

◆特邀栏目◆

Des(rhamnosyl) verbascoside 抗 HBV 作用的定量蛋白质组学研究^{*}邓洁¹, 赵童诗尧¹, 牟俊飞¹, 梁成钦², 周先丽^{1*}

(1. 桂林医学院智能医学与生物技术学院, 广西桂林 541004; 2. 桂林医学院药学院, 广西桂林 541004)

摘要:为探究 des(rhamnosyl) verbascoside 体外抗乙型肝炎病毒(HBV)的活性作用和机制,本研究以 des(rhamnosyl) verbascoside 为实验药物对 HepG2. 2. 15 细胞进行干预,实验分为药物干预组和对照组,采用串联质谱标签(Tandem Mass Tag, TMT)蛋白质组学方法对提取的总蛋白进行分析。结果表明,共筛选得到 300 个差异表达蛋白,其中有 109 个上调蛋白,191 个下调蛋白。基因本体论(Gene Ontology, GO)分析结果显示,差异蛋白主要参与 DNA 复制(DNA replication)、鞘糖脂代谢(Glycosphingolipid metabolic process)、细胞增殖(Cell proliferation)、寡糖分解代谢(Oligosaccharide catabolic process)等生物学过程,以及 DNA 聚合酶活性(DNA polymerase activity)、丝氨酸型羧肽酶活性(Serine-type carboxypeptidase activity)、DNA 引物酶活性(DNA primase activity)等分子功能。京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)分析结果显示,差异蛋白主要参与细胞代谢(Metabolism)、遗传信息传导(Genetic information processing)、生物系统通路(Organismal systems)等相关信号通路。亚细胞定位分析表明,差异蛋白大多定位在细胞质和细胞核。本研究共筛选出 13 个与抗 HBV 密切相关的蛋白。通过定量蛋白质组学初步揭示 des(rhamnosyl) verbascoside 可能通过增加 HGF、SORT1、MAN2B1, 减少 PRIM1、PRIM2、POLA1、POLD3、POLD2、POLD1、POLE、ERCC2、LAMC1、SDC1 等蛋白表达来起到体外抗 HBV 的作用。

关键词:des(rhamnosyl) verbascoside; 蛋白质组学; 乙型肝炎病毒; 生物信息学; 旱田草

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2024)01-0197-08

DOI: 10.13656/j.cnki.gxkx.20221118.001

乙型肝炎病毒(HBV)作为一种 DNA 病毒,是目 人感染 HBV,该病毒常导致慢性肝炎,并引起严重的
前传播较为广泛的病毒之一。世界各地约有 2.5 亿 肝硬化、肝癌,甚至死亡^[1,2]。目前治疗慢性乙型肝炎

收稿日期: 2022-04-21

修回日期: 2022-06-02

* 国家自然科学基金项目(82060787, 31560100)和广西自然科学基金项目(2017GXNSFAA198242)资助。

【第一作者简介】

邓洁(1990—),女,博士,主要从事天然药物抗病毒药理学研究。

【**通信作者简介】

周先丽(1979—),女,博士,教授,硕士研究生导师,主要从事天然药物化学和药理学研究, E-mail: xlzhou2019@glmc.edu.cn。

【引用本文】

邓洁, 赵童诗尧, 牟俊飞, 等. Des(rhamnosyl) verbascoside 抗 HBV 作用的定量蛋白质组学研究[J]. 广西科学, 2024, 31(1): 197-204.

DENG J, ZHAO T S Y, MOU J F, et al. Quantitative Proteomics Study of Anti-HBV Effects of Des(rhamnosyl) verbascoside [J]. Guangxi Sciences, 2024, 31(1): 197-204.

炎的药物有恩替卡韦、拉米夫定以及干扰素等,常具有明显的耐药性和不良反应^[3,4],如嗜睡、疲劳和低血压等^[5]。因此,迫切需要开发天然、低毒的抗乙型肝炎病毒药物。

中药不仅具有多成分、多靶点的治疗作用^[6],而且成本低、毒性小^[7]。目前,临床常采用中药辅助治疗乙型肝炎的相关疾病^[8]。旱田草又称朋锯咪,是玄参科(Scrophulariaceae)母草属(*Lindernia*)植物旱田草[*Lindernia ruellioides* (Colsm.) Pennell]的全草,为瑶族人民常用的一种药材,具有消肿、止痛、活血等功效,民间常用于治疗瘀伤、蛇狗咬伤、月经不调等^[9]。前期研究发现,旱田草中化合物 des(rhamnosyl) verbascoside 具有抗乙型肝炎病毒的作用,其对 HepG2. 2. 15 细胞分泌的 HBsAg、HBeAg、HBV-DNA 具有明显的抑制作用,但其机制尚不清楚^[10]。蛋白质组学可以实时监测和准确量化药物治疗前后肿瘤细胞的蛋白表达变化^[11],广泛应用于中医药相关领域,主要用于药物作用机制的研究^[12],其中串联质谱标签(Tandem Mass Tag, TMT)法在复杂蛋白混合物组分的鉴定和定量方面具有明显优势^[13,14]。由于天然活性产物抗病毒是多靶点、多信号通路作用的结果,因此可通过蛋白质组学来深入分析其作用机制。本研究通过定量蛋白质组学方法检测 des(rhamnosyl) verbascoside 干预 HepG2. 2. 15 细胞后对对照组和药物干预组的差异蛋白,并进行生物信息学分析,拟进一步阐明 des(rhamnosyl) verbascoside 抗乙型肝炎病毒的机制,为其治疗乙型肝炎提供蛋白质组学证据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物制备

