

重组人 Tim-3 蛋白的制备及基于亲和超滤-液质联用技术的天然配体筛选

杨忠杰^{1,3}, 李森森^{1,2*}, 曹 娟¹, 应真真^{1,3}, 张永威^{1,3}, 王 瑞^{1,3}

1. 漯河市中心医院, 河南 漯河 462000

2. 黄淮学院医学院, 河南 驻马店 463000

3. 河南省中药制剂与加工中医药重点实验室, 河南 漯河 462000

摘要: 目的 构建人T细胞免疫球蛋白黏蛋白-3 (Tim-3)-His表达载体, 表达纯化Tim-3重组蛋白, 建立亲和超滤-液质联用技术筛选Tim-3蛋白天然配体。方法 利用DNA重组技术构建人Tim-3-His表达质粒, 转染HEK293细胞表达Tim-3重组蛋白, 通过Ni柱亲和色谱柱进行蛋白纯化, 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析Tim-3重组蛋白纯度。10 μL 受试物 (黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、白术内酯I、芒柄花黄素、毛蕊异黄酮) 溶液、180 μL 磷酸盐缓冲溶液 (pH 7.4, 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 与10 μL Tim-3 (0.84 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 混合, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗孵育1 h后, 转移至 1×10^4 超滤离心管中以12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min, 将沉淀加入200 μL 甲醇-水 (90:10) 中室温解离10 min, 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min, 收集滤液, 进行UPLC-MS/MS分析。通过比较受试物组和Tim-3蛋白变性组中超滤液中待测物的峰面积, 计算各待测物特异结合率。结果 经双酶切及测序鉴定证明, 人Tim-3-His重组表达质粒构建正确; 纯化的人Tim-3重组蛋白质量分数达90%以上; 建立的亲和超滤-液质联用筛选体系专属性、精密度、重复性、稳定性良好; 白术内酯I可与Tim-3蛋白特异性结合。结论 成功表达了可溶性、高纯度的人Tim-3重组蛋白, 成功建立亲和超滤-液质联用筛选体系, 白术内酯I可与Tim-3蛋白特异性结合。

关键词: T细胞免疫球蛋白黏蛋白-3; 重组蛋白; 亲和超滤-液质联用; 白术内酯I

中图分类号: R392.12, R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2023) 03-0545-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.03.010

Preparation of recombinant human Tim-3 protein and screening of natural ligands based on affinity ultrafiltration-liquid mass spectrometry

YANG Zhongjie^{1,3}, LI Sensen^{1,2}, CAO Juan¹, YING Zhenzhen^{1,3}, ZHANG Yongwei^{1,3}, WANG Rui^{1,3}

1. Luohe Central Hospital, Luohe 462000, China

2. Medical College of Huanghuai University, Zhumadian 463000, China

3. Henan Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Preparations and Processing Chinese Medicine, Luohe 462000, China

Abstract: **Objective** To construct a prokaryotic expression vector of T cell immunoglobulin mucin-3 (Tim-3)-His, express and purify the recombinant Tim-3 protein, and construct an ultrafiltration affinity technology to screen natural ligands of Tim-3 protein. **Methods** Human Tim-3-His expression plasmid was constructed by DNA recombination technology, and then transfected into HEK293 cells to express Tim-3 recombinant protein. The protein was purified by Ni column affinity chromatography, and the purity of Tim-3 recombinant protein was analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Test substance (astragaloside A, calyx isoflavone glucoside, atractylolactone I, anthocyanin, and calyx isoflavone) solution of 10 μL , 180 μL phosphate buffer solution (pH 7.4, 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) and 10 μL Tim-3 (0.84 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) mixed, incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 1 h in dark, transferred to 1×10^4 centrifuge with 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ in ultrafiltration centrifuge tube for 10 min, and added the sediment to 200 μL methanol-water (90:10) dissociated at room temperature for 10 min, centrifuged 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ for 10 min, and the filtrate was collected for UPLC-MS/MS analysis. The specific binding rate of each analyte was calculated by comparing the peak area of the analyte in the ultrafiltration fluid of the test substance group and the Tim-3 protein denaturation group. **Results** The recombinant expression plasmid of human Tim-3-His was constructed correctly by double restriction enzyme digestion and sequencing. The mass

收稿日期: 2022-08-10

基金项目: 河南省科技攻关项目 (212102311110); 漯医专 (2021)207号 (2021LYZKJXM034)

