

韩敏,易旭,游绍伟.酒精性脂肪肝小鼠肝组织蛋白表达谱检测及白藜芦醇干预作用机制的探讨[J].中国比较医学杂志, 2023, 33(1): 16-25.

Han M, Yi X, You SW. Liver protein expression profile of AFLD mice determined by four-dimensional label-free quantitative proteomics and the therapeutic effect of resveratrol [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(1): 16-25.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.01.003

酒精性脂肪肝小鼠肝组织蛋白表达谱检测 及白藜芦醇干预作用机制的探讨

韩 敏¹, 易 旭^{2*}, 游绍伟²

(1. 贵州中医药大学, 贵阳 550025; 2. 贵州中医药大学第二附属医院, 贵阳 550003)

【摘要】 目的 应用蛋白质组学方法分析酒精性脂肪肝(alcoholic fatty liver disease, AFLD)小鼠肝组织蛋白表达谱变化及白藜芦醇干预影响。**方法** 采用 NIAAA 法制备 C57BL/6J 小鼠 AFLD 模型,连续 9 d 灌胃给予白藜芦醇(400 mg/kg)干预。采用 4D 非标定量蛋白质组方法对各实验组小鼠肝组织中的蛋白质进行鉴定和定量。以同时满足倍数变化 ≥ 1.5 或 ≤ 0.67 ,且 $P < 0.05$ 的条件对正常对照组与 AFLD 组、AFLD 组与白藜芦醇干预组,正常对照组与白藜芦醇等 3 个比较组中显著上调或下调差异表达蛋白进行筛选,然后进行差异表达蛋白的 GO 分类、KEGG 通路富集和蛋白质网络互作分析。**结果** 分别鉴定和定量到 4513、3763 个蛋白质,筛选出 1228 个差异表达蛋白质和 11 个差异共表达蛋白质。与对照组比较($P < 0.05$),AFLD 组分别有 370、324 个蛋白质显著下调和上调,白藜芦醇干预组分别有 40、43 个蛋白质显著上调和下调;与 AFLD 组比较($P < 0.05$),白藜芦醇干预组分别有 224、227 个蛋白质显著上调和下调。1228 个差异表达蛋白质分别涉及 GO 注释的 40 个生物学过程、36 个细胞组成、38 个分子功能和 45 条 KEGG 通路,11 个差异共表达蛋白经 GO、KEGG 及蛋白质网络互作分析,其中 9 个差异共表达蛋白质涉及 9 种分子功能、5 个差异共表达蛋白质涉及 5 条信号通路,4 个差异共表达蛋白质发生了相互作用。**结论** 慢性酒精摄入后小鼠肝组织蛋白表达谱发生了显著变化,硫转移酶家族胞浆 1B 成员 1(sulfotransferase family cytosolic 1B member 1, Sult1b1)、载脂蛋白 A-IV(apolipoprotein A-IV, ApoA4)、甘油-3-磷酸酰基转移酶 3(glycerol-3-phosphate acyltransferase 3, Gpat3)、环氧化物水解酶 1(epoxide hydrolase 1, Ephx1)等 4 种蛋白质表达水平变化与 AFLD 的发生和白藜芦醇的 AFLD 干预作用具有密切关系。

【关键词】 酒精性脂肪肝;白藜芦醇;4D 非标量蛋白质组

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 01-0016-10

Liver protein expression profile of AFLD mice determined by four-dimensional label-free quantitative proteomics and the therapeutic effect of resveratrol

HAN Min¹, YI Xu^{2*}, YOU Shaowei²

(1. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China.

2. the Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550003)

【Abstract】 Objective Proteomics were used to analyze changes in the liver protein expression profile of AFLD mice and the effect of resveratrol treatment. **Methods** The AFLD model of C57BL/6J mice was prepared by NIAAA method, and resveratrol(400 mg/kg)was administered orally for 9 days. Proteins in the liver tissues were quantified by the 4D non-standard quantitative proteomic method. Under conditions of multiple changes ≥ 1.5 or ≤ 0.67 and $P < 0.05$, significantly up- or down-regulated differentially expressed proteins in three comparison groups were screened. GO

【基金项目】 国家自然科学基金(81660752)结余经费(3040-040210081,3054-054210007)。

【作者简介】 韩敏(1996—),女,硕士研究生,研究方向:肝病的发生与防治基础。E-mail: 2523035077@qq.com

【通信作者】 易旭(1976—),女,教授,硕士生导师,博士,研究方向:肝病的发生与防治基础。E-mail: yixu2013@yeah.net

classification, KEGG pathway enrichment, and protein network interaction analysis of differentially expressed proteins were carried out. **Results** Totals of 4513 and 3763 proteins were identified and quantified, respectively, and 1228 differentially expressed proteins and 11 differentially coexpressed proteins were screened. Compared with the control group ($P < 0.05$), 370 and 324 proteins were significantly down- and up-regulated in the AFLD group. Compared with the AFLD group ($P < 0.05$), 224 and 227 proteins were significantly up- and down-regulated, respectively, in the resveratrol treatment group. A total of 1228 differentially expressed proteins were involved in 40 biological processes, 36 cellular components, 38 molecular functions, and 45 KEGG pathways annotated by GO classification. A total of 11 differentially coexpressed proteins were screened and found to be related to 9 molecular functions and 5 signaling pathways, of which 4 differentially coexpressed proteins interacted. **Conclusions** After chronic alcohol intake, the protein expression profile of mouse liver tissue changes significantly. The changes in expression of Sult1b1 (sulfotransferase family cytosolic 1B member 1), Apoa4 (apolipoprotein A-IV), Gpat3 (glycerol-3-phosphate acyltransferase 3), and Ephx1 (epoxide hydrolase 1) were closely related to AFLD occurrence and the therapeutic effect of resveratrol on AFLD.

