

基于蛋白质组学方法探讨沙蓬粗寡糖改善2型糖尿病肝损伤的作用机制



张紫涵¹, 张晓桀¹, 杨瑀泽¹, 杨天硕¹, 邢东洋¹, 马茜茜^{1, 2}, 包书茵^{1, 2}

1. 内蒙古民族大学公共卫生学院 (内蒙古通辽 028000)

2. 内蒙古民族大学糖脂代谢紊乱干预策略与新药研究创新团队 (内蒙古通辽 028000)

【摘要】目的 基于 Astral-数据独立采集 (DIA) 蛋白质组学技术筛选沙蓬粗寡糖 (AOS) 改善 2 型糖尿病肝损伤的潜在靶点, 并探讨其作用机制。**方法** 将 12 只 db/db 小鼠随机分为模型组、AOS 低剂量组 (LAOS, 375 mg/kg) 和高剂量组 (HAOS, 750 mg/kg), 每组 4 只, 另设 4 只 db/m 小鼠为空白对照组。干预 8 周后, 采集肝脏组织进行蛋白质组学分析, 通过韦恩图、KEGG 通路富集、基因本体论 (GO) 注释、蛋白质-蛋白质互作 (PPI) 网络及基因集富集分析 (GSEA) 等方法解析 AOS 的作用机制。**结果** LAOS 组鉴定出 180 个差异蛋白, GO 分析显示其参与细胞氨基酸分解代谢; KEGG 提示与丁酸代谢以及缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸降解通路相关。HAOS 组筛选出 282 个差异蛋白, 显著富集于小分子代谢、有机酸代谢、酮酸代谢、羧酸代谢过程, KEGG 分析表明其通过调控代谢途径、丙酸代谢、碳代谢、氧化磷酸化以及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解等通路发挥作用。PPI 网络筛选出酰基辅酶 A 合成酶短链家族成员 1 (ACSS1)、含烯酰辅酶 A 水合酶域 1 (ECHDC1) 和烯酰辅酶 A 水合酶 1 (ECHS1) 等 10 个核心靶蛋白。GSEA 显示, LAOS 的作用与干扰素- γ 信号和缺氧通路激活相关, 而 HAOS 涉及上皮-间质转化、缺氧、未折叠蛋白反应、肌细胞生成以及蛋白质分泌通路。**结论** AOS 可能通过调节支链氨基酸代谢、短链脂肪酸代谢、丙酮酸代谢及氧化磷酸化等途径改善糖尿病肝损伤, ACSS1、ECHDC1 和 ECHS1 等靶点是其关键作用节点。

【关键词】 沙蓬粗寡糖; 2 型糖尿病; 肝损伤; 蛋白质组学

【中图分类号】 R965

【文献标识码】 A

Mechanism of agiophyllum oligo saccharides in improving type 2 diabetes mellitus related liver injury based on proteomics method

ZHANG Zihan¹, ZHANG Xiaojie¹, YANG Yuze¹, YANG Tianshuo¹, XING Dongyang¹, MA Qianqian^{1, 2}, BAO Shuyin^{1, 2}

1. School of Public Health, Inner Mongolia Minzu University, Tongliao 028000, Inner Mongolia, China

2. Innovation Team for Intervention Strategies and New Drug Research on Disordered Glucose and Lipid Metabolism of Inner Mongolia Minzu University, Tongliao 028000, Inner Mongolia, China

Corresponding authors: BAO Shuyin, Email: baoshuyin8881@163.com; MA Qianqian, Email: maqq2020@126.com

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202503028

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (82004070); 内蒙古自治区高等学校青年科技英才支持计划项目 (NJYT23134); 内蒙古自治区“草原英才”工程青年创新创业人才 (一层次) 培养计划项目 (2023QNCXRC09); 内蒙古自然科学基金资助项目 (2024QN08028); 内蒙古自治区高校直属经费项目 (GXKY25Z022); 内蒙古民族大学博士科研启动基金项目 (BS677)

通信作者: 包书茵, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, Email: baoshuyin8881@163.com

马茜茜, 博士, 讲师, 硕士研究生导师, Email: maqq2020@126.com

【Abstract】Objective Based on Astral-data-independent acquisition (DIA) proteomics technology, to screen the potential targets of agiophyllum oligo saccharides (AOS) to improve type 2 diabetes mellitus (T2DM) related liver injury, and explore its mechanism. **Methods** Twelve db/db mice were randomly divided into a model group, a low-dose AOS group (LAOS, 375 mg/kg), and a high-dose AOS group (HAOS, 750 mg/kg), with 4 mice in each group. Additionally, 4 db/m mice were set as a blank control group. After 8 weeks of intervention, liver tissues were collected for proteomic analysis, and the mechanism of AOS was analyzed using methods such as Venn diagram, KEGG pathway enrichment, gene ontology (GO) annotation, protein-protein interaction (PPI) network, and gene set enrichment analysis (GSEA). **Results** 180 differentially expressed proteins were identified in LAOS group. GO analysis showed that they were involved in breakdown and metabolism of cellular amino acid. KEGG suggested that they were related to the pathways of butyric acid metabolism and degradation of valine, leucine and isoleucine. 280 differentially expressed proteins were identified in HAOS group. They were significantly enriched in processes of small molecule metabolism, organic acid metabolism, ketone acid metabolism and carboxylic acid metabolism. KEGG analysis showed that they exerted their effects through regulating the pathways such as metabolic pathways, propionic acid metabolism, carbon metabolism, oxidative phosphorylation, and degradation of valine, leucine and isoleucine. PPI network screened 10 core target proteins including ACSS1, ECHDC1, ECHS1 and so on. GSEA showed that the role of LAOS was related to activation of IFN- γ signaling and hypoxic pathways, while HAOS was involved in pathways of epithelial mesenchymal transition, hypoxia, unfolded protein response, muscle cell generation and protein secretion. **Conclusion** AOS might improve liver injury in diabetes by regulating branched chain amino acid metabolism, short chain fatty acid metabolism, pyruvate metabolism and oxidative phosphorylation. Targets such as ACSS1, ECHDC1, ECHS1 etc. were its key action nodes.