第一作者: 杨忠杰, 研究方向为中药学。E-mail: yang8056266@163.com

*通信作者: 李森森, 研究方向为免疫调控靶点中药活性成分筛选。E-mail: lsswcy@163.com

fraction of purified human Tim-3 recombinant protein is more than 90%. The established affinity ultrafiltration-LC-MS screening system has good specificity, precision, repeatability and stability. Atractylolide I can specifically bind to Tim-3 protein. **Conclusion** The recombinant expression plasmid of human Tim-3-His was constructed correctly by double restriction enzyme digestion and sequencing. The mass fraction of purified human Tim-3 recombinant protein was more than 90%. The established affinity ultrafiltration-LC-MS screening system had good specificity, precision, repeatability and stability. Atractylolide I can specifically bind to Tim-3 protein.

Key words: T cell immunoglobulin mucin-3; recombinant protein; ultrafiltration affinity-LC-MS; atractylolide I

T细胞免疫球蛋白黏蛋白3(Tim-3)是一种新型免疫检查点分子,正在成为癌症免疫治疗的新靶点^[1],Tim-3表达与许多癌症的不良预后相关,如口腔鳞状细胞癌、卵巢癌和胃癌^[2-4]。Tim-3可通过调节T细胞、自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞等发挥免疫调节作用进而介导肿瘤发生免疫逃逸^[5]。有研究显示当程序性死亡受体1(PD-1)/细胞程序性死亡配体1(PD-L1)抑制剂产生耐药反应时, Tim-3的表达明显升高,进而抑制T细胞免疫应答,诱导免疫耐受^[6]。因此, Tim-3抑制剂有可能作为新型免疫治疗药物用于肿瘤的临床治疗。

超滤亲和-液质联用技术是通过受体与有潜在活性的小分子配体结合形成配体-受体配合物,与未结合的化合物通过超滤膜分离出来,然后配合物中释放出结合的配体化合物,最后通过超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)进行分析鉴定^[13],示意图见图1。超滤亲和-液质联用技术是一种从天然产物中筛选生物活性化合物的高效方法^[14]。

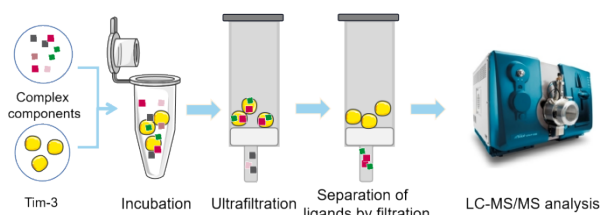


图1 亲和超滤-液质联用技术筛选活性成分示意图

Fig. 1 Schematic diagram of affinity ultrafiltration - UPLC-MS/MS method for screening bioactive components

中医药治疗肿瘤历史悠久、疗效独特,常用的中药有黄芪、白术、白花蛇舌草、党参等^[7],其中黄芪、人参、白术等均可提高免疫功能^[8],黄芪能改善NK细胞活性,促进白细胞介素(IL)-2的分泌,从而改善机体的免疫功能^[9],还可通过增加CD3⁺CD4⁺T细胞、CD3⁺CD8⁺T细胞调节免疫微环境中T细胞迁移浸润,改善免疫功能^[10]。白术内酯I可通过下调吡哆胺2,3-双加氧酶(IDO)蛋白的表达促进T淋巴细胞的增殖活性^[11],可诱导肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤细胞增殖、侵袭,调控免疫功能^[12]。本研究构建人

Tim-3-His表达载体,并进行蛋白表达及纯化,借助超滤亲和-UPLC-MS/MS技术研究白术、黄芪的活性成分——黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、白术内酯I、芒柄花黄素、毛蕊异黄酮是否能够与Tim-3蛋白结合,寻找能够与Tim-3结合的天然活性成分。

1 材料

1.1 主要试剂

HEK293细胞购自上海赛百慷生物技术股份有限公司;限制性核酸内切酶、T4连接酶购自安诺伦(北京)生物科技有限公司;大肠杆菌DH5 α 、pCDNA3.1、LB培养基购自艾柏森生物科技有限公司;卡那霉素购自生工生物工程股份有限公司;质粒DNA小量抽提试剂盒、DNA凝胶回收试剂盒、DNA ladder、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)购自安诺伦(北京)生物科技有限公司;HEK293-无血清培养基购自美国Gibico公司;黄芪甲苷(批号110781-201616,质量分数97.4%)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(批号111920-201606,质量分数97.6%)购自中国食品药品检定研究院;白术内酯I(批号DST190807-014,质量分数99.7%)、芒柄花黄素(批号DST-19033005,质量分数99.03%)、毛蕊异黄酮(批号DST-18120901,质量分数99.84%)均购于成都德思特生物科技有限公司;甲酸、乙腈(色谱纯)购自美国TEDIA公司;其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.2 主要仪器