【Keywords】 alcoholic fatty liver; resveratrol; 4D label-free quantitative proteomics

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

酒精性脂肪肝 (alcoholic fatty liver disease, AFLD) 是酒精性肝病逐渐发展和治疗的关键病理前提^[1-2]。尽管对酒精诱导脂肪肝的病理生理学进行了广泛的研究,但在过去 50 年中,除了禁酒以及对症处理和营养支持外,仍然没有针对性的治疗^[3-4]。白藜芦醇是一种存在于红酒和葡萄的膳食多酚,研究显示在减轻酒精性和非酒精性肝功能障碍、胆汁淤积性肝损伤、化学性肝毒性、肝缺血再灌注等方面具有独特的药理活性^[5-8]。Tang 等^[9]发现白藜芦醇处理减少了油酸和酒精作用后的 HepG2 细胞内脂滴形成。类似地, Tang 等^[10]、Kasdallah-Grissa 等^[11]、Chen 等^[12]和 Ma 等^[13]发现,白藜芦醇除可能通过诱导自噬对酒精性脂肪肝变性具有保护作用外,膳食补充或服用白藜芦醇可降低酒精诱导的大鼠或 C57BL/6J 小鼠肝的氧化应激和凋亡,增加超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GPx) 等抗氧化酶活性,上调肝缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) 蛋白表达,从而减少酒精性肝损伤。白藜芦醇也作为蛋白质去乙酰化酶 SIRT1 的激动剂,可以通过上调肝中 SIRT1-AMPK 信号系统阻止乙醇喂养小鼠酒精性脂肪肝的发生^[14-18]。尽管白藜芦醇的有益作用已在各种酒精性肝病的动物和细胞模型中得到充分证实,但其具体作用分子机制仍不清楚。使用多种蛋白质质谱技术分别在一定程度上揭示了大鼠或小鼠肝组织在摄入不同程度酒精后的蛋白质表达变化^[19-22]。遗憾的是,这些研究结果较零散,且对 AFLD 这一重要酒精性肝病病理初始

阶段的肝蛋白质表达谱变化缺乏了解^[23-24]。因此,本文运用 4D 非标定量蛋白质组学技术检测 AFLD 小鼠肝组织蛋白质表达情况,并由此探索白藜芦醇介导的抗 AFLD 干预作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 9 只, 8~10 周龄, 体重 (22 $\pm$ 2) g, 由北京唯尚立德生物科技有限公司提供 [SCXK (京) 2021-0010]。饲养于贵州医科大学实验动物中心 (北校区) 带有 IVC 系统的饲养房内 [SYXK (黔) 2018-0001], 20~23℃。实验前适应性喂养 1 周, 自由进食 SPF 级鼠饲料和自由饮用灭菌自来水。实验过程严格遵守 3R 原则。动物实验由贵州中医药大学伦理委员会审批 (20210093)。

1.2 主要试剂与仪器

BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (中国碧云天公司, 生产编号: P0011); 胰蛋白酶 (美国 Promega, 生产编号: V5117); 乙腈 (美国 Thermofisher scientific, 生产编号: 204433); 甲酸 (美国 Fluka, 生产编号: A117-50); 二硫苏糖醇 (美国 Sigma, 生产编号: D9163-25G)。除盐柱 (Phenomenex, 货号: 8B-S100-EBJ); NanoElute 液相色谱仪、Tims TOF Pro 飞行时间质谱仪 (美国 bruker)。

1.3 实验方法

1.3.1 药物制备

运用高压灭菌的 30% koliphor HS15 (BASF, 30944788Q0) 制备白藜芦醇 (sigma, R5010) 溶液。

1.3.2 动物分组与处理

小鼠分为对照组(C)、AFLD组(M)及白藜芦醇干预组(R),采用 Lieber-DeCarli 酒精液体饲料自由摄入+1次95%乙醇灌胃的 NIAAA 法制备小鼠 AFLD 模型和给予 400 mg/kg 白藜芦醇灌胃处理,具体方法见以往发表文章^[25]。最后1次用药后24 h 收集肝组织,以备蛋白组学检测分析用。

1.3.3 肝组织总蛋白质制备和胰蛋白酶水解

取适量-80℃保存的肝组织,用液氮研磨成粉末,加入40 μL 体积含8 mol/L 尿素、1%蛋白酶抑制剂、3 μmol/L 去乙酰化酶抑制剂、50 mmol/L 烟酰胺的裂解缓冲液,进行3次高强度超声裂解。4℃,12 000 r/min 离心10 min 后,收集上清液,蛋白质浓度用 BCA 法测定。取等量蛋白质样品和适量标准蛋白质混合物,加入终浓度为20% v/v 的三氯乙酸,充分混合,4℃沉淀2 h。500 r/min 离心5 min 后,使用预冷丙酮洗涤和沉淀样品。在最终浓度为200 mmol/L 的四甲基溴化铵溶液中进行超声分散,然后添加1/50 比例的胰蛋白酶过夜处理,加入最终浓度为5 mmol/L 的二硫苏糖醇,然后在56℃下还原30 min。

1.3.4 液相色谱-质谱联用分析

分别制备含有2%乙腈和0.1%甲酸的液相色谱流动相A溶液和含有100%乙腈和0.1%甲酸的B溶液,然后通过纳米管UHPLC系统分离溶解在流动相A溶液中的肽。将流速设置为300 nL/min,按2%~5% B,0~1 min 进行;5%~27% B,1~76 min;27%~35% B,76~82 min 和35%~85% B,82~86 min。分离的肽经毛细管离子源电离,电压为1.75 kV,然后进行一次和二次(扫描范围为100~1700)串联质谱分析,动态排除时间扫描为30 s。

1.3.5 肝组织蛋白组学的生物信息学分析

(1) 数据库搜索

借助 Maxquant (v1.6.15.0) 进行二级质谱数据检索,在 Mus_musculus_10090_SP_20201214 中有蛋白质序列。FASTA (17 063 序列) 蛋白质数据库构建理论二级光谱数据库,搜索质谱产生的二级光谱,并与理论二级光谱图进行比较,通过算法评分和过滤得到匹配的理论肽序列,完成样品蛋白质的识别,识别出的蛋白质特异性肽可以识别蛋白质信息。

(2) 蛋白质的定量分析及差异表达蛋白的筛选
将肽段在不同样本中的肽信号强度值通过中

心化变化后得到相应的相对定量值,进一步采用中位数归一化方法校正后用于计算蛋白的相对定量值。最后采用皮尔森相关性、主成分分析和相对标准差三种统计分析方法对蛋白质定量结果进行重复性检验,使定量结果具有统计学一致性。以重复定量值的平均值比值作为各蛋白质在 AFLD 组/对照组(M/C)、白藜芦醇组/AFLD 组(R/M)、白藜芦醇组 and 对照组(R/C) 3 个样本比较对中的表达差异倍数,经过 Log2 对数转换后进行 *t* 检验分析,并计算相应的 *P* 值,以此作为显著性指标。以满足 $P < 0.05$ 和差异倍数 ≥ 1.5 或 ≤ 0.67 两个条件进行显著上调或下调的差异表达蛋白筛选,将同时在3个样本比较组中显著差异表达的蛋白视为差异共表达蛋白。

