

槲皮素抗阿霉素诱导心肌毒性的网络多靶标研究

贾 静¹, 刘增娟¹, 朱臻宇², 柴逸峰², 陈 思^{2*}

1. 石家庄市第三医院 药剂科, 河北 石家庄 050011

2. 海军军医大学, 上海 200433

摘要: **目的** 研究槲皮素抗阿霉素诱导心肌毒性的网络多靶标机制。**方法** 成年 ICR 小鼠随机分为对照组、阿霉素组和槲皮素组 (每组 8 只)。给药结束后收集血清, 用于测量肌酸激酶 (CK) 和乳酸脱氢酶 (LDH) 水平。同时快速取心脏组织液氮冷冻, 用于蛋白质组学研究, 将得到的差异蛋白与槲皮素已知靶标蛋白进行网络分析, 筛选其抗阿霉素诱导心肌毒性所靶向的蛋白。**结果** 槲皮素能显著抑制阿霉素诱导的血清 CK 和 LDH 的升高, 缓解阿霉素诱导的心肌损伤。蛋白质组学分析结果表明槲皮素通过调节 40 个差异蛋白的表达来发挥心肌保护作用。基因本体分析和通路富集分析结果表明, 槲皮素主要通过调节氧化还原、能量代谢、脂肪酸代谢、高密度脂蛋白和凋亡来发挥心肌保护作用。进一步的网络分析结果筛选出了槲皮素调节以上生物过程和通路靶向的 11 个靶标蛋白。**结论** 槲皮素主要通过靶向 11 个靶标蛋白调节氧化还原、能量代谢、脂肪酸代谢、高密度脂蛋白和凋亡来缓解阿霉素诱导的心肌毒性。

关键词: 槲皮素; 蛋白质组学; 阿霉素; 心肌毒性; 肌酸激酶; 乳酸脱氢酶

中图分类号: R966; R917 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)18-4364-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.18.015

A network-based multi-target strategy to investigate cardioprotection effect against doxorubicin by quercetin

JIA Jing¹, LIU Zeng-juan¹, ZHU Zhen-yu², CHAI Yi-feng², CHEN Si²

1. Pharmacy Department, The Third Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050011, China

2. Naval Military Medical University, Shanghai 200433, China

Abstract: Objective To investigate the multi-target action mechanism of quercetin against doxorubicin-induced myocardial toxicity. **Methods** Adult ICR mice were randomly divided into control group, doxorubicin group, and quercetin treatment group ($n = 8$). After experiments, serum was collected for measurement of creatine kinase and lactate dehydrogenase, and cardiac tissue cryopreservation was rapidly excised for proteomics studies. Finally, a network of differential proteins and known target proteins of quercetin was constructed to identify target proteins of quercetin against doxorubicin-induced myocardial toxicity. **Results** Quercetin significantly reduced the concentration of doxorubicin-induced elevated serum creatine kinase and lactate dehydrogenase, suggesting that quercetin can alleviate doxorubicin-induced myocardial damage. Proteomic results indicated that quercetin protected doxorubicin-induced cardiotoxicity by regulating differential expression of 40 proteins. Gene ontology analysis and pathway enrichment analysis showed that quercetin mainly exerted myocardial protection by regulating redox, energy metabolism, fatty acid metabolism, high density lipoprotein, and apoptosis. Further network analysis screened out 11 proteins that quercetin targeted to regulate the above biological processes and pathways. **Conclusion** Quercetin relieves doxorubicin-induced myocardial toxicity by targeting 11 proteins and then regulating redox, energy metabolism, fatty acid metabolism, high-density lipoprotein, and apoptosis.

Key words: quercetin; proteomics; doxorubicin; cardiotoxicity; creatine kinase; lactate dehydrogenase

阿霉素是一种有效的广谱抗肿瘤药物^[1], 然而, 其严重的副作用大大限制了其临床应用, 其中最显著的副作用是心肌毒性^[2]。大多数研究表明阿霉素诱

导的心肌病与氧化应激密切相关, 活性氧和氧化还原循环在阿霉素诱导心肌损伤的发病机制中发挥重要作用^[3-5]。槲皮素是一种黄酮类化合物, 体内和

收稿日期: 2019-02-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81773683)

作者简介: 贾 静, 女, 硕士, 主管药师, 研究方向为中药活性成分筛选。Tel: 17732802076 E-mail: jiajing007@aliyun.com

*通信作者 陈 思, 女, 博士, 博士后, 研究方向为系统药理学。E-mail: caroline-sisi-chen@hotmail.com

体外实验均表明槲皮素具有心脏保护作用,并能缓解阿霉素诱导的心肌毒性^[6-9]。此外,文献还报道该化合物具有抗氧化、抗炎、清除活性氧等生物活性^[10-11],然而,其心脏保护作用的潜在靶标和作用机制仍不完全明确。