【Keywords】 Agiophyllum oligo saccharides; Type 2 diabetes mellitus; Liver injury; Proteomics

2型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 是一种以胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 导致的血糖升高和胰岛素分泌相对减少为特征的代谢性疾病。根据第 10 版《全球糖尿病地图》统计,截至 2021 年全球糖尿病患者已达 5.37 亿,患病率超过 10%,预计到 2045 年患病人数将增加 46%,届时全球将有超过 1 万亿美元的健康支出用于糖尿病治疗,这一疾病正严重威胁人类健康和社会经济发展^[1]。作为机体代谢的核心器官,肝脏功能在糖尿病病理进程中受到显著影响:T2DM 引发的糖脂代谢紊乱和 IR 状态会显著增强肝细胞对炎症及损伤性刺激的敏感性,促进大量活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 生成。当 ROS 过度累积时,会严重破坏机体的抗氧化防御系统,最终导致肝脏实质性损伤^[2]。因此,T2DM 相关肝损伤已成为当前需要深入研究和解决的重大健康挑战。

蛋白质组是指特定基因组编码或在细胞、组织中表达的全部蛋白质^[3],而蛋白质组学则通过系统性分析蛋白质的表达差异,从功能层面揭示疾病机制或确定潜在药物靶点^[4]。近年来,基

于 Orbitrap Astral 质谱仪的 Astral-数据独立采集 (data-independent acquisition, DIA) 技术为蛋白质组学研究提供了强大支持,该质谱仪凭借其高通量、高覆盖深度、高灵敏度及高定量精度的卓越性能,结合 DIA 技术可实现稳定检测并定量分析超过 10 000 个蛋白质^[5]。本实验所研究的药物沙蓬粗寡糖 (agiophyllum oligosaccharides, AOS) 是从蒙古族特色药材沙蓬的干燥地上部分经分离纯化获得,课题组前期研究已证实其对 Goto-Kakizaki (GK) 大鼠及 db/db 小鼠具有显著降低血糖和血脂、改善糖耐量以及缓解糖尿病相关肝肾损伤的作用^[6-8]。

AOS 是一种成分复杂的大分子结构糖类物质,可能通过多机制改善 T2DM 的肝损伤。研究表明,AOS 能够激活胰岛素受体 (insulin receptor, INS-R) / 胰岛素受体底物 -2 (insulin receptor substrate-2, IRS-2) / 磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K) / 蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) / 葡萄糖转运蛋白 4 (glucose transporter 4, Glut4) / 过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferator-activated

receptor, PPAR) γ 通路, 上调肝脏和胰腺组织中关键分子的表达, 并促进 IRS-2 和 AKT 的磷酸化, 从而改善胰岛素敏感性、减轻 IR、促进肝细胞增殖和葡萄糖摄取。此外, AOS 还能显著降低血糖、游离脂肪酸、丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 和天门冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 水平, 缓解肝脏脂质蓄积、纤维化及胰腺损伤^[9-10]。然而, 目前关于 AOS 的作用机制研究尚不全面, 因此本研究利用 Astral-DIA 蛋白质组学技术对所有可定量蛋白进行分析, 以进一步探索 AOS 改善 T2DM 肝损伤的潜在分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

Vanquish Neo 高效液相色谱仪和 Orbitrap Astral 质谱仪购自美国 Thermo 公司; 590 血糖仪 (批号: 2011)、一次性采血针 (28 G 注式 SOFT 型, 批号: M0652)、血糖试纸 (葡萄糖氧化酶法, 批号: 1304055) 均购自江苏鱼跃医疗设备股份有限公司。

AOS (藻寡糖, 褐色粉末, 具茶香味) 由沙蓬 (Agriophyllum squarrosum) 醇提-树脂纯化-脱色所得粗寡糖, 其 1 g 相当于 14.4 g 沙蓬原料; 经苯酚-硫酸法测定, 粗寡糖含量为 72.6%; 实验所用沙蓬地上部分采自内蒙古通辽市奈曼旗, 由内蒙古民族大学蒙医药学院包桂花教授鉴定符合内蒙古药材标准 (2021 版)。高脂饲料 (邳州市小河科技发展有限公司, 脂肪含量 60%, 批号: 23021002)。

1.2 动物

健康的 db/db 小鼠 (12 只) 和 db/m 小鼠 (4 只), 清洁级, 8~10 周龄, 体重 18~22 g, 雌雄不限, 均购自中国江苏华创信诺医药科技有限公司 [实验动物生产许可证号: SCXK (苏) 2020-0009]。所有小鼠饲养于内蒙古民族大学附属医院 SPF 级动物实验中心, 在标准条件下培育: 12 h 明暗循环, 恒温 22~25℃, 相对湿度 50%~70%。本实验方案经内蒙古民族大学附属医院医学伦理委员会审批通过 (伦理审批号: NM-LL-2024-03-16-03)。

1.3 方法

1.3.1 动物分组、造模及给药

将 18 只 db/db 小鼠适应性饲养 1 周后作为造

模组, 给予高脂饲料 (60% 脂肪) 和普通饮水喂养; 同时设同周龄 db/m 小鼠作为正常血糖对照组 (normal glucose, NG), 给予普通饲料和饮水喂养。持续喂养 7 周后, 通过尾尖采血测定空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG), 若造模组小鼠 FBG ≥ 11.1 mmol/L (随机血糖 ≥ 16.7 mmol/L) 则判定为 T2DM 造模成功^[11]。随后将造模成功的小鼠随机分为 3 组: 模型组 (model glucose, MG)、AOS 低剂量组 (LAOS, 375 mg/kg, 0.5 倍临床等效剂量) 和 AOS 高剂量组 (HAOS, 750 mg/kg, 临床等效剂量), 每组 4 只。各给药组每日上午灌胃相应剂量的 AOS 溶液, NG 组和 MG 组则给予等体积蒸馏水, 连续干预 8 周。实验期间每周监测小鼠体重指数、FBG, 并记录其进食量、饮水量及精神状态变化。

1.3.2 蛋白质组学测定

实验结束后对 4 组小鼠实施解剖, 采集肝脏组织进行蛋白质组学分析, 检测工作委托上海美吉生物医药科技有限公司分析测试平台完成。具体实验流程如下: 采用质谱上样缓冲液溶解等量肽段, 并用与液相系统和质谱仪进行 LC-MS/MS 分析; 肽段经液相系统进行分离, 色谱柱为 Ionopticks C₁₈ 柱 (250 mm \times 75 μ m, 1.6 μ m), 流动相 A 为含 2% 乙腈和 0.1% 甲酸的水溶液, 流动相 B 为含 80% 乙腈和 0.1% 甲酸的水溶液, 梯度洗脱 (0~0.1 min, 4% \rightarrow 8% B; 0.1~1 min, 8% \rightarrow 12.5% B; 1~1.1 min, 12.5% \rightarrow 12.6% B; 1.1~3.1 min, 12.6% \rightarrow 22.5% B; 3.1~4.6 min, 22.5% \rightarrow 45% B; 4.6~5 min, 45% \rightarrow 99% B; 5~6.5 min, 99% B), 流速为 300 nL/min, 柱温为 25℃; 分离后的肽段通过纳升电喷雾离子源导入质谱仪, 在 DIA 模式下进行分析, 质谱检测采用正离子模式, 离子源电压设置为 1.5 kV, 离子传输管温度维持在 400℃, MS1 分辨率设置为 70 000, 扫描范围为 350~1 300 m/z, 随后进行二级碎裂检测。