(3) 差异表达蛋白的 GO、KEGG 分析及蛋白质互作网络分析

对每个比较组的差异表达蛋白进行了基因本体论(GO)分类和 KEGG 通路分析。将3个比较组中共表达的差异蛋白进行 GO 功能富集及 KEGG 通路分析,然后将3个比较组中筛选出的差异共表达蛋白的蛋白序列与 STRING (v. 11.0) 蛋白网络互作数据库比对,根据 confidence score > 0.4 提取得到差异蛋白互作关系,并对差异蛋白互作网络进行可视化展示。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件对数据进行统计分析。组间蛋白差异倍数比较采用 Student's *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 白藜芦醇对 AFLD 小鼠肝脂肪变性的影响

经油红“O”染色后镜下观察,发现白藜芦醇干预后 AFLD 小鼠肝细胞脂肪变性显著减轻,具体结果可参见以往发表论文^[24]。

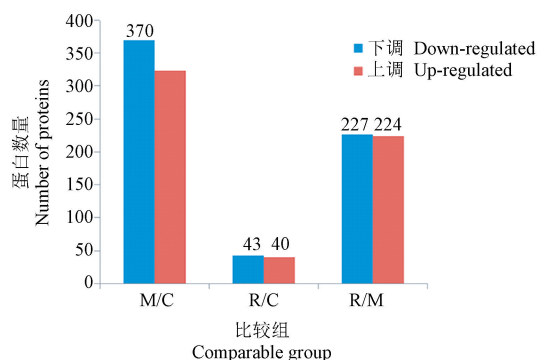
2.2 肝组织蛋白质表达质谱鉴定、定量及差异表达蛋白质筛选结果

各实验组共鉴定出 4513 个蛋白质,其中定量蛋白质有 3763 个。M/C、R/M 和 R/C 3 个样本比较组共筛选出 1228 个显著差异表达蛋白质。与对照组比较($P < 0.05$), AFLD 组、白藜芦醇干预组小鼠肝组织中分别有 324、40 个蛋白表达显著上调和分别有 370、43 个蛋白表达显著下调。与 AFLD 组比较($P < 0.05$),白藜芦醇干预组小鼠肝组织分别有

224、227 个蛋白表达显著上调和下调(如图 1)。白藜芦醇干预后能够将模型组中 198 个显著上调、171 个显著下调表达的蛋白质分别相应地显著下调和上调。运用火山图分析 3 个样本比较组之间蛋白质表达水平的差异(如图 2)。

2.3 差异表达蛋白的功能富集分析结果

1228 个差异表达蛋白的 GO 功能富集分析显示, M/C、R/M 和 R/C 三个比较组对分别涉及 19、10、11 个生物过程、19、9、8 个细胞组成和 14、11、13 个分子功能的变化(如图 3), 此外, 分别有 13、15 和 17 个 KEGG 通路显著富集(如图 4)。

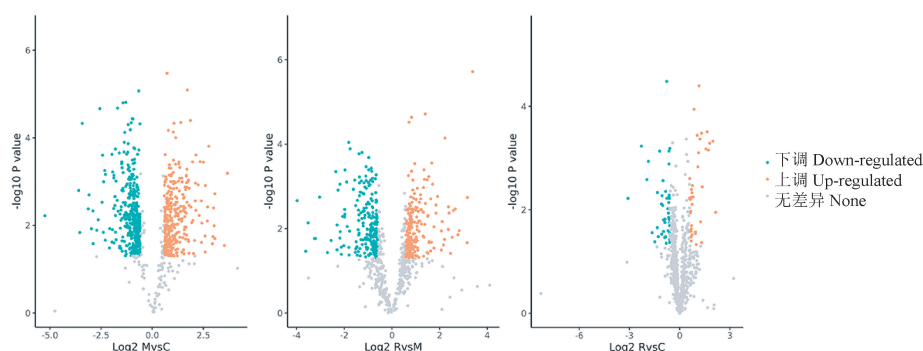


注: M/C: AFLD 组/对照组; R/C: 白藜芦醇组/对照组; R/M: 白藜芦醇组/AFLD 组。蛋白表达相对定量值满足 $P < 0.05$, 差异倍数 ≥ 1.5 或 ≤ 0.67 被分别视为显著上调(红色)或下调(蓝色)。

图 1 三个样本比较组差异表达蛋白质筛选

Note. M/C, AFLD group/control group. R/C, Resveratrol group/control group. R/M, Resveratrol group/AFLD group. The relative quantitative value of protein expression meets the $P < 0.05$, and the difference multiple ≥ 1.5 or ≤ 0.67 is regarded as significantly up-regulated (red) or down-regulated (blue), respectively.

Figure 1 Screening of differentially expressed proteins in three sample comparison groups



注: 图中红色和绿色点分别代表上调、下调的差异表达蛋白。

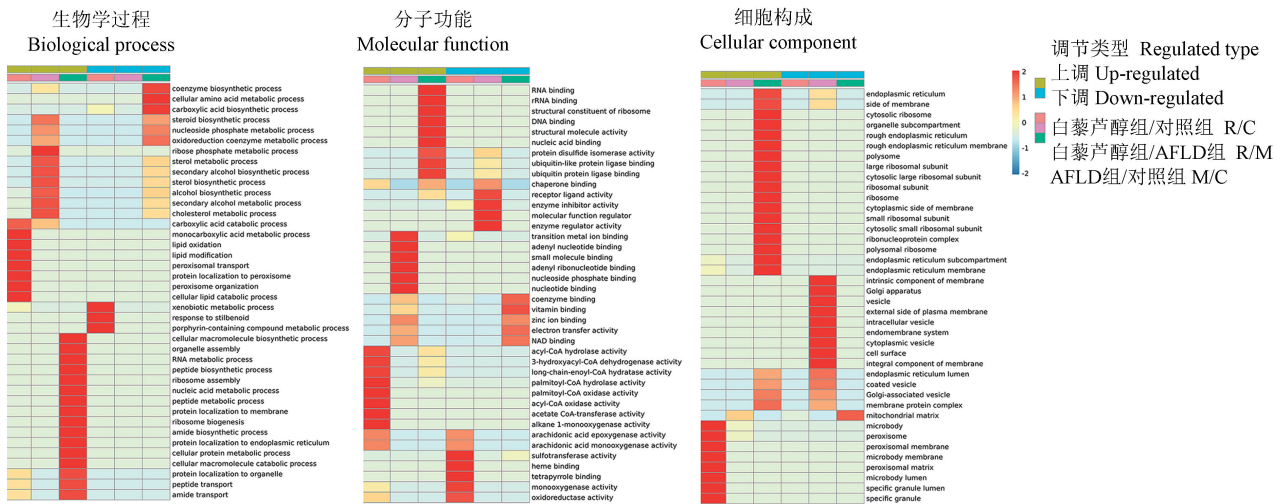
图 2 三个样本比较组差异表达蛋白质的火山图分析

Note. The red and green dots in the figure represent the up-regulated and down-regulated differentially expressed proteins respectively.

