

基于蛋白质组学探究三七总皂苷对2型糖尿病小鼠肝脏的保护作用

刘文虎¹, 张金花¹, 吴敏¹, 谢楠¹, 王爽¹, 常晋霞^{2*}, 张帆^{1*}

(1. 川北医学院, 药学院, 四川南充 637100; 2. 川北医学院, 基础医学与法医学院, 四川南充 637100)

摘要: 肝脏是机体糖脂代谢的主要器官, 持续性高血糖是导致肝损伤的常见原因。三七总皂苷 (*Panax notoginsenosides*, PNS) 是三七中的主要活性成分, 具有抗炎、抗氧化等作用。本研究拟采用定量蛋白质组学结合实验验证探究 PNS 对 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 小鼠肝损伤的保护作用及其潜在机制。所有动物实验经川北医学院实验动物伦理委员会批准 (批准号: NSMC2022023)。采用苏木精-伊红染色 (hematoxylin-eosin staining, H&E) 和透射电镜分析 PNS 对 T2DM 小鼠肝脏结构及形态的影响; 通过脱氧核苷酸末端转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记 (TdT-mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL) 染色分析 PNS 对 T2DM 小鼠肝细胞凋亡的影响; 采用活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 和丙二醛 (malonaldehyde, MDA) 试剂盒探究 PNS 对 T2DM 小鼠肝脏氧化损伤的影响作用。基于定量蛋白质组学探究 T2DM 和 T2DM+PNS 组小鼠肝脏蛋白质表达谱变化。利用倍数变化及显著性水平分析 T2DM 和 T2DM+PNS 组间差异表达蛋白; 采用 GeneAnalytics 数据库通路富集分析; 使用 Metascape 数据库基因本体分析; 基于 STRING 数据库构建蛋白-蛋白互作网络; 采用 Western blot 检测蛋白表达水平。结果表明, PNS 能够改善 T2DM 小鼠肝脏结构, 抑制肝细胞凋亡, 改善线粒体和内质网形态。蛋白质组数据显示, 489 种基因在 T2DM 小鼠肝脏中表达显著改变, PNS 治疗后 42 种基因表达改变且向正常组转归。通路富集表明, T2DM 组固醇激素生物合成、AMP 依赖蛋白激酶 (adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, AMPK) 通路、氧化压力、胰岛素信号、磷脂酰肌醇通路、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 介导的炎症、胰岛素抵抗及 mTOR 信号异常改变, PNS 能够激活 AMPK、TNF- α 、凋亡及胰岛素通路。Western blot 表明, PNS 抑制 Bax、Grp78 和 Chop 的表达, 降低 cleaved casp6/casp6 比值, 增加 pAMPK α 、HO-1 和核内 Nrf2 的表达, 提示 PNS 可能通过激活 AMPK/Nrf2/HO-1 信号通路减轻氧化应激和内质网应激, 抑制细胞凋亡进而发挥对糖尿病小鼠的肝脏保护作用。

关键词: 三七总皂苷; 降糖作用; AMPK/Nrf2/HO-1 信号通路; 氧化应激; 内质网应激; 保肝作用

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)08-2255-10

Proteomics study the protective effects of *Panax notoginsenosides* on liver in mice with type 2 diabetes mellitus

LIU Wen-hu¹, ZHANG Jin-hua¹, WU Min¹, XIE Nan¹, WANG Shuang¹,
CHANG Jin-xia^{2*}, ZHANG Fan^{1*}

(1. Department of Pharmacy, North Sichuan Medical College, Nanchong 637100, China; 2. School of Basic Medical Sciences & Forensic Medical, North Sichuan Medical College, Nanchong 637100, China)

Abstract: Liver is the main organ of glucose and lipid metabolism, and persistent hyperglycemia is a common cause of liver injury. *Panax notoginsenosides* (PNS) is the main active ingredient in *Panax notoginseng*, which have anti-inflammatory and antioxidant effects. In this study, quantitative proteomics combined with experimental

收稿日期: 2024-02-02; 修回日期: 2024-03-20.

基金项目: 国家大学生创新创业项目 (202310634010); 四川省应用基础科研项目 (2019YJ0378); 川北医学院重点发展项目 (CBY22-ZDA01); 南充市校企合作专项 (18SXHZ0402, 20SXFWD0004).

*通讯作者 E-mail: jinxiachang@163.com; zhangfan596@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0109

verification was used to explore the protective effect of PNS on liver injury in type 2 diabetes mellitus (T2DM) mice and its potential mechanism. All experiments were approved by the Ethical Committee Experimental Animal Center of North Sichuan Medical College (NSMC2022023). Hematoxylin-eosin (H&E) staining and transmission electron microscopy were used to observe the effect of PNS on the histopathological changes of liver in T2DM mice. TdT-mediated dUTP Nick-end labeling (TUNEL) staining was used to analyze the effect of PNS on hepatocyte apoptosis in T2DM mice. Reactive oxygen species (ROS) and malonaldehyde (MDA) kits were used to detect the effect of PNS on oxidative damage of liver in T2DM mice. Subsequently, proteomics profiling of mice in T2DM and T2DM+PNS groups were investigated based on quantitative proteomics. Differentially expressed proteins were screened out according to fold change and significance level in T2DM and T2DM+PNS groups, respectively. Pathway enrichment analysis of these differential proteins was done using GeneAnalytics database. Gene ontology analysis was conducted by Metascape database. Protein-protein interaction networks were constructed based on STRING database. Western blot was used to detect protein expression. These results showed that PNS could improve liver abnormalities, inhibit hepatocyte apoptosis, and improve the morphology of mitochondria and endoplasmic reticulum in T2DM mice. Proteome data demonstrated that 489 genes expression changed significantly in liver of T2DM mice compared with normal, and 42 ones were significantly reversed after PNS treatment and returned to normal levels. Pathway analysis showed that sterol hormone biosynthesis, adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway, oxidative stress, insulin signaling, phosphatidylinositol pathway, tumor necrosis factor- α (TNF- α) mediated inflammation, insulin resistance, and mTOR signaling pathway exhibited notable changes based on pathway enrichment ratio and significance level. It is worth noting that PNS could improve the abnormal changes of AMPK, TNF- α , apoptosis and insulin pathways. Western blot manifested that PNS inhibit the expression of Bax, Grp78 and Chop, reduce ratio of cleaved casp6/casp6, increase the levels of pAMPK α , HO-1 and Nu-Nrf2 in the liver of T2DM mice. These results suggested that PNS may play protective roles in the liver of T2DM mice by inhibiting apoptosis *via* activating AMPK/Nrf2/HO-1 signaling pathway, alleviating oxidative stress and endoplasmic reticulum stress.