将旱田草(4 kg)的茎叶晒干后碾碎成粉状,用75%乙醇提取3次,合并提取物,减压浓缩干燥。将所得粗提物重新悬浮于水,用乙酸乙酯萃取,得到提取物,随后使用硅胶色谱柱进行柱层析,采用小孔树脂(MCI)对其进行脱色,经 RP-18 柱层析分离后,进一步用半制备高效液相色谱(HPLC, 35% MeOH-H₂O, 1 mL/min)进行分析及分离。采用 HPLC、¹H-NMR、¹³C-NMR 等技术鉴定化合物为 des(rhamnosyl) verbascoside^[10],于-20℃低温保存备用。

1.1.2 HepG2. 2. 15 细胞

HepG2. 2. 15 细胞株(稳转 HBV 病毒 HepG2

细胞)由桂林医学院苏何玲教授赠送,本课题组自行传代培养,用 G418 (380 μg/mL)定期筛选。

1.1.3 试剂

TMT 标记试剂盒、甲酸均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;碘乙酰胺、NH₃·H₂O 均购自瑞典 Sigma 公司;BCA 定量试剂盒购自上海碧云天生物技术股份有限公司;SDT 裂解液、UA buffer、IAA buffer 和四乙基溴化铵(TEAB)溶液均购自上海吉凯基因医学科技股份有限公司;牛血清白蛋白(BSA)购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.1.4 仪器与设备

Votex 振荡器购自美国 GENIE 公司, Nano Dro 酶标仪、Q Exactive plus 质谱仪购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 5430R 低温高速离心机购自德国 Eppendorf 公司, GNP-9080 恒温培养箱购自上海精宏实业有限公司, HCM-100 pro 精巧型恒温混匀仪购自上海大龙实业有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

采用含 10% 胎牛血清的达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM),在温度为 37℃、含 5% CO₂ 的培养箱中培养 HepG2. 2. 15 细胞。以 380 μg/mL G418 常规筛选 HepG2. 2. 15 细胞,每隔 2 d 更换新鲜培养基,当细胞浓度为 80%—90%时,用 0.25% 胰酶消化传代。

1.2.2 蛋白质抽提

取 HepG2. 2. 15 细胞,首先用胰酶消化,然后加 DMEM 制成 2×10⁶ 个/mL 的细胞悬液接种于培养皿中(直径 100 mm),每皿加入悬液的体积为 6 mL, 24 h 后给药,分别设置正常细胞对照组和药物干预组(100 mg/L),各设 3 个复孔。孵育 48 h 后,用磷酸盐(PBS)缓冲液轻柔冲洗细胞 3 次,加入裂解液(4% SDS, 100 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L DTT) 300 μL,金属浴 15 min, 12 000 r/min 离心 15 min,取上清,测定蛋白质浓度。分装样品,-20℃保存备用。

1.2.3 超滤管内酶解(FASP)与 TMT 标记

取各蛋白质样品 200 μg,添加二硫苏糖醇(DTT)至终浓度为 100 mmol/L,沸水浴 5 min,冷却至室温。加入 200 μL UA buffer 尿素缓冲液混匀,转入 30 kD 超滤离心管中,12 000 r/min 离心 25 min,弃滤液,重复两次。加入 100 μL 吡啶-3-乙酸(IAA) buffer, 600 r/min 振荡 1 min,室温避光 30 min, 12 000 r/min 离心 25 min。再加入 100 μL UA

buffer, 12 000 r/min 离心 15 min, 重复两次。加入 100 μ L 0.1 mol/L 三乙基二乙胺盐 (TEAB) 溶液, 12 000 r/min 离心 15 min, 重复两次。加入 40 μ L 胰蛋白酶 (Trypsin) buffer, 600 r/min 振荡 1 min, 37 $^{\circ}$ C 放置 16–18 h。换新收集管, 12 000 r/min 离心 15 min。最后加入 20 μ L 0.1 mol/L TEAB 溶液, 12 000 r/min 离心 15 min, 收集滤液。TMT 标记参照 TMT 标记试剂盒说明书操作。