Figure 2 Volcanic map analysis of differentially expressed proteins in three sample comparison groups

2.4 差异共表达蛋白筛选及 GO 功能、KEGG 通路分析

在 M/C、R/C、R/M 3 个比较组中筛选出 11 个差异共表达蛋白质, 其中推测水解酶 (putative hydrolase RBBP9, Rbbp9), 白细胞弹性蛋白酶抑制剂 A (leukocyte elastase inhibitor A, Serpinb1a), 蛋氨酸-R-亚砷还原酶 B1 (methionine-R-sulfoxide reductase B1, Msrbl), 硫转移酶家族胞质 1B (sulfotransferase family cytosolic 1B, Sult1b1) 等 4 个蛋白在模型组中显著下调 0.08~0.39 倍, 过氧化物酶体膜蛋白 (peroxisomal membrane protein, Slc25a17), 载脂蛋白 A-IV (apolipoprotein A-IV, ApoA4), UDP-N-乙酰己糖胺焦磷酸化酶样蛋白 1 (UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase-like protein 1, Uap1l1) 内质网金属肽酶 1 (endoplasmic reticulum metalloproteinase 1, Ermp1), 甘油-3-磷酸酰基转移酶 3 (glycerol-3-phosphate acyltransferase 3, Gpat3), 环氧化物水解酶 1 (epoxide hydrolase 1, Ephx1), STIP1 同源性含 U 盒蛋白 1 (STIP1 homology and U box-containing protein 1, Stub1) 等 7 个蛋白显著上调 2.44~6.79 倍, 相应地, 经白藜芦醇干预后能够分别上调 1.6~6.0 倍和下调 0.26~0.63 倍。GO 功能富集分析显示, 除 Rbbp9、Ermp1 2 个蛋白质无分子功能外, 其余 9 个蛋白质涉及 9 种分子功能(如表 1)。此外, KEGG 通路分析显示其中 ApoA4、Uap1l1、Slc25a17、Gpat3、Ephx1 等 5 个蛋白质分别涉及脂肪消化和吸收、过氧化物、异生物质 CYP450 代谢和代谢等 5 条通路(如图 5)。

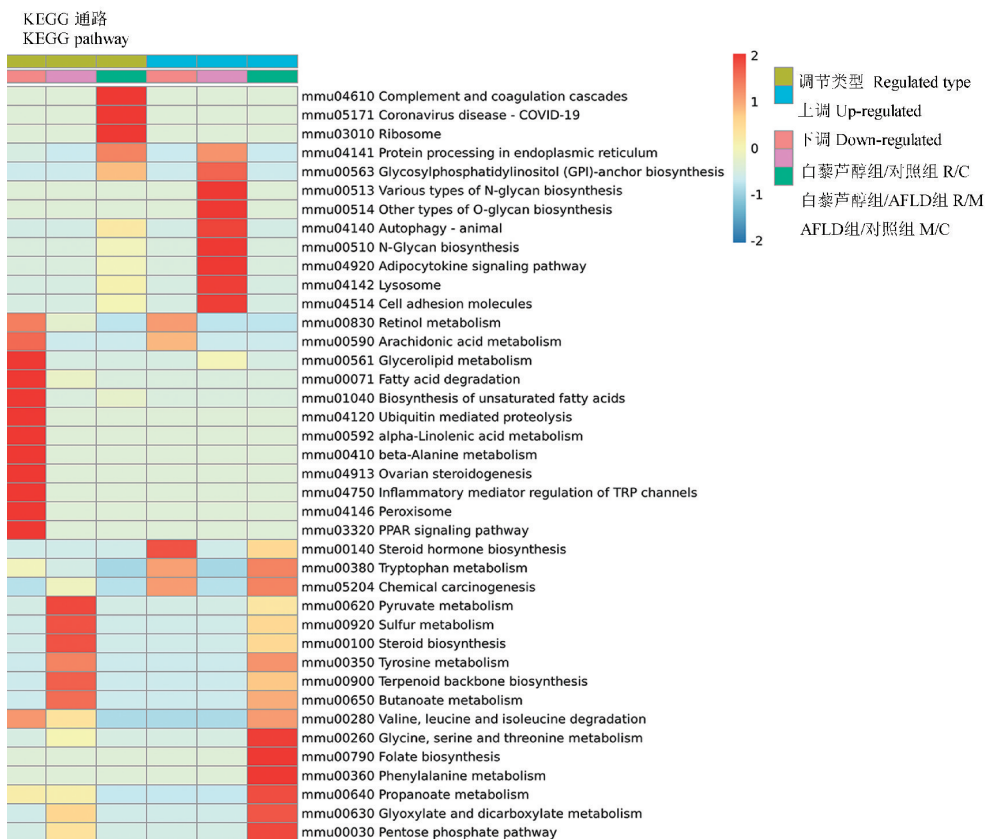


注:图中映射颜色越深且 P 值越小,表示显著性越明显;映射值越大表示蛋白聚集越丰富。

图 3 差异表达蛋白的 GO 分类分析结果

Note. Darker the mapping color in the figure and the smaller the P value, the more obvious the significance is. Higher the aggregation value, the more abundant the mapping protein.

Figure 3 GO classification analysis results of differentially expressed proteins



注:图中映射颜色越深且 P 值越小,表示显著性越明显;映射值越大表示蛋白聚集越丰富。

图 4 差异表达蛋白的 KEGG 富集通路分析结果

Note. Darker the mapping color in the figure and the smaller the P value, the more obvious the significance is. Higher the aggregation value, the more abundant the mapping protein.

Figure 4 Analysis results of KEGG enrichment pathway of differentially expressed proteins

2.5 差异共表达蛋白网络互作分析结果

11 个差异共表达蛋白网络互作分析结果显示, Sult1b1、Apoa4、Agpat9 (Gpat3)、Ephx1 等 4 个蛋白

具有相互作用关系, 其余 7 个蛋白 Rbbp9、Msrbl、Ermp1、Stub1、Slc25a17、Serpina1a、Uap111 无相互作用关系(如图 6)。