1.3.3 蛋白质组学分析

蛋白质组学数据分析流程如下: 首先对鉴定蛋白进行数据预处理, 剔除在 $>50\%$ 样本中缺失的蛋白, 并采用 Sequential KNN 方法对组内 $>20\%$ 样本表达的蛋白进行缺失值填补。以差异表达倍数 (fold change, FC) >1.2 为显著上调标准, FC <0.83 为显著下调标准筛选差异表达蛋

白。为避免实验误差导致的极端FC值影响结果可靠性，进一步剔除 $|\log_2FC| > 8$ 的差异蛋白。分别筛选MG vs. NG、LAOS vs. MG及HAOS vs. MG 3组比较的差异蛋白，绘制韦恩图获取共有差异蛋白，并进行GO功能注释和KEGG通路富集分析（结果可视化呈现）。将LAOS组和HAOS组治疗相关的差异蛋白集分别导入STRING数据库（<https://cn.string-db.org/>）构建蛋白质-蛋白质互作（protein-protein interaction, PPI）网络，运用Cytoscape 3.10.1软件可视化网络并依据度（degree）值筛选核心蛋白节点。同时，采用基因集富集分析（gene set enrichment analysis, GSEA）4.0.0软件对MG组、LAOS组、HAOS组的全基因组表达谱进行GSEA，系统评估AOS干预对T2DM肝损伤的调控作用。

1.4 统计学分析

采用独立样本 t 检验进行组间差异蛋白分析。GO功能富集分析和KEGG通路富集分析分别使用Benjamini-Hochberg（BH）法和Holm法进行多重假设检验校正。STRING数据库蛋白质互作网络分析中，设置最小互作置信度阈值为0.4。GSEA以 $P < 0.05$ 作为显著性阈值。所有统计分析均采用双侧检验，以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 差异表达蛋白情况分析

4组样品中共检测到104 375个肽段，经UniProt数据库比对鉴定获得8 024个蛋白质。经过数据预处理（剔除 $> 50\%$ 样本缺失蛋白并

进行缺失值填补）后，最终保留6 156个高质量蛋白用于后续分析。通过比较MG组与NG组的蛋白表达谱，共筛选出1 570个差异表达蛋白（图1A），剔除极端值后保留1 561个有效差异蛋白，其中上调蛋白757个，下调蛋白804个。值得注意的是，在MG组中表达上调最显著的蛋白为Fmo3，而下调最显著的蛋白为Cyp7b1。

通过比较LAOS组与MG组的蛋白表达谱，共鉴定出418个差异表达蛋白（图1B）。剔除极端值后保留408个有效差异蛋白，包括164个上调蛋白和244个下调蛋白。其中，上调表达最显著的蛋白为羧肽酶A1（Cpa1），下调表达最显著的蛋白为绒毛蛋白1（Vil1），具体差异蛋白信息见表1。

通过HAOS组与MG组的蛋白质组学比较分析，共筛选出575个差异表达蛋白（图1C）。经严格质量控制（剔除异常值）后，最终获得563个有效差异蛋白，包括249个上调蛋白和314个下调蛋白。其中，组蛋白去甲基化酶Kdm3b呈现最显著上调表达，而维生素B₁₂受体蛋白Cubn则表现出最显著下调表达，具体差异蛋白信息见表2。

2.2 差异蛋白的功能富集

通过韦恩图分析发现，将MG组与NG组的差异蛋白分别与LAOS-MG组和HAOS-MG组的差异蛋白进行比较，获得了与AOS治疗相关的关键蛋白集合。结果显示：LAOS组治疗相关的交集蛋白共180个（图2A），而HAOS组治疗相关的交集蛋白更多，达282个（图2B）。

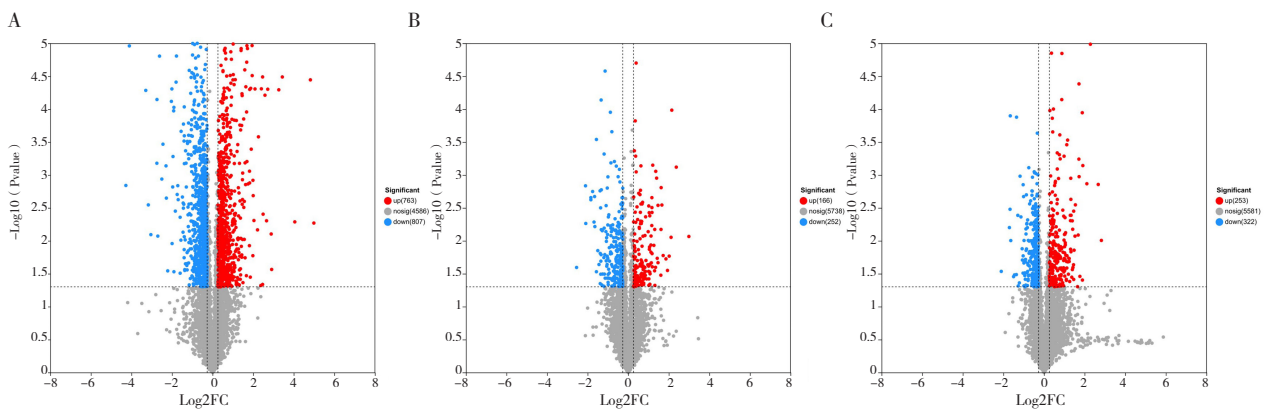


图1 各组差异蛋白火山图

Figure 1. Volcano plot of differentially expressed proteins in each group

注：A. MG组和NG组；B. LAOS组和MG组；C. HAOS组和MG组。

表1 LAOS组与MG组差异表达蛋白中上调及下调倍数排名前5的蛋白质
Table 1. Top 5 upregulated and downregulated proteins in the differentially expressed proteins between LAOS group and MG group