1.2.4 High PH RP 分离与质谱分析

色谱柱用缓冲液 (10 mmol/L HCOONH_4 , 5% ACN, pH 值为 10.0) 平衡, 流速为 1 mL/min; 再用缓冲液 (10 mmol/L HCOONH_4 , 85% ACN, pH 值为 10.0) 梯度洗脱, 最后维持在 100%。监测 214 nm 处的吸光度值, 每隔 1 min 收集组分, 约收集 40 份, 将样品冻干后用 0.1% FA (甲酸) 复溶备用。样品用 Q Exactive plus 质谱仪进行质谱分析。检测方式为正离子模式, 母离子扫描范围为 350–1 800 m/z, 一级质谱分辨率为 70 000。

1.2.5 生物信息学分析

使用 Matplotlib v3.3.4 软件对蛋白质和样本表达进行二维分类。通过整合 Uniprot (<https://www.uniprot.org/>)、HPA (<https://www.proteinatlas.org/>)、Cell-PLOC (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc/>) 3 个数据库的信息对差异蛋白进行亚细胞定位分类, 并使用 WoLF PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp/>) 软件对无法直接分类的差异蛋白进行定位预测分析。在基因本体论 (Gene Ontology, GO) 数据库 (<https://www.geneontology.org/>) 进行功能富集分析。以 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 进行京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路分析。利用 STRING 网站 (<https://cn.string-db.org/>) 对抗 HBV 密切相关的蛋白进行蛋白质互作 (Protein-Protein Interaction, PPI) 分析。

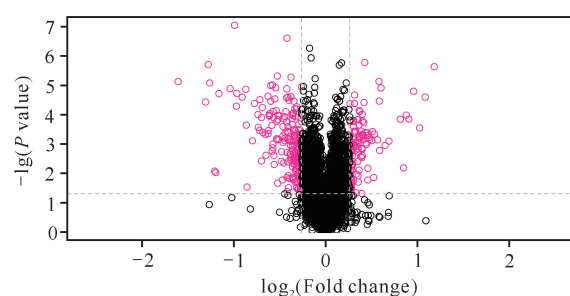
1.2.6 数据分析

使用 Proteome Discoverer 2.1 软件分析结果, 以错误发现率 (False discovery rate, FDR) < 0.01 的标准对数据进行筛选。将对照组和药物干预组获得的蛋白样品进行质谱鉴定和生物信息学分析, 表达差异倍数大于 1.2 倍且 P 值小于 0.05 的即为差异蛋白。

2 结果与分析

2.1 差异蛋白鉴定结果

筛选得到 des(rhamnosyl) verbascoside 作用后的差异表达蛋白 300 个, 其中差异表达上调蛋白和下调蛋白分别为 109 和 191 个 (图 1)。对药物干预组和对照组进行聚类分析, 结果显示组内数据模式相似度较高, 组间数据模式相似度较低 (图 2), 进一步证明了筛选差异蛋白的合理性。



The red circle on the left in the diagram represents the number of down regulated proteins, while the red circle on the right represents the number of up regulated proteins. The horizontal axis represents the multiple of differences, and the vertical axis represents the P value.

图 1 药物干预组和对照组差异表达蛋白的火山图

Fig. 1 Volcano plot of differentially expressed proteins between drug intervention group and control group

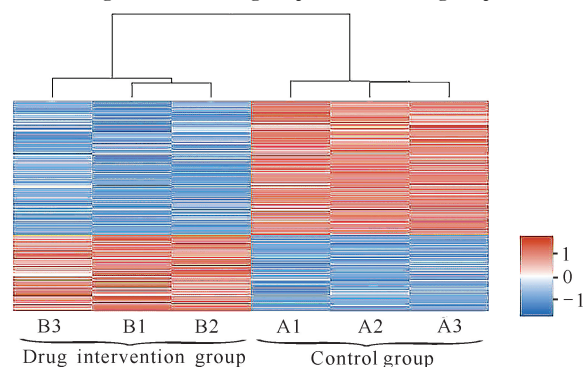


图 2 药物干预组和对照组的蛋白聚类分析

Fig. 2 Protein cluster analysis of drug intervention group and control group

2.2 差异蛋白的生物信息学分析

2.2.1 差异蛋白 GO 分析

利用 DAVID 数据库对 300 个差异蛋白进行 GO 分析, 选择 P 值最高的 13 个差异条目进行分析 (图 3)。差异蛋白主要富集于外泌体 (Exosome)、溶酶体 (Lysosome)、线粒体 (Mitochondrion)、细胞外基质 (Extracellular matrix)、血液微粒 (Blood microparticle) 等细胞组分。化合物 des(rhamnosyl) verbascoside

side 主要在细胞内调控 DNA 聚合酶活性(DNA polymerase activity)、DNA 引物酶活性(DNA primase activity)和氧化还原酶活性(Oxidoreductase activity)。同时,化合物 des(rhamnosyl) verbascoside 能在 DNA 复制(DNA replication)、鞘糖脂代谢过程

(Glycosphingolipid metabolic process)、通过重组维持端粒(Telomere maintenance via recombination)、细胞增殖(Cell proliferation)、寡糖分解代谢(Oligosaccharide catabolic process)等生物过程发挥作用。