Key words: *Panax* notoginsenosides; hypoglycemic effect; AMPK/Nrf2/HO-1 signaling pathway; oxidative stress; endoplasmic reticulum stress; hepatoprotective effect

2型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 是以高血糖、胰岛素缺乏及胰岛素抵抗为主要特征的慢性代谢性疾病。根据国际糖尿病联盟 (international diabetes federation, IDF) 数据, 目前全世界约有 5.37 亿糖尿病, 占世界总人口的 10.5%, 其中 90% 以上为 T2DM^[1]。T2DM 已成为当前威胁人类健康的重大公共健康问题之一。

三七 [*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen] 为五加科人参属名贵中药材, 其根茎、叶、花均可入药, 皂苷是三七中的主要活性成分, 在调节机体微循环障碍、抗氧化、抗衰老、抗炎、降血脂及免疫调节等方面具有重要作用^[2-4]。三七总皂苷 (*Panax notoginsenosides*, PNS) 是三七皂苷的药效组分和血塞通的主要成分, 具有活血祛瘀、通脉活络、抑制血小板聚集等作用。研究显示, PNS 可通过内质网应激调控细胞凋亡和炎症, 用于控制小鼠饮食性肥胖^[5]; PNS 眼部给药可抑制核因子 κ B (NF- κ B) 信号通路, 有效降低炎症反应, 对大鼠糖尿病视网膜病变具有改善作用^[6]。然而, 关于 PNS 在血糖调控方面的相关研究较少。作者^[7]曾从代谢层面探究了 PNS 对 T2DM 小鼠的降糖作用, 其机制与抑制 NF- κ B 信号通路, 调节花生四烯酸和亚油酸代谢, 降低炎症因

子水平有关, 研究还显示, PNS 对 T2DM 小鼠肝脏具有保护作用, 然而相关机制尚不明确。

本研究以前期研究为基础, 依托已建立的 T2DM 小鼠模型, 基于定量蛋白质组学结合实验验证探究 PNS 对 T2DM 小鼠的肝脏保护作用及其潜在机制, 旨在为 PNS 的开发利用提供理论依据和参考。

材料与方法

实验动物 40 只 5~6 周龄雄性 SPF 级 C57BL/6J 小鼠 (16~20g), 购于北京维通利华实验动物有限公司 [合格证号: SCXK (京) 2021-0006], 饲养于川北医学院实验动物中心, 环境温度 20~25 °C, 相对湿度 50%~60%, 昼夜周期为 12 h。动物实验操作符合 2011 年修订版《实验动物管理条例》之规定, 并通过川北医学院伦理委员会审查批准 (NSMC2022023)。

试药与主要仪器 三七总皂苷 (含量 \geq 90%, 批号 DST200706-054) 购于成都德思特生物技术有限公司, 链脲佐菌素 (STZ, USP 级) 购于源叶生物科技。Bax (60267-1-Ig)、Casp6 (67825-1-Ig)、AMPK α (66536-1-Ig)、Nrf2 (16396-1-AP)、HO-1 (10701-1-AP)、Grp78 (11587-1-

AP)、Chop (15204-1-AP)、 β -actin (81115-1-RR)、Tubulin (10068-1-AP) 抗体购于 Proteintech 公司; pAMPK α (50081S) 购于 Cell Signaling Technology; 二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT)、碘乙酰胺 (iodoacetamide, IAA) 购于 Thermo Fisher Scientific; Bradford 蛋白浓度检测试剂盒 (P0006) 和超敏 ECL 化学发光试剂盒 (P0018S) 购于碧云天生物科技, 组织活性氧检测试剂盒 (reactive oxygen species, ROS, BB-470532) 购于上海贝博生物科技有限公司, 丙二醛检测试剂盒 (malondialdehyde, MDA, S0131S) 购于碧云天生物科技, 脱氧核苷酸末端转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记 (TdT-mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL) 凋亡检测试剂盒 (E-CK-A322) 购于 Elabscience 生物科技, 其他试剂均为色谱纯或分析纯。

Easy-nLC 1200 高效液相色谱 (Thermo Fisher Scientific, USA) 搭载 C18 反相色谱柱 [预分离柱: 3 μ m, 2 cm \times 75 μ m, 孔径 120 \AA (自制)]; 分析柱: 1.9 μ m, 25 cm \times 75 μ m, 孔径 120 \AA (自制)。Orbitrap Fusion Lumos 质谱仪 (Thermo Fisher Scientific, 美国), HT7800 透射电子显微镜 (日立高新技术公司), H1650R 型高速冷冻离心机 (湘仪)、CEBO-24 型多样品组织研磨仪 (上海测博生物科技)、SCIENTZ08-II 型超声破碎仪 (宁波新芝)、MC-3 型真空离心浓缩仪 (吉艾姆); 电泳及电转系统 (美国 Bio-Rad 公司), 多功能酶标仪 (美国 Bio Tek 公司)。

T2DM 小鼠模型构建及给药 T2DM 小鼠建立方法详见课题组之前的报道^[7]。40 只 C57BL/6J 小鼠随机分为正常组和高脂组 (high fat diet, HFD), 正常组和高脂组分别用普通饲料和 60% 脂肪供能纯化型饲料喂养, 12 周后小鼠禁食 10 h, 正常组按 0.01 mL \cdot g⁻¹ 腹腔注射柠檬酸缓冲液, HFD 组按 40 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹ 腹腔注射 STZ, 连续 5 天, 末次给药 1 周后, 禁食 12 h, 尾尖采血检测空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG), 高脂组 FBG \geq 11.1 mmol \cdot L⁻¹ 视为 T2DM 模型成功, 将造模成功的小鼠用于实验。

三七总皂苷组给药方法参见文献^[7]。依据临床三七总皂苷注射剂血栓通单日剂量 150 mg 确定小鼠静脉注射的临床等效剂量为 20 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹。按照口服生物利用度为 10% 确定小鼠灌胃的临床等效剂量为 200 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹。本实验 PNS 用生理盐水溶解后按照 200 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹ (临床等效剂量) 和 300 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹ (1.5 倍临床等效剂量) 灌胃。正常组和模型组给予等量生理盐水, 每组 8 只, 剂量为 0.01 mL \cdot g⁻¹, 每天 1 次, 持续 6 周。前期研究显示, 300 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹ 的 PNS 对 T2DM 小鼠具有降糖作用, 而 200 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹ 的 PNS 降糖效果不佳^[7]。因此, 本研究仅针对 300 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹ 剂量的 PNS 对 T2DM

小鼠的肝脏保护作用进行探究。

样本收集及处理 小鼠经腹腔注射 1% 戊巴比妥钠溶液麻醉, 左心室灌注, 取肝脏组织, PBS 清洗, 部分肝组织置于 4% 多聚甲醛固定、梯度脱水、石蜡包埋, 切片备用; 部分组织经液氮速冻后转移至 -80 $^{\circ}$ C 冰箱, 备用。

苏木精-伊红 (H&E) 染色 小鼠肝脏石蜡切片经二甲苯脱蜡, 置于梯度乙醇溶液中水化, 苏木素、0.5% 伊红染色, 二甲苯脱水, 中性树胶封片, 光镜下拍片观察肝脏组织形态。

TUNEL 染色 小鼠肝脏石蜡切片脱蜡水化, PBS 漂洗 3 次, 每个样本滴加 100 μ L 蛋白酶 K 工作液, 37 $^{\circ}$ C 反应 20 min, 样本浸入 PBS 漂洗 3 次。按照试剂盒使用方法标记染色, 用含抗荧光淬灭剂的封片剂封片, 拍照。

透射电镜 将肝组织置于 5 mL 戊二醛中, 4 $^{\circ}$ C 过夜。PBS 漂洗, 1% 锇酸固定 2 h, PBS 漂洗。依次放入浓度为 50%、70%、80%、90%、100% 的乙醇中脱水, 最后用丙酮脱水。用 Epon812 包埋剂与丙酮按等比混合液浸泡 1 h, 包埋剂浸泡过夜。37 $^{\circ}$ C 处理 12 h, 60 $^{\circ}$ C 处理 24 h。切成 60~80 nm 切片, 200 目铜网捞片, 醋酸铀和枸橼酸铅染色, 室温干燥, 拍片。

