DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.05.002

基于蛋白组学探讨三七改善血瘀证阿霉素肾纤维化模型大鼠的作用机制

吴金玉[1],陆良喜[2],黄志敏[1]
(1.广西中医药大学第一附属医院,广西中医药防治医学分子生物重点实验室,广西 南宁 530023;
2.广西中医药大学,广西 南宁 530001)

摘要:目的 基于蛋白组学探讨三七改善血瘀证阿霉素肾纤维化大鼠的作用机制。方法 将30只SD大鼠随机分为6组:正常组、模型组、三七低剂量组、三七中剂量组、三七高剂量组、阳性对照组,每组5只。采用LC-MS技术同时结合生物信息学分析等对肾组织蛋白进行鉴定、定量分析,筛选差异蛋白,对差异蛋白进行GO和KEGG富集分析。结果 通过各实验组动物肾组织蛋白组学检测分析,模型组鉴定出与正常组有统计差异的478个蛋白,其中146个表达上调、332个表达下调。三七中剂量组鉴定出与模型组有统计差异的180个蛋白,包括76个表达上调、104个表达下调的蛋白。通过对三七中剂量组、模型组、正常组进行鉴定分析,三七可能调控的蛋白7个:其中三七可能上调的蛋白为Gtf2f2和LOC681410,可能下调的蛋白为RT1-Ba、Cnpy4、Pdcd11、Gimap4、P3h1。KEGG通路富集结果显示最为显著的是能量代谢通路Metabolic pathways。结论 三七可能通过调节差异肾组织蛋白Gtf2f2、LOC681410、RT1-Ba、Cnpy4、Pdcd11、Gimap4和P3h1的表达,调控相关能量代谢通路Metabolic pathways,从多靶点、多途径改善血瘀证阿霉素大鼠肾纤维化进程。

关键词:慢性肾脏病;肾纤维化;蛋白组学;三七;血瘀证
中图分类号:R285.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2026)05-0007-11

Mechanism of Sanqi(Notoginseng Radix et Rhizoma) Improving Blood Stasis Syndrome in Rats with Adriamycin-Induced Nephrotoxic Fibrosis Using Proteomics

WU Jinyu[1],LU Liangxi[2],HUANG Zhimin[1]
(1. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine,Guangxi Key Laboratory of Molecular Biology of Preventive Medicine of Traditional Chinese Medicine,Nanning 530023,Guangxi,China;
2. Guangxi University of Chinese Medicine,Nanning 530001,Guangxi,China)

Abstract:*Objective* To investigate the mechanism of Sanqi(Notoginseng Radix et Rhizoma) improving the renal fibrosis induced by adriamycin in rats with blood stasis syndrome based on proteomics. *Methods* Thirty SD rats were randomly divided into 6 groups:normal group,model group,Sanqi(Notoginseng Radix et Rhizoma) low-dose group,Sanqi(Notoginseng Radix et Rhizoma) medium-dose group,Sanqi(Notoginseng Radix et Rhizoma) high-dose group and positive control group,with 5 rats in each group. Using LC-MS technology in combination with bioinformatics analysis,protein identification,quantification and differential protein screening were performed on renal tissues. Differential proteins were subjected to GO and KEGG enrichment analysis. *Results* There were 478 proteins in the model group compared with those in the normal group,of which 146 proteins were up-regulated and 332 proteins were down-regulated. Compared with those in the model group,there were 180 different proteins in the Sanqi(Notoginseng Radix et Rhizoma) medium-dose group,including 76 up-regulated and 104 down-regulated proteins. Combined with the above experimental results,further analysis of the Sanqi(Notoginseng Radix et Rhizoma) medium-dose group,the model group and the normal group showed that there were 7 differentially expressed proteins regulated by Sanqi(Notoginseng Radix et Rhizoma). Among them,the proteins that Sanqi(Notoginseng Radix et Rhizoma) may up-regulate were Gtf2f2 and LOC681410. The possible down-regulated proteins were RT1-Ba,Cnpy4,Pdcd11,Gimap4 and P3h1. KEGG pathway enrichment results showed that the most significant energy pathway was metabolic pathways. *Conclusion* Sanqi(Notoginseng

基金项目:国家自然科学基金项目(81960866,82160878);中医学广西一流学科项目(桂教科研〔2022〕1号);广西中医药大学引进博士科研启动基金项目(2023BS040)
作者简介:吴金玉(1965-),女,广东广州人,教授、主任医师,博士研究生导师,博士,研究方向:中医药防治风湿免疫疾病、肾脏病。
通讯作者:黄志敏(1988-),女,广西贵港人,副主任医师,博士,研究方向:中医药防治风湿免疫疾病、肾脏病。E-mail:547953387@qq.com。

Radix et Rhizoma) may play a role in anti-renal fibrosis in adriamycin-induced rat model with blood stasis syndrome through multi-target and multi-pathway by regulating differential expressions of renal tissue proteins Gtf2f2, LOC681410, RT1-Ba, Cnpy4, Pdcd11, Gimap4 and P3h1 and modulating metabolic pathways associated with energy metabolism.

