

# 磷酸化蛋白质组学在三阴性乳腺癌诊治研究中的进展

史云蔚<sup>1,2</sup>, 左涛<sup>2\*</sup>, 徐平<sup>1,2,3\*</sup>

1 中国医科大学公共卫生学院 环境毒理学研究室, 辽宁 沈阳 110122

2 军事科学院军事医学研究院生命组学研究所 国家蛋白质科学中心(北京) 北京蛋白质组研究中心 蛋白质组学国家重点实验室, 北京 102206

3 中国医学科学院蛋白组学与新药研发创新单元, 北京 102206

史云蔚, 左涛, 徐平. 磷酸化蛋白质组学在三阴性乳腺癌诊治研究中的进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(2): 321-336.

SHI Yunwei, ZUO Tao, XU Ping. Phosphoproteomics in the diagnosis and treatment of triple-negative breast cancer: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(2): 321-336.

**摘要:** 三阴性乳腺癌是乳腺癌中恶性程度最高的亚型, 其治疗仍以化疗为主, 但容易出现耐药, 且患者预后较差。随着蛋白质组学技术的发展, 磷酸化蛋白质组学研究取得了长足的进步, 并在肿瘤发生发展机制和诊治研究中得到了广泛的应用。同样, 磷酸化蛋白质组学在三阴性乳腺癌的发生发展、靶向治疗和耐药机制研究等方面也发挥着重要作用。本文主要对目前磷酸化蛋白质组学在三阴性乳腺癌中的研究进展进行综述, 旨在为基于磷酸化蛋白质组学的三阴性乳腺癌发生发展机制和诊治研究提供指导和帮助。

**关键词:** 蛋白质组学; 磷酸化蛋白质组学; 三阴性乳腺癌

资助项目: 国家自然科学基金(32101190, 32070668, 32141003); 蛋白质组学国家重点实验室基金项目(2021-NCPSB-001, SKLP-C202002, SKLP-Y201901)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32101190, 32070668, 32141003) and the Foundation of State Key Laboratory of Proteomics (2021-NCPSB-001, SKLP-C202002, SKLP-Y201901).

\*Corresponding authors. E-mail: XU Ping, xuping@ncpsb.org.cn; ZUO Tao, zuotao@ncpsb.org.cn

Received: 2023-06-25; Accepted: 2023-08-24

# Phosphoproteomics in the diagnosis and treatment of triple-negative breast cancer: a review

SHI Yunwei<sup>1,2</sup>, ZUO Tao<sup>2\*</sup>, XU Ping<sup>1,2,3\*</sup>

1 Program of Environmental Toxicology, School of Public Health, China Medical University, Shenyang 110122, Liaoning, China

2 State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, National Center for Protein Sciences (Beijing), Beijing Institute of Lifeomics, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 102206, China

3 Research Unit of Proteomics & Research and Development of New Drug, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 102206, China

**Abstract:** Triple-negative breast cancer (TNBC) is the most malignant subtype of breast cancer. Currently, chemotherapy remains to be the primary treatment for TNBC, but drug resistance is common while patient prognosis is poor. With the development of proteomics technology, phosphoproteomics research has made great progress and has been widely used in the study of tumor mechanism, diagnosis and treatment. Similarly, phosphoproteomics plays a significant role in the studies of the occurrence, development, targeted therapy, and drug resistance mechanisms of TNBC. This article summarizes the research progress of phosphoproteomics in TNBC, with the aim to facilitate the research on the mechanism and treatment of TNBC based on phosphoproteomics.

**Keywords:** proteomics; phosphoproteomics; triple-negative breast cancer

三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)是乳腺癌的一种独特临床病理分类亚型,以雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)和人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor-2, Her-2)表达阴性为特征,恶性程度高,侵袭能力强,复发率高,预后差<sup>[1]</sup>。因缺乏 ER、PR 和 Her-2 的表达, TNBC 对激素受体的内分泌治疗和 Her-2 的靶向治疗不敏感,导致其治疗选择十分有限<sup>[2]</sup>。三阴性乳腺癌发病率约占所有乳腺癌的 15%–20%,但高达 83% 的乳腺癌相关死亡由三阴性乳腺癌导致,危害性很大<sup>[3]</sup>。为改善三阴性乳腺癌患者的预后,实现精准治疗, Jiang 等<sup>[4]</sup>基于大样本三阴性乳腺癌患者基因、转录分子特征和临床数据分

析,提出了三阴性乳腺癌“复旦分型”,并揭示了各个亚型的靶向治疗策略,大大提高了治疗有效率(objective response rate, ORR)<sup>[5]</sup>。然而大部分三阴性乳腺癌对这些已有的精准治疗策略不敏感,使得三阴性乳腺癌依然是一个临床治疗难题,亟待研究。

蛋白磷酸化几乎与包括受体介导的信号转导、分化、增殖、转化和代谢等细胞全部的生理或病理过程密切相关,磷酸化蛋白质及其调控酶的失调会导致细胞各项生命活动的异常,从而导致发生癌变<sup>[6]</sup>。Zagorac 等<sup>[7]</sup>运用高通量磷酸化蛋白质组学,阐明了与 TNBC 相关的磷酸化位点和激酶,并提出了一个基于靶点的 TNBC 临床分类系统,发现了 6 种和 TNBC 患者预后相关的激酶,为筛选 TNBC 临床治疗候

选药物提供依据。因此通过对失调磷酸化蛋白及其调控酶的研究,可揭示三阴性乳腺癌的发病机制,发现特异性肿瘤标志物,建立基于蛋白质组特征分子组合的诊断模型,进而发现潜在药物靶点,阐明药物耐受机制。笔者就近年来磷酸化蛋白质组学技术在三阴性乳腺癌分子机制和诊治研究中的进展进行综述。

## 1 三阴性乳腺癌研究进展

三阴性乳腺癌是一种高度异质性的疾病,也是目前乳腺癌中最难治疗的一种,其死亡率高,易复发。因缺乏相关受体的表达,三阴性乳腺癌对激素和靶向治疗都不敏感,治疗方法十分有限<sup>[8]</sup>。尽管其对化疗有一定的敏感性,然而在常规化疗治疗后,三阴性乳腺癌患者预后仍较差。根据文献报道,III-IV期三阴性乳腺癌患者的5年生存率仅为13%<sup>[9]</sup>,且目前尚无明确的内分泌及靶向治疗方案。

### 1.1 三阴性乳腺癌分子分型的研究进展

激素受体阳性或HER-2阳性的乳腺癌患者可以接受抗激素治疗或靶向治疗,而三阴性乳腺癌因其分子机制不明确,仍限于以细胞毒性化疗药物为主要的治疗手段。为了改善三阴性乳腺癌患者的诊疗现状,近年来对三阴性乳腺癌的分子分型的研究逐渐深入。2011年,Lehmann等<sup>[10]</sup>检测了587名三阴性乳腺癌患者的共2188组基因组的表达谱,将三阴性乳腺癌细分为6种亚型:基底细胞样1型(basal-like1, BL1)、基底细胞样2型(basal-like2, BL2)、免疫调节亚型(immunomodulatory, IM)、间质型(mesenchymal, M)、间质干细胞样亚型(mesenchymal stem-like, MSL)和管腔雄激素受体亚型(luminal androgen receptor, LAR)。2015年, Burstein等<sup>[11]</sup>分析了198例TNBC患者的mRNA和DNA表达特征,并使用公共数据集进行验证,成功鉴

定了4种不同的三阴性乳腺癌亚型:雄激素受体型(LAR)、间充质型(mesenchymal, MES)、基底样免疫抑制型(basal-like immune-suppressed, BLIS)以及基底样免疫激活型(basal-like immune-activated, BLIA)。2019年, Jiang等<sup>[4]</sup>基于复旦大学肿瘤中心的465例原发性三阴性乳腺癌患者的基因、转录分子特征和临床数据分析,提出了三阴性乳腺癌“复旦分型”,将TNBC分为免疫调节型(IM)、腔面雄激素受体型(LAR)、基底样免疫抑制型(BLIS)和间质型(MES)。该分型纳入病例全部来源于东亚人群,证明了在东亚人群中LAR亚型的占比较高,PIK3CA基因的突变频率也较高,从而更好地显示出中国三阴性乳腺癌患者的基因表型特征。然而由于三阴性乳腺癌的内部异质性高,其基因表型并不稳定,基于基因表达谱的分子分型无法对TNBC进行系统全面的描述,因此仍需研究者们从更多维度,包括代谢组、蛋白质组、磷酸化蛋白质组等,对三阴性乳腺癌进行更加准确的分型。

