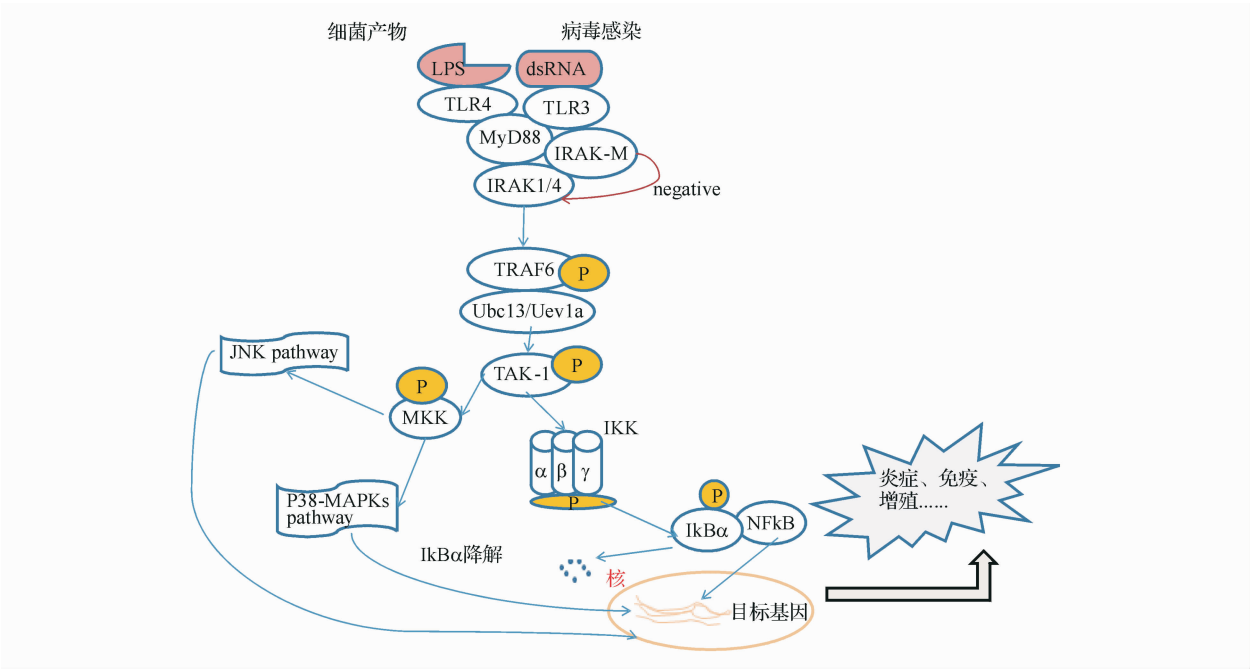


图 3 病毒感染和细菌脂多糖激活 NF- κ B 信号通路^[65]

2.4.3 药物抗病原微生物机制研究 为研究一种新型的聚酮化合物 kendomycin 对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 产生抑制作用的分子机制, Elnakady 等^[67]对 kendomycin 作用后的 MRSA 细菌细胞进行蛋白质组学和基因转录谱分析。结果显示, 该化合物影响参与 TCA、糖异生作用、氧化应激、细胞壁的生物合成、细胞分裂、荚膜产生、细菌细胞程序性死亡等相关的基因和蛋白的表达。白念珠菌能够对氟康唑 (FLC) 产生耐药性, 从而造成抗真菌治疗失败, 而小檗碱 (BBR) 与 FLC 合用对

耐药白念珠菌则具有显著的协同抑菌作用。Xu 等^[68]通过 2-DE 技术分析了临床耐药白念珠菌 0304103、01010 在 FLC 和 BBR 单用及合用前后的蛋白表达谱, 发现差异表达蛋白主要参与氧化应激和能量代谢等过程。进一步实验发现 FLC + BBR 处理组能增加线粒体膜电位, 降低细胞内 ATP 水平, 抑制 ATP 合酶活性和使 ROS 生成增加, 从而认为“活性氧机制”可能是 FLC 与 BBR 协同抗耐药白念珠菌的重要分子机制之一。进一步通过 cDNA 芯片技术、琼脂点板实验等研究, 与蛋白质组学实验结果