ID	蛋白名称	FC	Log ₂ FC	P	变化趋势	LAOS	MG
Q7TPZ8	Cpa1	7.937 0	2.988 6	0.008 59	up	597.237 0	75.247 2
B9EJI9	Tmem229a	5.162 2	2.368 0	0.000 75	up	672.729 0	130.319 3
A0A0B4J1I1	Igkv16-104	4.428 4	2.146 8	9.373 × 10 ⁻⁵	up	280.510 7	63.344 0
A6P3E4	Mapk8	4.321 9	2.111 7	0.008 84	up	154.203 2	35.679 8
Q3URQ0	Tex10	4.052 2	2.018 7	0.017 08	up	173.429 9	42.798 9
Q3UYC0	Ppm1h	0.279 0	-1.841 7	0.002 37	down	67.801 7	243.056 1
Q3UDI8	Mcm7	0.279 0	-1.841 7	0.002 20	down	50.604 1	181.371 7
P47968	Rpia	0.234 5	-2.092 3	0.005 44	down	172.025 6	733.581 9
O88576	Sle6a18	0.232 3	-2.105 9	0.001 45	down	92.777 8	399.344 7

注：由上至下对应蛋白的中文名称依次为羧肽酶A1、跨膜蛋白229A、免疫球蛋白κ轻链可变区16-104、丝裂原活化蛋白激酶8、睾丸表达蛋白10、蛋白磷酸酶1H、微小染色体维持复合体组分7、核糖5-磷酸异构酶A、溶质载体家族6成员18；up代表该蛋白表达上调；down代表该蛋白表达下调。

表2 HAOS组与MG组差异表达蛋白中上调及下调倍数排名前5的蛋白质
Table 2. Top 5 upregulated and downregulated proteins in the differentially expressed proteins between HAOS group and MG group

ID	蛋白名称	FC	Log ₂ FC	P	变化趋势	HAOS	MG
Q6ZPY7	Kdm3b	7.079 9	2.823 7	0.009 85	up	578.316 6	81.684 1
Q923I7	Sle5a2	6.359 4	2.668 9	0.001 38	up	2 919.879 0	459.142 6
O70423	Aoc3	4.865 8	2.282 7	3.397 × 10 ⁻⁷	up	700.864 6	144.040 1
F6UND7	Hck	4.312 4	2.108 5	0.001 35	up	227.896 4	52.847 3
O70145	Ncf2	3.759 3	1.910 5	0.000 71	up	225.246 6	59.917 5
Q3UJ74	Csde1	0.321 3	-1.638 0	0.009 90	down	77.937 2	242.604 6
Q9CWF2	Tubb2b	0.316 0	-1.662 0	0.000 12	down	395.791 3	1 252.378 1
A0A3Q4EGY4	Prepl	0.313 4	-1.673 9	0.003 31	down	37.181 7	118.658 6
Q9JLT2	Treh	0.306 6	-1.705 6	0.006 29	down	167.013 7	544.691 8

注：由上至下对应蛋白的中文名称依次为赖氨酸去甲基化酶3B、钠/葡萄糖协同转运蛋白2、含铜胺氧化酶3、酪氨酸蛋白激酶HCK、中性粒细胞因子2、冷休克结构域蛋白E1、微管蛋白β-2B链、脯氨酰内肽酶样蛋白、海藻糖酶；up代表该蛋白表达上调；down代表该蛋白表达下调。

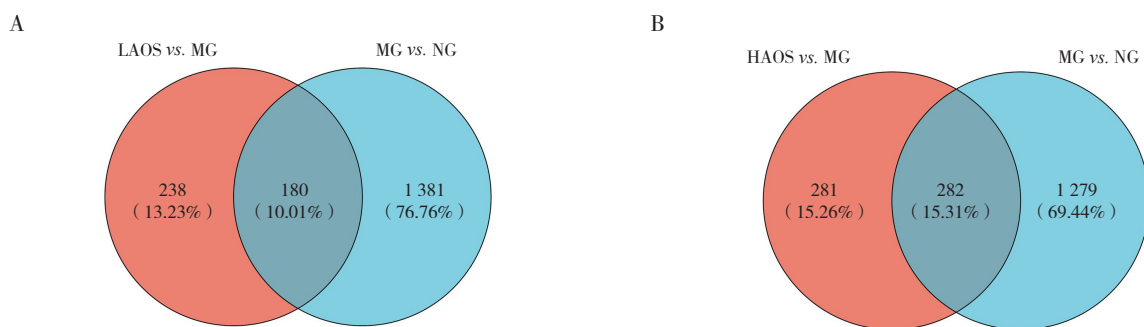


图2 差异蛋白的韦恩图

Figure 2. Venn diagram of differential proteins

注：A. 与LAOS治疗相关的差异蛋白；B. 与HAOS治疗相关的差异蛋白。

通过GO富集分析发现，LAOS组180个差异蛋白显著富集于细胞氨基酸分解代谢过程（GO：0009063）（图3A），而HAOS组282个差异蛋白则广泛参与多种代谢通路，包括小分子代谢过程（GO：0044281）、有机酸代谢过程（GO：0044281）、酮酸代谢过程（GO：0043436）、

羧酸代谢过程（GO：0019752）以及羧酸分解代谢过程（GO：0046395）等（图3B）。

KEGG通路富集分析结果显示，LAOS组的180个差异蛋白主要富集于丁酸代谢以及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解2条代谢通路（图4A）。相比之下，HAOS组的282个差异蛋白则显示出

更广泛的代谢调控作用，显著富集于包括代谢途径、丙酸代谢、碳代谢、氧化磷酸化以及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解在内的多个重要通路（图4B）。