### 1.2 三阴性乳腺癌耐药机制的研究进展

虽然三阴性乳腺癌在早期诊断和治疗方面已取得了较大进展,但许多患者在用药过程中逐渐出现了耐药性,这大大限制了三阴性乳腺癌的治疗效果。目前,在三阴性乳腺癌中已经发现了7种耐药机制<sup>[12]</sup>,包括:(1)ABC转运蛋白将各种化疗药物泵出肿瘤细胞,其中多重耐药蛋白-1(multidrug-resistant protein-1, MRP1)能产生对长春花生物碱、蒽环类和大剂量甲氨蝶呤等药物的耐药性,乳腺癌抗性蛋白(ABCG2)使得多柔比星等药物外流;(2) $\beta$ -微管蛋白III亚群的过表达导致紫杉醇抗性;(3)DNA修复酶的突变诱导细胞对表柔比星、多柔比星和米托蒽醌耐药;(4)p53、bcl-2、bcl-x的改变与环磷酰胺、多柔比星、甲氨蝶呤等药物的耐

药性相关, 这类细胞凋亡相关基因的变化大大减弱了化疗药物引起的细胞凋亡; (5) 谷胱甘肽/谷胱甘肽-s-转移酶(glutathione s-transferase, GST)和醛脱氢酶 1A1 (aldehyde dehydrogenase 1A1, ALDH1A1)调节化疗药物在人体内的分解, 其中 GST 的活性增加可加快对顺铂等药物的分解, ALDH1A1 的过表达会减弱环磷酰胺的活性; (6) 核因子  $\kappa$ B (nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B)信号通路诱导细胞耐药, 激活的 NF- $\kappa$ B 通路被抑制会产生紫杉醇耐药; (7) 人驱动蛋白家族成员 14 (kinesin family member 14, KIF14)介导的 AKT 磷酸化促进对多西他赛的显著耐药性。另外, 由于不同含氧量的环境会直接改变肿瘤细胞增殖的环境酸碱度, 而酸性环境会降低化疗药物疗效, 因此, 低氧环境会加速肿瘤细胞衰老, 进而促使细胞耐药, 是影响 TNBC 化疗效果的一个关键微环境因素<sup>[13]</sup>。

### 1.3 三阴性乳腺癌转移机制的研究进展

与其他乳腺癌亚型相比, 三阴性乳腺癌的癌细胞具有高度的异质性, 并且可以通过上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程使得肿瘤发生转移扩散<sup>[14]</sup>。EMT 是指肿瘤干细胞由静息状态变为迁移状态, 随血流向远处迁移的过程。当肿瘤干细胞迁移至新的位置后, 经过“间充质-上皮转化”这一逆向过程使得新定殖的细胞恢复上皮特征, 并启动新的肿瘤生长<sup>[15]</sup>。三阴性乳腺癌细胞无论在分子还是功能上都表现出肿瘤干细胞的特征, 这可能是导致三阴性乳腺癌患者预后差的诸多因素之一。三阴性乳腺癌的远处转移风险较高, 这不仅严重威胁到 TNBC 患者的生存预后, 而且其转移机制复杂, 涵盖肿瘤发生、发展的方方面面, 包括微环境改变、肿瘤血管生成、癌细胞迁移、免疫系统逃逸和异质性改变等, 因此

TNBC 的转移机制亟待进一步研究。

### 1.4 三阴性乳腺癌治疗靶点的研究进展

三阴性乳腺癌的临床治疗仍以蒽环类药物为主, 如紫杉醇类化疗药物与蒽环类药物联用, 则效果更佳, 但总体而言, 化疗敏感性较低。随着临床对三阴性乳腺癌研究的不断深入, 针对 TNBC 的靶向药物研究及临床试验也陆续开展(表 1)。雄激素受体抑制剂、PI3K/蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT)-哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian/mechanistic targets of rapamycin, mTOR)抑制剂、血管生成抑制剂、表皮生长因子受体抑制剂、细胞周期蛋白依赖性激酶 4/6 (cyclin dependent kinase 4/6, CDK4/6)抑制剂、多聚 ADP 核糖聚合酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP)抑制剂以及新型抗体药物偶联物(antibody-drug conjugates, ADC)等相关研究成果相继发表, 为三阴性乳腺癌治疗手段的进步奠定了基础。

Gucalp 等<sup>[16]</sup>在 II 期临床研究中共纳入 51 例雄激素受体阳性、ER/PR 阴性的晚期乳腺癌患者使用雄激素受体抑制剂比卡鲁胺, 结果显示患者耐受性良好, 比卡鲁胺治疗后 6 个月的临床获益率(clinical benefit rate, CBR)为 19%, 中位无进展生存期(progression-free survival, PFS)为 12 周。Lehmann 等<sup>[17]</sup>发现 PIK3CA 抑制剂可以抑制 PI3K 活性增加的肿瘤发展, 抑制雄激素的表达可以绕过 PTEN 途径抑制肿瘤细胞生长和增殖能力, 使用 PI3K 抑制剂联合雄激素受体拮抗剂治疗可以加速 AR 阳性的 TNBC 细胞凋亡。尽管目前靶向药物的临床试验大多是针对整个 TNBC 群体, 对药物疗效的探究仍有待深入开展, 但靶向治疗仍可能是短期内最有希望提高三阴性乳腺癌患者生存预后的重要手段, 值得期待。

表 1 三阴性乳腺癌靶向药物的临床试验

Table 1 Clinical trials of targeted drugs in TNBC

Drug	Target	Combination drugs	Study phase	ClinicalTrials.gov ID
Olaparib	PARP	Onalespib	2	NCT02898207
		Durvalumab	1	NCT03544125
		Paclitaxel	1/2	NCT00707707
Talazoparib	PARP	None	2	NCT02401347
Veliparib	PARP	Cyclophosphamide	2	NCT01306032
Niraparib	PARP	Pembrolizumab	1/2	NCT02657889
Ipatasertib	PI3K/AKT-mTOR	Atezolizumab, Paclitaxel	3	NCT04177108
		Paclitaxel, Placebo	3	NCT03337724
Alpelisib	PI3K/AKT-mTOR	Olaparib	1	NCT01623349
Apatinib	VEGF	None	2	NCT03243838
		Vinorelbine	2	NCT03254654
Bevacizumab	VEGF	None	2	NCT03577743
		Abraxane	2	NCT00472693
		Paclitaxel, Docetaxel	4	NCT01094184
		Carboplatin, Paclitaxel	1/2	NCT00691379
Enzalutamide	AR	None	2	NCT01889238
		Placebo, Paclitaxel	3	NCT02929576
Bicalutamide	AR	None	2	NCT02348281
		Ribociclib	1/2	NCT03090165
Erlotinib	EGFR	None	2	NCT00739063
		Metformin	1	NCT01650506
Gefitinib	EGFR	None	2	NCT01732276
Cetuximab	EGFR	Cisplatin	2	NCT00463788
Palbociclib	CDK4/6	Paclitaxel, Carboplatin	2	NCT05067530
		Binimetinib	1/2	NCT04494958
		Avelumab	1	NCT04360941
Ribociclib	CDK4/6	Bicalutamide	1/2	NCT03090165
		Belinostat	1	NCT04315233
Abemaciclib	CDK4/6	None	2	NCT03130439
Trastuzumab Deruxtecan	Her-2	Pembrolizumab	1	NCT04042701
Sacituzumab Govitecan	TROP-2	None	3	NCT05552001
		Atezolizumab	2	NCT04434040
		Pembrolizumab	2	NCT04230109

<https://clinicaltrials.gov/>.