相结合。最终得出白念珠菌通过胞吞作用将 BBR 转运至空泡中贮存,从而出现对其耐药现象。而当 BBR 与 FLC 合用后,FLC 的破膜作用可破坏空泡膜释放 BBR,BBR 再通过增强 TCA、抑制线粒体 ATP 合酶活性等途径使菌体胞内 ROS 大量增多,同时引发真菌 DNA 损伤,进而产生协同抗耐药真菌作用。

2.5 其他应用

蛋白质组学方法还广泛用于研究辐射和骨生成等方面。Kempf 等^[69]采用同位素标记蛋白(isotope-coded protein label, ICPL)的定量蛋白质组方法分别研究出生后 10 d 的雌性 C57BL/6J 小鼠经 γ 射线辐射和母体妊娠期用 X 射线照射子宫后对子代小鼠的海马体 and 大脑皮层蛋白组的影响。结果显示辐射影响与记忆形成有关的环磷酸腺苷应答元件结合蛋白(CREB)信号转导通路。Lei 等^[70]通过 iTRAQ 结合 Nano LC-MS/MS 技术研究细胞外 Ca^{2+} 对人骨髓间充质干细胞(human bone marrow mesenchymal stem cells, BM hMSC)增长和分化的影响,并探讨其分子机制。BM hMSC 在 Ca^{2+} 浓度分别为 0、4 和 6 mmol/L 的无血清培养基中培养 3 周,之后对这些细胞的增殖分化和细胞中差异表达蛋白进行分析。结果显示 Ca^{2+} 能促进 BM hMSC 增殖且具有诱导成骨分化作用,MAPK 信号通路可能参与了 Ca^{2+} 诱导的成骨分化。为了探讨骨生成的潜在机制,Ge 等^[71]从小鼠 Mc3t3 造骨细胞上清液中分离出外泌体,用 2-DE 结合 MS 分析其蛋白质组。结果共确定了 1 069 个蛋白,其中 786 个蛋白可在 Exocarta 数据库中找到。通过信号通路软件 IPA 分析发现这些蛋白最有可能参与的通路有:真核细胞翻译起始因子 2(eukaryotic initiation factor 2, eIF2)的调控信号通路,泛素化信号通路,整合素信号通路和 mTOR 通路等。该研究发现了潜在的成骨相关蛋白和信号途径,并提供了一个丰富的蛋白质组数据资源,为进一步研究骨疾病相关蛋白的功能提供基础。

3 结 语

综上所述,将蛋白组学的方法用于各个研究领域,通过对比不同状态下的细胞或组织中蛋白质组表达差异,并可由此推测和寻找信号传导机制。虽然蛋白质组学技术推动了许多信号通路研究的发展,但由于将一个蛋白样品的全部蛋白分离并成功

检测难以实现,且仍然没有很好的方法来实现两个相互作用网络间的比较,从而对已知信号通路的未知蛋白或未知信号通路的发现造成困难。同时,细胞信号传导机制复杂交叉,涉及各种不同蛋白,影响因素众多,这些都亟待蛋白质组学技术的进一步突破和完善。