ROS 和 MDA 浓度检测 肝脏经匀浆裂解后测定蛋白浓度, 再根据活性氧和丙二醛试剂盒测定各组中 ROS 水平及 MDA 的含量。

小鼠肝脏蛋白质组样本的制备与肽段分离 蛋白质组样本的制备参照文献^[8,9]。约 30 μ g 肝脏中加入 1 mL 蛋白提取混合液, 剪碎、匀浆、裂解, 离心, Bradford 法测蛋白浓度。蛋白还原烷基化、FASP 酶解, 减压浓缩, 得肽段。

肽段经 Water 2695 型 HPLC 液相分离, 流动相 A 为水, B 为乙腈, 洗脱梯度为: 0~34 min, 0~98% B; 35~40 min, 98% B, 流速 0.5 mL \cdot min⁻¹, 按 1 min 每管收集肽段洗脱液, 按课题组已报道的方法合并洗脱液^[10,11], 得混合肽段组分, 质谱检测。

色谱及质谱 肽段经 0.1% 甲酸溶解后采用 Easy-nLC 2000 nano 高效液相色谱仪分离, 流动相 A 为 0.1% 甲酸-水溶液, 流动相 B 为 0.1% 甲酸-乙腈体系, 梯度洗脱如下: 0~5 min, 0~5% B; 6~90 min, 6%~35% B; 91~110 min, 36%~98% B; 111~120 min, 2% B; 流速为 200 nL \cdot min⁻¹。

Orbitrap Fusion Lumos 型质谱仪, 喷雾电压 2.2 kV, 毛细管温度 320 $^{\circ}$ C。采用数据依赖采集模式 (data dependent acquisition, DDA) 采集数据, 一级谱图采用 Orbitrap 全扫, 质荷比 (m/z) 范围为 350~1 550, 分辨率

为 120 000, 自动增益控制 (automatic gain control, AGC) 为 5e5, 最大注入时间为 50 ms; 二级质谱通过 32% 的高能碰撞解离对母离子碎裂, 分辨率 15 000, AGC 为 5e4, 最大注入时间为 22 ms。

蛋白质鉴定、定量及差异表达蛋白质的筛选 利用 Proteome Discoverer 软件 (v.2.2) 检索 UniProt 数据库 (<http://www.uniprot.org/>) 中的鼠源蛋白质序列, 参数设置为: 肽段置信度高, 酶解最大漏切蛋白位点数为 2, 肽检测长度为 6~144 个氨基酸, 母离子质量偏差为 20 ppm, 子离子质量偏差为 0.05 Da, 半胱氨酸末端脲甲基化为固定修饰, 蛋氨酸 *N*-乙酰化及氧化为动态修饰, 肽段水平错误发现率小于 1%。

数据采集后, 根据峰面积进行归一化定量分析, 方法为每个变量的峰面积除以样本中所有变量峰面积之和, 为方便展示, 将所有变量归一化后的相对峰面积扩大 10^5 倍。肽段筛选设置为: 每个蛋白被检测的 unique peptide ≥ 1 。采用差异倍数 (fold change, FC) 及显著性水平 (*P*) 进行差异蛋白质筛选, 若某蛋白的相对定量值在两组样本中的均值之比 (FC) ≥ 1.5 或 ≤ 0.67 , 且满足 $P < 0.05$, 认为该蛋白在两组样本中的表达具有显著性差异。

生物信息学分析 利用 Metascape 数据库 (<https://metascape.org/gp/index.html>) 对差异表达蛋白质进行基因本体学分析。利用 GeneCard (<http://www.gene-cards.org/>) 和 STRING (<http://www.string-db.org/>) 数据库进行通路富集及网络互作分析, 采用 GraphPad Prism 8.0.1 及 BioLadder 网站 (<https://www.biolladder.cn/web/#/pro/index>) 对数据进行可视化展示。

统计学分析 使用 SPSS 26.0 软件统计学分析, 数据用均数 \pm 标准误 ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) 表示。多组间比较用单因素方差分析, 方差齐性且符合正态分布采用最小显著性差异法, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结果

1 三七总皂苷对 T2DM 小鼠肝脏病理组织的影响

H&E 染色显示, 正常组小鼠肝脏结构清晰, 肝细胞形态完整、细胞排列有序且呈放射性分布, 无明显炎症细胞浸润和空泡现象 (图 1A)。T2DM 组小鼠肝脏结构紊乱, 肝细胞排列疏松, 胞浆内有弥漫性和大小不等空泡, 可见空泡融合挤压细胞核, 以及炎症细胞浸润伴有点状坏死。与 T2DM 组相比, T2DM+PNS 组小鼠肝脏结构形态明显改善, 肝细胞排列较为整齐, 胞浆内空泡数量及炎症细胞浸润减少 (图 1A)。

电镜结果显示, 正常组小鼠肝脏内质网丰富且排列有序, 线粒体结构完整, 线粒体膜清晰, 线粒体脊可

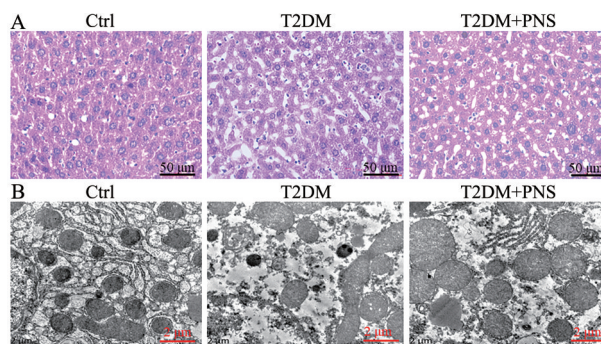


Figure 1 The images of mouse liver tissues observed by H&E staining (A) and transmission electron microscope (B) in Ctrl, T2DM and T2DM+PNS groups. Ctrl: Control; T2DM: Type 2 diabetes mellitus; PNS: *Panax notoginsenoside*; H&E: Hematoxylin-eosin

见 (图 1B)。T2DM 组小鼠肝脏内质网结构紊乱, 线粒体肿胀, 线粒体内外膜模糊, 细胞间有大量水肿。经 PNS 治疗后 T2DM 小鼠肝细胞线粒体膜及脊结构清晰, 内质网排列及形态改善, 胞浆水肿缓解 (图 1B)。

2 三七总皂苷抑制 T2DM 小鼠肝细胞的凋亡

与正常组比较, T2DM 组肝细胞凋亡数明显增加 (箭头标识红色荧光)。与 T2DM 组相比, T2DM+PNS 组肝细胞凋亡细胞数明显减少 (图 2A、B)。Western blot 表明, 与正常组相比, T2DM 组 Bax 表达升高, cleaved casp6/casp6 的比值增加, 经 PNS 治疗后 Bax 表达降低, cleaved casp6/casp6 比值减小 (图 2C、D), 提示 PNS 抑制 T2DM 小鼠肝细胞凋亡。

3 三七总皂苷降低 T2DM 小鼠肝脏氧化水平

结果显示, 与正常组相比, T2DM 组小鼠肝脏绿色荧光信号增强, ROS 生成增加 (图 3A、B), MDA 含量升高 (图 3C); T2DM+PNS 组绿色荧光信号减弱, ROS 生成减少 (图 3A、B), MDA 浓度降低 (图 3C), 表明 PNS 减少 T2DM 小鼠肝脏 ROS 及脂质过氧化产物 MDA 生成。