几十年来, 研究人员通过对基因组学的相关研究发现了多种在癌症中存在的基因突变, 这些突变在肿瘤的发生发展中至关重要, 指导了精准治疗方案的设计。这种针对每位 TNBC 患者的个性化疗法比传统化疗更有效, 也是近年来

三阴性乳腺癌治疗取得较大进展的主要原因。对于三阴性乳腺癌的靶向治疗, 虽然已有许多相关通路的报道, 然而, 到目前为止还未出现有说服力的 III 期临床试验数据的支持, 因此三阴性乳腺癌的靶向治疗仍然在探索的路上。

只有对 TNBC 的发病机制不断深入了解,才有可能探索更为有效、精准的治疗策略。在肿瘤发生发展过程中,失调的蛋白激酶介导的磷酸化信号通路发生异常,激酶活性的异常改变在经过一系列激酶级联放大反应后,会导致多条癌症相关信号通路激活或相应抑癌信号通路失活。因此,磷酸化蛋白质组学技术可用于识别 TNBC 中异常激活的信号通路,从而探究 TNBC 肿瘤进展中的潜在分子机制和治疗靶点。

## 2 磷酸化蛋白质组学研究进展

蛋白质磷酸化是最常见的蛋白质翻译后修饰之一,可调节蛋白质的活性以及众多细胞生命过程中的蛋白质-蛋白质相互作用<sup>[18]</sup>。随着特定磷酸多肽富集技术和高灵敏度质谱仪的发展,磷酸化蛋白质组学技术日趋成熟,对该技术步骤进行优化与改进的相关报道逐渐增多,包括样品制备、多肽富集、质谱(mass spectrometry, MS)检测及数据分析等多个步骤。

### 2.1 磷酸化蛋白质组学样品制备研究进展

在蛋白质组学研究中,样品制备是其中至关重要且易被忽视的步骤。特别是在磷酸化蛋白质组学中,是否有效地进行样品制备会直接影响最终检测结果<sup>[19]</sup>。提取蛋白质后,通常使用胰蛋白酶对蛋白质进行水解,胰蛋白酶切割特异性高,可切割赖氨酸和精氨酸的羧基末端肽,使得肽段末端带上碱性氨基酸,可对磷酸化多肽特异性富集后进行质谱检测<sup>[20]</sup>。因此,蛋白质的不完全消化和非特异性水解可能导致蛋白质丰度被低估,不仅影响单个蛋白质的定量,还会影响整个研究的准确性和重现性<sup>[21]</sup>。

Dickhut 等<sup>[19]</sup>研究发现,蛋白质磷酸化会影响蛋白质水解消化,与未修饰的肽段相比,只有不到 10%的磷酸化肽段可被胰蛋白酶切割,这种磷酸化序列对胰蛋白酶切割的抗性可

能是由于精氨酸或赖氨酸与磷酸氨基酸的潜在静电相互作用导致胰蛋白酶切割位点的可及性受损,但增加胰酶浓度可提高酶切效率。Huesgen 等<sup>[22]</sup>研究发现,赖氨酸精氨酸 N 端白酶(LysargiNase)与胰蛋白酶(trypsin)相比,可将磷酸化位点的覆盖率提高 23%。由于 LysargiNase 可切割赖氨酸和精氨酸的 N 端,在质谱离子碎裂中,可产生以 b 离子为主的碎片离子,而 trypsin 酶切肽段主要产生以 y 离子为主的碎片离子,因此 LysargiNase 能鉴定到一些无法被 trypsin 鉴定到的位点,二者可互为补充<sup>[23]</sup>。胰蛋白酶替代酶的开发可大幅提升蛋白质翻译后修饰的研究水平,优化蛋白质样品制备技术将成为未来磷酸化蛋白质组学的重要研究内容。

### 2.2 磷酸化蛋白质组学多肽富集研究进展

人类基因组编码的 19 700 余种蛋白质中超过 2/3 会被磷酸化<sup>[24]</sup>。尽管磷酸化蛋白的数目相对较多,但磷酸化蛋白在细胞内的化学计量值和丰度较低<sup>[25-26]</sup>,难以在复杂样本中被质谱技术检测到。大量非磷酸化蛋白的存在对识别磷酸化蛋白造成了巨大挑战,因此需要发展特异性的富集方法进行样品前处理,以提高磷酸化肽段含量。目前,磷酸化肽段的富集方法包括基于亲和色谱的固定化金属离子亲和色谱法(immobilized metal ion affinity chromatography, IMAC)和金属氧化物亲和色谱法(metal oxide affinity chromatography, MOAC),抗体富集法<sup>[27]</sup>以及强阳/阴离子交换色谱法(strong cation/anion exchange chromatography, SCX/SAX)<sup>[28-29]</sup>。

IMAC 通过带正电荷的金属阳离子与带负电荷的磷酸基团之间的亲和力富集磷酸化肽段,MOAC 利用金属氧化物与磷酸基团之间的亲和力富集磷酸化肽段,这两种方法的富集特

异性较高, IMAC 主要富集多磷酸化肽段, MOAC 主要富集单磷酸化肽段<sup>[30]</sup>。Thingholm 等<sup>[31]</sup>研究发现, 将 IMAC 与 MOAC 结合成 IMAC 顺序洗脱法(sequential elution from IMAC, SIMAC)可将磷酸化肽段富集效率提高到 2 倍。使用亲和色谱法可有效对丝氨酸和苏氨酸磷酸化肽段进行富集, 但由于酪氨酸磷酸化肽段丰度较低, 常规方法的富集能力非常有限。酪氨酸侧链上的芳香环使得其抗原决定簇比丝氨酸和苏氨酸的更大, 因此磷酸化酪氨酸可与抗体产生更强的特异性结合。但一种抗体通常只能结合一种磷酸化氨基酸, 且抗体成本较高, 限制了其广泛使用。因此目前主要使用基于 SH2 (Src homology)超亲体的微量样品的酪氨酸磷酸化蛋白质组技术对酪氨酸磷酸化肽段进行富集, 但该方法还需要进一步优化<sup>[32]</sup>。

SCX/SAX 方法利用酶切肽段与阴/阳离子固定相之间的相互作用富集肽段。SCX 法富集磷酸化肽段需在强酸条件下进行, 而 SAX 法则在中性或碱性条件下进行, 二者洗脱顺序相反。然而, SCX/SAX 方法特异性并不高, 现在通常作为多肽的预分离手段, 将复杂样品初步分离得到较为相似的组分, 可提高磷酸化肽段的富集效率和鉴定数目<sup>[33]</sup>。总之, 随着磷酸化肽段富集技术的不断发展, 极大提高了磷酸化蛋白质组学的研究效率, 但目前尚无某种磷酸化富集方法能够完全描绘磷酸化蛋白组, 为了提高对磷酸化肽段的鉴定效率, 还需对富集方法进行探索。

### 2.3 磷酸化蛋白质组学定量检测研究进展

研究蛋白质组学的目的是对生物系统中的所有蛋白质进行全面鉴定和定量, 以揭示蛋白质在生理和病理过程中的作用。在过去的几十年里, 液相色谱-质谱(liquid chromatography mass spectrometry, LC-MS)的发展推动了基于质谱的

蛋白质组定量方法的巨大进步。基于 LC-MS 的蛋白质组学中最广泛使用的策略是自下而上的蛋白质组学<sup>[34]</sup>, 即蛋白质首先被水解成多肽, 使用反相高效液相色谱(reversed-phase high-performance liquid chromatography, RP-HPLC)分离多肽, 再对肽段进行分析。MS1 水平上可以确定多肽的分子量, 而相应的碎片离子是经碰撞池中破碎后在 MS2 水平上获得的。人们通过将 MS1 中测定的母离子和 MS2 中的碎片离子与相应蛋白质序列酶切产生的理论质量进行匹配, 可以鉴定出样品中的肽, 并利用这些信息将肽分配给相应的蛋白质, 从而实现对它们的定性和定量。