AB SCIEX Triple QuadTM 4500MD串联质谱仪、Analyst 1.6.1数据处理软件(美国Applied Biosystems公司);LC-20A高效液相色谱仪(日本Shimadzu公司);Bio-Rad CFX connect PCR仪(美国BIO-RAD公司);JY200C电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司);Amicon Ultra-0.5 10K型超滤离心管(截留相对分子质量10 000,德国Merck公司);Geno Sents 1850凝胶成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司);微量分光光度计(上海宝予德科学仪器有限公司);5810R高速离心机(美国Eppendorf公司);AUW-120D十万分之一天平(日本Shimadzu公

司);SPH-200D 超凡型小容量恒温培养摇床(上海世平实验设备有限公司);LC-250Y 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);HH2 数显恒温水浴锅(上海力辰邦西仪器科技有限公司);DHP 恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);YXQ 高压蒸汽灭菌锅(上海博讯实业有限公司);DL-CJ-2N 超级工作台(北京东联哈尔有限公司);Milli-Q Reference 超纯水仪(美国 Millipore 公司)。

1.3 Tim-3 胞外段目的基因同源臂 PCR 引物的设计

在 NCBI 数据库结合 uniprot 数据库中确定 Tim-3 胞外段基因编码序列, 并自行设计合成目的基因同源臂 PCR 引物。上游引物: 5'-TTTAAAC TTAAGCTTGGTACCGCCACCATGTTTTTCACATC TT-3', 下游引物: 5'-TGCTGGATATCTGCAGA ATTCTCAGTGATGGTGGTGGTGGTGTCTGATG GT-3', 引物由上海生工生物技术公司合成。

2 方法与结果

2.1 人 Tim-3-His 蛋白的制备及纯化

2.1.1 人 Tim-3-His 表达载体构建 通过化学合成方法获得 Tim-3 胞外区目的基因序列,并通过 PCR 扩增获取带有同源臂的目的片段。Tim-3 胞外段片段大小为 621 bp,PCR 产物经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳显示,在相对于 DNA Marker 500~750 bp 处有一特异性扩增条带,大小与预期相符(图 2)。

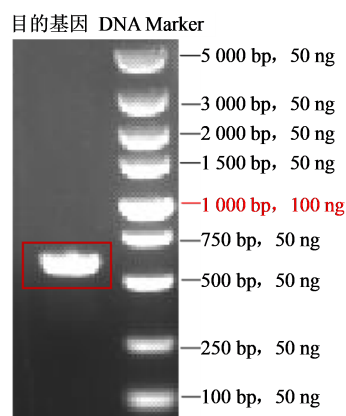
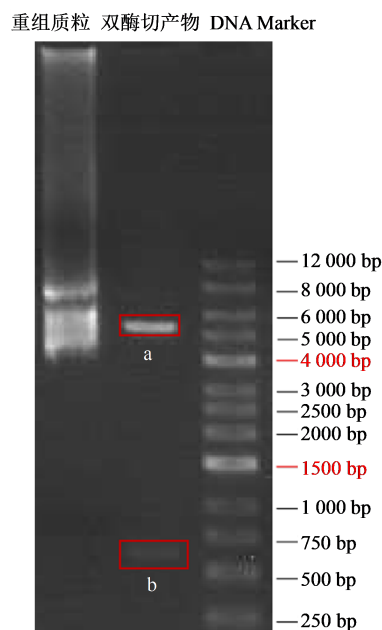


图2 目的基因PCR电泳图

Fig. 2 Electrophoretic profile of PCR product of target gene

将PCDNA3.1载体用Acc651/EcoRI进行双酶切反应,产物经1.2%的琼脂糖凝胶电泳显示,在相对于DNA Marker 500~750 bp和5 000~6 000 bp各有一特异性扩增条带,大小与预期相符(图3)。然后进行切胶回收,将切胶回收的载体与目的基因片段进行重组酶连接,获得重组质粒。