4 三七总皂苷对 T2DM 小鼠肝脏蛋白质表达谱的影响

以 293T 细胞的全蛋白组为质控样本, 对正常组、T2DM 组和 T2DM+PNS 组小鼠肝脏蛋白质表达谱进行检测。结果显示, 质控样本的相关系数大于 0.90 (图 4A), 3 组样本共检测到蛋白 9 291 个, 主成分分析 (principal composition analysis, PCA) 显示, 正常组、T2DM 组和 T2DM+PNS 组分别沿第一和第二主成分 (PC1 和 PC2) 方向分组, PC1 和 PC2 可解释组间 53.1% 和 23.3% 的变异 (图 4B)。聚类结果表明, 3 组样本的表达谱具有差异, 且 T2DM+PNS 组与正常组的表达谱相似 (图 4C), 提示 PNS 对 T2DM 小鼠肝脏蛋白质组的异常改变具有改善作用。

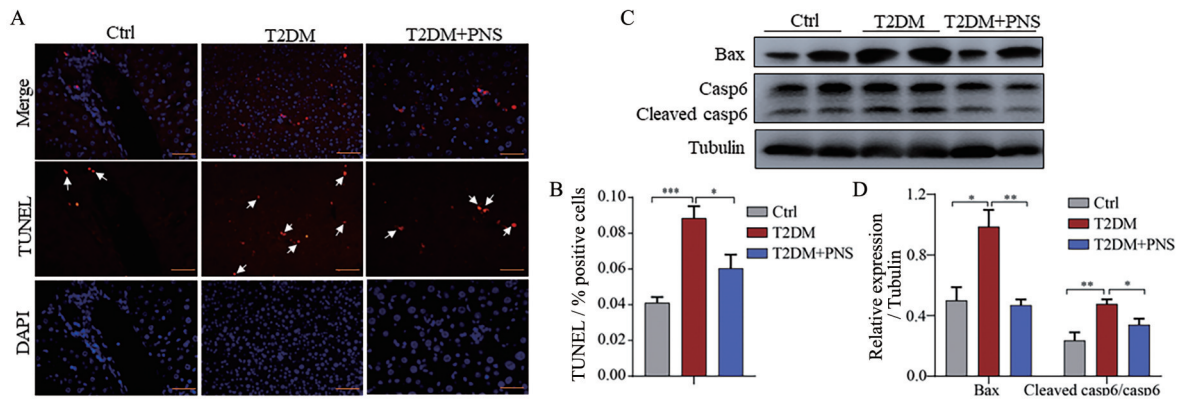


Figure 2 The effect of PNS on hepatocyte apoptosis. A: TUNEL, DAPI and merged pictures (red arrows show apoptotic cell, scale bar: 20 μm); B: Quantification of TUNEL-positive cell rate; C: Western blot representation of proteins involved in the apoptotic process; D: Quantification of Bax and cleaved casp6/casp6 values. $n = 3$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. TUNEL: TdT-mediated dUTP nick-end labeling; DAPI: 4',6-Diamidino-2-phenylindole

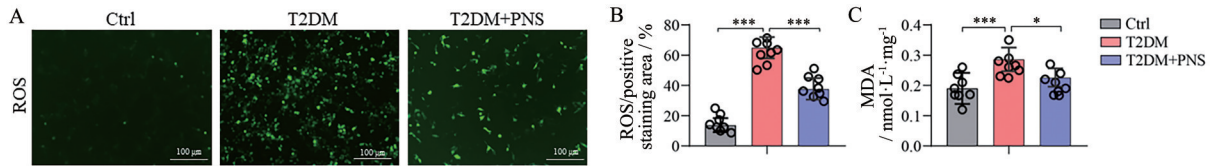


Figure 3 Detection of ROS production and MDA contents in liver tissues of mice. A: The images of ROS fluorescence staining in the liver tissues; B, C: Calculation of ROS staining area and MDA levels. $n = 8$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. ROS: Reactive oxygen species; MDA: Malondialdehyde

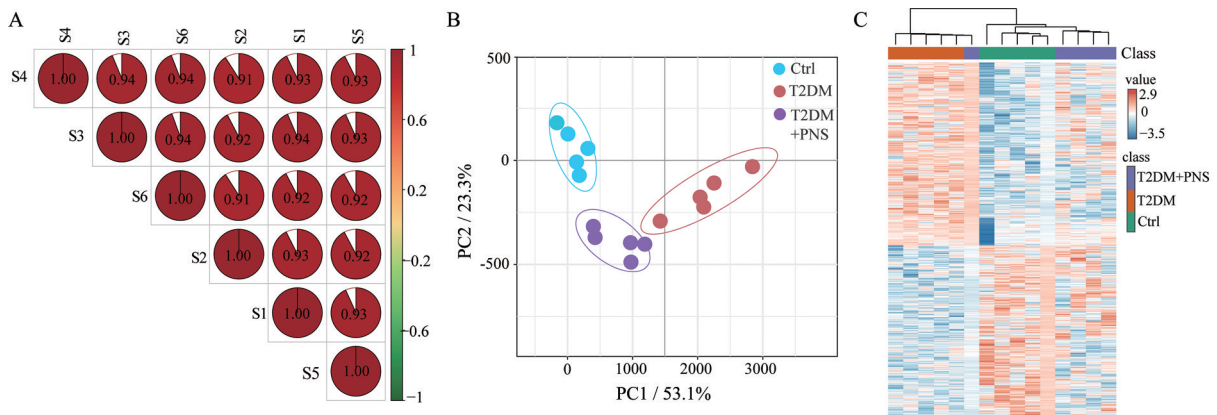


Figure 4 Proteomics profiling of Ctrl, T2DM and T2DM+PNS groups. A: Spearman's correlation coefficients analysis of 293T cell samples; B: Principal component scores of Ctrl, T2DM and T2DM+PNS groups, respectively; C: Clustering proteome analysis of Ctrl, T2DM and T2DM+PNS groups

5 差异表达蛋白质的筛选及分析

差异表达蛋白质的筛选参照文献^[11]方法。样本中缺失值超过一半的变量剔除, 然后采用K-临界法($K = 10$)对剩余变量的缺失值填补, 并对每个变量按样本总面积归一化。若某蛋白的相对表达量在每组样本中的均值之比 ≥ 1.5 或 ≤ 0.67 且 $P < 0.05$, 则视为该蛋白在两组中的表达差异具有统计学意义, 并通过火山图可视化展示, T2DM组中表达上调分子被标注为红色,

下调分子被标注为蓝色, 其他分子被认为在两组中的表达无显著变化, 标注为灰色(图5A)。结果显示, T2DM组显著变化的蛋白有489种, 其中上调268种(占蛋白质组2.9%), 下调221种(占蛋白质组2.4%), 无显著变化8802种(占蛋白质组94.7%)。差异表达蛋白按倍数变化排序, 显示T2DM组中与AMPK信号相关的分子(Prkaa1、Prkag1、Pik3c2g、Pik3cd、Pik3c3), 以及抗氧化应激分子(Nrf2、Gsr、Txn、HO-1、Cat、Gsr、

Trim16) 的表达显著降低。相反, 与炎症生成和释放相关分子 (Tnfaip3、Ripk1、Fadd、Tnfsf14、Rnf31、Traf1) 的表达升高 (图 5B)。趋势聚类显示, T2DM 组中多数蛋白的表达呈现上调 (图 5C)。