准确量化动态变化的蛋白质组成是理解生物系统功能的基础。根据是否使用同位素标记, 现有的基于质谱的蛋白质组定量方法可分为无标记蛋白质组学<sup>[35-36]</sup>和标记的蛋白质组学<sup>[37]</sup>。由于无标记方法不需要用同位素标记衍生化, 可以在任何类型的质谱仪上实现, 因此得到了广泛的应用, 并取得了良好的效果<sup>[38]</sup>。但无标记蛋白质组学每次 LC-MS 运行只能分析一个样品, 且在精确度方面无法校正分析变异性, 在通量方面有较大局限性。而同位素往往具有相同的理化性质、不同的质量, 因此稳定同位素标记是一个更加理想的选择。1999 年, Gygi 等<sup>[39]</sup>首次使用了同位素编码亲和标签(isotope-coded affinity tag, iCAT), Oda 等<sup>[40]</sup>发现了 <sup>15</sup>N 代谢标记法。此后, 又出现了细胞培养中氨基酸稳定同位素标记(stable isotope labeling by amino acids, SILAC)<sup>[41]</sup>、相对和绝对定量等重标记(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)<sup>[42]</sup>、串联质量标记(tandem mass tags, TMT)<sup>[43]</sup>和等重肽末端标记(isobaric peptide termini labeling, IPTL)<sup>[44-45]</sup>等一系列多重定量方法。差异标记的多肽可以

通过质谱进行解析, 并且标记的样品在 LC-MS 之前就被混合在一起, 因此可以实现多个样品的同时分析, 避免了实验过程中样品损失和技术误差等引起的信号变化<sup>[46]</sup>。

目前, SILAC、TMT 和非标记定量技术 (label-free quantitation, LFQ) 是基于 MS 的定量磷酸化蛋白质组学中最常用的技术。Mertins 等<sup>[47]</sup>将 iTRAQ 标记技术与磷酸化富集技术相结合对磷酸化肽段进行定量分析, 该方法可以对多个条件下的样品进行比较分析, 被用于磷酸化定量蛋白质组学分析。Zhang 等<sup>[48]</sup>比较了 LFQ、SILAC、TMT 技术在肿瘤组织中的磷酸化蛋白质组定量数据, 发现 TMT 技术重复性和稳定性较好; SILAC 技术的准确性和稳定性均较好, 但对同位素试剂的依赖性限制了其应用范围; 而 LFQ 技术可鉴定到最多的磷酸化肽段, 但稳定性差。因此磷酸化蛋白质组学中定量方法的选择至关重要。数据分析时还需要利用蛋白质组的数据对磷酸化蛋白质组数据进行标准化, 该方法可以帮助在确定位点磷酸化水平差异时不受本底蛋白质水平变化的影响<sup>[49]</sup>。为了避免蛋白质水解消化过程中发生漏切等情况造成实验误差, 最终还需要人工对定量结果进行核查<sup>[50]</sup>。

#### 2.4 磷酸化蛋白质组学质谱数据采集方法研究进展

目前蛋白质组和翻译后修饰分析最常见的策略是使用数据依赖性的采集方法 (data-dependent acquisition, DDA), 但该方法偏向于检测高丰度多肽, 有一定局限性, 会导致数据缺失<sup>[51]</sup>。为了解决这一问题, 数据非依赖性的采集方法 (data-independent acquisition, DIA) 逐渐进入了人们的视野, 这种采集方法能够系统客观地记录样本中理论上存在的所有多肽的片段信息<sup>[52-53]</sup>。据报道, 数据非依赖性采集同步

累积连续碎裂的离子效率接近 100%, 可以实现在大规模蛋白质组研究中定量的一致性和准确性, 提高蛋白质组数据挖掘的覆盖率和可重复性<sup>[54]</sup>。但在传统的以多肽为中心的 DIA 中, 谱图文库中只包含了一个最密集的片段峰子集用于特征提取, 可能无法为确定磷酸化位点提供证据。将多种方法结合使用可提高检测效率, 如 Narumi 等<sup>[55]</sup>在基于磷酸化蛋白质组学的乳腺癌样本研究中, 用 DDA 法进行了全蛋白质检测, 并用靶向检测方法鉴定生物标志物。Bekker-Jensen 等<sup>[56]</sup>开发了一种算法来精确定位 DIA 数据集中的磷酸化位点, 用于具有较小液相色谱梯度的 DIA 质谱。结合基于抗体的富集方法, 在蛋白酶体抑制剂处理的细胞中约有 35 000 个不同修饰的多肽被重复识别和定量, 与基于 DDA 的磷酸化蛋白质组学定量方法相比有巨大改进<sup>[57]</sup>。

### 3 磷酸化蛋白质组学在三阴性乳腺癌研究中的应用

研究发现蛋白质组, 特别是磷酸化蛋白质组与 TNBC 的发生、发展、侵袭和耐药密切相关, 可以为 TNBC 的临床诊断、精准治疗提供新方向 (图 1)。

#### 3.1 磷酸化蛋白质组学在三阴性乳腺癌分型与诊断研究中的应用

2000 年, Perou 等<sup>[58]</sup>首次提出乳腺癌分子分型, 将乳腺癌分为正常乳腺样型、Luminal-like 型、HER-2 阳性型及 Basal-like 型。由于该分子分型是通过基因表达谱检测分出的乳腺癌亚型, 临床诊断难度较高, 因此目前临床上常用 ER、PR、HER2 和 Ki67 这 4 种标志物通过免疫组织化学方法进行病理学诊断。而由于 TNBC 具有高度异质性, 需进一步细分, 进而针对不



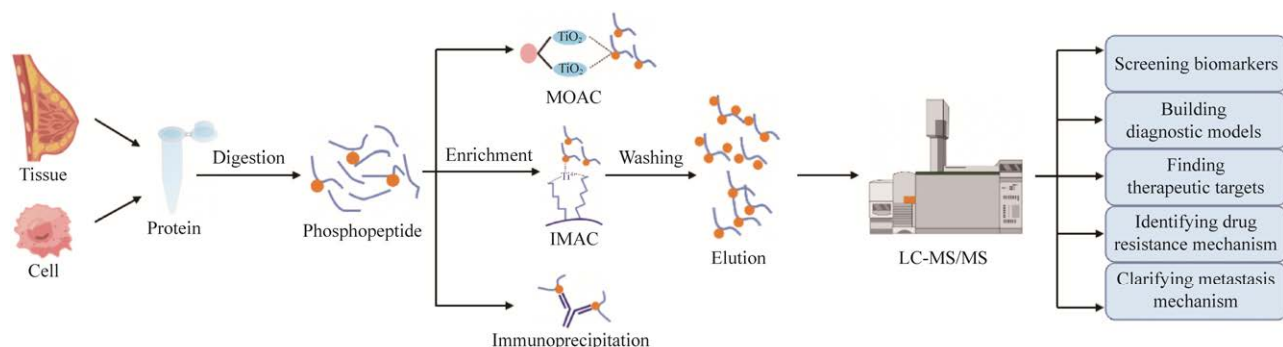


图 1 磷酸化蛋白质组学技术流程及其在三阴性乳腺癌中的应用

Figure 1 Workflow for the phosphoproteomics and its application in TNBC.

同亚型进行个性化的精准治疗，才可能提高患者的生存质量<sup>[59]</sup>。但遗憾的是尽管高通量基因组学研究已经揭示了三阴性乳腺癌存在的明显异质性，但尚未发现和其有高度相关的致癌基因。基于磷酸化蛋白质组学的研究是 TNBC 新型诊治技术研究的新希望。

Gong 等<sup>[60]</sup>通过对数据集进行蛋白质组网络分析和共表达网络分析，整合来自相同队列的基因组和转录组，发现了三阴性乳腺癌不同亚型的关键信号传导通路和主要调节因子，并根据全部蛋白质组和磷酸化蛋白质组将三阴性乳腺癌分为 iP-1、iP-2、iP-3 和 iP-4 共 4 种整合亚型。这 4 种不同的整合亚型具有各自不同的分子特征和信号传导通路特征。尽管磷酸化蛋白质组学技术日趋成熟，但经过临床验证的生物标志物数量依然很少，这可能是由于实验设计不合理或统计分析不当所致，因此研究过程中必须进行严格质控，以减小引入数据的变异性<sup>[61]</sup>。

### 3.2 磷酸化蛋白质组学在三阴性乳腺癌耐药机制研究中的应用

研究表明大多数复发的三阴性乳腺癌患者会对化疗药物产生多药耐药性 (multidrug resistance, MDR)<sup>[62]</sup>。为了改善治疗效果，研究