随着系统生物学和组学技术的快速发展,蛋白质组学技术已广泛应用于小分子的靶标鉴别^[12-13]。最近,一些研究采用蛋白质组学策略探讨了槲皮素的生物学效应^[14-18]。Chen 等^[9]还采用 2D-DIGE-MALDI-TOF-MS 技术对槲皮素抗阿霉素心肌毒性的作用进行了细胞蛋白组学研究,结果表明槲皮素通过调节代谢活化、蛋白折叠和细胞骨架重排发挥保护作用。最近,研究人员还应用 2D-PAGE 策略找到了几种槲皮素调节的蛋白,如异质核糖核蛋白 A1^[19]、热休克蛋白 70^[16]和 Ras GTP 酶激活样蛋白^[17]。然而,以上经典的基于凝胶的蛋白质组学技术具有一些局限性,比如很难检测到一些疏水膜蛋白和低丰度蛋白^[20-21]。

iTRAQ 是一种同位素标记相对和绝对定量技术,具有高精密度和高灵敏度的特点,该技术是近年来定量蛋白组学常用的高通量筛选技术^[22]。为了更全面地鉴别槲皮素治疗阿霉素诱导心肌损伤所调控的差异蛋白,本实验基于 iTRAQ 技术进行了相关蛋白组学研究。随后,采用网络多靶标策略,将得到的蛋白组学结果与槲皮素已知的靶标数据相结合,构建蛋白相互作用网络,鉴别出槲皮素治疗阿霉素诱导心肌损伤所靶向的蛋白,探讨其治疗阿霉素诱导心肌病的潜在作用机制。

1 材料

1.1 药品与试剂

槲皮素(批号 5086,质量分数 99%)购自上海诗丹德有限公司;iTRAQTM试剂盒购自 AB SCIEX(批号 A7052);阿霉素[批号 135501,辉瑞制药(无锡)有限公司]购自上海长海医院;BCA 试剂盒、Tris/HCl 购自碧云天生物技术有限公司;尿素、2% SDS 购自 Sigma-Aldrich 公司;蛋白质组学分析中使用的所有化学试剂均为分析级,甲酸铵、乙腈和甲酸分别购自 Sigma-Aldrich 公司、Merck KgaA 公司及 Fluka 公司;制备蛋白样品的试剂二硫苏糖醇和碘乙酰胺购自 Sigma-Aldrich 公司;肌酸激酶(CK)和乳酸脱氢酶(LDH)ELISA 试剂盒购自卧宏生物科技有限公司;蛋白酶抑制剂(批

号 09693122003,规格 20 片,每片加 50 mL 溶剂)购自罗氏公司。

1.2 动物

ICR 小鼠,SPF 级,体质量 25~30 g,购自中国科学院上海实验动物中心(上海斯莱克实验动物有限责任公司),饲养温度为 20~25 ℃,饲养湿度为 50%~60%,实验期间,给小鼠喂食无菌食物和自来水。

1.3 仪器

LC-20A 购自岛津公司;Eksigent Nano LC-UltraTM System Tandem TripleTOFTM5600+购自 AB SCIEX 公司。

2 方法

2.1 动物分组及给药

所有动物实验均在海军军医大学实验动物中心按照相关法律法规进行,小鼠适应环境 3 d 后采用随机数字表法分成 3 组,分别为对照组、阿霉素组和槲皮素组,每组 8 只。整个实验周期共 7 d,对照组连续 ig 饮用水(30 mg/kg)7 d,第 4 天 ip 生理盐水(20 mg/kg);阿霉素组连续 ig 饮用水(30 mg/kg)7 d,第 4 天 ip 阿霉素(20 mg/kg);槲皮素组连续 ig 槲皮素(30 mg/kg,根据预试验确定的最佳有效剂量)7 d,第 4 天 ip 阿霉素(20 mg/kg)。ip 阿霉素 72 h 后,收集各组小鼠血清,用于测量 CK 和 LDH,并且快速取出心脏冷冻于液氮中用于蛋白组学分析。

2.2 样品前处理

每组随机选取 6 只小鼠心脏合并为一个样本。取一定量组织,按质量比 1:10 加入组织裂解液(1% SDS、1 mmol/L 原钒酸钠、1 mmol/L 氟化钠,每 10 毫升加入 1/4 片蛋白酶抑制剂),电动匀浆器冰浴条件下将混合物充分匀浆,沸水浴 3 min,超声细胞破碎提取蛋白(超声 10 s,停 15 s,循环 10 次),1 600 r/min 下离心 10 min,将上清液转移至新管中,使用 BCA 试剂盒测定蛋白质量浓度。将裂解物(每个样品 200 μg 蛋白)加入 4 μL 浓度为 1 mol/L 的二硫苏糖醇溶液,37 ℃下还原 1 h。然后在室温避光条件下,加入 20 μL 1 mol/L 的碘乙酰胺烷基化 1 h。将溶液加入超滤管(截留相对分子质量 1×10^4)中并在 12 000 r/min 离心 20 min。弃去滤液,然后加入 100 μL 尿素溶液进行沉淀,离心 2 次。向沉淀中加入 100 μL EDTA 缓冲液,离心,弃去上清液,重复 3 次。每个样品在 37 ℃下

加入 40 μL 胰蛋白酶过夜处理, 离心收集滤液, 之后在超滤管中加入 40 μL EDTA 缓冲液, 离心并与之前滤液合并。然后根据 AB SCIEX 提供的手册采用 iTRAQ 试剂对不同组的蛋白质样品进行标记; 对照组: iTRAQ 试剂 113 和 117; 阿霉素组: iTRAQ 试剂 114 和 118; 槲皮素组: iTRAQ 试剂 116 和 121, 每组均有 1 个技术重复。标记程序持续 2 h, 将标记的样品储存在 -80°C 下等待进一步分级。