6 差异表达蛋白的信号通路及网络分析

基于 GeneCard 数据库对差异表达蛋白通路富集分析, 依据显著性水平 (P) 及富集率 (enrichment ratio, ER) 对通路可视化展示 (图 6A)。结果显示, 固醇激素生物合成 ($P = 0.001$ 、ER = 0.77)、AMPK 通路 ($P = 0.009$ 、ER = 0.67)、氧化压力 ($P = 0.01$ 、ER = 0.70)、胰岛素信号 ($P = 0.01$ 、ER = 0.58)、磷脂酰肌醇通路 ($P = 0.01$ 、ER = 0.64) 的显著性水平和通路富集率高。亚油

酸代谢 ($P = 0.03$ 、ER = 0.76)、TNF- α 介导的炎症 ($P = 0.02$ 、ER = 0.54)、胰岛素抵抗 ($P = 0.02$ 、ER = 0.58) 及 mTOR 信号 ($P = 0.03$ 、ER = 0.47) 显示较高的富集率 (图 6A)。网络分析显示, 各基因依据生物功能的不同构成了多个子网络, 其中氧化压力 ($P = 5.67\text{e-}14$)、AMPK 通路 ($P = 5.49\text{e-}11$)、TNF- α 介导的炎症反应 ($P = 1.11\text{e-}16$)、磷脂酰肌醇信号 ($P = 2.55\text{e-}15$)、NF- κ B ($P < 1.0\text{e-}16$)、胰岛素 ($P = 1.45\text{e-}13$)、固醇激素合成 ($P < 1.0\text{e-}16$)、凋亡 ($P < 1.0\text{e-}16$) 及亚油酸代谢 ($P < 1.0\text{e-}16$) 子网络具有显著的富集率 (图 6B~J)。

7 差异表达基因本体分析

采用 Metascope 数据库对差异表达基因进行功能

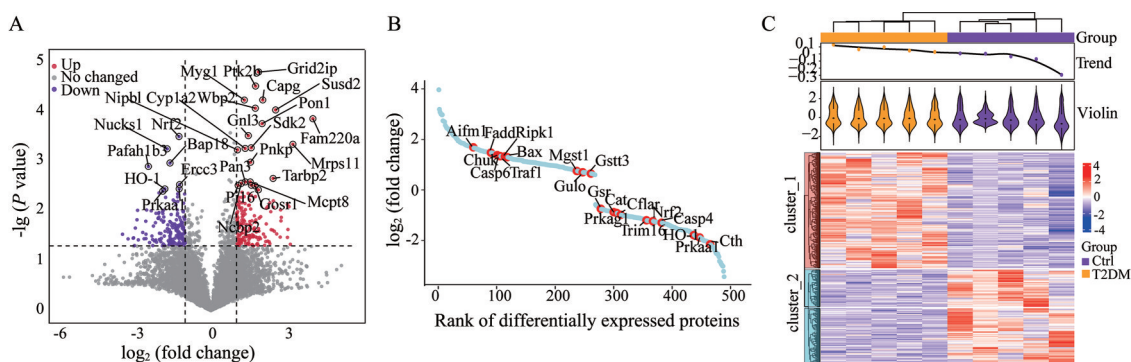


Figure 5 Analysis of differentially expressed proteins. A: Differentially expressed proteins shown by volcano plot; B: Rank of differentially expressed proteins; C: Heat map of differentially expressed proteins. $n = 5$

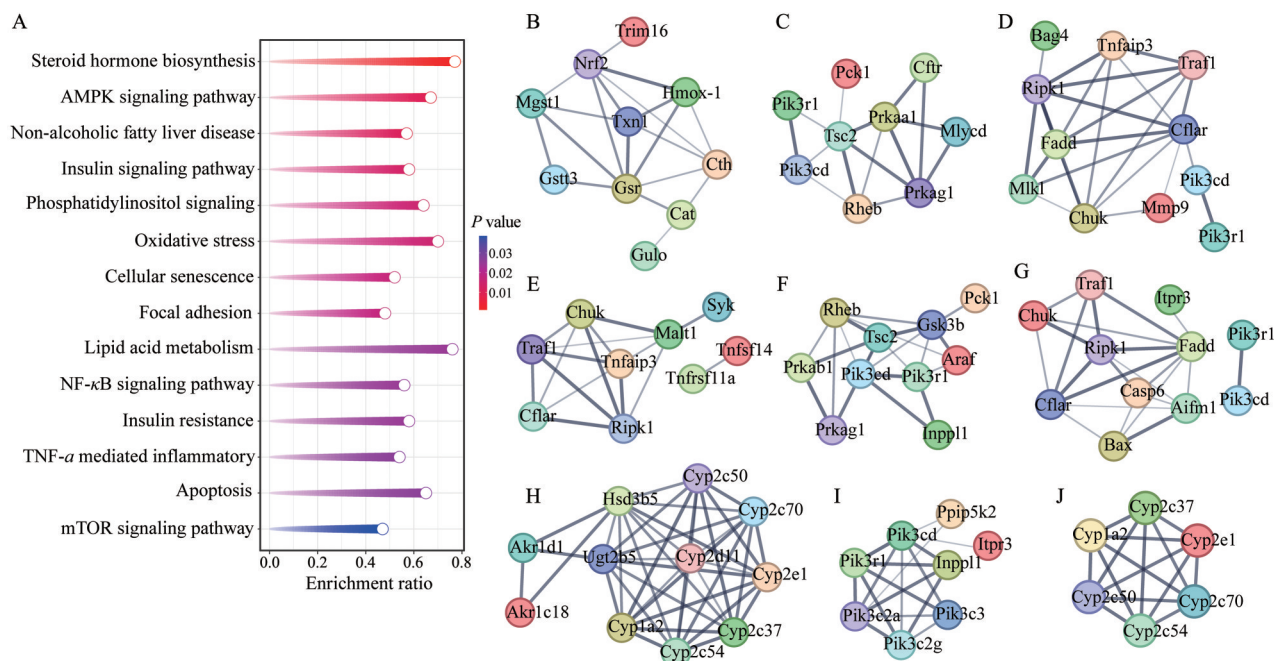


Figure 6 Signal pathway and network analysis of differentially expressed proteins. A: Meteor diagram of signaling pathways; B~J: Protein-protein interaction network plot of signaling pathways. B: Oxidative stress response; C: AMPK signaling pathway; D: TNF- α mediated inflammation; E: NF- κ B signaling pathway; F: Insulin signaling pathway; G: Apoptosis; H: Steroid hormone biosynthesis; I: Phosphatidylinositol signaling; J: Lipid acid metabolism. AMPK: Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase; TNF- α : Tumor necrosis factor- α ; NF- κ B: Nuclear factor kappa-B

富集分析。结果显示, TNF- α 信号 ($-\lg P = 6.71$)、氧化压力反应 ($-\lg P = 5.58$)、调控 AMPK 活性 ($-\lg P = 5.15$)、固醇激素生物合成 ($-\lg P = 5.03$)、调控 NF- κ B 转录因子活性 ($-\lg P = 5.02$)、调控细胞凋亡过程等 16 条生物学过程被富集 (图 7A)。功能上, 这些生物学事件主要涉及炎症、氧化压力、信号通路、凋亡、细胞代谢及转运等过程 (图 7B)。