TNBC 的耐药机制对开发新的治疗策略以预测和克服耐药性非常重要。Kohale 等<sup>[63]</sup>对发生化疗敏感 (chemotherapy sensitive, CS) 和耐药 (chemotherapy resistant, CR) 的三阴性乳腺癌患者 PDX 模型中酪氨酸磷酸化介导的信号网络进行了定量研究，揭示了药物的多种作用机制，发现丝氨酸家族激酶 (Src family kinases, SFKs) 抑制剂可以有效抑制肿瘤生长。Deng 等<sup>[64]</sup>通过比较对 4 种化疗药物具有极端反应的 TNBC 细胞系中磷酸化蛋白的变化来筛选失调的信号通路，发现细胞周期素依赖性激酶 5 (cyclin-dependent kinase 5, CDK5)、早幼粒细胞白血病蛋白 (promyelocytic leukemia protein, PML)、激活蛋白-1 (activator protein 1, AP-1) 和热休克因子 1 (heat shock factor 1, HSF-1) 等 4 种差异磷酸化蛋白，并证明这 4 种蛋白的磷酸化可能共同促进了耐药细胞的上皮-间质转化过程。Wang 等<sup>[65]</sup>发现白介素-6 (interleukin-6, IL-6) 可通过激活 TNBC 细胞系 MDA-MB-231 中的信号传导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 来上调缺氧诱导因子 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1 $\alpha$ ) 的表达，从而增强了 TNBC 的耐药性。敲低 HIF-1 $\alpha$  后，凋亡相关分子 B 淋巴细胞瘤-2

蛋白(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)和 BCL2 关联 X 蛋白(BCL2-associated X protein, Bax)的表达以及 P-gp 和多药耐药关联蛋白 1 (multidrug resistanc-associated protein-1, MRP1)的表达降低,从而减弱了肿瘤细胞的耐药性。Wang 等<sup>[66]</sup>发现,白介素-22 (interleukin-22, IL-22)可以活化 JAK-STAT3/MAPK/AKT 通路,进而诱导乳腺癌的迁移和耐药。表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)在肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)介导的细胞活性中至关重要。其中, HGF 的激活是肿瘤浸润的一个重要指标,可以增强细胞增殖和侵袭的能力; EGFR 通过加速细胞周期 G1/S 期的转换促进 TNBC 细胞的多重耐药,也可能通过降低 Thr654 和 Thr669 位点的磷酸化水平增加 EGFR 和 HGF 的活性进而导致三阴性乳腺癌的耐药<sup>[67-68]</sup>。通过对耐药机制的研究探索,可以针对产生耐药的各分子及通路,改变肿瘤细胞生长的微环境,减轻耐药,增强疗效,这对三阴性乳腺癌患者的生存质量有重要意义。

### 3.3 磷酸化蛋白质组学在三阴性乳腺癌复发转移研究中的应用

目前磷酸化蛋白质组学技术已广泛应用于发现肿瘤中异常激活的信号通路及靶点,进而阐明肿瘤复发转移的分子机制。Zagorac 等<sup>[7]</sup>选择了治疗 3 年后复发和超过 12 年未复发的共 34 名三阴性乳腺癌患者的肿瘤样本进行磷酸化蛋白质组学检测,通过质谱联合体外实验验证,确定了 6 种与复发有较高相关性的激酶 PRKCE、c-Kit、p-ERK (Thr202/Tyr204)、p-P70S6K (Thr389)、p-PNK (Ser114/Thr118)和 CDK6 在 TNBC 复发患者中高表达,并在另一个样品队列得到了验证,提出了一个基于靶点的 TNBC 临床分类系统。通过检测这 6 种蛋白激酶的状态可以预测 TNBC 的演变,基于这

6 种激酶靶向药物单独或两两联合,有望推动 TNBC 临床治疗新型候选药物组合的深入研究。雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)作为 PI3K/Akt/mTOR 信号通路中一个重要的调控基因,不仅可以通过促进细胞周期运行,抑制细胞凋亡促进肿瘤的进展,还可以通过上调基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinases-2, MMP-2)的表达水平,提升细胞外基质的分解能力,破坏血管基膜,进而促进肿瘤细胞的远处转移能力<sup>[69]</sup>。

### 3.4 磷酸化蛋白质组学在三阴性乳腺癌治疗靶点研究中的应用

目前化疗仍是三阴性乳腺癌的主要治疗手段,尚无针对该亚型乳腺癌患者的靶向治疗。随着对磷酸化蛋白质组学的不断探究,已识别出与 TNBC 相关的磷酸化信号靶点,为有效提高 TNBC 患者生存率、改善生存质量提供了新的视角。PI3K/AKT/mTOR 通路的异常是各种亚型乳腺癌中最常见的基因组异常之一<sup>[70]</sup>。Umemura 等<sup>[71]</sup>研究发现在 TNBC 中 p-AKT 的表达水平较非三阴性乳腺癌显著升高,提示三阴性乳腺癌中 Akt 磷酸化被激活。Walsh 等<sup>[72]</sup>使用免疫组织化学方法,在 89 个三阴性乳腺癌患者和 99 个非三阴性乳腺癌患者中分别检测了 mTOR 和 p-mTOR,结果显示 p-mTOR 在 TNBC 中的表达水平明显高于其他亚型乳腺癌,提示 mTOR 可能是治疗三阴性乳腺癌的新靶点。因此,抑制关键通路中的重要靶点可为三阴性乳腺癌患者带来新的治疗方案。

Rontogianni 等<sup>[73]</sup>运用磷酸化蛋白质组学报道了 EGFR 和 ROCK 两种抑制剂对三阴性乳腺癌细胞的双重作用可以增强其自噬作用导致癌细胞死亡,并通过 Western blotting 和荧光计数进一步验证了以上结论,为相关临床药物治疗提供了有力的理论依据。由于单一组学的表型

并不稳定,因此需从多维度出发,对肿瘤进行包括转录组学、代谢组学、蛋白质组学和磷酸化蛋白质组学等在内的多组学分析,进而筛选肿瘤标志物及潜在治疗靶点。Gong 等<sup>[60]</sup>以蛋白质组学技术为中心对三阴性乳腺癌患者进行了多组学特征和整合网络分析,从 86 个肿瘤和 70 个配对非癌性邻近组织(non-cancerous adjacent tissues, NAT)的磷酸化蛋白质组分析中获得了 4 194 个蛋白质上的 20 069 个磷酸位点,最终发现脂肪酸代谢中的系列关键分子,如丝氨酸苏氨酸激酶 AKT1 和脂肪酸合成酶 FASN 是 TNBC iP-2 亚型的可能靶点。Chew 等<sup>[74]</sup>对 18 例三阴性乳腺癌和 1 例 Luminal B 型乳腺癌患者的 PDX 模型进行磷酸化蛋白质组学分析,发现有 1/3 的 PDX 模型表现出 FGFR1、FGFR2 或 FGFR4 的磷酸化增强,进一步利用多组学分析证实了两种抗 FGFR 药物的靶向作用。Lehmann 等<sup>[75]</sup>在基于基因组表达谱的分子分型基础上,对各分型三阴性乳腺癌进行了包括磷酸化蛋白质组学在内的多组学综合分析,确定了一种潜在的免疫逃逸机制,解释了针对 PD1/PD-L1 的免疫检查点抑制剂对大部分 TNBC 患者无效的原因。磷酸化蛋白质组学作为多组学研究中至关重要的一部分,现已成为筛选标志物和治疗靶点的新方法,将其运用于 TNBC 的研究越来越多。

## 4 总结与展望

在过去的几十年中,乳腺癌死亡率稳步下降,这主要归因于乳腺癌治疗方案的不断改善<sup>[60]</sup>。但大部分治疗进展仅限于激素受体阳性和 Her2 阳性乳腺癌,三阴性乳腺癌仍然缺乏特定的靶向药物,化疗仍是目前唯一的治疗选择,然而当肿瘤对常规化疗出现耐药时会导致迅速复发甚至死亡,限制了 TNBC 患者的治疗效果。因

此,筛选出药物敏感的新型生物标志物对于有效治疗三阴性乳腺癌至关重要。

目前,在肿瘤相关研究中磷酸化蛋白质组学的应用主要集中于治疗靶点的发现以及肿瘤分型和耐药机制。然而,磷酸化蛋白质组学在 TNBC 中的研究还处在起步阶段,目前只有少数的磷酸化蛋白被鉴定为 TNBC 的重要生物标志物,更多失调的磷酸化蛋白在 TNBC 中的作用及其在疾病发生发展中的机制尚不清楚。