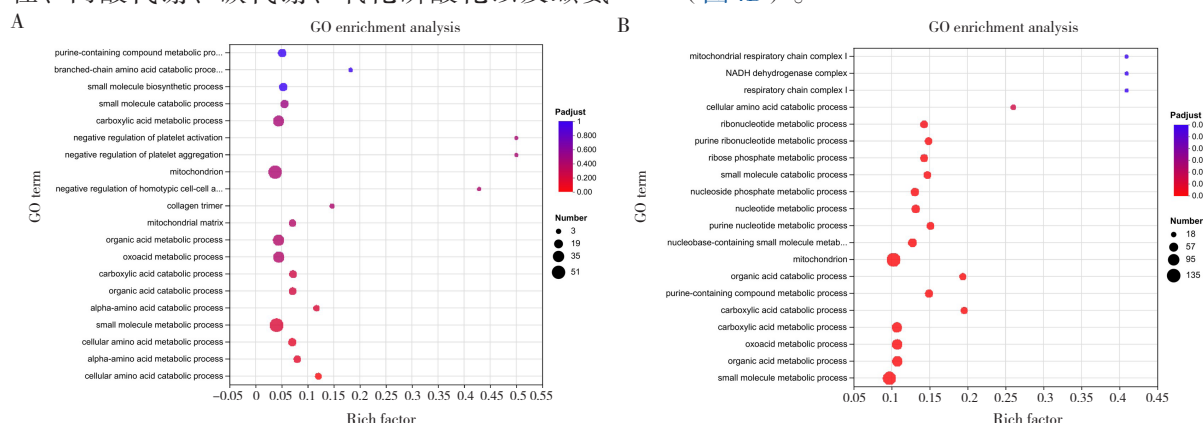


图3 GO分析气泡图

Figure 3. Bubble chart of GO analysis

注：A. LAOS组差异蛋白主要富集信号通路；B. HAOS组差异蛋白主要富集信号通路。

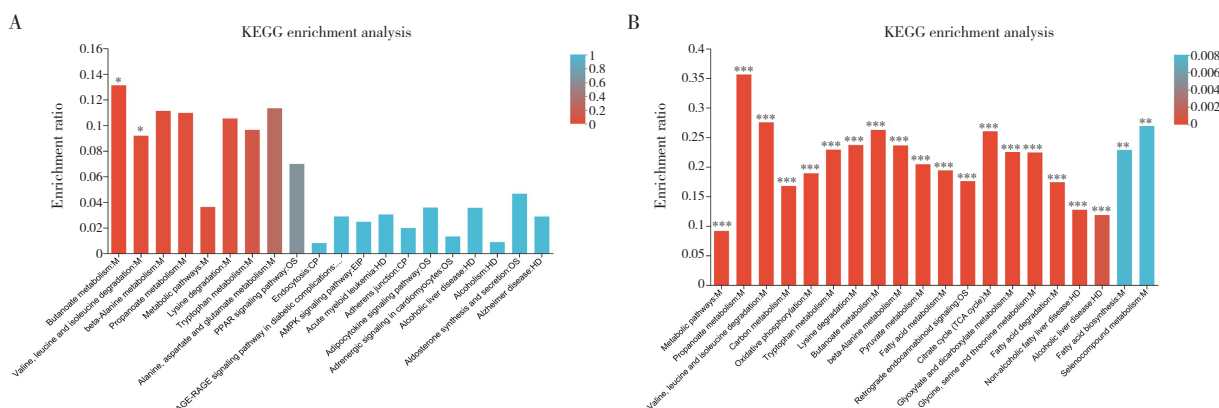


图4 KEGG分析柱状图

Figure 4. Bar chart of KEGG analysis

注：A. LAOS组差异蛋白主要富集信号通路；B. HAOS组差异蛋白主要富集信号通路。

2.3 差异蛋白的交互网络分析

基于STRING数据库的蛋白质互作网络分析结果显示，在LAOS组中，通过degree值排序筛选出的7个关键蛋白依次为：乙酰辅酶A合成酶1 (acetyl-CoA synthetase 1, ACSS1)、基底膜蛋白聚糖 (lumican, LUM)、支链酮酸脱氢酶E2亚基 (dihydrolipoamide branched chain transacylase E2, DBT)、烯酰辅酶A水合酶1 (enoyl-CoA hydratase domain containing 1, ECHDC1)、羟基酰基辅酶A脱氢酶 (hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, HADA) 以及胶原蛋白VI $\alpha 2/\alpha 1$ 链 (collagen type VI alpha 2/1 chain, COL6A2/COL6A1) (图5A)。而HAOS组则鉴定出9个核心蛋白：烯酰辅酶A水合酶1 (enoyl-CoA hydratase short chain 1, ECHS1)、NADH脱氢酶黄素蛋白1 (NADH: ubiquinone oxidoreductase

core subunit V1, NDUFV1)、乙酰辅酶A酰基转移酶2 (acetyl-CoA acyltransferase 2, ACAA2)、琥珀酰辅酶A连接酶 (succinate-CoA ligase subunit alpha, SUCLG1)、三功能酶亚基 β (hydroxyacyl-CoA dehydrogenase trifunctional multienzyme complex subunit beta, HADHB)、ATP柠檬酸裂解酶 (ATP citrate lyase, ACLY)、二氢硫辛酰胺脱氢酶 (dihydrolipoamide dehydrogenase, DLD)、中链酰基辅酶A脱氢酶 (acyl-CoA dehydrogenase medium chain, ACADM) 和羟基酰基辅酶A脱氢酶 (hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, HADH) (图5B)。

通过UniProt检索上述核心蛋白质功能，进一步筛选确定10个关键蛋白，分别为ACSS1、ECHDC1、ECHS1、NDUFV1、ACAA2、SUCLG1、HADHA、ACLY、DLD和ACADM。

2.4 GSEA分析

为了系统解析 AOS 对 T2DM 肝损伤的调控机制，采用 GSEA 方法对所有可定量蛋白进行了全基因组富集分析。结果显示：与 MG 组相比，LAOS 组蛋白显著富集于缺氧通路和干扰

素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 信号通路 (图 6A 和图 6B)；而 HAOS 组则表现出更广泛的调控作用，其蛋白主要富集于上皮-间质转化、缺氧、肌细胞生成、未折叠蛋白反应以及蛋白质分泌等通路 (图 6C~图 6G)。