参 考 文 献

- [1] Wu B, Li ZY, Yang SC, et al. Regulation of apoptosis signaling pathway by common heat shock proteins[J]. *Chin J Biochem Mol Biol* (中国生物化学与分子生物报), 2011, **27**(1): 22–31.
- [2] Su LT, Xia SH. Role and mechanism of Smad proteins in TGF- β signal transduction pathway[J]. *J Med Mol Biol* (医学分子生物杂志), 2008, **5**(4): 352–355.
- [3] Yang XX, Wang K, Chen XJ, et al. Function and regulation of MAVS, the mitochondrial antiviral signaling protein in innate immunity[J]. *Prog Biochem Biophys* (生物化学与生物物理进展), 2013, **40**(5): 397–405.
- [4] Huangfu HY, Guan CY, Guo BS, et al. Research progress of proteomics and plant proteomics[J]. *Crop Res* (作物研究), 2006, **20**(5): 577–581.
- [5] Qin KW, Liu CL, Jiao BH. Expressive proteomics analysis of multiplesclerosis[J]. *Med Recap* (医学综述), 2010, **16**(22): 3386–3384.
- [6] Liu YF, Chen YH, Li MY, et al. Quantitative proteomic analysis identifying three annexins as lymph node metastasis-related proteins in lung adenocarcinoma[J]. *Med Oncol*, 2012(29): 174–184.
- [7] Li WK, Li ZB. Proteomics-A rising discipline of protein molecular biology[J]. *J Changsha Med Univ* (长沙医学院学报), 2007, **12**(25): 31–42.
- [8] Farber GK. New approaches to rational drug design[J]. *Pharm Ther*, 1999, **84**(3): 327–332.
- [9] Li BL. Functional proteomics[J]. *Chem Life* (生命化学), 1998, **18**(6): 1–3.
- [10] Sohn J, Do KA, Liu S, et al. Functional proteomics characterization of residual triple-negative breast cancer after standard neoadjuvant chemotherapy [J]. *Ann Oncol*, 2013, **24**(10): 2522–2526.
- [11] Guo CY, Zhan KH. Research progress and application in technology of proteome [J]. *J Yunnan Agric Univ* (云南农业大学学报), 2010, **25**(4): 583–591.
- [12] Chen Y, Xu Y, Ying HJ, et al. Research progress of affinity chromatography[J]. *Ion Exc Adsorp* (离子交换与吸附), 2001, **17**(3): 276–280.
- [13] Zhen Y, Shi JS. Application of mass spectrometry in proteomics studies[J]. *J Nanjing Forestry Univ* (Nat Sci) (南京林业大学学报), 2011, **35**(1): 103–108.