由于满足磷酸化蛋白质组学研究的高质量人肿瘤样本较难获取,目前与三阴性乳腺癌相关的研究主要通过细胞系或有限的组织样本进行比较研究来实现。在磷酸化蛋白质组研究方面,由于磷酸化蛋白的丰度和稳定性较低,提高其检测的覆盖率还面临较大挑战。随着蛋白质组学技术的成熟,样品制备技术的不断完善,磷酸化蛋白质组学技术运用于三阴性乳腺癌的研究会越来越多,并将成为筛选治疗靶点、预测疾病预后的新方法。

## REFERENCES

- [1] GELMON K, DENT R, MACKEY JR, LAING K, MCLEOD D, VERMA S. Targeting triple-negative breast cancer: optimising therapeutic outcomes[J]. *Annals of Oncology*, 2012, 23(9): 2223-2234.
- [2] JIA H, TRUICA CI, WANG B, WANG Y, REN X, HARVEY HA, SONG J, YANG JM. Immunotherapy for triple-negative breast cancer: existing challenges and exciting prospects[J]. *Drug Resistance Updates*, 2017, 32: 1-15.
- [3] WEIN L, LOI S. Mechanisms of resistance of chemotherapy in early-stage triple negative breast cancer (TNBC)[J]. *The Breast*, 2017, 34: S27-S30.
- [4] JIANG YZ, MA D, SUO C, SHI JX, XUE MZ, HU X, XIAO Y, YU KD, LIU YR, YU Y, ZHENG YT, LI XN, ZHANG CH, HU PC, ZHANG J, HUA Q, ZHANG JY, HOU WW, REN LY, BAO D, et al. Genomic and transcriptomic landscape of triple-negative breast cancers: subtypes and treatment strategies[J]. *Cancer Cell*, 2019, 35(3): 428-440.e5.

- [5] JIANGYZ, LIU Y, XIAO Y, HU X, JIANG L, ZUO WJ, MA D, DING JH, ZHU XY, ZOU JJ, VERSCHRAEGEN C, STOVER DG, KAKLAMANI V, WANG ZH, SHAO ZM. Molecular subtyping and genomic profiling expand precision medicine in refractory metastatic triple-negative breast cancer: the FUTURE trial[J]. *Cell Research*, 2021, 31(2): 178-186.
- [6] ARRINGTON JV, HSU CC, ELDER SG, ANDY TAO W. Recent advances in phosphoproteomics and application to neurological diseases[J]. *Analyst*, 2017, 142(23): 4373-4387.
- [7] ZAGORAC I, FERNANDEZ-GAITERO S, PENNING R, POST H, BUENO MJ, MOURON S, MANSO L, MORENTE MM, ALONSO S, SERRA V, MUÑOZ J, GÓMEZ-LÓPEZ G, LOPEZ-ACOSTA JF, JIMENEZ-RENARD V, GRIS-OLIVER A, AL-SHAHROUR F, PIÑEIRO-YAÑEZ E, MONTOYA-SUAREZ JL, APALA JV, MORENO-TORRES A, et al. *In vivo* phosphoproteomics reveals kinase activity profiles that predict treatment outcome in triple-negative breast cancer[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 3501.
- [8] MIRZANIA M, SAFAEESR, SHAHI F, JAHANZAD I, ZAHEDI G, MEHDIZADEH R. Treatment outcomes and clinicopathologic characteristics of triple-negative breast cancer: a report from cancer institute of Iran[J]. *International Journal of Hematology Oncology and Stem Cell Research*, 2017, 11(1): 37-42.
- [9] SANTUARIO-FACIO SK, CARDONA-HUERTA S, PEREZ-PARAMO YX, TREVINO V, HERNANDEZ-CABRERA F, ROJAS-MARTINEZ A, USCANGA-PERALES G, MARTINEZ-RODRIGUEZ JL, MARTINEZ-JACOBO L, PADILLA-RIVAS G, MUÑOZ-MALDONADO G, GONZALEZ-GUERRERO JF, VALERO-GOMEZ J, VAZQUEZ-GUERRERO AL, MARTINEZ-RODRIGUEZ HG, BARBOZA-QUINTANA A, BARBOZA-QUINTANA O, GARZA-GUAJARDO R, ORTIZ-LOPEZ R. A new gene expression signature for triple-negative breast cancer using frozen fresh tissue before neoadjuvant chemotherapy[J]. *Molecular Medicine*, 2017, 23(1): 101-111.
- [10] LEHMANN BD, BAUER JA, CHEN X, SANDERS ME, CHAKRAVARTHY AB, SHYR Y, PIETENPOL JA. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2011, 121(7): 2750-2767.
- [11] BURSTEIN MD, TSIMELZON A, POAGE GM, COVINGTON KR, CONTRERAS A, FUQUA SAW, SAVAGE MI, OSBORNE CK, HILSENBECK SG, CHANG JC, MILLS GB, LAU CC, BROWN PH. Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer[J]. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 2015, 21(7): 1688-1698.
- [12] O'REILLY EA, GUBBINS L, SHARMA S, TULLY R, GUANG MHZ, WEINER-GORZEL K, MCCAFFREY J, HARRISON M, FURLONG F, KELL M, MCCANN A. The fate of chemoresistance in triple negative breast cancer (TNBC)[J]. *BBA Clinical*, 2015, 3: 257-275.
- [13] MILANE L, DUAN ZF, AMIJI M. Role of hypoxia and glycolysis in the development of multi-drug resistance in human tumor cells and the establishment of an orthotopic multi-drug resistant tumor model in nude mice using hypoxic pre-conditioning[J]. *Cancer Cell International*, 2011, 11: 3.
- [14] KVOKAČKOVÁ B, REMŠÍK J, JOLLY MK, SOUČEK K. Phenotypic heterogeneity of triple-negative breast cancer mediated by epithelial-mesenchymal plasticity[J]. *Cancers*, 2021, 13(9): 2188.
- [15] AGNOLETTI C, CORRÀ F, MINOTTI L, BALDASSARI F, CRUDELE F, COOK W, Di LEVA G, D'ADAMO A, GASPARINI P, VOLINIA S. Heterogeneity in circulating tumor cells: the relevance of the stem-cell subset[J]. *Cancers*, 2019, 11(4): 483.
- [16] GUCALP A, TOLANEY S, ISAKOFF SJ, INGLE JN, LIU MC, CAREY LA, BLACKWELL K, RUGO H, NABELL L, FORERO A, STEARNS V, DOANE AS, DANSO M, MOYNAHAN ME, MOMEN LF, GONZALEZ JM, AKHTAR A, GIRI DD, PATIL S, FEIGIN KN, et al. Translational breast cancer research consortium (TBCRC 011). Phase II trial of bicalutamide in patients with androgen receptor-positive, estrogen receptor-negative metastatic breast cancer[J]. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 2013, 19(19): 5505-5512.
- [17] LEHMANN BD, BAUER JA, SCHAFFER JM, PENDLETON CS, TANG LJ, JOHNSON KC, CHEN X, BALKO JM, GÓMEZ H, ARTEAGA CL, MILLS GB, SANDERS ME, PIETENPOL JA. PIK3CA mutations in androgen receptor-positive triple negative breast cancer confer sensitivity to the combination of PI3K and androgen receptor inhibitors[J]. *Breast Cancer Research: BCR*, 2014, 16(4): 406.