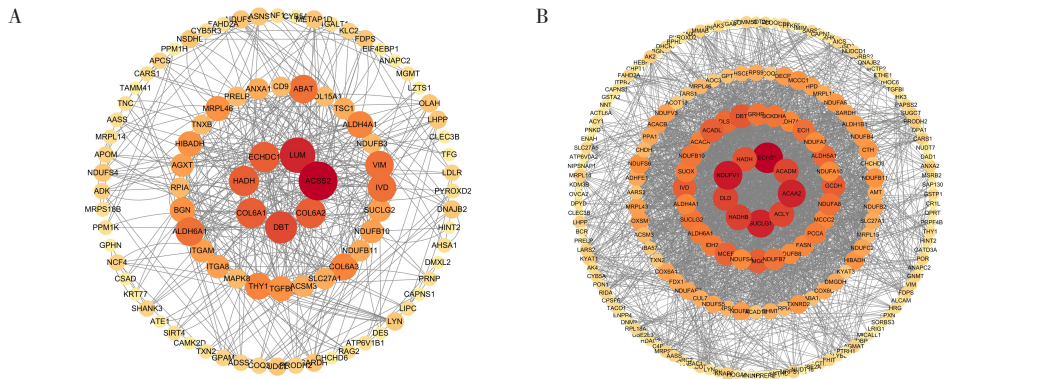


图5 PPI蛋白互作网络

Figure 5. Protein protein interaction network

注：A. LAOS组差异蛋白的PPI网络分析；B. HAOS组差异蛋白的PPI网络分析。

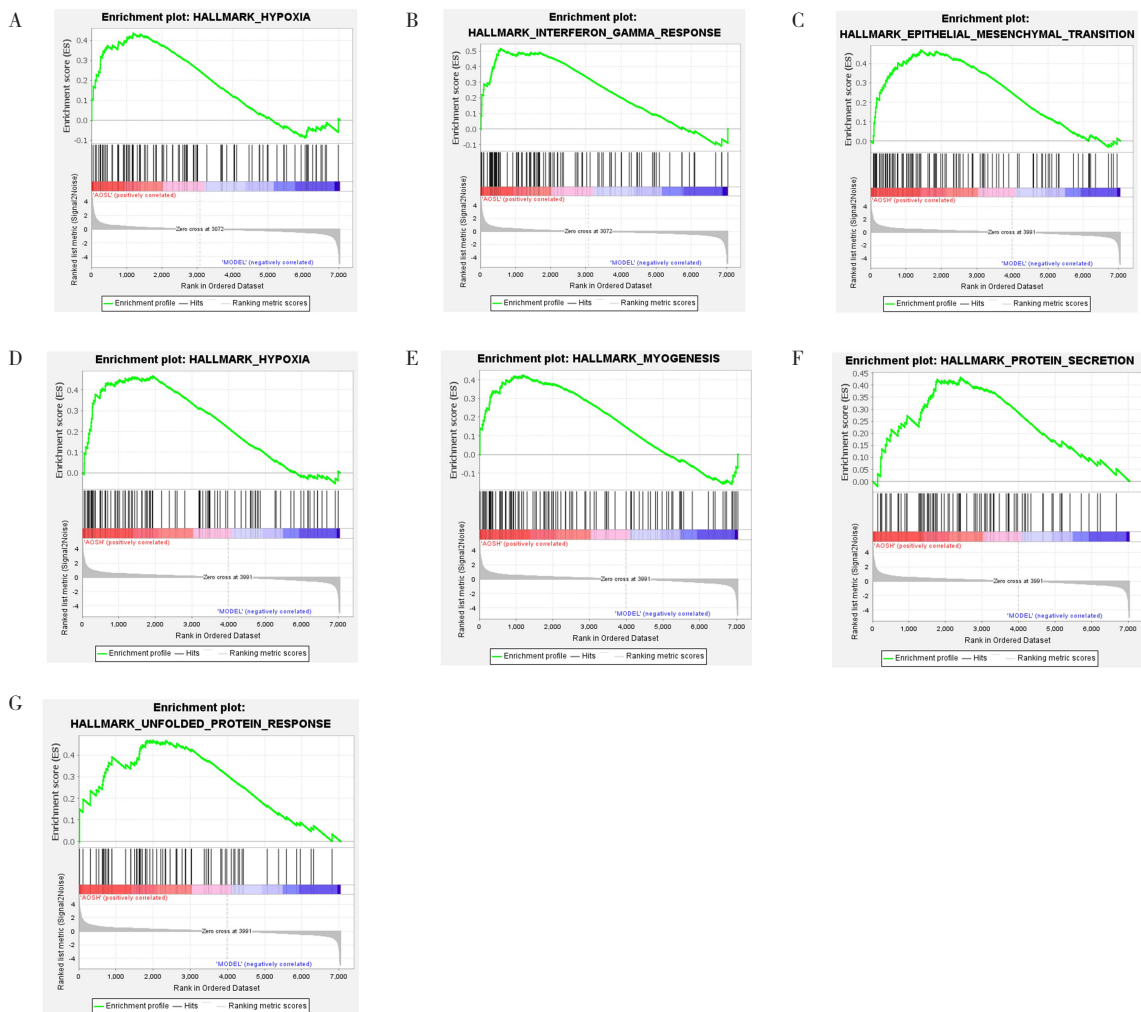


图6 GSEA富集分析

Figure 6. GSEA analysis

注：A和B. LAOS组蛋白主要富集通路；C~G. HAOS组蛋白主要富集通路。

3 讨论

糖尿病肝损伤是一种以糖代谢紊乱与肝脏病理改变为特征的慢性肝脏疾病^[12]。本研究聚焦的AOS源自传统蒙药沙蓬的干燥地上部分,该药材在蒙医临床中具有清热泻火、解毒利尿等功效,是治疗“消渴病”(糖尿病)的常用药物^[13-15]。与黄连解毒汤(抗炎)、沙棘多糖(缓解内质网应激)及葛根苓连汤(抑制铁死亡)等中药成分相比,AOS的独特优势在于其能协同调控代谢与炎症通路^[16]。前期研究证实,AOS可通过激活AKT磷酸化等促增殖信号通路,显著改善糖尿病肝损伤的组织病理学变化^[10]。为进一步系统阐明AOS的多靶点作用机制,本研究创新性地采用蛋白质组学技术,通过对高通量测序数据的深度挖掘,全面解析了AOS改善糖尿病肝损伤的分子网络,为后续研究提供了重要理论依据。

蛋白质组学分析揭示了LAOS和HAOS组在代谢调控中的差异化作用模式。LAOS组的差异蛋白显著富集于细胞氨基酸分解代谢、丁酸代谢以及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解通路,提示其可能通过调控支链氨基酸(branched chain amino acid, BCAA)代谢和短链脂肪酸(short chain fatty acids, SCFAs)代谢来靶向改善肝脏代谢稳态。相比之下,HAOS组展现出更广泛的代谢调控网络,其差异蛋白不仅参与小分子代谢、有机酸代谢和羧酸代谢,还在KEGG分析中富集于代谢主通路、丙酸代谢和氧化磷酸化等关键通路。值得注意的是,两组在BCAA降解通路的共同富集表明该途径在肝损伤修复中的核心地位,而HAOS组特有的氧化磷酸化通路激活可能解释了其更显著的全身代谢改善效果。这些发现为理解AOS的剂量依赖性治疗机制提供了重要分子依据。

现有研究证实,BCAAs在糖代谢调控中具有双重作用:一方面其水平升高与IR、肥胖及糖尿病风险呈正相关^[17];另一方面,柯雅蕾等^[18]揭示BCAAs可通过哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路抑制AKT2-胰岛素诱导的基因2(insulin-induced gene 2, INSIG2a)信号转导,从而调控肝脏脂质代谢重分布,而蛋白磷酸酶Mg²⁺/Mn²⁺依赖性1K(protein phosphatase, Mg²⁺/Mn²⁺ dependent