最后,将重组质粒转化至感受态大肠杆菌



a-酶切后质粒,5 405 bp;b-目的基因,621 bp

a-plasmid after enzyme digestion, 5 405 bp; b-target gene, 621 bp

图3 重组表达质粒酶切图

Fig. 3 Restriction map of recombinant plasmid

DH5 α ,细菌恢复正常生长状态后,取部分菌液涂布于含氨苄西林的固体LB培养基平板中,将平板倒置放入37℃恒温培养箱中培养12~16 h。待平板中的菌长至合适大小时将单克隆菌挑至LB培养基中,200 r·min⁻¹、37℃恒温振荡过夜至菌液变浑浊。将克隆菌液送测序公司测序,人Tim-3-His表达质粒见图4。序列与GenBank中序列比对一致,无突变与移位。

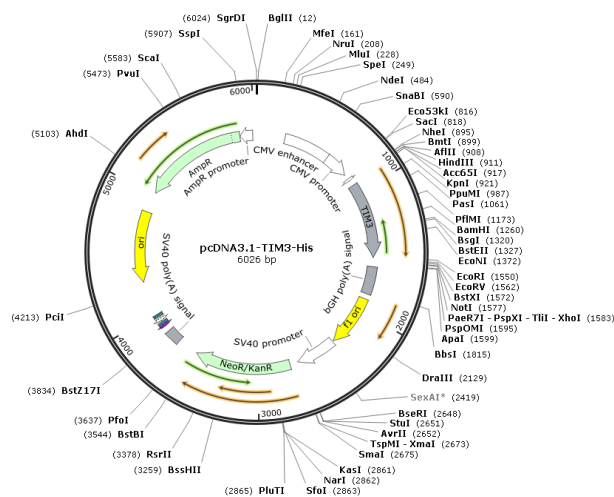


图4 pCDNA3、1-Tim-3-His载体图谱

Fig. 4 PCDNA3, 1-Tim-3-His vector map

2.1.2 人 Tim-3-His 蛋白表达及纯化

使用 HEK293-无血清培养基培养 HEK293 细胞, 将要表达的重组质粒与转染试剂混合后加入细胞中, 培养

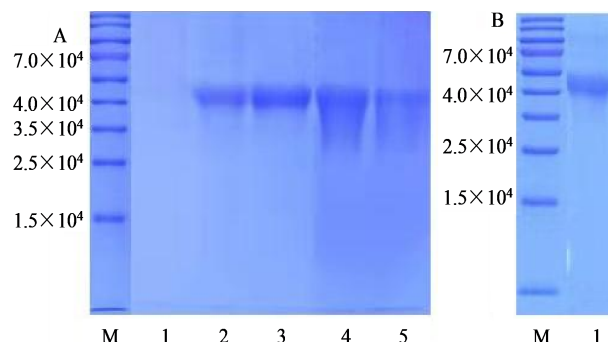
7 d。摇瓶培养条件:5% CO₂、温度 37 °C,摇床转速 175 r·min⁻¹。将培养完成的细胞离心,取细胞上清经 0.22 μm 滤膜滤过后通过 Ni 柱亲和色谱柱进行蛋白纯化。步骤如下:用 5 倍柱体积的去离子水洗滤层析柱,去除空气和 20% 乙醇;5~10 倍柱体积 Buffer A(PBS,pH 7.5)平衡柱子;将样品以 3 mL·min⁻¹ 的体积流量流穿 Ni 柱;用 Buffer A 冲洗柱子,冲掉未结合的杂蛋白;用 20、500 mmol·L⁻¹ 咪唑洗脱;将洗脱下来的样品分别进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分析是否有目的蛋白;收集洗脱的蛋白,透析袋透析到 buffer B(PBS, pH 8.0)溶液中,4 °C 过夜,并用 SDS-PAGE 胶检测目的蛋白质量分数;根据纯化后跑胶结果,对 500 mmol·L⁻¹ 洗脱的蛋白进行分开合样。使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定浓缩后的重组 Tim-3 蛋白相对质量浓度。

Tim-3 蛋白(由 190 个氨基酸组成,相对分子质量 2.13×10⁴;在还原条件下的 SDS-PAGE 中,由于糖基化,人 Tim-3 的表观相对分子质量为 4.28×10⁴)经 15% SDS-PAGE 电泳检测结果与预期一致,质量分数≥90%(图 5)。浓缩后的重组 Tim-3 蛋白质量浓度为 0.84 mg·mL⁻¹。