- [14] Nesvizhskii AI, Vitek O, Aebersold R. Analysis and validation of proteomic data generated by tandem mass spectrometry[J]. *Nat Methods*, 2007, **4**(10):787-797.
- [15] Deng JS, Zhao F, Yu XY, *et al.* Identification of the protective role of DJ-1 in hypoglycemic astrocyte injury using proteomics[J]. *J Proteome Res*, 2015, **14**:2839-2848.
- [16] Cheng TL, Chen JH, Wang PK, *et al.* Quantitative proteomics analysis reveals that S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) and nitric oxide signaling enhance poplar defense against chilling stress[J]. *Planta*, 2015, **242**:1361-1390.
- [17] Mok L, Wynne JW, Ford K, *et al.* Proteomic analysis of pteropus-alecto kidney cells in response to the viral mimic, Poly I:C[J]. *Proteome Sci*, 2015, **13**(25):2-11.
- [18] Xia QC, Zeng R, Cao XJ, *et al.* *Protein Chemistry and Proteomics* (蛋白质化学与蛋白质组学)[M]. Beijing: Science Publishing Company, 2004:467-470.
- [19] Shan Q, Lou XM, Xiao T, *et al.* Cancer/testis antigen microarray to screen autoantibody biomarkers of non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Lett*, 2013, **328**(1):160-167.
- [20] Xiao XY, Wei XP, He DC. Application of protein microarray technique in screening of serum lung cancer marker proteins[J]. *Chin Sci (Series C)* [中国科学(C辑)], 2003, **33**(4):323-328.
- [21] Fields S, Song OK. A novel genetic system to detect protein-protein interactions[J]. *Nature*, 1989, **340**(6230):245-246.
- [22] Liu Z, Shi L, Tang Q, *et al.* Genome-wide identification and transcriptional expression analysis of mitogen-activated protein kinase and mitogen-activated protein kinase kinase genes in *Capsicum annuum*[J]. *Front Plant Sci*, 2015, **6**:780.
- [23] Park SY, Choi HK, Seo JS, *et al.* DNAB1 negatively regulates MIG6 to promote epidermal growth factor receptor signaling[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, **1853**(10):2722-2730.
- [24] Hadweh P, Habelbah H, Kieff E, *et al.* The PP4R1 subunit of protein phosphatase PP4 targets TRAF2 and TRAF6 to mediate inhibition of NF- κ B activation[J]. *Cell Sig*, 2014, **26**(12):2730-2737.
- [25] Wang XW, Guo TY, Peng F, *et al.* Proteomic and functional profiles of a follicle-stimulating hormone positive human nonfunctional pituitary adenoma[J]. *Electrophoresis*, 2015, **36**(11/12):1289-1304.
- [26] Wu Z, Wang L, Guo ZG, *et al.* Experimental study on differences in clivus chordoma bone invasion; an iTRAQ-based quantitative proteomic analysis[J]. *PLoS ONE*, 2015, **10**(3):e011952.
- [27] Peng XC, Gong FM, Chen Y, *et al.* Proteomics identification of PGAM1 as a potential therapeutic target for urothelial bladder cancer[J]. *J Proteomics*, 2016, **132**:85-92.
- [28] Li LD, Sun HF, Liu XX, *et al.* Down-regulation of NDUFB9 promotes breast cancer cell proliferation, metastasis by mediating mitochondrial metabolism[J]. *PLoS ONE*, 2015, **10**(12):e0144441.