1K, PPM1K)则能通过激活碳水化合物反应元件结合蛋白-β(carbohydrate response element binding protein-β, ChREBP-β)转录因子促进肝脏脂质生成。在SCFAs方面,其主要由肠道菌群发酵膳食纤维和蛋白质产生,同时也可通过脂肪酸氧化途径生成^[19]。其中,丁酸被发现具有多重代谢调节功能:不仅能激活胚胎干细胞中胰腺发育关键基因以促进β细胞分化,还能通过抑制组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)活性调控p38/细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路,从而保护β细胞功能并改善糖代谢稳态^[20]。这些机制研究为理解BCAAs和SCFAs在T2DM发生发展中的作用提供了重要理论基础,也为AOS通过调控这些代谢通路改善糖尿病肝损伤的机制研究提供了科学依据。

多项研究揭示了线粒体能量代谢与糖尿病肝损伤的密切关联。Abulizi等^[21]证实,线粒体三磷酸鸟苷依赖的磷酸烯醇式丙酮酸循环在胰岛素分泌调控中起关键作用,该通路通过小分子活化增强葡萄糖刺激的胰岛素分泌,同时不引起胰岛损伤,并能显著改善机体胰岛素敏感性。在糖尿病动物模型中,该代谢通路的激活还伴随糖异生减少、红细胞糖酵解增强及肝脏脂肪变性减轻等获益效应。张蕾等^[22]进一步发现,糖尿病状态下肝脏线粒体功能显著受损,表现为以琥珀酸为底物时的磷氧比、呼吸控制比及H⁺-ATP酶合成活性均明显降低,提示糖尿病可导致线粒体氧化磷酸化耦联障碍。这些发现为理解糖尿病肝损伤中线粒体功能障碍的分子机制提供了重要证据,也印证了本研究中HAOS组差异蛋白显著富集于氧化磷酸化通路的生物学意义。

本研究通过PPI网络分析鉴定出10个枢纽基因,主要参与脂肪酸代谢、氧化磷酸化和支链氨基酸代谢等关键通路。其中:ECHDC1通过降解甲基/乙基丙二酰辅酶A调控脂肪酸合成,抑制异常支链脂肪酸形成^[23];ECHS1作为代谢开关,在营养缺乏时促进BCAAs和FAs分解供能,而在营养充足时通过乙酰化介导的酶活性抑制实现代谢重编程^[24];NDUFV1作为线粒体复合物I核心亚基,既参与质子动力产生又是ROS主要来源,其缺陷可导致严重代谢紊乱^[25];ACAA2通过抑

制 ATGL 活性促进肝细胞脂质蓄积^[26]; HADHA 被证实能直接调控 Pck1/G6pc/Pgc1a 等糖异生关键基因表达^[27]; ACLY 则通过将柠檬酸转化为乙酰辅酶 A, 在糖脂代谢转换中起枢纽作用^[28]。这些基因与 KEGG/GO 分析结果高度吻合, 部分已被证实可导致肝糖脂代谢紊乱, 虽尚未明确其是否为 AOS 的直接作用靶点, 但为阐明 T2DM 肝损伤机制提供了重要线索。建议通过基因敲除/过表达实验进一步验证这些关键靶点在 AOS 治疗中的作用。

本研究通过整合蛋白质组学和生物信息学分析, 系统揭示了 AOS 改善 T2DM 肝损伤的多靶点作用机制。GSEA 分析表明, LAOS 主要通过调控 IFN- γ 和缺氧等炎症相关通路发挥作用, 而 HAOS 则通过更广泛的通路网络(包括间质转化、未折叠蛋白反应、肌细胞生成等)改善糖酵解、缓解内质网应激并促进组织修复。蛋白质互作网络分析鉴定出 ACSS1、ECHDC1、ECHS1、NDUFV1 等 10 个关键靶蛋白, 这些蛋白主要参与 BCAA 代谢、SCFAs 代谢、丙酮酸代谢及氧化磷酸化等代谢通路。研究结果表明, AOS 可能通过多靶点协同调控糖脂代谢、能量代谢和炎症反应来改善 T2DM 肝损伤。本研究不仅为阐明 AOS 的作用机制提供了新的理论依据, 也为后续开展深入的机制验证研究指明了方向, 未来我们将针对这些关键通路和靶蛋白开展系统的实验验证。

参考文献

- 1 Sun H, Saeedi P, Karuranga S, et al. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2022, 183: 109119. DOI: 10.1016/j.diabres.2021.109119.
- 2 何晴. 葛根苓连汤基于铁死亡改善 2 型糖尿病肝损伤的分子机制[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2024. DOI: 10.26922/d.cnki.ganzc.2024.000229.
- 3 罗玉. 蛋白质组联合转录组学分析肝母细胞瘤差异蛋白表达及意义的研究[D]. 贵州遵义: 遵义医科大学, 2022. DOI: 10.27680/d.cnki.gzyyc.2022.000070.
- 4 郑淇, 卢意, 于栋华, 等. 基于 DIA 蛋白质组学探讨刺五加提取物治疗转基因帕金森小鼠的作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, 31(8): 40–50. [Zheng Q, Lu Y, Yu DH, et al. DIA proteomics reveals mechanism of *acanthopanax senticosi* radix et rhizoma seu caulis extract in treating α -syn transgenic parkinson's disease in mice[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2025, 31(8): 40–50.] DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20250108.
- 5 Stewart HI, Grinfeld D, Giannakopoulos A, et al. Parallelized acquisition of orbitrap and astral analyzers enables high-throughput quantitative analysis[J]. *Anal Chem*, 2023, 95(42): 15656–15664. DOI: 10.1021/acs.analchem.3c02856.
- 6 包书茵. 蒙药沙蓬粗寡糖调控糖脂代谢紊乱抑制 T2DM-NAFLD 发生发展的机制研究[D]. 吉林延边: 延边大学, 2022. DOI: 10.27439/d.cnki.gybd.2022.000038.
- 7 包书茵, 韩淑英, 朝日雅, 等. 沙蓬粗寡糖对 GK 大鼠肝、肾保护作用及机制探讨[J]. *中国药理学通报*, 2018, 34(1): 147–148. [Bao SY, Han SY, Chao RY, et al. The protective effects of *Agiophyllum Oligo saccha-rides* on rat liver and kidney[J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2018, 34(1): 147–148.] DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2018.01.031.
- 8 包书茵, 韩淑英, 王胡格吉乐图, 等. 沙蓬粗寡糖对糖尿病 GK 大鼠一般表征和糖脂代谢的改善作用[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2016, 42(6): 1059–1065. [Bao SY, Han SY, Wang HJ, et al. Improvement effects of *agiophyllum oligosaccharides* on general characterization and glucose and lipid metabolism of diabetic GK rats[J]. *Journal of Jilin University (Medicine Edition)*, 2016, 42(6): 1059–1065.] DOI: 10.13481/j.1671-587x.20160604.
- 9 Bao S, Wu YL, Wang X, et al. *Agiophyllum oligosaccharides* ameliorate hepatic injury in type 2 diabetic db/db mice targeting INS-R/IRS-2/PI3K/AKT/PPAR- γ /Glut4 signal pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 257: 112863. DOI: 10.1016/j.jep.2020.112863.
- 10 Bao S, Wang X, Cho SB, et al. *Agiophyllum oligosaccharides* ameliorate diabetic insulin resistance through INS-R/IRS/Glut4-mediated insulin pathway in db/db mice and MIN6 cells[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 656220. DOI: 10.3389/fphar.2021.656220.
- 11 Suriano F, Vieira-Silva S, Falony G, et al. Novel insights into the genetically obese (ob/ob) and diabetic (db/db) mice: two sides of the same coin[J]. *Microbiome*, 2021, 9(1): 147. DOI: 10.1186/s40168-021-01097-8.
- 12 陆源源, 喻嵘, 向琴, 等. 左归降糖清肝方对 MKR 鼠 2 型糖尿病合并非酒精性脂肪性肝损伤的影响[J]. *时珍国医国药*, 2024, 35(7): 1547–1551. [Lu YY, Yu R, Xiang Q, et al. *Zuogui Jiangtang Qinggan* prescription on type 2 diabetes in MKR mice[J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2024, 35(7): 1547–1551.] DOI: 10.3969/j.issn.1008-0805.2024.07.03.
- 13 柳白乙拉, 武绍新, 主编. 中华本草: 蒙药卷[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 236.
- 14 朱亚民, 主编. 内蒙古植物药志: 第 1 卷[M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 2000: 299.
- 15 占布拉道尔吉, 主编. 无误蒙药鉴[M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 1988: 144.
- 16 郁静雯, 杜雨桥, 季旭明, 等. 中医药治疗 2 型糖尿病并发肝损伤相关机制研究进展[J]. *中草药*, 2025, 56(6): 2214–2223. [Yu JW, Du YQ, Ji XM, et al. Research progress on traditional Chinese medicine in treating type 2 diabetes mellitus with liver injury[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2025, 56(6): 2214–2223.] DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.06.032.
- 17 Zhou M, Shao J, Wu CY, et al. Targeting BCAA catabolism to treat