2.2 Tim-3 蛋白药物筛选系统的构建

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花黄素、白术内酯 I 对照品适量,分别置于 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,配制成质量浓度分别为 1.02、0.97、0.99、1.05、1.09 mg·mL⁻¹ 的对照品溶液,4 °C 避光保存。使用前,50% 甲醇溶液稀释到所需的质量浓度。

2.2.2 色谱条件 色谱柱 Kinetex C₁₈ 100A(50 mm×2.1 mm,2.6 μm),流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A)-0.1% 甲酸-5 mmol·L⁻¹ 乙酸铵-50% 甲醇乙腈(B);梯度洗脱:0~0.3 min、10% B,0.3~2.0 min、10%~95% B,2.0~3.5 min、95% B,3.5~4.0 min、95%~10% B,4.0~5.0 min、10% B;体积流量 0.3 mL·min⁻¹;柱温 40 °C;进样量 2 μL。



A-不同浓度咪唑洗脱液 SDS-PAGE 结果:M-Marker,1-7 μL 20 mmol·L⁻¹ 咪唑洗脱,2-6 μL 20 mmol·L⁻¹ 咪唑洗脱液,3-20 μL 500 mmol·L⁻¹ 咪唑洗脱,4-8 μL 500 mmol·L⁻¹ 咪唑洗脱,5-20 μL 500 mmol·L⁻¹ 咪唑洗脱;B-500 mmol·L⁻¹ 咪唑洗脱的蛋白合样 SDS-PAGE 结果:M-Marker,1-最终样品 5 μL

A-SDS-PAGE results of different concentrations of imidazole eluate: M-Marker, 1-17 μL 20 mmol·L⁻¹ imidazole elution, 2-6 μL 20 mmol·L⁻¹ imidazole elution, 3-20 μL 500 mmol·L⁻¹ imidazole elution, 4-8 μL 500 mmol·L⁻¹ imidazole elution, 5-20 μL 500 mmol·L⁻¹ imidazole elution; B-500 mmol·L⁻¹ imidazole eluted protein sample SDS-PAGE result: M-Marker, 1-final sample 5 μL

图 5 纯化蛋白 Tim-3 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE profile of purified fusion protein Tim-3

2.2.3 质谱条件 采用电喷雾离子化源(ESI);扫描方式为正离子多级反应监测模式(MRM);喷雾电压 5 500 V(ESI⁺);雾化气温度(TEM)500 °C;气帘气、碰撞气分别为 206.84、62.05 kPa,雾化器(GS1)和辅助气(GS2)均为 344.74 kPa。5 个指标成分的质谱参数见表 1^[15-16]。

2.2.4 超滤亲和技术筛选 Tim-3 蛋白天然配体 10 μL 对照品溶液、180 μL 磷酸盐缓冲液(pH 7.4, 50 mmol·L⁻¹)与 10 μL Tim-3 (0.84 mg·mL⁻¹)混合。将溶液在 37 °C 黑暗孵育 1 h 后,转移至 1×10⁴ 超滤离心管中以 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min。加入 150 μL 的磷酸盐缓冲液 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 洗涤,重复 3 次。将与 Tim-3 有特异性结合的结合配体与 200 μL 甲醇-水(90:10)室温解离 10 min,12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,收集滤液。上机检测。

2.2.5 方法学考察 ①专属性考察:设置实验组、空白组和蛋白变性对照组。实验组:10 μL

表 1 5 种化合物的质谱参数

Table 1 Mass spectrometry parameters of five components

成分	母离子 <i>m/z</i>	子离子 <i>m/z</i>	去簇电压(DP)/V	碰撞电压(CE)/eV
黄芪甲苷	807.5	627.5	150	70
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	447.4	285.1	80	27
毛蕊异黄酮	285.2	213.0	100	50
芒柄花黄素	269.1	197.0	80	35
白术内酯 I	231.2	185.1	40	24

对照品溶液、180 μL 磷酸盐缓冲溶液与 10 μL Tim-3 ($0.84 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 混合; 空白组: 190 μL 磷酸盐缓冲溶液与 10 μL Tim-3 混合; 蛋白变性对照组: 10 μL 对照品溶液、180 μL 磷酸盐缓冲溶液与 10 μL Tim-3 (水浴煮沸 20 min 使其变性) 混合。按照“2.2.4”项方法处理, 上机检测。结果显示空白组在待测物处无干扰, 见图 6。