2.3 样品分级

采用 Durashell- C_{18} 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm , Agela 公司), 合并高效液相制备色谱系统(安捷伦 1100) 将同位素标记的肽分成 10 个部分。流动相 A: 20 mmol/L 甲酸铵 (pH 10), 流动相 B: 80%乙腈 (含 20 mmol/L 甲酸铵, pH 10); 线性梯度程序: 0~5 min, 5% B; 5~30 min, 15% B; 30~45 min, 38% B; 45~46 min, 90% B; 46~55 min, 90% B; 55~65 min, 5% B; 体积流量 0.8 mL/min。从 5 min 开始收集样品, 通过进行该方法, 将样品分成 48 个组分, 并将分级分离物在真空中冷冻干燥, 用于进一步的蛋白质组学分析。

2.4 蛋白组学分析

根据紫外检测情况, 将高 PH 反相分离得到的 48 个组分合并为 10 个组分, 合并时采用 2%乙腈和 0.1%甲酸为溶剂。首先向第 1 个组分的离心管 (经过冷冻干燥) 加入 30 μL 溶剂, 涡旋振荡并离心后, 将得到的溶液转入第 2 个离心管, 依次直至合并组分最后 1 管 (组份合并原则为组分 1-48 靠近梯度开始和终止的组份进行合并, 例如 1、2 与 47、48 进行合并, 依次向中间进行; 此外, 根据紫外检测情况, 调节合并的管数, 尽量使合并后的组份肽段含量比较一致), 12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清上样然后通过 Nano LC-TripleTOFTM 5600 (AB Sciex) 进行定量蛋白质组分析。流动相 A: 2%乙腈和 0.1%甲酸; 流动相 B: 98%乙腈和 0.1%甲酸。使用自动进样器, 将 8 μL 样品上样到 Nano LC 预柱 (Chrom XPC₁₈_CL, 0.5 mm $\times$ 350 μm , 43 μm) 上, 并用流动相 A 洗脱 15 min, 体积流量为 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。在分析柱 (150 mm $\times$ 0.075 mm, 3 μm) 上用线性梯度的流动相 A 和流动相 B 分离 120 min, 梯度洗脱: 0~0.1 min, 5%~10% B; 0.1~80 min, 10%~23% B; 80~105 min, 23%~35% B; 105~106 min, 35%~80% B; 106~110 min, 80% B; 110~110.5 min, 80%~5% B; 110.5~120

min, 5% B; 体积流量为 300 nL/min。质谱分析的参数设定如下: ESI 离子源 [SilicaTipTM FS360-20-10-N-20-C12, Tip 为 (10 $\pm$ 1) μm , 美国], 离子雾化电压为 2.3 kV, 温度为 150 $^{\circ}\text{C}$, 正离子模式下 m/z 350~1 250, 高分辨率扫描模式下的累积扫描时间为 250 ms, 气帘气压力 206.85 kPa (30 psi), 雾化气体压力 103.425 kPa (15 psi), m/z 值扫描范围 100~1 500, 累积时间 0.1 s, 动态排除 25 s, 碎裂物的电荷为 +2~+5, 每个循环获得至多 40 个前体的 MS/MS 谱, 全程使用 iTRAQ 调整滚动碰撞能量。

2.5 数据库检索和蛋白的鉴定

使用 AB Sciex 质谱数据转换器 (版本 1.3) 及 Mascot (版本 2.5.1, Matrix Science, 英国) 分析串联质谱数据, 从 Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) 下载小鼠总蛋白质数据库, 使用 Scaffold (版本 Scaffold_4.6.1, Proteome Software Inc., 美国) 鉴定肽和蛋白质, 设定 FDR<0.01, unused 蛋白得分 (unused ProtScore, 蛋白质鉴定的可行度评分) > 1.3, 同时至少一个专有肽段的置信度大于 0.95。肽和蛋白质的定量分析主要使用 Scaffold Q⁺ (版本 Scaffold_4.6.1, Proteome Software Inc., 美国) 软件进行, 上调或下调倍数的截止值分别为 1.25 和 0.8, 同时 $P<0.05$ 的蛋白质被认为差异表达。然后通过 STRING (<https://string-db.org/>) 数据库分析这些差异蛋白相关的主要生物过程、分子功能、细胞组分和相关通路。

2.6 文本挖掘和网络分析

检索 ChEMBL 和 PubMed 数据库挖掘槲皮素已知的靶标蛋白, 然后检索 STRING 数据库得到这些靶标蛋白与槲皮素所调控差异蛋白之间的相互作用, 参数默认。依据得到的蛋白-蛋白相互作用图预测槲皮素治疗阿霉素诱导心肌损伤所靶向的蛋白。

2.7 统计分析

采用 GraphPad Prism 5 进行单向方差分析和事后 Dunnett- t 检验统计分析, 用于多组变量的比较。

3 结果

3.1 血清生化指标

参考文献报道及临床标准^[23], 对各组小鼠血清中的心肌疾病诊断标志物 CK 和 LDH 进行测量, 结果见图 1。与对照组比较, 阿霉素组小鼠 ip 阿霉素 72 h 后血清 CK 和 LDH 水平显著升高 ($P<0.05$), 槲皮素组小鼠血清 CK 和 LDH 水平较阿霉素组显著降低 ($P<0.05$)。表明阿霉素诱导小鼠心肌损伤模