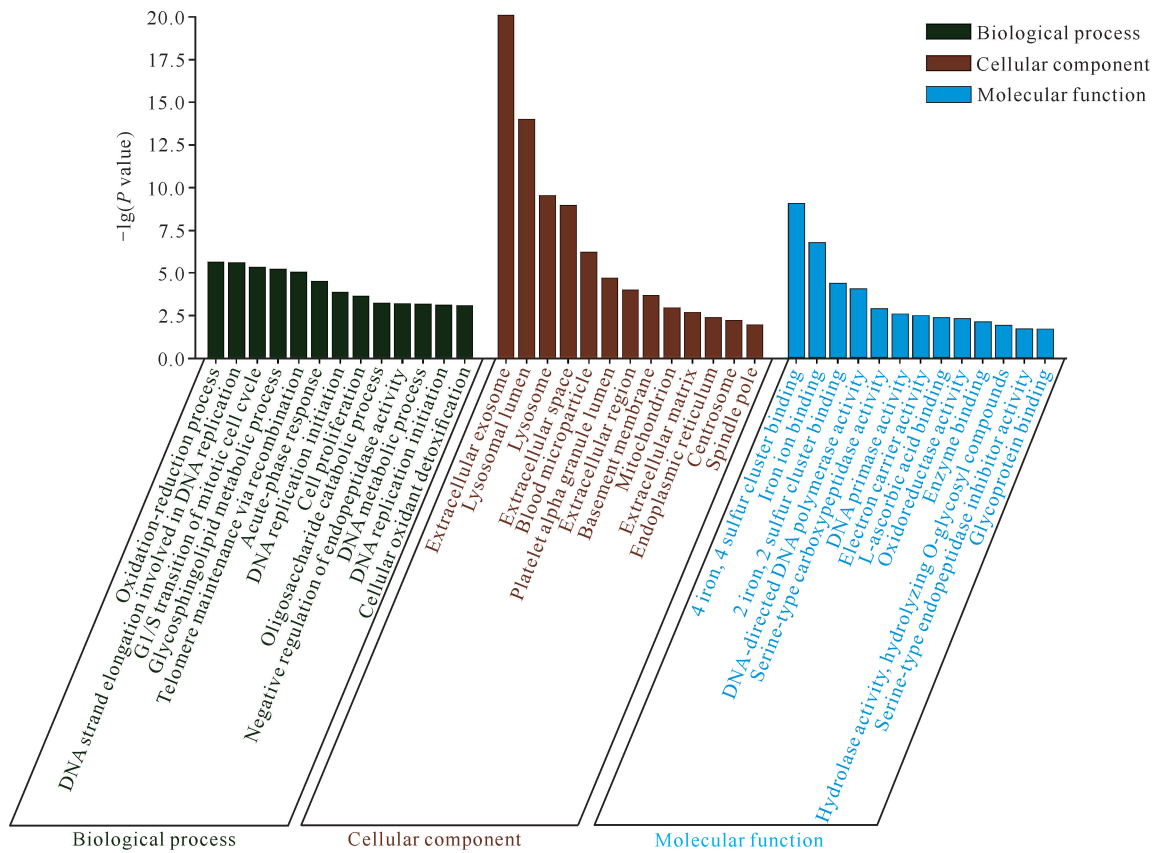
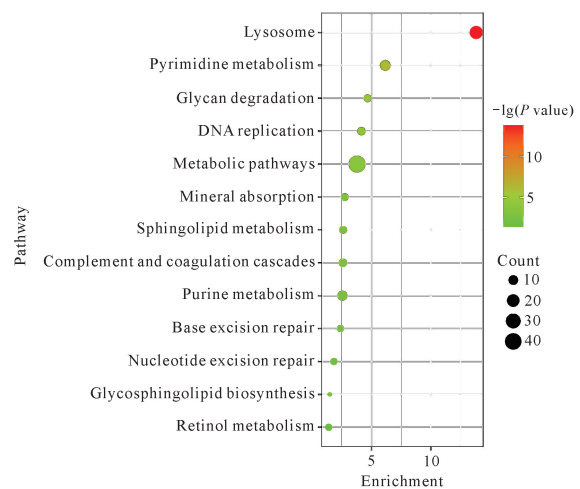


图3 GO 富集分析结果

Fig. 3 Results of GO enrichment analysis

2.2.2 差异蛋白 KEGG 通路分析

通过 KEGG 途径对 300 个差异蛋白进行分析,并筛选出 13 个显著富集的途径($P < 0.05$),见图 4 和表 1。这些途径包括细胞代谢(Metabolism)中的代谢途径(Metabolic pathways)、溶酶体、多糖降解(Glycan degradation)、鞘脂类代谢(Sphingolipid metabolism)、鞘糖脂生物合成(Glycosphingolipid biosynthesis)、视黄醇代谢(Retinol metabolism);遗传信息传导类通路(Genetic information processing)中的嘧啶代谢(Pyrimidine metabolism)、DNA 复制(DNA replication)、嘌呤代谢(Purine metabolism)、碱基剪切修复(Base excision repair)和核酸剪切修复(Nucleotide excision repair);生物系统通路(Organismal systems)中的主要代谢通路:免疫系统(Immune system)中的补体途径(Complement and coag-



Vertical axis is the pathway name, horizontal axis is the enrichment coefficient.