- [18] HUMPHREY SJ, JAMES DE, MANN M. Protein phosphorylation: a major switch mechanism for metabolic regulation[J]. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2015, 26(12): 676-687.
- [19] DICKHUT C, FELDMANN I, LAMBERT J, ZAHEDI RP. Impact of digestion conditions on phosphoproteomics[J]. *Journal of Proteome Research*, 2014, 13(6): 2761-2770.
- [20] LOW TY, MOHTAR MA, LEE PY, OMAR N, ZHOU HJ, YE ML. Widening the bottleneck of phosphoproteomics: evolving strategies for phosphopeptide enrichment[J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 2021, 40(4): 309-333.
- [21] SOLARI FA, dell'AICA M, SICKMANN A, ZAHEDI RP. Why phosphoproteomics is still a challenge[J]. *Molecular BioSystems*, 2015, 11(6): 1487-1493.
- [22] HUESGEN PF, LANGE PF, ROGERS LD, SOLIS N, ECKHARD U, KLEIFELD O, GOULAS T, GOMIS-RÜTH FX, OVERALL CM. LysargiNase mirrors trypsin for protein C-terminal and methylation-site identification[J]. *Nature Methods*, 2015, 12(1): 55-58.
- [23] TSIATSIANI L, GIANSANTI P, SCHELTEMA RA, van den TOORN H, OVERALL CM, ALTELAAR AFM, HECK AJR. Opposite electron-transfer dissociation and higher-energy collisional dissociation fragmentation characteristics of proteolytic K/R(X)<sub>n</sub> and (X)<sub>n</sub>K/R peptides provide benefits for peptide sequencing in proteomics and phosphoproteomics[J]. *Journal of Proteome Research*, 2017, 16(2): 852-861.
- [24] CHAUDHARI M, THAPA N, ISMAIL H, CHOPADEV S, CARAGEA D, KÖHN M, NEWMAN RH, DUKKA B KC. DTL-DephosSite: deep transfer learning based approach to predict dephosphorylation sites[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 9: 662983.
- [25] AEBERSOLD R, GOODLETT DR. Mass spectrometry in proteomics[J]. *Chemical Reviews*, 2001, 101(2): 269-296.
- [26] CIEŚLA J, FRĄCZYK T, RODE W. Phosphorylation of basic amino acid residues in proteins: important but easily missed[J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2011, 58(2): 137-148.
- [27] FÍLA J, HONYSD. Enrichment techniques employed in phosphoproteomics[J]. *Amino Acids*, 2012, 43(3): 1025-1047.
- [28] BEAUSOLEIL SA, JEDRYCHOWSKI M, SCHWARTZ D, ELIAS JE, VILLÉN J, LI JX, COHN MA, CANTLEY LC, GYGI SP. Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(33): 12130-12135.
- [29] ZHANG K. From purification of large amounts of phospho-compounds (nucleotides) to enrichment of phospho-peptides using anion-exchanging resin[J]. *Analytical Biochemistry*, 2006, 357(2): 225-231.
- [30] BODENMILLER B, MUELLER LN, MUELLER M, DOMON B, AEBERSOLD R. Reproducible isolation of distinct, overlapping segments of the phosphoproteome[J]. *Nature Methods*, 2007, 4(3): 231-237.
- [31] THINGHOLM TE, JENSEN ON, ROBINSON PJ, LARSEN MR. SIMAC (sequential elution from IMAC), a phosphoproteomics strategy for the rapid separation of monophosphorylated from multiply phosphorylated peptides[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2008, 7(4): 661-671.
- [32] 门丽影, 徐锋, 徐平. 基于SH2超亲体的微量样品酪氨酸磷酸化蛋白质组学技术研究进展及应用[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(7): 2334-2341.
- [33] MEN LY, XU F, XU P. Advances and application of enrichment technology in SH2 superbinder-based tyrosine phosphoproteomics[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(7): 2334-2341 (in Chinese).
- [34] 李佳然, 陈秀兰, 杨福全. 磷酸化蛋白质组学研究中磷酸化肽段富集与分离方法研究进展[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(10): 3648-3658.
- [35] LI JR, CHEN XL, YANG FQ. Advances in the methods of phosphopeptide enrichment and separation in phosphoproteomic research[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(10): 3648-3658 (in Chinese).
- [36] ZHANGYY, FONSLow BR, SHAN B, BAEK MC, YATES JR 3rd. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics[J]. *Chemical Reviews*, 2013, 113(4): 2343-2394.
- [37] ASARAJM, CHRISTOFK HR, FREIMARK LM, CANTLEY LC. A label-free quantification method by MS/MS TIC compared to SILAC and spectral counting in a proteomics screen[J]. *Proteomics*, 2008, 8(5): 994-999.
- [38] CHRISTIN C, BISCHOFF R, HORVATOVICH P. Data processing pipelines for comprehensive profiling of proteomics samples by label-free LC-MS for biomarker discovery[J]. *Talanta*, 2011, 83(4): 1209-1224.
- [39] ROSS PL, HUANG YN, MARCHESE JN,

- WILLIAMSON B, PARKER K, HATTAN S, KHAINOVSKI N, PILLAI S, DEY S, DANIELS S, PURKAYASTHA S, JUHASZ P, MARTIN S, BARTLET-JONES M, HE F, JACOBSON A, PAPPIN DJ. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents[J]. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 2004, 3(12): 1154-1169.
- [38] RÖST HL, SACHSENBERG T, AICHE S, BIELOW C, WEISSER H, AICHELER F, ANDREOTTI S, EHRlich HC, GUTENBRUNNER P, KENAR E, LIANG X, NAHNSEN S, NILSE L, PFEUFFER J, ROSENBERGER G, RURIK M, SCHMITT U, VEIT J, WALZER M, WOJNAR D, et al. OpenMS: a flexible open-source software platform for mass spectrometry data analysis[J]. *Nature Methods*, 2016, 13(9): 741-748.
- [39] GYGI SP, RIST B, GERBER SA, TURECEK F, GELB MH, AEBERSOLD R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags[J]. *Nature Biotechnology*, 1999, 17(10): 994-999.
- [40] ODA Y, HUANG K, CROSS FR, COWBURN D, CHAIT BT. Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(12): 6591-6596.
- [41] JIANG H, ENGLISH AM. Quantitative analysis of the yeast proteome by incorporation of isotopically labeled leucine[J]. *Journal of Proteome Research*, 2002, 1(4): 345-350.
- [42] OW SY, CARDONA T, TATON A, MAGNUSON A, LINDBLAD P, STENSJÖ K, WRIGHT PC. Quantitative shotgun proteomics of enriched heterocysts from *Nostoc* sp. PCC 7120 using 8-plex isobaric peptide tags[J]. *Journal of Proteome Research*, 2008, 7(4): 1615-1628.
- [43] DAYON L, HAINARD A, LICKER V, TURCK N, KUHN K, HOCHSTRASSER DF, BURKHARD PR, SANCHEZ JC. Relative quantification of proteins in human cerebrospinal fluids by MS/MS using 6-plex isobaric tags[J]. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(8): 2921-2931.
- [44] JIANG H, YIN H, XIE L, ZHANG Y, ZHANG L, YANG PY, LU H. A novel triplex isobaric termini labeling quantitative approach for simultaneously supplying three quantitative sources[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2018, 1001: 70-77.
- [45] ZHANG S, CHEN LF, SHAN YC, SUI ZG, WU Q, ZHANG LH, LIANG Z, ZHANG YK. Pseudo isobaric peptide termini labelling for relative proteome quantification by SWATH MS acquisition[J]. *Analyst*, 2016, 141(16): 4912-4918.
- [46] SONNETT M, YEUNG E, WÜHR M. Accurate, sensitive, and precise multiplexed proteomics using the complement reporter ion cluster[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(8): 5032-5039.
- [47] MERTINS P, UDESHI ND, CLAUSER KR, MANI DR, PATEL J, ONG SE, JAFFE JD, CARR SA. iTRAQ labeling is superior to mTRAQ for quantitative global proteomics and phosphoproteomics[J]. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 2012, 11(6): M111.014423.
- [48] ZHANG Y, DREYER B, GOVORUKHINA N, HEBERLE AM, KONČAREVIĆ S, KRISP C, OPITZ CA, PFÄNDER P, BISCHOFF R, SCHLÜTER H, KWIATKOWSKI M, THEDIECK K, HORVATOVICH PL. Comparative assessment of quantification methods for tumor tissue phosphoproteomics[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(31): 10893-10906.
- [49] WU RH, DEPHOURE N, HAAS W, HUTTLIN EL, ZHAI B, SOWA ME, GYGI SP. Correct interpretation of comprehensive phosphorylation dynamics requires normalization by protein expression changes[J]. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 2011, 10(8): M111.009654.
- [50] OLSEN JV, BLAGOEV B, GNAD F, MACEK B, KUMAR C, MORTENSEN P, MANN M. Global, *in vivo*, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks[J]. *Cell*, 2006, 127(3): 635-648.
- [51] TABB DL, VEGA-MONTOTO L, RUDNICK PA, VARIYATH AM, HAM AJ L, BUNK DM, KILPATRICK LE, BILLHEIMER DD, BLACKMAN RK, CARDASIS HL, CARR SA, CLAUSER KR, JAFFE JD, KOWALSKI KA, NEUBERT TA, REGNIER FE, SCHILLING B, TEGELER TJ, WANG M, WANG P, et al. Repeatability and reproducibility in proteomic identifications by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Proteome Research*, 2010, 9(2): 761-776.
- [52] VENABLE JD, DONG MQ, WOHLSCHLEGEL J, DILLIN A, YATES JR. Automated approach for quantitative analysis of complex peptide mixtures from tandem mass spectra[J]. *Nature Methods*, 2004, 1(1): 39-45.