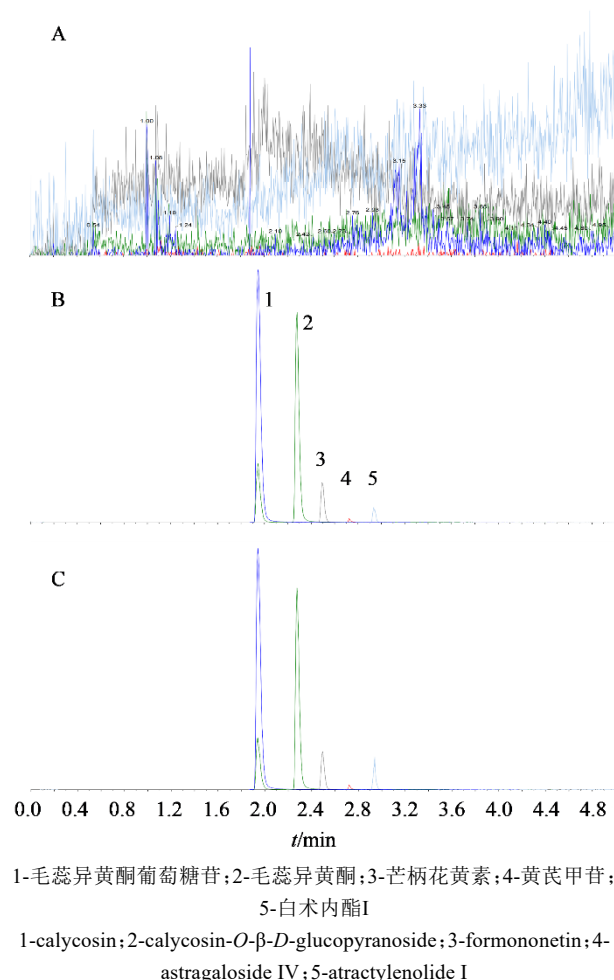


图 6 空白组 (A)、蛋白变性组 (B) 和实验组 (C) 总离子色谱图

Fig. 6 Total ion chromatogram profiles of blank control group (A), denatured control group (B) and sample group (C)

②精密度试验: 取配制的 10 μL 对照品溶液, 按“2.2.4”项下操作, 连续进样 6 次, 测得各成分的峰面积, 结果表明各峰相对峰面积和相对保留时间 RSD 分别为 1.16%~4.23%、0.50%~1.59%, 表明仪器精密度良好。

③重复性试验: 平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.2.4”项下操作, 进样分析, 各成分峰面积的 RSD 为 1.98%~5.55%, 表明该方法重复性良好。

④稳定性考察: 考察“2.2.4”项下最后收集的滤液 ($n=3$) 在室温放置 6 h 稳定性。测得各成分峰面

积与初始测定的峰面积平均值比值为 96.34%~102.61%, 表明滤液在室温 6 h 内稳定性良好。

2.3 Tim-3 蛋白亲和力的评价

通过比较样品组和蛋白变性组中超滤液中待测物的峰面积, 定义待测物与 Tim-3 的特异性结合, 计算各待测物特异结合率^[14]。

$$\text{特异结合率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{蛋白变性}}) / A_{\text{蛋白变性}}$$

白术内酯 I 在实验组中比蛋白变性组峰面积显著增大, 白术内酯 I 特异结合率为 70.84%, 推测白术内酯 I 可与 Tim-3 蛋白特异性结合。各待测物特异结合率见表 2。

表 2 Tim-3 潜在配体特异结合率 ($n=3$)

Table 2 Specific binding rate of Tim-3 potential ligand ($n=3$)

t_R/min	成分	特异结合率/%
1.93	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	-2.95
2.27	毛蕊异黄酮	-2.01
2.49	芒柄花黄素	-4.41
2.73	黄芪甲苷	15.56
2.93	白术内酯 I	70.84