- [29] Zanivan S, Meves A, Behrendt K, *et al.* In vivo SILAC-based proteomics reveals phosphoproteome changes during mouse skin carcinogenesis[J]. *Cell Rep*, 2013, **3**(2):552-566.
- [30] Ying Q, Ansong E, Diamond AM, *et al.* Quantitative proteomic analysis reveals that anti-cancer effects of selenium-binding protein 1 *in vivo* are associated with metabolic pathways[J]. *PLoS ONE*, 2015, **10**(5):e0126285.
- [31] Lin YY, Xie GB, Xia J, *et al.* TBMS1 exerts its cytotoxicity in NCI-H460 lung cancer cells through nucleolar stress-induced p53/MDM2-dependent mechanism, a quantitative proteomics study[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, **1864**(2):204-210.
- [32] Ger M, Kaupinis A, Ceniene AN, *et al.* Quantitative proteomic analysis of anticancer drug RH1 resistance in liver carcinoma[J]. *BBA-Proteins Proteom*, 2016(1864):219-232.
- [33] Diamond DL, Proll SC, Jacobs JM, *et al.* Proteomics: applying proteomic technologies to the study of liver function and disease[J]. *Hepatology*, 2006, **44**(2):299-308.
- [34] Vildhede A, Wisniewski JR, Norén A, *et al.* Comparative proteomic analysis of human liver tissue and isolated hepatocytes with a focus on proteins determining drug exposure[J]. *J Proteome Res*, 2015, **14**(8):3305-3314.
- [35] Liu Y, Dai M, Bi Y, *et al.* Active smoking, passive smoking, and risk of nonalcoholic fatty disease (NAFLD): a population-based study in China[J]. *J Epidemiol*, 2013, **23**(2):115-121.
- [36] Calvert VS, Collantes R, Lilariny H, *et al.* A systems biology approach to the pathogenesis of obesity-related nonalcoholic fatty liver disease using reverse phase protein microarrays for multiplexed cell signaling analysis[J]. *Hepatology*, 2007, **46**(1):166-172.
- [37] Thomas A, Stevens AP, Klein MS, *et al.* Early changes in the liver-soluble proteome from mice fed a nonalcoholic steatohepatitis inducing diet[J]. *Proteomics*, 2012, **12**(9):1437-1451.
- [38] Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, *et al.* Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues[J]. *Oncogene*, 2006, **25**(17):2537-2545.
- [39] Yang F, Yin YX, Wang F, *et al.* miR-17-5p promotes migration of human hepatocellular carcinoma cells through the p38 mitogen-activated protein kinase-heat shock protein 27 pathway[J]. *Hepatology*, 2010, **51**(5):1614-1623.
- [40] Xu L, Chen S, Bergan RC. MAPKAPK2 and HSP27 are downstream effectors of p38 MAP kinase-mediated matrix metalloproteinase type 2 activation and cell invasion in human prostate cancer[J]. *Oncogene*, 2006, **25**(21):2987-2998.
- [41] Wang SH, Huang X, Lao HM, *et al.* RN181 suppresses hepatocellular carcinoma growth by inhibition of the ERK/MAPK pathway[J]. *Hepatology*, 2011, **53**(6):1932-1942.
- [42] Borlak J, Singh P, Gazzana G. Proteome mapping of epidermal growth factor induced hepatocellular carcinomas identifies novel cell metabolism targets and mitogen activated protein kinase signaling events[J]. *BMC Genomics*, 2015, **16**(1):1312-1341.