图4 富集的前13个 KEGG 通路

Fig. 4 Top 13 enriched KEGG pathways

表 1 差异蛋白主要 KEGG 信号通路

Table 1 Main KEGG signaling pathway of differential proteins

项目 Item	KEGG 途径 KEGG pathway	数目 Number	P 值 P value	差异表达蛋白 Differentially expressed proteins
hsa04142	Lysosome	22	1.5E-14	SORT1, SMPD1, NPC1, NPC2, CTSA, CTSD, CTSL, DNASE2, GLA, GNS, GBA, HEXA, HEXB, LGMN, LIPA, MAN2B1, MANBA, NEU1, PPT1, PLA2G15
hsa00240	Pyrimidine metabolism	13	6.8E-07	NT5E, POLA1, POLD1, POLD2, POLD3, POLE, POLR3C, POLR3F, DUT, PRIM1, PRIM2, TK1, TYMS
hsa00511	Other glycan degradation	6	2.1E-05	GBA, HEXA, HEXB, MAN2B1, MANBA, NEU1
hsa03030	DNA replication	7	6.9E-05	POLA1, POLD1, POLD2, POLD3, POLE, PRIM1, PRIM2
hsa01100	Metabolic pathways	43	1.6E-04	HMGCS1, ALAS1, NT5E, POLA1, POLD1, POLD2, POLD3, POLE, ASAH1, NDUFA3, POLR3C, POLR3F, UGT1A1, UGT2B7, AOX1, AKR1B10, CYP1A1, DEGS1, DUT, DGKK, DHFR, GNS, GBA, GLUL, HKDC1, HEXA, HEXB, IDO2, MTMR6, NOS1, PPT1, PAH, PLD3, PPAT, GALNT4, PRIM1, PRIM2, P4HA1, SMPD1, SDHA, SDHB, TK1, TYMS
hsa04978	Mineral absorption	6	1.7E-03	STEAP1, FTH1, FTL, HMOX1, MT1E, MT2A
hsa00600	Sphingolipid metabolism	6	2.4E-03	ASAH1, DEGS1, GLA, GBA, NEU1, SMPD1
hsa04610	Complement and coagulation cascades	7	2.5E-03	F2, F13A1, C3, PLG, SERPINC1, SERPIND1, TFPI
hsa00230	Purine metabolism	11	2.7E-03	NT5E, POLA1, POLD1, POLD2, POLD3, POLE, POLR3C, POLR3F, PPAT, PRIM1, PRIM2
hsa03410	Base excision repair	5	4.0E-03	POLD1, POLD2, POLD3, POLE, NTHL1
hsa03420	Nucleotide excision repair	5	1.4E-02	POLD1, POLD2, POLD3, POLE, ERCC2
hsa00603	Glycosphingolipid biosynthesis	3	3.1E-02	GLA, HEXA, HEXB
hsa00830	Retinol metabolism	5	3.9E-02	UGT1A1, UGT2B7, AOX1, CYP1A1, RETSAT

ulation cascades) 和消化系统 (Digestive system) 中的矿物质吸收 (Mineral absorption)。

2.2.3 蛋白质亚细胞定位分析

对 300 个差异蛋白进行亚细胞定位分析, 结果见图 5。差异蛋白表达在细胞质 (Cytoplasm) 中有 27.67%, 细胞核 (Nucleus) 有 26.00%, 细胞外 (Extracellular) 有 14.33%, 线粒体 (Mitochondrion) 有 8.67%, 质膜 (Plasma membrane) 有 6.67%, 溶酶体 (Lysosome) 有 9.33%, 内质网 (Endoplasmic reticulum) 有 4.33%。

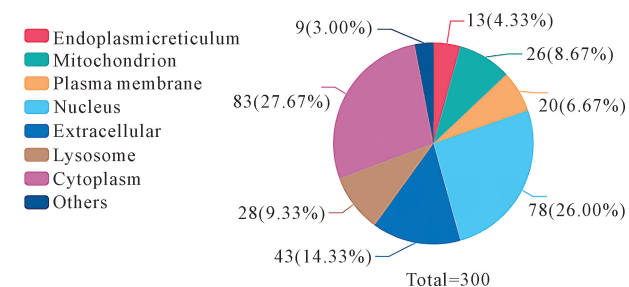


图 5 蛋白质亚细胞定位

Fig. 5 Subcellular localization of proteins

2.2.4 筛选 HBV 相关的关键差异蛋白

通过以上生物信息学分析, 发现 MAN2B1、SORT1、ERCC2、PRIM1、POLA1、POLD2、POLD1、POLE、PRIM2、POLD3、HGF、LAMC1、SDC1 等蛋白与 des(rhamnosyl) verbascoside 抗乙肝病病毒密切相关 (表 2)。