3 讨论

T 细胞免疫球蛋白 Tim-3 检查点蛋白作为新兴的免疫检查点分子之一作用广泛, 除参与炎症反应、移植排斥反应和自身免疫病外, 也是肿瘤发生免疫逃逸的因素之一。随着 PD-1/PD-L1 抗体药物逐渐暴露出耐药的问题, 有研究发现, 共表达 Tim-3/PD-1 的 T 细胞表现出更严重的衰竭, 并且对抗 PD-1 治疗无反应的患者往往与 Tim-3 的表达高度相关, 而对 PD-1 治疗产生耐药的患者也是由于 Tim-3 被选择性的表达, 以致肿瘤免疫逃逸。有研究者将抗人 PD-1 抗体 (keytruda) 与 Tim-3 抗体联合用药组与 PD-1 单独用药组相比, 结果发现联合用药组表现出更为明显的肿瘤抑制效果, 由此说明其联合抗肿瘤疗效优于 PD-1 单用。阻断 Tim-3 检查点被认为是治疗血液系统恶性肿瘤的有效方法, 特别是用于治疗急性髓系白血病和骨髓增生异常综合征^[17]。本研究通过化学合成方法获得 Tim-3 胞外区目的基因序列, 并克隆至过表达质粒 pCDNA3.1 载体上, 获得 pCDNA3, 1-TIM3-His 载体; 表达质粒转化到 HEK293 细胞, 培养后通过 Ni 柱亲和和色谱柱进行蛋白纯化成功获得 Tim-3 蛋白。为 Tim-3 蛋白进一步研究、开发和利用提供了参考依据。

目前抗 Tim-3 小分子配体的发现和开发正在兴起, 包括肽、RNA 适配体和一些专门设计的杂环分

子等^[18]。本实验通过超滤亲和-液质联用技术从黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花黄素、白术内酯I 5种中药成分中快速筛选出Tim-3蛋白特异性结合的化合物,结果显示白术内酯I特异性结合率为70.84%,初步推断白术内酯I可特异性与Tim-3蛋白结合。有研究显示白术内酯I通过干扰PSMD4-PSMD7相互作用增加26S免疫蛋白酶活性,进而增强PD-1检查点免疫疗法治疗效果,同时在与PD-1抑制剂联合使用时可促进肿瘤细胞的抗原呈递及其与T细胞的相互作用,显著增强免疫检查点阻断剂的治疗效果^[19]。结合本实验所得结论白术内酯I可与Tim-3蛋白特异性结合,推测白术内酯I可通过与Tim-3蛋白产生作用来抑制PD-1抑制剂的耐药反应。