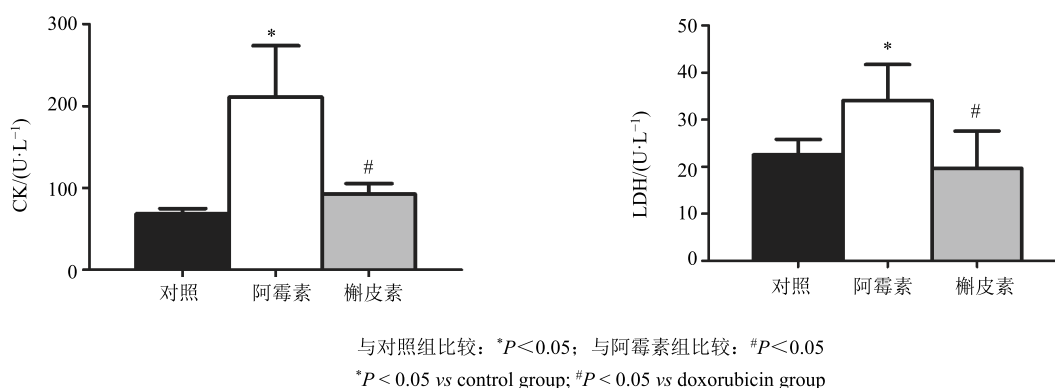


图 1 各组小鼠血清 CK 和 LDH 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 1 CK and LDH levels in serum of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

型造模成功, 并且槲皮素能缓解阿霉素诱导的心肌损伤。

3.2 整合 iTRAQ 标记技术和 Nano LC-Triple TOF/MS 鉴定槲皮素抗阿霉素诱导心肌损伤所调控的差异蛋白

为了鉴定槲皮素所调控的差异蛋白, 采用 iTRAQ 标记的 113 和 117 标记了对照组, 用 iTRAQ 标记的 114 和 118 标记了阿霉素组, 同时用 iTRAQ 标记的 116 和 121 标记了槲皮素组, 并应用 Nano LC-Triple TOF/MS 技术对这些样本进行了分析, 结果共鉴别出 1 358 个蛋白 (置信水平 > 0.95 , unused ProtScore > 1.3)。其中, 在对照组和阿霉素组之间具有统计学差异 (Fold change > 1.25 或 < 0.8 , $P < 0.05$), 且槲皮素能逆转的蛋白 (Fold change > 1.25 或 < 0.8 , $P < 0.05$) 共 40 个, 结果见表 1。其中 30 种蛋白在阿霉素组中下调 (Fold change < 0.8), 槲皮素组中上调 (Fold change > 1.25); 10 种蛋白在阿霉素组中上调 (Fold change > 1.25), 槲皮素组中下调 (Fold change < 0.8)。配对 t 检验结果表明 114/113 和 118/117、116/114 和 121/118 之间的变化具有统计学意义 ($P < 0.001$)。

3.3 差异蛋白的基因功能分析

检索 STRING 数据库, 对差异蛋白相关的生物过程、分子功能、细胞组分和相关通路进行了富集分析, 结果见图 2。槲皮素调控的 40 个差异蛋白主要存在于细胞内、细胞质、细胞器、膜结合的细胞器和细胞内膜结合细胞器上, 此外在细胞外区域、膜结合囊泡、大分子复合物、细胞外泌体和线粒体上也有分布。分子功能是指由一个蛋白质实现的生化功能, 如连接结合、生化反应的催化以及形态改

变。通过对分子功能进行富集分析, 结果表明差异表达蛋白的分子功能主要为离子结合和小分子结合, 其次为氧化还原酶活性、辅因子结合、单羧酸结合、脂肪酸结合和高密度脂蛋白颗粒结合。另外, 槲皮素抗阿霉素诱导心肌损伤主要通过调控氧化还原过程、小分子代谢过程和稳态过程, 其他次要生物过程主要有羧酸代谢过程、细胞死亡的负调节、防御反应、对药物的反应、脂肪酸代谢过程和 ATP 代谢过程。对差异调控蛋白进行了通路富集分析, 结果表明槲皮素主要通过调控代谢通路、氧化磷酸化、过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR) 信号通路、碳代谢和三羧酸循环来抗阿霉素诱导的心肌损伤。

3.4 槲皮素抗阿霉素诱导心肌损伤所靶向的蛋白

通过挖掘 ChEMBL 数据库, 得到了槲皮素已知的 273 个靶标蛋白, 对这些靶标蛋白进行提炼, 仅保留蛋白物种来源为人类, 活性值小于 $1 \mu\text{mol/L}$ 的蛋白, 最后共得到 37 个有效的靶蛋白, 这些靶标蛋白与差异蛋白无重复。然后检索 STRING 数据库, 得到槲皮素靶向蛋白与其所调控的 40 个差异蛋白之间的相互作用, 相互作用打分设定为 0.4, 结果见图 3。对图 3 所示蛋白-蛋白相互作用网络的边数进行了统计分析, 得到与每个节点 (蛋白) 相关蛋白的数量, 其中有 31 个差异蛋白相关蛋白的数量 ≥ 1 , 35 个靶标蛋白相关蛋白数 ≥ 1 , 相关蛋白数量 > 5 的靶标蛋白见表 2。相关蛋白数量越多, 表明该靶标蛋白在该网络中的作用越重要, 这些蛋白也更可能是槲皮素调控 40 个差异蛋白所靶向的, 从而更可能是槲皮素抗阿霉素诱导心肌损伤所靶向的蛋白。