表 1 11 个差异共表达蛋白质分子功能及差异倍数

Table 1 Molecular functions and differential fold values of 11 differentially co-expressed proteins															
基因名称 Gene name	分子功能 Molecular function									差异比值 Ratio			P		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	M/C	R/M	R/C	M/C	R/M	R/C
Rbbp9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.39	1.68	0.65	0.000211	0.002696	0.005586
Serpina1a	-	-	-	+	+	-	-	-	-	0.08	6	0.5	0.001592	0.003747	0.008216
Msrbl	+	+	-	-	-	-	-	-	-	0.29	2.17	0.64	0.000971	0.006664	0.007230
Sult1b1	+	-	+	-	-	-	-	-	-	0.21	2.87	0.59	0.000684	0.004905	0.005977
Slc25a17	-	+				+	-	-	-	3.24	0.59	1.92	0.001354	0.021333	0.026815
Apoa4	-	+		+	+	+		+	+	6.79	0.26	1.73	0.000155	0.000410	0.005629
Uap111	+	-	+	-	-	-	-	-	-	3.92	0.4	1.56	0.000354	0.001367	0.011455
Ermp1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.44	0.63	1.54	0.004036	0.026737	0.026245
Gpat3	+		+	-	-	-	-	-	-	3.98	0.53	2.12	0.007723	0.018115	0.001476
Ephx1	+	+	-	-	-	-	+	-	-	3.38	0.54	1.81	0.000985	0.013226	0.000113
Stub1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	5.66	0.30	1.68	0.000357	0.000129	0.030385

注:1:催化活性;2:蛋白结合;3:转移酶活性;4:分子功能调节剂;5:酶调节活性;6:运输活动;7:环氧化物水解酶活性;8:脂质转运体活性;9:抗氧化活性;+:蛋白质具有此分子功能;-:蛋白质无此分子功能。

Note. 1, Catalytic activity. 2, Protein binding. 3, Transferase activity. 4, Molecular function regulator. 5, Enzyme regulatory activity. 6, Transport activity. 7, Epoxide hydrolase activity. 8, Lipid transporter activity. 9, Antioxidant activity. +, Protein has this molecular function. -, Protein doesn't have this molecular function.

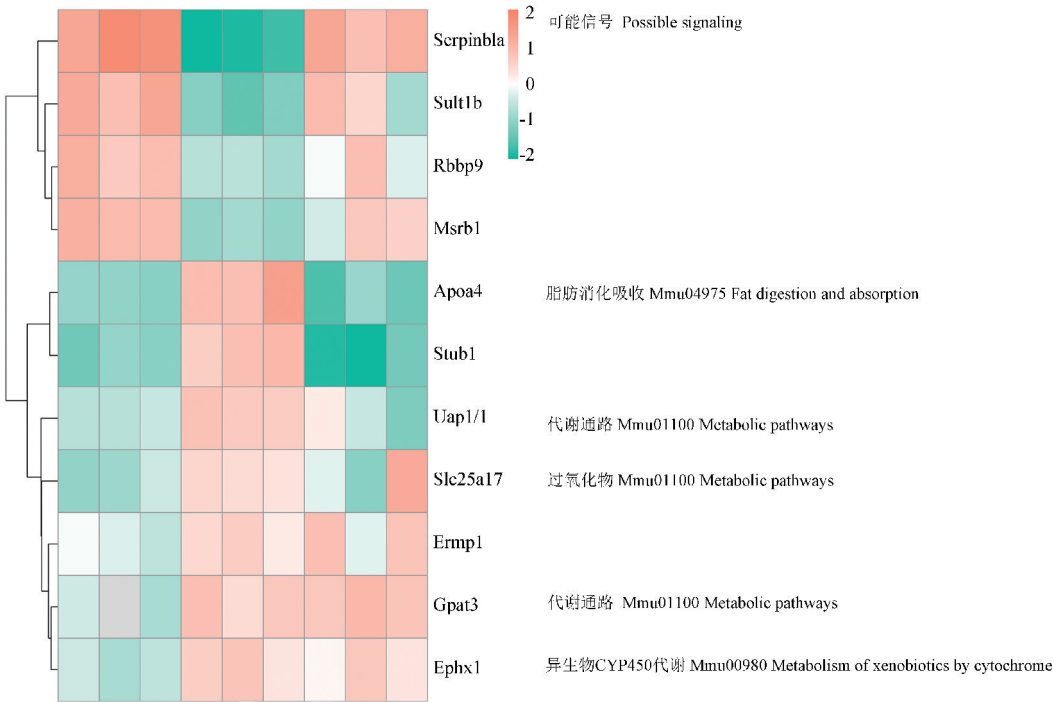
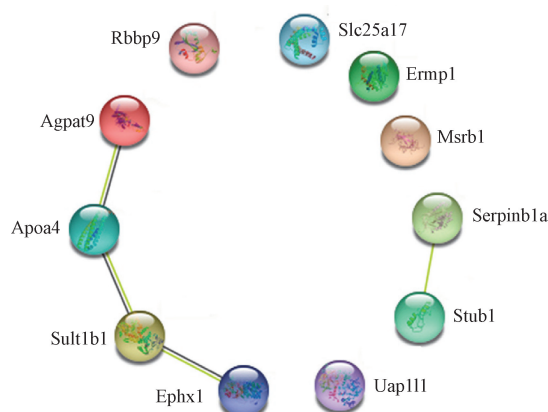


图 5 11 个差异共表达蛋白的 KEGG 通路分析结果

Note. The horizontal axis represents the samples of each group, and the vertical axis represents the expression levels of 11 differential coexpressed proteins. Each color square represents the protein expression level, in which orange represents up-regulation, and the color from dark to light indicates the gradual decrease of protein expression. Green represents down-regulation, and the color from dark to light represents a gradual increase in protein expression.

Figure 5 Analysis results of KEGG enrichment pathway of 11 differentially co-expressed proteins



注:圆圈代表差异表达蛋白,存在双线代表蛋白质之间具有相互关系。

图 6 11 个差异共表达蛋白质的网络互作关系图

Note. Circles represent differentially expressed proteins, and double lines indicate that the two proteins interact.

Figure 6 Network interaction diagram of 11 differentially co-expressed proteins

3 讨论

众所周知,疾病往往伴随着多个层面的蛋白质功能障碍^[26-27]。蛋白质组学技术的进步使筛选与疾病发生、防治相关的蛋白标志物成为可能^[28-30]。因此,全面了解 AFLD 相关信号通路中涉及的蛋白质分子可能会为 AFLD 的发生机制理解以及开发合适的临床治疗或新药的方法提供有价值的见解。Song 等^[31]通过蛋白质组学方法分析了刺梨对高脂血症小鼠肝组织蛋白质表达的影响,发现了 15 种与脂质代谢相关的蛋白质。类似的,Dai 等^[32]通过定量化学蛋白质组学分析发现,从黄芩中提取的黄芩苷激活了肝肉碱棕榈基转移酶 1,从而对代谢性疾病(如肝脂肪变性和肥胖)起到干预作用。Du 等^[33]利用蛋白质定量蛋白质组学发现,赖氨酸丙二酰化可能与 2 型糖尿病治疗密切相关。Liu 等^[34]利用蛋白质翻译后修饰技术发现泛素特异性蛋白酶 14 通过稳定其底物脂肪酸合酶在非酒精性脂肪肝中发挥作用。白藜芦醇作为治疗酒精性肝病研究最广泛、最有前途的膳食多酚^[5-8],其具体作用分子机制仍不清楚。故本文采用更高检测深度的 4D 非标定量蛋白质组学分析技术,从 AFLD 组中获得了 370 个差异表达蛋白质,该结果提示慢性饮酒可导致肝组织蛋白质表达谱的显著变化,也表明这些差异蛋白可能参与了 AFLD 的形成。白藜芦醇干预后能分别将 AFLD 小鼠其中下调表达的蛋白质中的 198 个