本实验也存在不足之处,超滤亲和筛选只能确定化合物与靶标蛋白有结合性,但是生物活性还需进一步实验验证。后期本课题组会深入研究白术内酯I在细胞水平及动物体内对Tim-3表达的影响及作用机制。本研究从肿瘤耐药的免疫逃逸机制出发,在获得人Tim-3蛋白的基因数据的基础上,制备、表达和纯化Tim-3蛋白;建立快速筛选可与Tim-3蛋白相互作用的天然活性成分的亲和色谱串联质谱系统,为进一步开发具有针对性的Tim-3抑制性药物或先导化合物提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Phong B L, Avery L, Sumpter T L, et al. Tim-3 enhances FcεRI-proximal signaling to modulate mast cell activation [J]. *J Exp Med*, 2015, 212(13): 2289-2304.
- [2] Wang H, Mao L, Zhang T, et al. Altered expression of TIM-3, LAG-3, IDO, PD-L1, and CTLA-4 during nimotuzumab therapy correlates with responses and prognosis of oral squamous cell carcinoma patients [J]. *J Oral Pathol Med*, 2019, 48(8): 669-676.
- [3] Fucikova J, Rakova J, Hensler M, et al. TIM-3 dictates functional orientation of the immune infiltrate in ovarian cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(15): 4820-4831.
- [4] Jiang J, Jin M S, Kong F, et al. Decreased galectin-9 and increased Tim-3 expression are related to poor prognosis in gastric cancer [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e81799.
- [5] Solinas C, De Silva P, Bron D, et al. Significance of TIM3 expression in cancer: From biology to the clinic [J]. *Semin Oncol*, 2019, 46(4/5): 372-379.
- [6] 吉芑, 陈迪康, 卞建叶, 等. TIM-3在人非小细胞肺癌CD4⁺肿瘤浸润淋巴细胞的表达增强提示预后不良 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2015, 31(6): 808-811.
- [7] Ji P, Chen D K, Bian J Y, et al. Up-regulation of TIM-3 on CD4⁺ tumor infiltrating lymphocytes predicts poor prognosis in human non-small-cell lung cancer [J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2015, 31(6): 808-811.
- [8] 喻明, 曹琦琛, 苏玉茜, 等. 基于中医传承辅助系统的中医治疗肿瘤方剂组方分析及新方发现 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(15): 3110-3114.
- [9] Yu M, Cao Q C, Su Y X, et al. Analysis on traditional Chinese medicine prescriptions treating cancer based on traditional Chinese medicine inheritance assistance system and discovery of new prescriptions [J]. *China J Chin Mater Med*, 2015, 40(15): 3110-3114.
- [10] 王继达, 王丽, 刘海朝, 等. 黄芪注射液辅助放疗对癌症患者疗效和不良反应的系统评价 [J]. *药物评价研究*, 2022, 45(6): 1147-1157.
- [11] Wang J D, Wang L, Liu H Z, et al. Meta-analysis of effects of Astragalus Injection combined with chemoradiotherapy on efficacy and immune function of cancer patients [J]. *Drug Eval Res*, 2022, 45(6): 1147-1157.
- [12] 胡逸中, 薛征, 胡扬. 黄芪甲苷对环磷酰胺所致免疫抑制小鼠免疫功能的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2021, 32(8): 1843-1844.
- [13] Hu Y Z, Xue Z, Hu Y. Effect of astragaloside IV on immune function of immunosuppressed mice induced by cyclophosphamide [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2021, 32(8): 1843-1844.
- [14] 孟晓莹. 黄芪、当归、忍冬藤水提物干预T淋巴细胞迁移和滑膜细胞炎性增殖的作用机制 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2021.
- [15] Meng X Y. Mechanism of water extracts of *Radix Astragali*, *Radix Angelicae Sinensis* and *Caulis Lonicerae* on T lymphocyte migration and inflammatory proliferation of synovial cells [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2021.
- [16] 王葱葱. 白术内酯I对MyD88+卵巢癌细胞的吡啶胺-2, 3双加氧酶(indoleamine-2, 3-dioxygenase IDO)的表达及外周血T淋巴细胞增殖活性的影响 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2014.
- [17] Wang C C. Effects of *Atractylodes macrocephala* I on Indole Amine-2, 3-dioxygenase I do expression in MyD88+ ovarian cancer cells and proliferation activity of peripheral blood T lymphocytes [D]. Chengdu: Chengdu University of TCM, 2014.
- [18] Liu H Y, Zhu Y J, Zhang T, et al. Anti-tumor effects of atractylenolide I isolated from *Atractylodes macrocephala* in human lung carcinoma cell lines [J].

- Molecules, 2013, 18(11): 13357-13368.
- [13] 郭思琪, 杨华, 李萍. 亲和超滤结合液质技术在中药有效成分发现中的应用 [J]. 药学学报, 2016, 51(7): 1060-1067.
- Wu S Q, Yang H, Li P. Application of the affinity ultrafiltration coupled with LC-MS technology in screening active components of traditional Chinese medicines [J]. *Acta Pharm Sin*, 2016, 51(7): 1060-1067.
- [14] Wang S, Huai J, Shang Y, et al. Screening for natural inhibitors of 5-lipoxygenase from Zi-Shen pill extract by affinity ultrafiltration coupled with ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 254: 112733.
- [15] Xu S Z, Qi X J, Liu Y Q, et al. UPLC-MS/MS of atractylenolide I, atractylenolide II, atractylenolide III, and atractyloside A in rat plasma after oral administration of raw and wheat bran-processed atractylodis rhizoma [J]. *Molecules*, 2018, 23(12): 3234.
- [16] 张瑜, 张富庚, 张博凯, 等. 芪苈强心胶囊中黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素在大鼠体内药动学研究 [J]. 中草药, 2019, 50(16): 3891-3896.
- Zhang Y, Zhang F G, Zhang B K, et al. Pharmacokinetics study of astragaloside, calycosin-7-glucoside and formononetin of Qili Qiangxin Capsule in rats [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2019, 50(16): 3891-3896.
- [17] Zeidan A M, Komrokji R S, Brunner A M. TIM-3 pathway dysregulation and targeting in cancer [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2021, 21(5): 523-534.
- [18] Bailly C, Thuru X, Quesnel B. Modulation of the gal-9/TIM-3 immune checkpoint with α -lactose. does anomery of lactose matter? [J]. *Cancers*, 2021, 13(24): 6365.
- [19] Xu H C, Van der Jeught K, Zhou Z L, et al. Atractylenolide I enhances responsiveness to immune checkpoint blockade therapy by activating tumor antigen presentation [J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(10): e146832.

[责任编辑 兰新新]