表 2 des(rhamnosyl) verbascoside 处理 HepG2. 2.15 细胞后的差异表达蛋白

Table 2 Differentially expressed protein of HepG2. 2.15 cells treated with des(rhamnosyl) verbascoside

蛋白 Protein	蛋白质描述 Protein description	表达情况 Expression situation	P 值 P value
MAN2B1	Lysosomal alpha-mannosidase	Up	9.70E-05
SORT1	Sortilin	Up	2.13E-02
ERCC2	General transcription and DNA repair factor IIIH helicase subunit XPD	Down	1.22E-02
PRIM1	DNA primase small subunit	Down	1.72E-04

续表

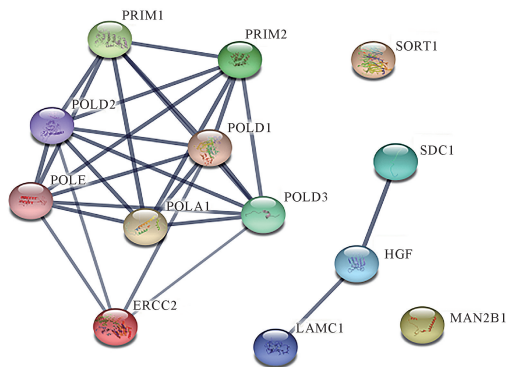
Continued table

蛋白 Protein	蛋白质描述 Protein description	表达情况 Expression situation	P 值 P value
POLA1	DNA polymerase alpha catalytic subunit	Down	3.42E-05
POLD2	DNA polymerase delta subunit 2	Down	1.11E-03
POLD1	DNA polymerase delta catalytic subunit	Down	4.20E-04
POLE	DNA polymerase epsilon catalytic subunit A	Down	5.38E-04
PRIM2	DNA primase large subunit	Down	1.69E-04
POLD3	DNA polymerase delta subunit 3	Down	2.29E-04
HGF	Hepatocyte growth factor	Up	1.42E-04
LAMC1	Laminin subunit gamma-1	Down	1.16E-03
SDC1	Syndecan-1	Down	1.20E-02

Note: "Up" means up-regulated, "Down" means down-regulated.

2.2.5 HBV 相关差异表达蛋白相互作用分析

在识别出的 13 个差异蛋白中, 有 11 个差异蛋白相互连接, 节点为 13, 代表相互作用的边有 27 条, PPI 富集 P 值 $< 1.0E-16$ (图 6)。



Proteins are represented by nodes of different colors, and the thickness of the connecting lines indicates the strength of their interactions.

图 6 蛋白质-蛋白质相互作用网络分析

Fig. 6 Network analysis of protein-protein interactions

3 讨论

HBV 属于嗜肝 DNA 病毒, HBV 感染是世界性的公共卫生问题, 严重时可能会导致肝硬化和肝癌^[15], 目前仍无有效的抗乙肝药物。大量文献报道发现, 中草药及其活性成分具有抗乙肝病毒活性, 其作用机制包括直接抑制 HBV 复制、抑制生物合成、

改善肝功能、抗氧化应激、提高免疫力、MAPK 与 JAK-STST 等信号通路调节等^[16]。研究发现, 具有抗 HBV 作用的中草药如当归 [*Angelica sinensis* (Oliv.) Diels]、黄芪 [*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge] 等, 还具有护肝、提高机体免疫、抗炎祛热等功效, 因此中草药可能通过改善肝功能来抗 HBV^[17]。前期研究发现, 从旱田草中提取的化合物 des(rhamnosyl) verbascoside 有抗 HBV 的活性^[10], 但其具体机制尚不明确。为探索 des(rhamnosyl) verbascoside 抗 HBV 的机制, 本研究通过 TMT 蛋白筛选技术对药物干预组和对照组的差异蛋白进行检测, 发现有 300 个差异蛋白, 其中 109 个上调蛋白, 191 个下调蛋白。人类生长因子 (HGF) 是一种能促进肝细胞再生, 间接减少胶原纤维产生, 从而减轻肝纤维化程度的生长因子^[18]。细胞外基质组分是反映肝纤维化的重要指标之一, 当肝脏纤维化改变时, 就会引起其生成增多, 出现沉积或纤维蛋白溶解能力增强的现象^[19]。本研究在 des(rhamnosyl) verbascoside 作用于 HepG2. 2. 15 细胞后, 发现肝生长因子 HGF 上调, 而层黏连蛋白 LAMC1、跨膜蛋白 SDC1 等细胞外基质组分下调, 推测药物可能通过改善乙肝病毒引起的肝损伤, 从而起到肝损伤保护作用, 但具体作用机制还需要进一步验证。