表 1 槲皮素抗阿霉素诱导心肌损伤所调控的差异蛋白

Table 1 Differential protein regulated by quercetin against doxorubicin-induced myocardial injury

Uniprot 编号	蛋白名	Unused ProtScore	总打分	范围/ %	多肽 (95%置信度)	Fold change			
						114/113	116/114	118/117	121/118
P52503	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 6, mitochondrial	32.54	32.55	78.5	34	0.38	1.29	0.09	8.63
P02089	hemoglobin subunit beta-2	22.32	81.90	93.9	103	0.33	2.58	0.15	7.31
P11404	fatty acid-binding protein, heart	52.93	52.93	96.2	54	0.39	1.46	0.15	4.61
Q9CQU0	thioredoxin domain-containing protein 12	1.82	1.83	30.0	3	0.65	1.27	0.17	4.57
P56480	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	125.66	125.76	80.5	118	0.33	1.80	0.15	3.10
Q9CQX8	28 S ribosomal protein S36, mitochondrial	32.78	32.79	72.6	31	0.36	1.77	0.27	3.05
O55042	alpha-synuclein	21.37	21.40	74.3	18	0.34	1.57	0.43	2.73
P07724	serum albumin	165.98	166.08	77.0	176	0.57	1.58	0.01	2.63
P51174	long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	41.21	41.47	58.8	33	0.44	1.46	0.25	2.38
P51881	ADP/ATP translocase 2	4.13	28.93	69.8	25	0.71	1.53	0.43	2.36
Q9D6J6	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	32.20	32.20	66.9	23	0.60	1.39	0.43	2.29
P16045	galectin-1	16.46	16.46	83.7	15	0.26	1.80	0.22	2.21
Q9DC77	small muscular protein	27.08	27.08	84.7	26	0.78	1.26	0.54	2.03
Q61171	peroxiredoxin-2	33.85	33.87	79.3	32	0.08	1.69	0.10	1.98
P11499	heat shock protein HSP 90-beta	19.48	19.56	47.5	16	0.63	1.43	0.44	1.94
Q9CR68	cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	37.10	37.14	46.7	29	0.43	1.42	0.26	1.87
Q06185	ATP synthase subunit e, mitochondrial	10.73	10.73	64.8	9	0.74	1.34	0.66	1.84
Q8BMS1	trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	37.67	37.74	51.0	37	0.62	1.39	0.45	1.84
P31786	acyl-CoA-binding protein	23.97	24.09	74.7	22	0.77	1.50	0.78	1.77
P48962	ADP/ATP translocase 1	51.30	51.30	81.5	45	0.39	1.89	0.61	1.75
Q9DCZ1	GMP reductase 1	11.15	11.18	35.4	9	0.49	1.31	0.35	1.66
Q99K10	aconitate hydratase, mitochondrial	58.86	58.86	56.4	48	0.63	1.39	0.50	1.60
P09813	apolipoprotein A-II	17.86	17.86	67.7	18	0.27	1.61	0.48	1.58
Q08857	platelet glycoprotein 4	72.52	72.52	59.3	65	0.19	1.26	0.23	1.58
Q6P2L7	protein CASC4	2.06	2.07	27.4	2	0.79	1.89	0.77	1.43
P08607	C4b-binding protein	11.40	11.42	36.5	11	0.43	1.32	0.60	1.42
Q9CPU0	lactoylglutathione lyase	12.32	12.32	47.3	12	0.11	2.42	0.08	1.36
P97807	fumarate hydratase, mitochondrial	22.11	22.14	41.2	13	0.56	1.31	0.70	1.33
P62821	ras-related protein Rab-1A	9.27	9.27	39.0	9	0.37	1.69	0.61	1.32
Q5EBG6	heat shock protein beta-6	9.58	9.58	71.6	8	0.78	1.37	0.75	1.27
P21460	cystatin-C	2.01	2.01	45.7	2	1.61	0.73	1.29	0.72
O08638	myosin-11	13.62	17.54	39.1	12	14.60	0.49	2.78	0.69
Q9DD18	D-tyrosyl-tRNA(Tyr) deacylase 1	2.81	2.81	23.4	2	1.60	0.68	1.77	0.65
Q8CDG3	deubiquitinating protein VCIP135	2.05	2.05	23.1	2	2.70	0.69	1.47	0.63
P10852	4F2 cell-surface antigen heavy chain	3.38	3.42	32.3	2	2.15	0.59	1.51	0.62
P24457	cytochrome P450 2D11	1.56	1.57	15.5	2	1.60	0.77	1.37	0.54
Q80UG5	septin-9	4.00	4.01	24.2	3	2.31	0.67	3.60	0.52
Q9D0L8	mRNA cap guanine-N7 methyltransferase	2.01	2.01	41.7	1	3.28	0.68	1.49	0.52
Q02357	ankyrin-1	8.97	9.12	24.7	9	2.40	0.11	10.09	0.21
Q3TYD6	serine/threonine-protein kinase Lemur tyrosine kinase 2	4.44	4.45	13.9	5	2.17	0.77	3.91	0.05