- [43] Xing XH, Huang Y, Wang S, *et al.* Comparative analysis of primary hepatocellular carcinoma with single and multiple lesions by iTRAQ-based quantitative proteomics [J]. *J Proteomics*, 2015, **128**:262–271.
- [44] Lovet JM, Bruix J. Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2008, **48**(4):1312–1327.
- [45] Li YH, Tai CSW, Xue JY, *et al.* Proteomic study of pyrrolizidine alkaloid-Induced hepatic sinusoidal obstruction syndrome in rats [J]. *Chem Res Toxicol*, 2015, **28**(9):1715–1727.
- [46] Liu Na, Yang HL, Wang P, *et al.* Functional proteomic analysis reveals that thee thanol extract of *Annona muricata* L. induces liver cancer cell apoptosis through endoplasmic reticulum stress pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, **189**:210–217.
- [47] Ma ZJ, Wang XX, Su G, *et al.* Proteomic analysis of apoptosis induction by lariciresinol in human HepG2 cells[J]. *Chem Biol Interact*, 2016, **256**:209–219.
- [48] Guo ZG, Liu XJ, Li ML, *et al.* Differential urinary glycoproteome analysis of type 2 diabetic nephropathy using 2D-LC-MS/MS and iTRAQ quantification[J]. *J Transl Med*, 2015, **13**(1):371.
- [49] Arrabal S, Lucena MA, Canduela MJ, *et al.* Pharmacological blockade of cannabinoid CB1 receptors in diet-induced obesity regulates mitochondrial dihydrolipoamide dehydrogenase in muscle[J]. *PLoS ONE*, 2015, **10**(12):e0145244.
- [50] Chiu CW, Chen HM, Wu TT, *et al.* Differential proteomics of monosodium urate crystals induced inflammatory response in dissected murine air pouch membranes by iTRAQ technology [J]. *Proteomics*, 2015, **15**(19):3338–3348.
- [51] Ahmad S, Kumar KA, Basak T, *et al.* PPAR signaling pathway is a key modulator of liver proteome in pups born to vitamin B12 deficient rats[J]. *Proteomics*, 2013, **91**:297–308.
- [52] Ferre P. The biology of peroxisome proliferator-activated receptors; relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity [J]. *Diabetes*, 2004, **53**(suppl 1):S43–50.
- [53] Miller I, Serchi T, Cambier S, *et al.* Hexabromocyclododecane (HBCD) induced changes in the liver proteome of eu- and hypothyroid female rats[J]. *Toxicol Lett*, 2016, **245**:40–51.
- [54] Ilavenil S, Al-Dhabi NA, Srigopalram S, *et al.* Acetaminophen induced hepatotoxicity in Wistar rats—A proteomic approach [J]. *Mol*, 2016, **21**(2):161.
- [55] Kim SW, Park TJ, Chaudhari HN, *et al.* Hepatic proteome and its network response to supplementation of an anti-obesity herbal mixture in diet-induced obese mice[J]. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 2015, **20**(4):775–793.
- [56] Liu Q, Zhao XP, Lu XY, *et al.* Proteomic study on usnic-acid-induced hepatotoxicity in rats[J]. *J Agric Food Chem*, 2012, **60**:7312–7317.
- [57] Wang QH, Yang X, Li XL, *et al.* Based on proteomics to study the property and flavor of Radix Aconiti Lateralis Preparata, Rhizoma Zingiberis, Pricklyash Peel[J]. *World Chin Med*, 2015, **10**:1824–1836.
- [58] Sun DB, Shi HY, Guo DH, *et al.* Analysis of protein expression changes of the Vero E6 cells infected with classic PEDV strain CV777 by using quantitative proteomic technique [J]. *J Virol Methods*, 2015, **218**(21):27–39.
- [59] Guo X, Hu H, Chen FZ, *et al.* iTRAQ-based comparative proteomic analysis of Vero cells infected with virulent and CV777 vaccine strain-like strains of porcine epidemic diarrhea virus[J]. *J Proteomics*, 2016, **130**:65–75.
- [60] Du C, Liu HF, Lin YZ, *et al.* Proteomic alteration of equine monocyte-derived macrophages infected with equine infectious anemia virus[J]. *Proteomics*, 2015, **15**(11):1843–1858.
- [61] Sun YT, Hu BL, Fan CF, *et al.* iTRAQ-based quantitative subcellular proteomic analysis of Avibirnavirus-infected cells[J]. *Electrophoresis*, 2015, **36**(14):1596–1611.
- [62] Berard AR, Coombs KM, Severini A. Quantification of the host response proteome after herpes simplex virus type 1 infection [J]. *J Proteome Res*, 2015, **14**(5):2121–2142.
- [63] Abraham R, Mudaliar P, Jaleel A, *et al.* High throughput proteomic analysis and a comparative review identify the nuclear chaperone, nucleophosmin among the common set of proteins modulated in Chikungunya virus infection [J]. *J Proteomics*, 2015, **120**:126–141.
- [64] Preciado D, Poley M, Tsai S, *et al.* A proteomic characterization of NTHlyses[J]. *Int J Pediatr Otorhi*, 2016, **80**(1):8–16.
- [65] Santoro MG, Rossi A, Amici C. NF-kappaB and virus infection: who controls whom[J]. *EMBO J*, 2003, **22**(11):2252–2260.
- [66] Geddes JMH, Caza M, Croll D, *et al.* Analysis of the protein kinase a-regulated proteome of *Cryptococcus* neormans identifies a role for the ubiquitin-proteasome pathway in capsule formation [J]. *mBio*, 2016, **7**(1):1862–1877.
- [67] Elnakady YA, Chatterjee I, Bischoff M, *et al.* Investigations to the antibacterial mechanism of action of kendomycin [J]. *PLoS ONE*, 2016, **11**(1):e0146165.
- [68] Xu Y, Wang Y, Yan L, *et al.* Proteomic analysis reveals a synergistic mechanism of fluconazole and berberine against fluconazole-resistant *Candida albicans*: endogenous ROS augmentation [J]. *J Proteome Res*, 2009, **8**(11):5296–5304.
- [69] Kempf SJ, Sepe S, Toerne CV, *et al.* Neonatal irradiation leads to persistent proteome alterations involved in synaptic plasticity in the mouse hippocampus and cortex[J]. *J Proteome Res*, 2015, **14**(11):4674–4686.
- [70] Lei Q, Chen J, Huang WX, *et al.* Proteomic analysis of the effect of extracellular calcium ions on human mesenchymal stem cells: Implications for bone tissue engineering [J]. *Chemico-Biol Interact*, 2015, **233**:139–146.
- [71] Ge M, Ke RH, Cai TY, *et al.* Identification and proteomic analysis of osteoblast-derived exosomes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, **467**(1):27–32.