上调、将上调表达中的 171 个蛋白实现下调的结果表明,这些蛋白也可能与白藜芦醇的 AFLD 干预作用可能密切相关。因此,慢性酒精摄入后引起肝组织蛋白质表达谱变化的结果为后续探讨药物干预机理和完善 AFLD 发生机制提供了重要的研究方向。进一步的差异表达蛋白质的功能富集分析也表明这些差异表达蛋白质与多种生物学效应有关,能够通过多种途径直接或间接影响小鼠摄入酒精后的肝病理学结局。

有趣的是,运用 PPI 分析,我们从 11 个差异共表达蛋白质中发现了 4 个具有相互作用关系的蛋白质,即环氧化物水解酶 1(Ephx1)、载脂蛋白 A-IV(Apoa4)、甘油-3-磷酸酰基转移酶 3(Gpat3)和硫转移酶家族胞浆 1B 成员(Sult1b1),然而与酒精性肝病关系尚不明确。本文检测结果显示,酒精摄入后小鼠肝组织 Ephx1、Apoa4、Gpat3 的表达水平分别显著上调 3.38、6.79 和 3.98 倍,经白藜芦醇干预后均分别显著下调了 0.54、0.26 和 0.53 倍。相反地,Sult1b1 在酒精摄入后显著下调 0.21 倍,经白藜芦醇干预后显著上调 2.87 倍。GO 分类和 KEGG 通路功能富集分析显示 Ephx1 通过细胞色素 P450 代谢外源性物质途径发挥作用。Ephx1 为在肝中广泛表达的解毒酶和水解酶折叠酶^[35],Gautheron 等^[36]通过小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞的 Ephx1 敲除实验,证明了 Ephx1 敲除促进细胞的氧化应激和衰老。然而也有研究证明 Ephx1 与细胞色素 P450 酶偶联^[37],Davydov 等^[38]使用化学交联质谱法确证了 Ephx1 和细胞色素 P450 2E1 的相互作用关系。微粒体 Ephx1 活性的增加可能通过增加细胞色素 P450 活性加速酒精向其有毒代谢物乙醛的转化^[39]。基于细胞色素 P450 2E1 与 AFLD 发生的密切相关性认知^[40-41],这些结果表明了白藜芦醇可能通过调节 Ephx1 表达水平进而影响细胞色素 P450 活性,从而达到小鼠 AFLD 的保护作用。脂肪生成和分解代谢的不平衡会导致脂肪肝等代谢性疾病^[42]。Apoa4 是主要表达于肠上皮细胞中的交换性载脂蛋白家族成员之一,它在促进肠脂质吸收、调节脂质和葡萄糖代谢中起关键作用^[43-45]。Li 等^[42]发现 Apoa4 缺乏会降低小鼠肝脂肪分解相关限速酶的表达,Apoa4 会促进脂肪分解和能量代谢。此外,肝 Apoa4 蛋白的过度表达在肝纤维化初期和非酒精性脂肪性肝炎相关肝癌中得到证实^[46-47]。Kang 等^[48]使用微阵列分析鉴定了参与肝脂肪代谢

的人亮氨酸拉链蛋白(LZIP)诱导基因,发现 LZIP 和 ApoA4 在人类脂肪变性样品中均高度表达,并促进小鼠肝中的肝脂肪变性。近期 Tryndyak 等^[49]利用饮食诱导的肝细胞脂肪变性体外模型,也证明了 ApoA4 表达的显著上调。一致地,我们的蛋白质组学数据也显示 AFLD 小鼠肝组织 ApoA4 蛋白的上调表达和白藜芦醇干预后的下调表达。提示白藜芦醇可能通过干预 ApoA4 的表达,调节肠道脂肪消化吸收途径参与小鼠 AFLD 的保护作用,不过需要进一步的验证。Gpat3 是甘油-3-磷酸酰基转移酶的一种亚型酶,在脂肪组织中高度表达,有研究证明 Gpat3 的敲低不仅减少甘油三酯的合成,还会损害脂肪的生成^[50]。Gao 等^[51]通过 Seipin/Gpat3 敲除小鼠体内实验,也发现 Gpat3 的缺乏能够缓解严重先天性全身性脂肪营养不良小鼠模型中的胰岛素抵抗和肝脂肪变性。Pagac 等^[52]在运用 3T3-L1 前脂肪细胞,发现敲低 Gpat3 显著增强了脂肪细胞分化,而 Sim 等^[53]通过 Gpat3 过表达 3T3-L1 细胞实验发现增强的 Gpat3 活性将积极调节脂肪细胞分化。Khatun 等^[54]发现 Gpat3 敲除小鼠表现出减弱的血浆甘油三酯偏移和肠细胞中积聚的脂质等结果证明了 Gpat3 是参与肠脂代谢的新型酶,肠道 Gpat3 是脂质吸收的次要途径。因此,研究这个蛋白是否通过脂肪细胞分化、肠道脂质吸收失衡来参与酒精诱导的脂肪肝及作为药物干预作用靶点将会是非常有意义的。综合我们的蛋白质组学定量数据和功能富集分析结果,提示,通过调节 Gpat3 对肝脂质稳态代谢通路的影响也可能是白藜芦醇发挥抗 AFLD 的重要途径。作为 SULT 家族成员之一的 Sult1b1 是小肠中表达并参与人体异源解毒的主要酶,与 SULT1A3/4 一起主要构成组织中硫转移酶蛋白质^[55-56]。Lian 等^[57]近期通过生物信息学分析和 qRT-PCR 鉴定、验证了 Sult1b1 在结直肠癌细胞中表达水平的显著降低,确定了是结直肠癌转移的新型生物标志物。然而 Sult1b1 虽然在药物、环境毒素和内源性类固醇的代谢中起重要作用已经被证实^[58],但是很少有研究显示 Sult1b1 表达或活性在酒精摄入后肝病理条件下的变化。我们研究结果表明了 AFLD 小鼠肝组织中 Sult1b1 的显著表达下调和白藜芦醇干预后的显著上调。GO 功能富集分析结果显示该蛋白涉及催化活性和转移酶活性两种分子功能,提示通过上调 Sult1b1 表达增强其发挥清除外源性物质、加强酒精代谢可能参与白藜芦醇