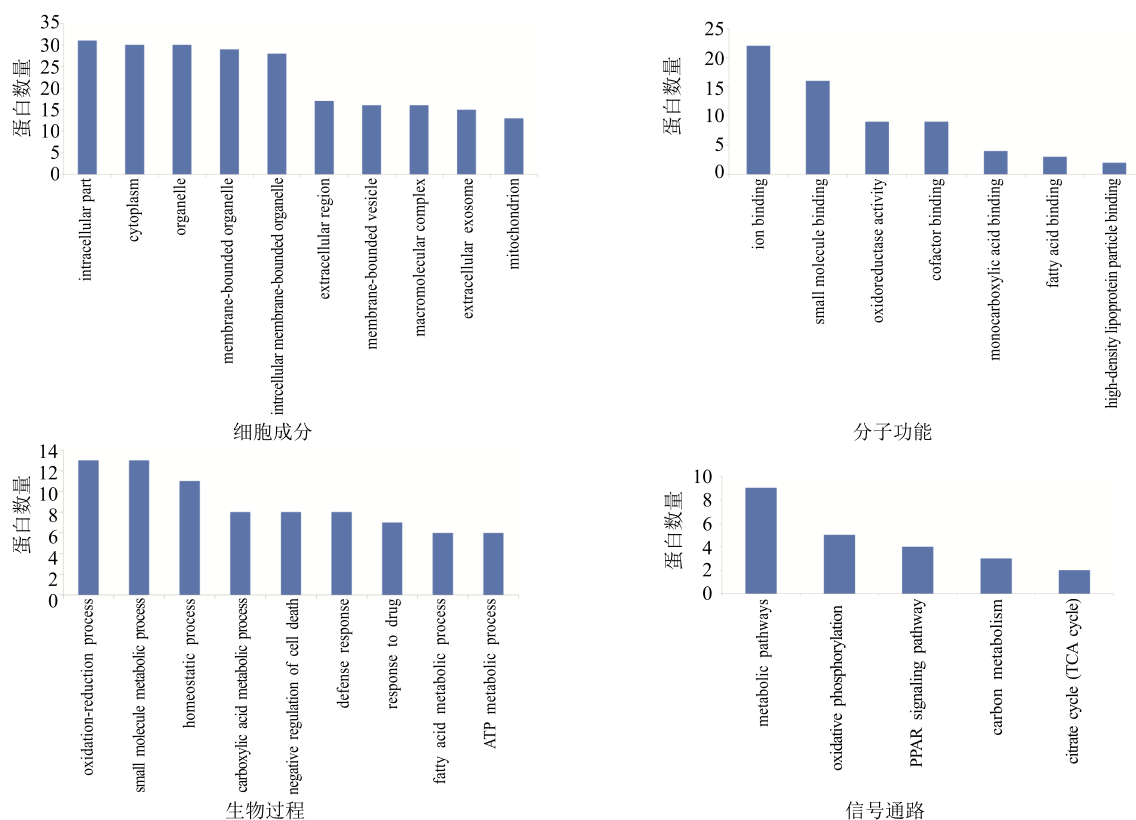


图 2 40 种差异表达蛋白的生物信息学分析

Fig. 2 Bioinformatics analysis of 40 differentially expressed proteins

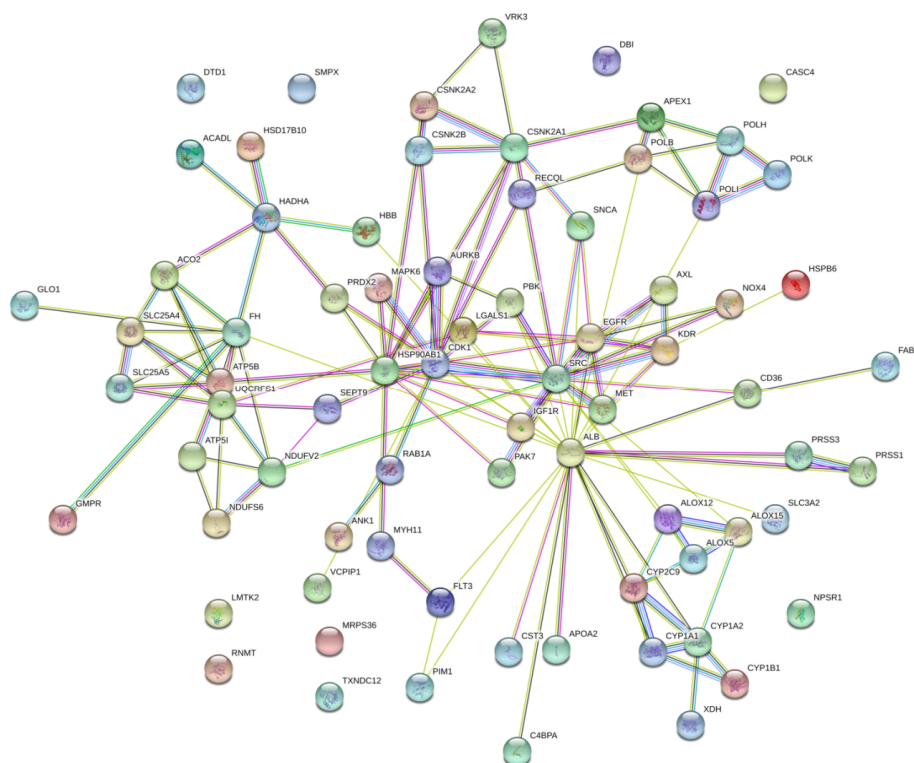


图 3 STRING 分析得到的靶标蛋白和差异表达蛋白之间的蛋白-蛋白相互作用

Fig. 3 Protein-protein network of target proteins and differentially expressed proteins analyzed by STRING

表 2 蛋白-蛋白相互作用网络的分析

Table 2 Protein-protein interaction network analysis.