Sortilin-1 (SORT1) 是一种多配体受体, 可广泛参与细胞过程, 属于 VPS10P 结构域受体家族。该蛋白可附着于 VPS10 结构域上的各种配体并将其运输至溶酶体^[20], 其可在肝脏的脂蛋白代谢过程中发挥作用^[21, 22]。此外, SORT1 是溶酶体通路的关键蛋白, 该蛋白上调可能在溶酶体通路中发挥一定的抗 HBV 的作用。研究发现, 肝脏 SORT1 蛋白表达与肝脏 HBsAg 表达呈负相关^[23]。MAN2B1 基因编码 α -甘露糖苷酶, 该酶可在炎症反应、细胞的黏附和免疫监视等方面发挥作用^[24]。

HBV 感染细胞后, 经过包膜剥离、衣壳分解等过程, 使 HBV rcDNA 释放至细胞核内, 然后在细胞内 DNA 聚合酶催化下迅速补齐长短链的缺口形成 cccDNA, 该过程是 HBV 自我复制的基础^[25]。从 HBV 的生命周期中可以发现, DNA 聚合酶在其致病性上发挥着重要作用。ERCC2 是一种进化保守的螺旋酶, 参与基因转录和核苷酸切除修复。本研究发现, 当 des(rhamnosyl) verbascoside 作用于 HepG2. 2. 15 细胞后, ERCC2、PRIM1、PRIM2、POLA1、POLD3、POLD2、POLD1、POLE 的表达水平

明显下调;通过 KEGG 和 PPI 分析发现,ERCC2 与 DNA 聚合酶催化基团 PRIM1、PRIM2、POLA1、POLD3、POLD2、POLD1、POLE 之间存在相互作用,它们之间可能通过抑制 DNA 聚合酶的活性,使 HBV DNA 的复制受到抑制,但 des(rhamnosyl) verbascoside 抗 HBV 的作用机制还需要进一步深入分析。

4 结论

本研究通过 TMT 标记蛋白质组学技术筛选 des(rhamnosyl) verbascoside 干预 HepG2. 2. 15 细胞后的差异表达蛋白,发现药物干预组与对照组之间有 300 种差异表达蛋白,其中有 109 种上调蛋白,191 种下调蛋白。GO 富集分析结果发现具有显著差异的条目分别为生物学过程、分子功能和细胞组分。KEEG 通路富集分析结果发现有 13 条差异显著的代谢通路。亚细胞定位分析结果发现差异表达蛋白主要位于细胞质和细胞核,分别占 27. 67% 和 26. 00%;其次是位于胞外的蛋白质,约占 14. 33%。研究结果可为后续筛选抗乙型肝炎病毒或肝损伤分子标记物奠定基础。

参考文献

- [1] NGUYEN M H, WONG G, GANE E, et al. Hepatitis B virus: advances in prevention, diagnosis, and therapy [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2020, 33(2): e00046-19.
- [2] YUEN M F, CHEN D S, DUSHEIKO G M, et al. Hepatitis B virus infection [J]. *Nature Reviews Disease Primers*, 2018, 4: 18035.
- [3] LI H, YAN L B, SHI Y, et al. Hepatitis B virus infection: overview [J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2020, 1179: 1-16.
- [4] 相佳瑶, 许敏, 冯阳. 抗 HBV 天然化合物作用机制的研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2021, 37(10): 1346-1351.
- [5] PALACIOS-ÁLVAREZ I, ROMÁN-CURTO C, MIR-BONAFÉ J M, et al. Autoimmune response as a side effect of treatment with interferon- α in melanoma: does this have prognostic implications? [J]. *International Journal of Dermatology*, 2015, 54(3): e91-e93.
- [6] SUCHER N J. The application of Chinese medicine to novel drug discovery [J]. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2013, 8(1): 21-34.
- [7] SONG P P, GAO J J, KOKUDO N, et al. Standardization of traditional Chinese medicine and evaluation of evidence from its clinical practice [J]. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 2011, 5(6): 261-265.
- [8] LI Z X, ZHAO Z M, LIU P, et al. Treatment of HBV cirrhosis with Fuzheng Huayu tablet and entecavir: design of a randomized, double-blind, parallel and multi-center clinical trial [J]. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 2021, 27(7): 509-513.
- [9] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 351.
- [10] MOU J F, LIN X Z, SU H L, et al. Anti-hepatitis B virus activity and hepatoprotective effect of des(rhamnosyl) verbascoside from *Lindernia ruellioides* in vitro [J]. *Phytotherapy Research*, 2021, 35(8): 4555-4566.
- [11] SEO J, LEE K J. Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches [J]. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 37(1): 35-44.
- [12] 牟翔宇, 孙鹏, 薛玲, 等. 基于整体观念探讨中医药应用蛋白质组学的研究进展 [J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(11): 6585-6588.
- [13] HUGHES C S, SPICER V, KROKHIN O V, et al. Investigating acquisition performance on the orbitrap fusion when using tandem MS/MS/MS scanning with isobaric tags [J]. *Journal of Proteome Research*, 2017, 16(5): 1839-1846.
- [14] WANG W, LI Q, HUANG G, et al. Tandem mass tag-based proteomic analysis of potential biomarkers for hepatocellular carcinoma differentiation [J]. *OncoTargets and Therapy*, 2021, 14: 1007-1020.
- [15] SHIRVANI-DASTGERDI E, SCHWARTZ R E, PLOSS A. Hepatocarcinogenesis associated with hepatitis B, delta and C viruses [J]. *Current Opinion in Virology*, 2016, 20: 1-10.
- [16] 肖冬焱, 刘正芸. 中药抗乙型肝炎病毒机制的研究进展 [J]. *贵州医药*, 2018, 42(2): 164-166.
- [17] 雷攀, 任攀, 王珊, 等. 中药抗乙型肝炎病毒作用机制及临床应用研究进展 [J]. *中国药师*, 2018, 21(7): 1258-1262.
- [18] 史美娜, 王小众, 郑伟达, 等. 白介素-10 对肝纤维化大鼠星状细胞 EGF 及 HGF 表达的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2005, 21(3): 327-331.
- [19] 夏海珊, 陈少茹, 钟月春, 等. 肝纤维化的发病机制和药物治疗现状 [J]. *中国医药导报*, 2014, 11(18): 162-165, 168.
- [20] STRONG A, RADER D J. Sortilin as a regulator of lipoprotein metabolism [J]. *Current Atherosclerosis Reports*, 2012, 14(3): 211-218.