8 三七总皂苷对 T2DM 小鼠肝脏蛋白质组的影响

蛋白表达谱显示, PNS 治疗后 T2DM 组中 177 种基因的表达水平显著改变, 其中 42 种基因水平向正常组转归 (图 8A)。功能分析显示, 这些基因归属氧化压力反应、AMPK、TNF- α 、NF- κ B、凋亡及胰岛素信号通路。定量分析显示, PNS 组抗氧化分子 (Txn、Nrf2、HO-1、Trim16、Gsr、Cth、Cat) 及 AMPK 信号通路相关分子 (Prkaa1、Prkag1、Pik3ap1、Pik3r1、Pik3cd、Pik3cg、Pik3c2a、Pik3c3、Rheb) 的表达上调; TNF- α (Tnfaip3、Ripk1、Fadd、Rnf31、Chuk、Traf1、Otlulin、Nsmf、Nlrc4) 和 NF- κ B (Tnfsf14、Tnfaip3、Chuk、Tnfrsf11a、Malt1、Ripk1 及 Traf1) 通路相关分子的表达降低。另外, 促凋亡分子 (Aifm1、Ripk1、Casp4、Casp6、Fadd、Bax、Chuk 及 Traf1) 水平降低, 而抗凋亡分子 Cflar 的表达升高。调控胰岛素信号相关的多个分子 (Inpp11、Gsk3b、Tsc2

及 Pck1) 的表达向正常组转归 (图 8B~G)。

9 三七总皂苷对 T2DM 小鼠肝脏 AMPK/Nrf2/HO-1 信号通路及内质网应激分子 Grp78 和 Chop 表达的影响

与正常组相比, T2DM 组中 pAMPK α /AMPK α 的比值降低, 且 HO-1 及核内 Nrf2 下调, 经 PNS 治疗后 pAMPK α /AMPK α 比值增加, HO-1 及核内 Nrf2 上调 (图 9A、B), 说明 PNS 激活了 T2DM 小鼠肝脏 AMPK/Nrf2/HO-1 信号通路。另一方面, 与 T2DM 组相比, T2DM+PNS 组小鼠肝脏中内质网应激分子 Grp78 和 Chop 的表达均降低 (图 9C、D), 这些结果提示 PNS 可能通过激活 AMPK/Nrf2/HO-1 信号通路, 缓解 T2DM 小鼠肝脏氧化应激和内质网应激。

讨论

机体在持续性高糖刺激下, 糖基化终端产物 (advanced glycation end products, AGEs) 蓄积, AGEs 与相应糖基化终端产物受体 (receptor for advanced glycation end products, RAGE) 结合, 激活氧化应激 (oxidation stress, OS) 和炎症信号通路^[12]。持续性高糖也可通过增加线粒体耗氧量损伤线粒体功能或激活还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine

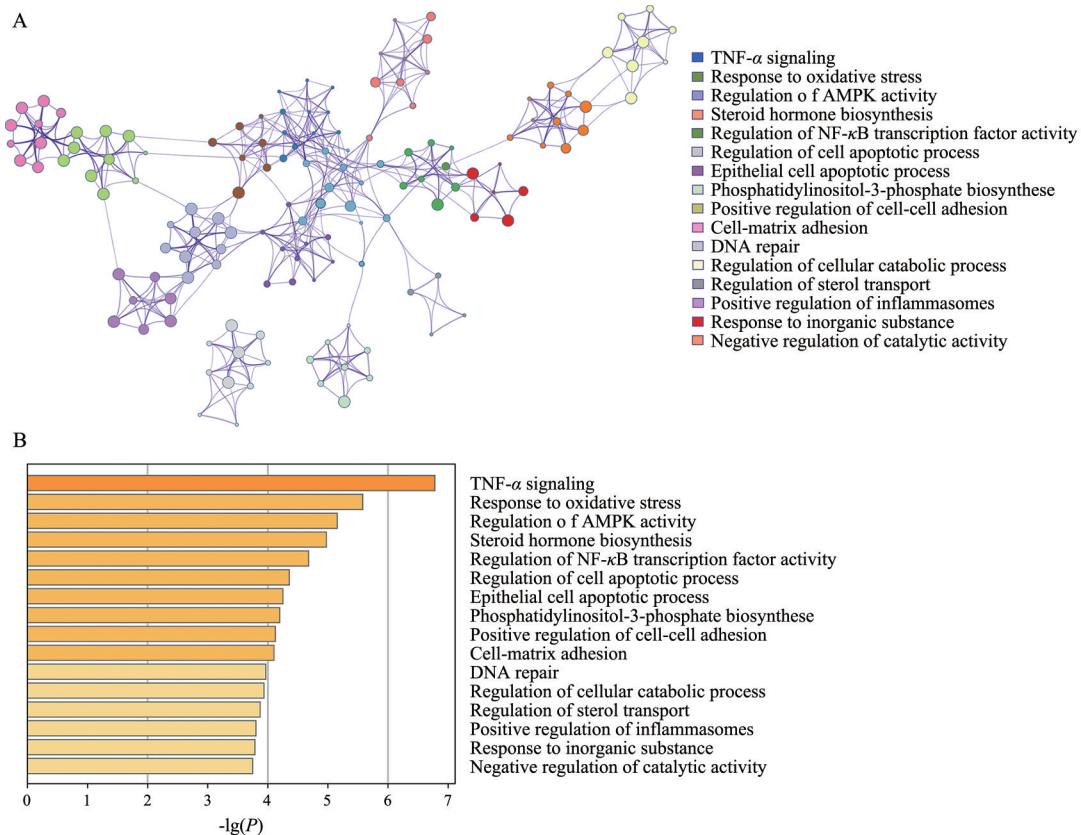


Figure 7 Gene ontology enrichment analysis of increased and decreased proteins. The results are displayed by network plot (A) and P -value (B), respectively