编号	基因名称	蛋白名称	相关蛋白数
1	SRC	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src	18
2	CDK1	Cyclin-dependent kinase 1	13
3	EGFR	Epidermal growth factor receptor	10
4	CSNK2A1	Casein kinase II subunit alpha	8
5	KDR	Vascular endothelial growth factor receptor 2	7
6	CYP2C9	Cytochrome P450 2C9	6
7	CYP1A2	Cytochrome P450 1A2	6
8	POL1	DNA polymerase iota	5
9	MET	Hepatocyte growth factor receptor	5
10	APEX1	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase	5
11	ALOX15	Arachidonate 15-lipoxygenase	5

4 讨论

许多研究表明阿霉素诱导的心肌病与氧化应激密切相关^[3-5]，而槲皮素是植物来源的酚类化合物，具有强效抗氧化和清除自由基的特性^[24]。因此，推测槲皮素可能通过调节氧化应激发挥阿霉素诱导心肌毒性的保护作用。本实验槲皮素蛋白组学研究得到的结果与这一推测不谋而合，结果表明槲皮素保护心肌活性主要与调节氧化还原酶活性、氧化还原过程及氧化磷酸化相关。并且许多其他研究也证明槲皮素主要通过抗氧化来抗阿霉素诱导的心肌毒性，具体表现为显著升高心肌抗氧化指数及降低心肌丙二醛（MDA）含量和 DNA 损伤^[25]，清除活性氧和自由基^[26-27]，增强抗氧化酶超氧化物歧化酶（SOD）的表达和降低诱导型一氧化氮合酶（iNOS）的活性^[7,28]。

此外，槲皮素蛋白组学结果还表明槲皮素通过调节能量代谢相关的 ATP 代谢过程、PPAR 信号通路和三羧酸循环来发挥心肌保护作用，这一结果也与现有的研究基本符合^[25]。该研究表明槲皮素能促进单磷酸腺苷激活的蛋白激酶催化亚单位 $\alpha 2$ （AMPK $\alpha 2$ ）、过氧化物酶体增殖物激活受体 α （PPAR α ）和过氧化物酶体增殖激活受体辅助活化因子-1 α （PCG-1 α ）的表达，显著调节 AMPK 激活的蛋白激酶信号通路，从而恢复心肌能量代谢来抵抗阿霉素诱导的心肌毒性。蛋白组学结果还表明，槲皮素通过调节脂肪酸代谢、高密度脂蛋白和凋亡（细胞死亡的负调节）来发挥心肌保护作用。

最后将蛋白组学结果与已知的槲皮素靶标数据相结合，进行网络多靶标分析，得到了槲皮素抗阿

霉素诱导心肌损伤所靶向的 11 个蛋白，这些蛋白分别为 Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src、Cyclin-dependent kinase 1、Epidermal growth factor receptor、Casein kinase II subunit alpha、Vascular endothelial growth factor receptor 2、Cytochrome P450 2C9、Cytochrome P450 1A2、DNA polymerase iota、Hepatocyte growth factor receptor、DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase 和 Arachidonate 15-lipoxygenase。以上 11 个靶标蛋白均为槲皮素已知的靶标蛋白，槲皮素抗阿霉素诱导心肌损伤所调控的差异蛋白也是实验所得，这 11 个靶标蛋白与差异蛋白之间的相互作用也是已知，可以初步推断槲皮素是靶向这 11 个蛋白抗阿霉素诱导的心肌毒性，但这一结论仍需要更深入、更全面的实验验证。本研究采用的网络多靶标策略将为活性小分子作用机制的探索提供参考。

参考文献

- [1] Yang N, Zhao K, Li X, *et al.* Comprehensive analysis of wintersweet flower reveals key structural genes involved in flavonoid biosynthetic pathway [J]. *Gene*, 2018, doi:10.1016/j.gene.2018.08.050.
- [2] Chiu Y J, Chou S C, Chiu C S, *et al.* Hepatoprotective effect of the ethanol extract of *Polygonum orientale* on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice [J]. *J Food Drug Anal*, 2018, 26(1): 369-379.
- [3] Carvalho F S, Burgeiro A, Garcia R, *et al.* Doxorubicin-induced cardiotoxicity: From bioenergetic failure and cell death to cardiomyopathy [J]. *Med Res Rev*, 2014, 34(1): 106-135.
- [4] Wang X, Han J, Yang J, *et al.* Matrix coating assisted by