- [21] DUBÉ J B, JOHANSEN C T, HEGELE R A. Sortilin, an unusual suspect in cholesterol metabolism: from GWAS identification to *in vivo* biochemical analyses, sortilin has been identified as a novel mediator of human lipoprotein metabolism [J]. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 2011, 33(6): 430-437.
- [22] BESHARAT S, KATOONIZADEH A, MOOSSAVI S, et al. The possible impact of sortilin in reducing HBsAg expression in chronic hepatitis B [J]. *Journal of Medical Virology*, 2016, 88(4): 647-652.
- [23] 刘波. 乙型肝炎病毒通过干扰溶酶体成熟抑制细胞自噬性降解途径[D]. 杭州: 浙江大学, 2013.
- [24] MOREMEN K W. Golgi α -mannosidase II deficiency in vertebrate systems: implications for asparagine-linked oligosaccharide processing in mammals [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2002, 1573(3): 225-235.
- [25] SCHREINER S, NASSAL M. A role for the host DNA damage response in hepatitis B virus cccDNA formation-and beyond? [J]. *Viruses*, 2017, 9(5): 125.

Quantitative Proteomics Study of Anti-HBV Effects of Des(rhamnosyl) verbascoside

DENG Jie¹, ZHAO Tongshiyao¹, MOU Junfei¹, LIANG Chengqin², ZHOU Xianli^{1* *}

(1. College of Intelligent Medicine and Biotechnology, Guilin Medical University, Guilin, Guangxi, 541004, China; 2. College of Pharmacy, Guilin Medical University, Guilin, Guangxi, 541004, China)

Abstract: In order to explore the activity and mechanism of des(rhamnosyl) verbascoside against hepatitis B virus (HBV) *in vitro*, the des(rhamnosyl) verbascoside was used as an experimental drug to intervene HepG2. 2. 15 cells. The experiment was divided into drug intervention group and control group. Tandem Mass Tag (TMT) proteomics method was used to analyze the extracted total protein. The results showed that a total of 300 differentially expressed proteins were screened, of which 109 proteins were up-regulated and 191 proteins were down-regulated. Gene Ontology (GO) analysis showed that the differentially expressed proteins were mainly involved in DNA replication, glycosphingolipid metabolic process, cell proliferation, and oligosaccharide catabolic process and other biological processes, as well as DNA polymerase activity, serine-type carboxypeptidase activity, DNA primase activity and other molecular functions. The results of Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analysis showed that the differentially expressed proteins were mainly involved in metabolism, genetic information processing, and organismal systems and other related signaling pathways. Subcellular localization analysis showed that most of the differentially expressed proteins were localized in the cytoplasm and nucleus. A total of 13 proteins closely related to anti-HBV were screened in this study. Through quantitative proteomics, it is preliminarily revealed that des(rhamnosyl) verbascoside may play an anti-HBV role *in vitro* by increasing HGF, SORT1, MAN2B1 and reducing the expression of PRIM1, PRIM2, POLA1, POLD3, POLD2, POLD1, POLE, ERCC2, LAMC1, SDC1 and other proteins.

Key words: des(rhamnosyl) verbascoside; proteomics; HBV; bioinformatics; *Lindernia ruellioides* (Colsm.) Pennell

责任编辑: 唐淑芬