的小鼠的 AFLD 保护作用,有必要深入了解具体的分子作用机理。

综上所述,我们研究了 AFLD 小鼠肝组织中蛋白质表达谱的变化及其与白藜芦醇干预作用的可能相关性。白藜芦醇至少通过正向或负向调节 Sult1b1、ApoA4、Gpat3、Ephx1 等 4 个蛋白质的表达,发挥调节肠道脂肪消化、细胞色素 P450 代谢外源性物质途径和代谢途径来减轻小鼠肝的酒精性脂肪变性,有望成为新的治疗 AFLD 的靶点,值得进一步探讨。

参考文献:

- [1] Seitz HK, Bataller R, Cortez-Pinto H, et al. Alcoholic liver disease [J]. Nat Rev Dis Primers, 2018, 4(1): 16-38.
- [2] Zeng T, Zhang CL, Zhao N, et al. Impairment of akt activity by CYP2E1 mediated oxidative stress is involved in chronic ethanol-induced fatty liver [J]. Redox Biol, 2018, 14: 295-304.
- [3] Singh S, Osna NA, Kharbanda KK, et al. Treatment options for alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease: a review [J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(36): 6549-6570.
- [4] 丁庆学, 王德学, 张小会. 中医药治疗酒精性脂肪肝的研究进展 [J]. 基层医学论坛, 2017, 21(16): 2124-2126.
- [5] Chan CC, Lee KC, Huang YH, et al. Regulation by resveratrol of the cellular factors mediating liver damage and regeneration after acute toxic liver injury [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2014, 29(3): 603-613.
- [6] Han SY, Choi YJ, Kang MK, et al. Resveratrol suppresses cytokine production linked to fceRI-MAPK activation in ige-antigen complex-exposed basophilic mast cells and mice [J]. Am J Chin Med, 2015, 43(8): 1605-1623.
- [7] Sinha K, Chaudhary G, Gupta YK. Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats [J]. Life Sci, 2002, 71(6): 655-665.
- [8] Chupradit S, Bokov D, Zamanian MY, et al. Hepatoprotective and therapeutic effects of Res-veratrol: a focus on anti-inflammatory and antioxidative activities [J]. Fundam Clin Pharmacol, 2022, 36(3): 468-485.
- [9] Tang LY, Chen Y, Rui BB, et al. Resveratrol ameliorates lipid accumulation in HepG2 cells, associated with down-regulation of lipin1 expression [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2016, 94(2): 185-189.
- [10] Tang L, Yang F, Fang Z, et al. Resveratrol ameliorates alcoholic fatty liver by inducing autophagy [J]. Am J Chin Med, 2016, 44(6): 1207-1220.
- [11] Kasdallah-Grissa A, Mornagui B, Aouani E, et al. Resveratrol a red wine polyphenol attenuates ethanol-induced oxidative stress in rat liver [J]. Life Sci, 2007, 80(11): 1033-1039.
- [12] Chen WM, Shaw LH, Chang PJ, et al. Hepatoprotective effect

- of resveratrol against ethanol-induced oxidative stress through induction of superoxide dismutase *in vivo* and *in vitro* [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11(4): 1231–1238.
- [13] Ma Z, Zhang Y, Li Q, et al. Resveratrol improves alcoholic fatty liver disease by downregulating HIF-1 α expression and mitochondrial ROS production [J]. *PLoS One*, 2017, 12(8): e0183426.
- [14] Peiyuan H, Zhiping H, Chengjun S, et al. Resveratrol ameliorates experimental alcoholic liver disease by modulating oxidative stress [J]. *Evid Based Complement Altern Med*, 2017, 2017(12): 4287890–4287900.
- [15] Luo G, Xiao L, Wang D, et al. Resveratrol protects against ethanol-induced impairment of insulin secretion in INS-1 cells through SIRT1-UCP2 axis [J]. *Toxicol In Vitro*, 2020, 65: 104808–104840.
- [16] Ren R, Wang Z, Wu M, et al. Emerging roles of SIRT1 in alcoholic liver disease [J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(16): 3174–3183.
- [17] Szkudelski T, Szkudelska K. Potential of resveratrol in mitigating metabolic disturbances induced by ethanol [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 101: 579–584.
- [18] Ajmo JM, Liang X, Rogers CQ, et al. Resveratrol alleviates alcoholic fatty liver in mice [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008, 295(4): G833–842.
- [19] 王晓玉, 罗建平, 查学强, 等. 蛋白质组学及代谢组学在酒精性肝病中的应用 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2014, 30(2): 168–173.
- [20] Fernando H, Wiktorowicz JE, Soman KV, et al. Liver proteomics in progressive alcoholic steatosis [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 266(3): 470–480.
- [21] Banerjee A, Russell WK, Jayaraman A, et al. Identification of proteins to predict the molecular basis for the observed gender susceptibility in a rat model of alcoholic steatohepatitis by 2-D gel proteomics [J]. *Proteomics*, 2008, 8(20): 4327–4337.
- [22] Klouckova I, Hrnčirova P, Mechref Y, et al. Changes in liver protein abundance in inbred alcohol-preferring rats due to chronic alcohol exposure as measured through a proteomics approach [J]. *Proteomics*, 2006, 6(10): 3060–3074.
- [23] Swart PC, Russell VA, Vlok NM, et al. Early-Ethanol exposure induced region-specific changes in metabolic proteins in the rat brain: a proteomics study [J]. *J Mol Neurosci*, 2018, 65(3): 277–288.
- [24] 易旭, 王硕石, 郝杰, 等. 酒精性脂肪肝小鼠肝脏 LXR α -SREBP-1c 信号表达检测及葛花解酒汤脂汤干预作用 [J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(7): 13–16, 261.
- [25] 易旭, 游绍伟, 龙毅, 等. 自拟葛花解酒汤脂汤对酒精性脂肪肝小鼠肝脏脂肪沉积及 PXR 表达的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27(3): 36–42.
- [26] Li X, Wang W, Chen J. Recent progress in mass spectrometry proteomics for biomedical research [J]. *Sci Chin Life Sci*, 2017, 60(10): 1093–1113.
- [27] Liu S, Li Z, Yu B, et al. Recent advances on protein separation and purification methods [J]. *Adv Colloid Interface Sci*, 2020, 284: 102254–102286.
- [28] Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics [J]. *Nature*, 2003, 422(6928): 198–207.
- [29] Niu L, Thiele M, Geyer PE, et al. A paired Liver biopsy and plasma proteomics study reveals circulating biomarkers for alcohol-related Liver disease [EB/OL]. [2020-01-01]. <https://doi.org/10.1101/2020.10.16.337592>.
- [30] 朱明雪, 匡海学, 兰辛键, 等. ITRAO 法分析增龄雌性小鼠肝蛋白组学变化 [J]. *中国实验动物学报*, 2021, 29(2): 168–175.
- [31] Song P, Shen X. Proteomic analysis of liver in diet-induced Hyperlipidemic mice under Fructus Rosa roxburghii action [J]. *J Proteomics*, 2021, 230: 103982–103994.
- [32] Dai J, Liang K, Zhao S, et al. Chemoproteomics reveals baicalin activates hepatic CPT1 to ameliorate diet-induced obesity and hepatic steatosis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(26): E5896–E5905.
- [33] Du Y, Cai T, Li T, et al. Lysine malonylation is elevated in type 2 diabetic mouse models and enriched in metabolic associated proteins [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2015, 14(1): 227–236.
- [34] Liu B, Jiang S, Li M, et al. Proteome-wide analysis of USP14 substrates revealed its role in hepatosteatosis via stabilization of FASN [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 4770–4782.
- [35] Václavíková R, Hughes DJ, Soucek P. Microsomal epoxide hydrolase 1 (EPHX1): Gene structure function and role in human disease [J]. *Gene*, 2015, 571(1): 1–8.
- [36] Gautheron J, Morisseau C, Chung WK, et al. EPHX1 mutations cause a lipotrophic diabetes syndrome due to impaired epoxide hydrolysis and increased cellular senescence [J]. *eLife*, 2021, 10: e68445–e68475.
- [37] Guengerich FP, Davidson NK. Interaction of epoxide hydrolase with itself and other microsomal proteins [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1982, 215(2): 462–477.
- [38] Davydov DR, Dangi B, Yue G, et al. Exploring the interactome of cytochrome P450 2E1 in human liver microsomes with chemical crosslinking mass spectrometry [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(2): 185–200.
- [39] Wong NA, Rae F, Bathgate A, et al. Polymorphisms of the gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to alcoholic liver disease and hepatocellular carcinoma in a Caucasian population [J]. *Toxicol Lett*, 2000, 115(1): 17–22.
- [40] 庞硕, 吕丹, 张连峰. 二烯丙基硫醚通过靶向抑制 CYP2E1 对相关疾病治疗的潜在作用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(8): 117–121.
- [41] Li BY, Mao QQ, Gan RY, et al. Protective effects of tea extracts against alcoholic fatty liver disease in mice via modulating cytochrome P450 2E1 expression and ameliorating oxidative damage [J]. *Food Sci Nutr*, 2021, 9(10): 5626–5640.
- [42] Li XM, Liu XH, Cheng C, et al. 1822-P: Regulation of trafficking of lipids from liver to fat by apoA4 in a mouse model of nonalcoholic steatohepatitis [EB/OL]. [2020-01-01].