- obesity-associated insulin resistance[J]. *Diabetes*, 2019, 68(9): 1730–1746. DOI: [10.2337/db18-0927](https://doi.org/10.2337/db18-0927).
- 18 柯雅蕾, 罗建沅, 王海英. 支链氨基酸代谢及其与疾病的关系 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2023, 39(1): 24–32. [Ke YL, Luo JY, Wang HY. Branched chain amino acid metabolism and its relationship with diseases[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2023, 39(1): 24–32.] DOI: [10.13865/j.cnki.cjbmb.2022.06.1059](https://doi.org/10.13865/j.cnki.cjbmb.2022.06.1059).
- 19 姜荣生, 张龙, 管其凡, 等. 短链脂肪酸在 2 型糖尿病中的作用研究进展 [J]. *中国全科医学*, 2024, 27(24): 3031–3037. [Jiang RS, Zhang L, Guan QF, et al. Advances in the role of short-chain fatty acids in type 2 diabetes[J]. *Chinese General Practice*, 2024, 27(24): 3031–3037.] DOI: [10.12114/j.issn.1007-9572.2023.0533](https://doi.org/10.12114/j.issn.1007-9572.2023.0533).
- 20 Khan S, Jena G. The role of butyrate, a histone deacetylase inhibitor in diabetes mellitus: experimental evidence for therapeutic intervention[J]. *Epigenomics*, 2015, 7(4): 669–680. DOI: [10.2217/epi.15.20](https://doi.org/10.2217/epi.15.20).
- 21 Abulizi A, Cardone RL, Stark R, et al. Multi-tissue acceleration of the mitochondrial phosphoenolpyruvate cycle improves whole-body metabolic health[J]. *Cell Metab*, 2020, 32(5): 751–766.e11. DOI: [10.1016/j.cmet.2020.10.006](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.10.006).
- 22 张蕾, 李伟伟, 刘树森. 冬虫夏草提取液对肝线粒体氧化磷酸化功能的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2010, 30(21): 3146–3147. [Zhang L, Li WW, Liu SS. Protective effect of *Cordyceps sinensis* extract on oxidative damage of liver mitochondria in diabetic mice[J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2010, 30(21): 3146–3147.] DOI: [10.3969/j.issn.1005-9202.2010.21.049](https://doi.org/10.3969/j.issn.1005-9202.2010.21.049).
- 23 Dewulf JP, Gerin I, Rider MH, et al. The synthesis of branched-chain fatty acids is limited by enzymatic decarboxylation of ethyl- and methylmalonyl-CoA[J]. *Biochem J*, 2019, 476(16): 2427–2447. DOI: [10.1042/BCJ20190500](https://doi.org/10.1042/BCJ20190500).
- 24 Zhang YK, Qu YY, Lin Y, et al. Enoyl-CoA hydratase-1 regulates mTOR signaling and apoptosis by sensing nutrients[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 464. DOI: [10.1038/s41467-017-00489-5](https://doi.org/10.1038/s41467-017-00489-5).
- 25 Li L, Zhang L, Cao Y, et al. NDUFV1 attenuates renal ischemia-reperfusion injury by improving mitochondrial homeostasis[J]. *J Cell Mol Med*, 2023, 27(10): 1341–1352. DOI: [10.1111/jcmm.17735](https://doi.org/10.1111/jcmm.17735).
- 26 颜忠康. 乙酰辅酶 A 酰基转移酶 2 介导脂质代谢作用机理的初步探究 [D]. 合肥: 安徽大学, 2021. DOI: [10.26917/d.cnki.ganhu.2021.00046](https://doi.org/10.26917/d.cnki.ganhu.2021.00046).
- 27 Pan A, Sun XM, Huang FQ, et al. The mitochondrial β -oxidation enzyme HADHA restrains hepatic glucagon response by promoting β -hydroxybutyrate production[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 386. DOI: [10.1038/s41467-022-28044-x](https://doi.org/10.1038/s41467-022-28044-x).
- 28 Burke AC, Huff MW. ATP-citrate lyase: genetics, molecular biology and therapeutic target for dyslipidemia[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2017, 28(2): 193–200. DOI: [10.1097/MOL.0000000000000390](https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000390).

收稿日期: 2025 年 03 月 09 日 修回日期: 2025 年 06 月 14 日
本文编辑: 马琳璐 钟巧妮