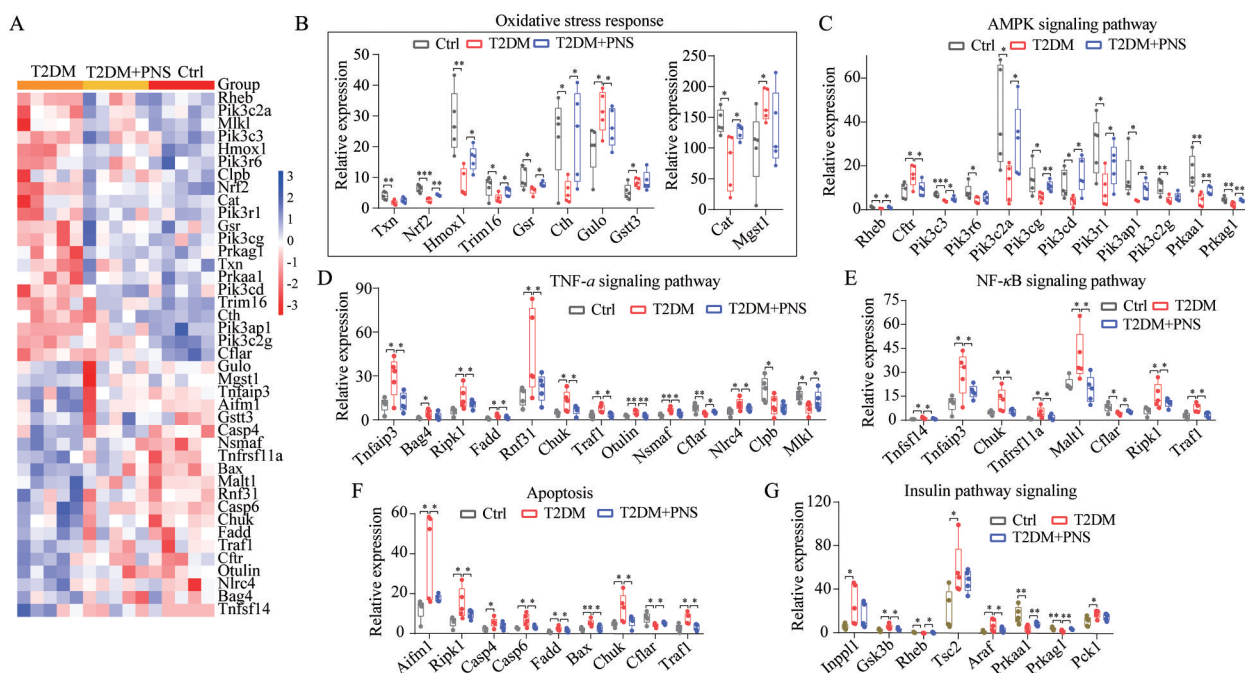


Figure 8 Analysis of differential proteins and signaling pathways. A: Heat map visualization of differential proteins; B-G: Quantitative analysis of gene expression in pathways. $n = 5, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

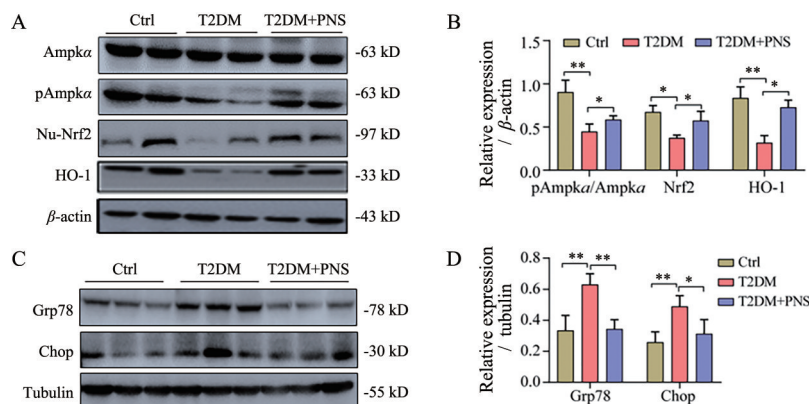


Figure 9 The expression of AMPK/Nrf2/HO-1 pathway and endoplasmic reticulum markers Grp78 and Chop by Western blot. A, C: The detection of AMPK α , pAMPK α , Nu-Nrf2, HO-1, Grp78 and Chop in Ctrl, T2DM and T2DM+PNS groups, respectively; B, D: Quantitative analysis of these proteins by using image J software. $n = 3, \bar{x} \pm SEM$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

dinucleotide phosphate, NADPH) 氧化酶, 导致活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 累积, 诱发 OS^[13]。反过来, OS 产生的 ROS 和自由基可诱发炎症反应, 导致胰岛 β 细胞损伤, 加重胰岛素抵抗, 促进糖尿病进展^[14], 如此形成自我催化的恶性循环, 造成机体内稳态破坏和器官功能的损伤。不仅如此, 高糖还可通过线粒体电子传递链、葡萄糖自氧化等途径增加 ROS 水平, 过量的 ROS 导致线粒体 DNA 损伤^[13]。课题组之前研究表明^[7], 不论是血液还是肝脏, 致炎因子 IL-6 和 TNF- α 在 T2DM 小鼠均增加, 且肝脏中抗氧化因子 GSH-Px、SOD 和 CAT 的活性降低, 表明 T2DM 小鼠处于氧化应

激状态。本研究进一步证实, T2DM 小鼠肝脏中 ROS 和 MDA 浓度增加, 且 Nrf2、HO-1、Txn、Gsr、Cat、Cth 等抗氧化信号分子水平降低; 相反, 炎症相关分子包括 Tnfaip3、Rnf31、Tnfsf14、Tnfrsf11a、Traf1、Bag4、Ripk1、Chuk、Nsmf 及 Fadd 的表达增加, 且炎症相关信号通路 TNF- α 及 NF- κ B 被富集, 这些数据佐证了之前的研究, 拓展了对 T2DM 发病的理解和认识。结果表明, PNS 治疗使 T2DM 小鼠肝脏抗氧化应激相关基因的表达增加, 炎症分子的水平降低, 提示 PNS 不仅减轻了糖尿病小鼠的氧化应激状态, 而且抑制了炎症分子的生成和释放。

AMPK 由 α 、 β 和 γ 3 个亚基构成的复合分子, 是调控机体能量稳态和代谢的重要激酶和调节器, 对维持细胞正常的生理活动至关重要^[15]。AMPK 在调节糖脂代谢、促进白色脂肪棕色化、抗氧化应激方面发挥重要作用, 且能够改善胰岛素抵抗和减轻胰岛 β 细胞损伤, 被认为是糖尿病防控的重要靶标之一^[16]。不仅如此, AMPK 还可通过抑制 NF- κ B 及炎性小体核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白-3 生成, 抑制白介素及 TNF- α 的生成与释放, 降低机体的炎症反应, 缓解糖尿病并发症^[17]。作为机体重要的氧化-还原转录因子, Nrf2 易被 AMPK 激活, 进而与抗氧化反应元件 (antioxidant response element, ARE) 结合, 转录激活下游抗氧化因子 HO-1、NQO1、SOD、CAT、GPx 和 GSR 等, 进而抑制 NF- κ B 及 TNF- α 活性, 发挥抗氧化应激及抗炎双重作用。激活 AMPK/Nrf2/HO-1 通路可改善氧化应激状态, 降低 ROS 水平, 缓解由氧化应激导致的器官损伤和功能紊乱^[18,19]。蛋白质组结果显示, 与正常组相比, T2DM 小鼠肝脏 Prkaa1 和 Prkag1 (AMPK α 和 γ 亚基) 水平显著降低, 表明 AMPK 的活性及 Nrf2/HO-1 通路被抑制, 经 PNS 治疗后, Prkaa1、Prkag1、Nrf2 及 HO-1 水平增加, 提示 PNS 可能通过激活 AMPK/Nrf2/HO-1 通路抑制由高糖引起的氧化应激, 进而发挥对肝脏的保护作用 (图 10)。

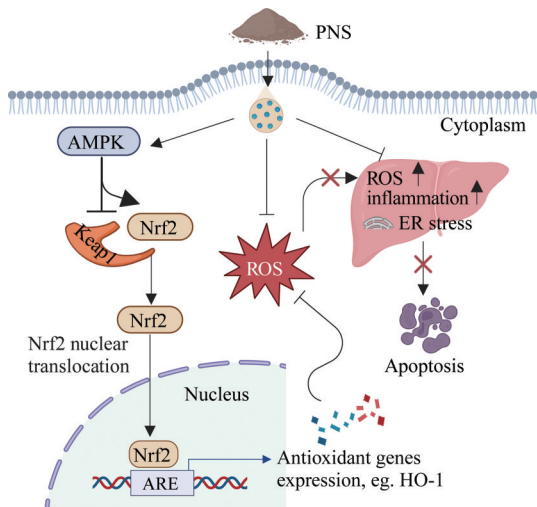


Figure 10 The protective effects of PNS on liver in mice with T2DM mice *via* activation of AMPK/Nrf2/HO-1 signaling pathway