- <https://doi.org/10.2337/db20-1822-P>.
- [43] Wu CL, Zhao SP, Yu BL. Intracellular role of exchangeable apolipoproteins in energy homeostasis, obesity and non-alcoholic fatty liver disease [J]. Biol Rev Camb Philos Soc, 2015, 90(2): 367-376.
- [44] Simon T, Cook VR, Rao A, et al. Impact of murine intestinal apolipoprotein A-IV expression on regional lipid absorption gene expression and growth [J]. J Lipid Res, 2011, 52(11): 1984-1994.
- [45] Qu J, Fourman S, Fitzgerald M, et al. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) is a novel receptor for apolipoprotein A4 (APOA4) in adipose tissue [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 13289-13293.
- [46] Wang PW, Hung YC, Wu TH, et al. Proteome-based identification of apolipoprotein A-IV as an early diagnostic biomarker in liver fibrosis [J]. Oncotarget, 2017, 8(51): 88951-88964.
- [47] Dechassa ML, Tryndyak V, Conti AD, et al. Identification of chromatin-accessible domains in non-alcoholic steatohepatitis-derived hepatocellular carcinoma [J]. Mol Carcinog, 2018, 57(8): 978-987.
- [48] Kang M, Kim J, An HT, et al. Human leucine zipper protein promotes hepatic steatosis via induction of apolipoprotein A-IV [J]. FASEB J, 2017, 31(6): 2548-2561.
- [49] Tryndyak VP, Willett RA, Avigan MI, et al. Non-Alcoholic fatty liver disease-associated DNA methylation and gene expression alterations in the livers of collaborative cross mice fed an obesogenic high-fat and high-sucrose diet [J]. Epigenetics, 2022, 17(11): 1-15.
- [50] Shan D, Li JL, Wu L, et al. GPAT3 and GPAT4 are regulated by insulin-stimulated phosphorylation and play distinct roles in adipogenesis [J]. J Lipid Res, 2010, 51(7): 1971-1981.
- [51] Gao M, Liu L, Wang X, et al. GPAT3 deficiency alleviates insulin resistance and hepatic steatosis in a mouse model of severe congenital generalized lipodystrophy [J]. Human Mol Genet, 2020, 29(3): 432-443.
- [52] Pagac M, Cooper DE, Qi Y, et al. SEIPIN regulates lipid droplet expansion and adipocyte development by modulating the activity of glycerol-3-phosphate acyltransferase [J]. Cell Rep, 2016, 17(6): 1546-1559.
- [53] Sim MFM, Persiani E, Talukder MMU, et al. Oligomers of the lipodystrophy protein seipin may co-ordinate GPAT3 and AGPAT2 enzymes to facilitate adipocyte differentiation [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 3259-3273.
- [54] Khatun I, Clark RW, Vera NB, et al. Characterization of a novel intestinal glycerol-3-phosphate acyltransferase pathway and its role in lipid homeostasis [J]. J Biol Chem, 2016, 291(6): 2602-2615.
- [55] Riches Z, Stanley EL, Bloomer JC, et al. Quantitative evaluation of the expression and activity of five major sulfotransferases (sults) in human tissues: the sult "pie" [J]. Drug Metab Dispos, 2009, 37(11): 2255-2261.
- [56] Coughtrie MWH. Function and organization of the human cytosolic sulfotransferase (sult) family [J]. Chem Biol Interact, 2016, 259: 2-7.
- [57] Lian W, Jin H, Cao J, et al. Identification of novel biomarkers affecting the metastasis of colorectal cancer through bioinformatics analysis and validation through qRT-PCR [J]. Cancer Cell Int, 2020, 20: 105-117.
- [58] Xie Y, Xie W. The Role of sulfotransferases in liver diseases [J]. Drug Metab Dispos, 2020, 48(9): 742-749.

[收稿日期] 2022-04-08