- an electric field (MCAEF) for enhanced tissue imaging by MALDI-MS [J]. *Chem Sci*, 2015, 6(1): 729-738.
- [5] Farooqi A A, Jabeen S, Attar R, *et al.* Quercetin-mediated regulation of signal transduction cascades and microRNAs: Natural weapon against cancer [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(12): 9664-9674.
- [6] Qayyum S, Sharma D, Bisht D, *et al.* Identification of factors involved in *Enterococcus faecalis* biofilm under quercetin stress [J]. *Microb Pathog*, 2018, doi:10.1016/j.micpath.2018.11.013.
- [7] Dong Q, Chen L, Lu Q, *et al.* Quercetin attenuates doxorubicin cardiotoxicity by modulating Bmi-1 expression [J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(19): 4440-4454.
- [8] Matouk A I, Taye A, Heeba G H, *et al.* Quercetin augments the protective effect of losartan against chronic doxorubicin cardiotoxicity in rats [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2013, 36(2): 443-450.
- [9] Chen J Y, Hu R Y, Chou H C. Quercetin-induced cardioprotection against doxorubicin cytotoxicity [J]. *J Biomed Sci*, 2013, doi:10.1186/1423-0127-20-95.
- [10] Perez-Vizcaino F, Duarte J. Flavonols and cardiovascular disease [J]. *Mol Aspects Med*, 2010, 31(6): 478-494.
- [11] Boots A W, Haenen G R, Bast A. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 585(2/3): 325-337.
- [12] Fei H, Hou J, Wu Z, *et al.* Plasma metabolomic profile and potential biomarkers for missed abortion [J]. *Biomed Chromatogr: BMC*, 2016, 30(12): 1942-1952.
- [13] Du H, Wang K, Su L, *et al.* Metabonomic identification of the effects of the Zhimu-Baihe saponins on a chronic unpredictable mild stress-induced rat model of depression [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, doi:10.1016/j.jpba.2016.06.019.
- [14] Chen Y W, Chou H C, Lin S T, *et al.* Cardioprotective effects of quercetin in cardiomyocyte under ischemia/reperfusion injury [J]. *Evidence-Based Compl Altern Med*, 2013, doi: 10.1155/2013/364519.
- [15] Wenzel U, Herzog A, Kuntz S, *et al.* Protein expression profiling identifies molecular targets of quercetin as a major dietary flavonoid in human colon cancer cells [J]. *Proteomics*, 2004, 4(7): 2160-2174.
- [16] Hu W, Wu W, Verschraegen C F, *et al.* Proteomic identification of heat shock protein 70 as a candidate target for enhancing apoptosis induced by farnesyl transferase inhibitor [J]. *Proteomics*, 2003, 3(10): 1904-1911.
- [17] Zhou J, Liang S, Fang L, *et al.* Quantitative proteomic analysis of HepG2 cells treated with quercetin suggests IQGAP1 involved in quercetin-induced regulation of cell proliferation and migration [J]. *Omics: J Integr Biol*, 2009, 13(2): 93-103.
- [18] Shah F A, Park D J, Koh P O. Identification of proteins differentially expressed by quercetin treatment in a middle cerebral artery occlusion model: A proteomics approach [J]. *Neurochem Res*, 2018, 43(8): 1608-1623.
- [19] Ko C C, Chen Y J, Chen C T, *et al.* Chemical proteomics identifies heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) A1 as the molecular target of quercetin in its anti-cancer effects in PC-3 cells [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(32): 22078-22089.
- [20] Du H, Zhao H, Lai X, *et al.* Metabolic profiles revealed synergistically antidepressant effects of lilies and *Rhizoma Anemarrhenae* in a rat model of depression [J]. *Biomed Chromatogr: BMC*, 2017, doi:10.1002/bmc.3923.
- [21] Zieske L R. A perspective on the use of iTRAQ reagent technology for protein complex and profiling studies [J]. *J Exper Bot*, 2006, 57(7): 1501-1508.
- [22] Pierce A, Unwin R D, Evans C A, *et al.* Eight-channel iTRAQ enables comparison of the activity of six leukemogenic tyrosine kinases [J]. *Mol Cell Proteom*, 2008, 7(5): 1535-9484.
- [23] Tan G, Lou Z, Liao W, *et al.* Potential biomarkers in mouse myocardium of doxorubicin-induced cardiomyopathy: A metabonomic method and its application [J]. *PLoS One*, 2011, 6(11): e27683.
- [24] Minaei A, Sabzichi M, Ramezani F, *et al.* Co-delivery with nano-quercetin enhances doxorubicin-mediated cytotoxicity against MCF-7 cells [J]. *Mol Biol Rep*, 2016, 43(2): 99-105.
- [25] Zakaria N, Khalil S R, Awad A, *et al.* Quercetin reverses altered energy metabolism in the heart of rats receiving Adriamycin chemotherapy [J]. *Cardiovr Toxicol*, 2018, 18(2): 109-119.
- [26] Han Y, Yu H, Wang J, *et al.* Quercetin alleviates myocyte toxic and sensitizes anti-leukemic effect of adriamycin [J]. *Hematology*, 2015, 20(5): 276-283.
- [27] Psotova J, Chlopickova S, Grambal F, *et al.* Influence of silymarin and its flavonolignans on doxorubicin-iron induced lipid peroxidation in rat heart microsomes and mitochondria in comparison with quercetin [J]. *Phytother Res*, 2002, 16(S1): 63-67.
- [28] 裴天仙, 徐长庆, 李 滨, 等. 槲皮素对阿霉素致小鼠心肌损伤的保护作用及其机制 [J]. *药学报*, 2007, 42(10): 1029-1033.