另一方面, 机体在持续性氧化应激状态时易诱导胰岛靶腺细胞 (肝细胞和肌细胞) 凋亡, 导致胰岛素抵抗, 加重糖尿病并发症^[20]。不仅如此, 氧化应激也可引起细胞膜脂质过氧化, 造成细胞膜结构和功能的改变及线粒体蛋白质氧化损伤, 从而诱发细胞凋亡^[21]。蛋白质组结果表明, T2DM 小鼠肝脏氧化应激信号增强,

促凋亡分子 Casp4、Casp6、Bax、Fadd、Aifm1、Ripk1、Chuk 及 Traf1 表达增加, 而抗凋亡分子 Cflar 降低。TUNEL 染色结合 Western blot 证实, T2DM 小鼠肝细胞凋亡率提高, 而 PNS 可抑制其凋亡, 这可能是 PNS 改善 T2DM 小鼠肝脏功能的原因之一。

内质网应激通过活化 IRE1 促进 TNF- α 和 IL-1 β 表达, 诱发炎症, 加重胰岛素抵抗^[22,23]。Western blot 显示, PNS 可降低 T2DM 小鼠肝脏内质网应激分子 Grp78 和 Chop 的水平, 提示 PNS 能够缓解糖尿病小鼠肝脏内质网应激, 这些结果与电镜现象一致。文献^[24]报道, 肝脏内质网应激可通过调控游离脂肪酸和脂肪因子分泌, 促进炎症发生与发展。蛋白质组结果显示, T2DM 小鼠肝脏中调节脂肪酸代谢分子 (Cyp1a2、Cyp2c50、Cyp2c54、Cyp2c70、Cyp2e1 和 Cyp2c37) 的水平增加, 而 PNS 能够降低这些蛋白的表达, 提示 PNS 可能对糖尿病小鼠肝脏脂肪酸的异常代谢具有改善作用。然而, 这种作用是否与抑制内质网应激有关, 尚需进一步探究。

综上, 本研究认为, PNS 可能通过激活 AMPK/Nrf2/HO-1 信号通路, 减轻糖尿病小鼠氧化应激和内质网应激, 抑制肝细胞凋亡发挥保肝作用。

作者贡献: 刘文虎、张帆、常晋霞负责实验设计及管理; 刘文虎执行实验、完成数据分析、文章撰写及修改; 张金花、吴敏、谢楠、王爽完成部分实验。

利益冲突: 本文不存在任何利益冲突。

References

- [1] International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas [M]. 10th Ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2021.
- [2] Zhang S, Chen C, Lu W, et al. Phytochemistry, pharmacology, and clinical use of *Panax notoginseng* flowers buds [J]. *Phytother Res*, 2018, 32: 2155-2163.
- [3] Cui G, Li Q, Shu FF, et al. *Panax notoginseng* saponins ameliorated LPS-induced acute lung injury in mice by inhibiting the activation of NF- κ B [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 3587-3595.
- [4] Wang GR, Chen ZY, Wu H, et al. Xueshuantong improves cerebral microcirculation disorder: action mechanism based on network pharmacology and experimental validation [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 2077-2086.
- [5] Tan Y, Zhang X, Zhou Y, et al. *Panax notoginseng* extract and total saponin suppress diet-induced obesity and endoplasmic reticulum stress in epididymal white adipose tissue in mice [J]. *Chin Med*, 2022, 17: 75.
- [6] Sun X, Wang YR, Cheng XM, et al. Ameliorative effect of *Panax notoginseng* saponins eye drops on non-proliferative diabetic retinopathy in rats [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*,

- 2024, 59: 1271-1279.
- [7] Zhang JH, Liu HX, Liu YX, et al. Mechanistic investigation on the hypoglycemic effect of *Panax notoginseng saponins* in type 2 diabetic mice based on plasma metabolomics [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2024, 59: 1028-1039.
- [8] Wisniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, et al. Universal sample preparation method for proteome analysis [J]. Nat Methods, 2009, 6: 359-362.
- [9] Zhang JH, Chang JX, Tang JC, et al. Mechanism of HES1 regulating herceptin resistance in gastric cancer cells by ferroptosis [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2023, 58: 3354-3365.
- [10] Liu WH, Yuan JB, Chang JX. Label-free quantitative proteomics for investigation of signaling pathways of GATA6 regulating trastuzumab resistance in gastric cancer cells [J]. Chin J Anal Chem (分析化学), 2020, 48: 187-211.
- [11] Chang JX, Wang SB, Yuan JB, et al. Label-free quantitative proteomic study of RUNX3 regulating herceptin resistance in gastric cancer cells [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2021, 56: 1953-1964.
- [12] Twarda-Clapa A, Olczak A, Białkowska AM, et al. Advanced glycation end-products (AGEs): formation, chemistry, classification, receptors, and diseases related to AGEs [J]. Cells, 2022, 11: 1312.
- [13] Rizwan H, Pal S, Sabnam S, et al. High glucose augments ROS generation regulates mitochondrial dysfunction and apoptosis via stress signaling cascades in keratinocytes [J]. Life Sci, 2020, 241: 117148.
- [14] Singh A, Kukreti R, Saso L, et al. Mechanistic insight into oxidative stress-triggered signaling pathways and type 2 diabetes [J]. Molecules, 2022, 27: 950.
- [15] Herzig S, Shaw RJ. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018, 19: 121-135.
- [16] Entezari M, Hashemi D, Taheriazam A, et al. AMPK signaling in diabetes mellitus, insulin resistance and diabetic complications: a pre-clinical and clinical investigation [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 146: 112563.
- [17] Lee HM, Kim JJ, Kim HJ, et al. Upregulated NLRP3 inflammasome activation in patients with type 2 diabetes [J]. Diabetes, 2013, 62: 194-204.
- [18] Lei L, Chai Y, Lin H, et al. Dihydroquercetin activates AMPK/Nrf2/HO-1 signaling in macrophages and attenuates inflammation in LPS-induced endotoxemic mice [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 662.
- [19] Hao Y, Gao X. Diosgenin protects retinal pigment epithelial cells from inflammatory damage and oxidative stress induced by high glucose by activating AMPK/Nrf2/HO-1 pathway [J]. Immun Inflamm Dis, 2022, 10: e698.
- [20] Henriksen EJ, Diamond-Stanic MK, Marchionne EM. Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes [J]. Free Radic Biol Med, 2011, 51: 993-999.
- [21] Su LJ, Zhang JH, Gomez H, et al. Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis [J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 5080843.
- [22] Riaz TA, Junjappa RP, Handigund M, et al. Role of endoplasmic reticulum stress sensor IRE1 α in cellular physiology, calcium, ROS signaling, and metaflammation [J]. Cells, 2020, 9: 1160.
- [23] Hotamisligil GS. Role of endoplasmic reticulum stress and c-Jun NH2-terminal kinase pathways in inflammation and origin of obesity and diabetes [J]. Diabetes, 2005, 54: S73-S78.
- [24] Mondal AK, Das SK, Varma V, et al. Effect of endoplasmic reticulum stress on inflammation and adiponectin regulation in human adipocytes [J]. Metab Syndr Relat Disord, 2012, 10: 297-306.