- [53] GILLET LC, NAVARRO P, TATE S, RÖST H, SELEVSEK N, REITER L, BONNER R, AEBERSOLD R. Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*: MCP, 2012, 11(6): O111.016717.
- [54] MEIER F, BRUNNER AD, FRANK M, HA AN, BLUDAU I, VOYTIK E, KASPAR-SCHOENEFELD S, LUBECK M, RAETHER O, BACHE N, AEBERSOLD R, COLLINS BC, RÖST HL, MANN M. diaPASEF: parallel accumulation-serial fragmentation combined with data-independent acquisition[J]. *Nature Methods*, 2020, 17(12): 1229-1236.
- [55] NARUMI R, MURAKAMI T, KUGA T, ADACHI J, SHIROMIZU T, MURAOKA S, KUME H, KODERA Y, MATSUMOTO M, NAKAYAMA K, MIYAMOTO Y, ISHITOBI M, INAJI H, KATO K, TOMONAGA T. A strategy for large-scale phosphoproteomics and SRM-based validation of human breast cancer tissue samples[J]. *Journal of Proteome Research*, 2012, 11(11): 5311-5322.
- [56] BEKKER-JENSEN DB, BERNHARDT OM, HOGREBE A, MARTINEZ-VAL A, VERBEKE L, GANDHI T, KELSTRUP CD, REITER L, OLSEN JV. Rapid and site-specific deep phosphoproteome profiling by data-independent acquisition without the need for spectral libraries[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 787.
- [57] HANSEN FM, TANZER MC, BRÜNING F, BLUDAU I, STAFFORD C, SCHULMAN BA, ROBLES MS, KARAYEL O, MANN M. Data-independent acquisition method for ubiquitinome analysis reveals regulation of circadian biology[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 254.
- [58] PEROU CM, SØRLIE T, EISEN MB, van de RIJN M, JEFFREY SS, REES CA, POLLACK JR, ROSS DT, JOHNSEN H, AKSLEN LA, FLUGE Ø, PERGAMENSCHIKOV A, WILLIAMS C, ZHU SX, LØNNING PE, BØRRESEN-DALE AL, BROWN PO, BOTSTEIN D. Molecular portraits of human breast tumours[J]. *Nature*, 2000, 406(6797): 747-752.
- [59] ASLEH K, RIAZ N, NIELSEN TO. Heterogeneity of triple negative breast cancer: current advances in subtyping and treatment implications[J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2022, 41(1): 265.
- [60] GONG TQ, JIANG YZ, SHAO C, PENG WT, LIU MW, LI DQ, ZHANG BY, DU P, HUANG Y, LI FF, LI MY, HAN ZL, JIN X, MA D, XIAO Y, YANG PY, QIN J, SHAO ZM, ZHU WM. Proteome-centric cross-omics characterization and integrated network analyses of triple-negative breast cancer[J]. *Cell Reports*, 2022, 38(9): 110460.
- [61] LETAI A. Functional precision cancer medicine—moving beyond pure genomics[J]. *Nature Medicine*, 2017, 23(9): 1028-1035.
- [62] BAYRAKTAR S, GLÜCK S. Molecularly targeted therapies for metastatic triple-negative breast cancer[J]. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2013, 138(1): 21-35.
- [63] KOHALE IN, YU J, ZHUANG YX, FAN XY, REDDY RJ, SINNWELL J, KALARI KR, BOUGHEY JC, CARTER JM, GOETZ MP, WANG LW, WHITE FM. Identification of src family kinases as potential therapeutic targets for chemotherapy-resistant triple negative breast cancer[J]. *Cancers*, 2022, 14(17): 4220.
- [64] DENG XY, KOHANFARS M, HSU HM, SOUDA P, CAPRI J, WHITELEGGE JP, CHANG HR. Combined phosphoproteomics and bioinformatics strategy in deciphering drug resistant related pathways in triple negative breast cancer[J]. *International Journal of Proteomics*, 2014, 2014: 390781.
- [65] WANG K, ZHU X, ZHANG K, YIN YX, CHEN Y, ZHANG T. Interleukin-6 contributes to chemoresistance in MDA-MB-231 cells *via* targeting HIF-1 $\alpha$ [J]. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2018, 32(3): e22039.
- [66] WANG S, YAO Y, YAO M, FU P, WANG W. Interleukin-22 promotes triple negative breast cancer cells migration and paclitaxel resistance through JAK-STAT3/MAPKs/AKT signaling pathways[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 503(3): 1605-1609.
- [67] MEHTA R, KATTA H, ALIMIRAH F, PATEL R, MURILLO G, PENG XJ, MUZZIO M, MEHTA RG. Deguelin action involves c-Met and EGFR signaling pathways in triple negative breast cancer cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e65113.
- [68] LISIAK N, DZIKOWSKA P, WISNIEWSKA U, KACZMAREK M, BEDNARCZYK-CWYNAR B, ZAPRUTKO L, RUBIS B. Biological activity of oleanolic acid derivatives HIMOXL and Br-HIMOLID in breast cancer cells is mediated by ER and EGFR[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(6): 5099.

- [69] UENG SH, CHEN SC, CHANG YS, HSUEH S, LIN YC, CHIEN HP, LO YF, SHEN SC, HSUEH C. Phosphorylated mTOR expression correlates with poor outcome in early-stage triple negative breast carcinomas[J]. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2012, 5(8): 806-813.
- [70] Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours[J]. Nature, 2012, 490(7418): 61-70.
- [71] UMEMURA S, YOSHIDA S, OHTA Y, NAITO K, OSAMURA RY, TOKUDA Y. Increased phosphorylation of Akt in triple-negative breast cancers[J]. Cancer Science, 2007, 98(12): 1889-1892.
- [72] WALSH S, FLANAGAN L, QUINN C, EVOY D, McDERMOTT EW, PIERCE A, DUFFY MJ. mTOR in breast cancer: differential expression in triple-negative and non-triple-negative tumors[J]. The Breast, 2012, 21(2): 178-182.
- [73] RONTOGIANNI S, ISKIT S, van DOORN S, PEEPER DS, ALTELAAR M. Combined EGFR and ROCK inhibition in triple-negative breast cancer leads to cell death *via* impaired autophagic flux[J]. Molecular & Cellular Proteomics: MCP, 2020, 19(2): 261-277.
- [74] CHEW NJ, LIM KAM SIAN TCC, NGUYEN EV, SHIN SY, YANG J, HUI MN, DENG N, MCLEAN CA, WELM AL, LIM E, GREGORY P, NOTTLE T, LANG T, VEREKER M, RICHARDSON G, KERR G, MICATI D, JARDÉ T, ABUD HE, LEE RS, et al. Evaluation of FGFR targeting in breast cancer through interrogation of patient-derived models[J]. Breast Cancer Research: BCR, 2021, 23(1): 82.
- [75] LEHMANN BD, COLAPRICO A, SILVA TC, CHEN JJ, AN HB, BAN YG, HUANG HC, WANG L, JAMES JL, BALKO JM, GONZALEZ-ERICSSON PI, SANDERS ME, ZHANG B, PIETENPOL JA, CHEN XS. Multi-omics analysis identifies therapeutic vulnerabilities in triple-negative breast cancer subtypes[J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 6276.

(本文责编 陈宏宇)