Keywords: chronic kidney disease; renal fibrosis; proteomics; Sanqi (Notoginseng Radix et Rhizoma); blood stasis syndrome

以肾小球硬化和肾小管间质纤维化为特征的肾纤维化是各种慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)的最终共同病理表现,持续性肾损伤引起炎症反应、促纤维化因子过表达和肌成纤维细胞增殖,随后细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分过度积累,肾小管破坏,最终导致肾纤维化,逐渐发展为终末期肾脏疾病(end-stage renal disease, ESRD),形成慢性肾衰竭(chronic renal disease, CRF)[1-2]。肾小管间质纤维化比肾小球硬化更能反映肾功能恶化,抑制肾小管间质纤维化更有利于保护肾功能。CKD肾纤维化的机制复杂,延缓肾纤维化的手段有限。因此,需要不断探索CKD肾纤维化发生发展的机理。

中医学认为肾纤维化病机为本虚标实,虚实夹杂,涉及肺、脾、肾三脏虚损,以肾虚为本,以痰浊、水湿、血瘀为标。目前"肾虚血瘀"是肾纤维化基本病因病机已成为医家共识,"瘀"贯穿肾纤维化病程始终[3]。三七又名田七,味甘、微苦,性温,主要归肝胃二经,为五加科多年生草本植物人参三七的干燥根,其主要功效是活血化瘀、止痛、止血、补虚强健。三七"活血化瘀、补虚强健"的功效与其病机高度切合。血瘀证在肾脏病表现为血液流变学和血黏度改变,以及凝血功能障碍,在血液高凝状态下和血液流变学功能紊乱损害肾小球,导致肾小球硬化,造成不可逆的损伤,从而出现肾功能损害或肾衰竭[4]。本项目基于蛋白组学探讨三七改善血瘀证阿霉素肾纤维化大鼠的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级雄性SD大鼠30只,体质量(220±30)g。实验所需动物从湖南斯莱克景达实验动物有限公司购买,公司许可证号为SCXK(湘)2019-0004。动物实验福利伦理审查批号:DW20221221-241。在广西中医药防治医学分子生物重点实验室饲养。

1.2 主要仪器、试剂及药物

酶标仪(Thermo Multiskan, FC),液相色谱仪(Thermo, Vanquish),质谱仪(Thermo, Orbitrap Exploris 120),电泳仪(北京六一仪器厂,DYY-7C),GTF2F2/TFIIF(Affynity, DF13977),GIMAP4(Santa Cruz, sc-515595),CNPY4(Santa Cruz, sc-514307),Gros1/P3h1(Santa Cruz, sc-393003),HRP标记羊抗兔二抗(武汉博士德生物工程有限公司,BA1054),BCA试剂盒(碧云天,P0012S)。三七:中药配方颗粒(江苏省江阴市天江药业有限公司)。盐酸贝那普利5 mg/片(北京诺华制药有限公司,国药准字H20000292)。

1.3 血瘀证阿霉素肾纤维化大鼠模型制备

参照前期研究中阿霉素肾纤维化大鼠模型的建立,镜检出现节段甚至球性肾小球硬化、球囊粘连、肾小管上皮细胞空泡变性、肾间质纤维化及炎症细胞浸润等病理改变则提示肾纤维化造模成功[5]。在阿霉素肾纤维化大鼠模型的基础上建立血瘀证模型[6]:在手术后6周,以盐酸肾上腺素注射液0.1 mg/kg剂量皮下注射于造模的大鼠,2 h后置于4 ℃冷水中游泳5 min,连续2周。以血液流变学改变评估血瘀证模型。

1.4 实验分组与给药方法

将30只清洁级SD雄性大鼠采用随机数字表法分为正常组、模型组、三七低剂量组、三七中剂量组、三七高剂量组、阳性对照组(贝那普利组),每组5只。正常组大鼠正常条件饲养,不造模;其余组大鼠按上法造模。造模完成后,阳性对照组大鼠每天给予贝那普利片给药,参考陈奇主编《中药药理实验方法学》体表面积等效剂量换算比率按人常用量5 mg/d,大鼠剂量5 mg×0.018=0.09 mg,200 g体质量大鼠的剂量为0.09 mg,0.09 mg/0.2 kg=0.45 mg/kg,溶于生理盐水,按体质量灌胃给药。中药组按人和动物体表面积换算公式:大鼠中药给药剂量依据人-大鼠体表面积换算(1∶6.25),并按临床成人用药量的1、2、4倍剂量给药,三七低、中、高剂量组分别予以含生药0.45、0.9、1.8 g/kg三七颗粒水冲剂。正常组和模型组大鼠每天给予等体积的0.9%生理盐水。各组皆按1 mL/100 g体质量灌胃,1次/d,连续8周。给药完成后腹主动脉采血后摘除左肾,放入液氮保存。

1.5 指标检测

1.5.1 质谱检测 质谱色谱条件:配制流动相A液(100%水、0.1%甲酸)和B液(80%乙腈、0.1%甲酸)。使用10 μL A液溶解冻干粉末,4 ℃下14 000 g离心20 min,取上清1 μg样品进样。使用Orbitrap Exploris™ 480质谱仪,选配FAIMS Pro™ Interface,补偿电压CV在-45 V和-65 V之间,Nanospray Flex™(NSI)离子源,设定离子喷雾电压2.0 kV,离子传输管温度320 ℃。质谱采用数据依赖型采集模式,质谱全扫描范围350~1500 m/z,一级质谱分辨率120000(200 m/z),AGC为300%,C-trap最大注入时间50 ms;二级质谱检测用"Top Speed"模式,二级质谱分辨率为15 000(200 m/z),AGC为75%,最大注入时间22 ms,肽段碎裂碰撞能量为33%,生成质谱检测原始数据(.raw)。

1.5.2 色谱梯度 色谱梯度:时间0 min,流动相B比例8%;时间10 min,流动相B比例12%;时间89 min,流动相B比例30%;时间105 min,流动相B比例40%;时间106 min,流动相B比例95%;时间120 min,流动相B比例95%。

1.5.3 GO富集分析和KEGG富集分析 GO分为分子功能、细胞组分和生物过程。利用GO数据库功能进行差异蛋白质与生物学功能显著相关性分析。利用KEGG数据库进行通路富集分析。

1.5.4 Western blot法验证Gimap4、Gtf2f2、CNPY4、P3h1蛋白 取50 mg肾脏组织于液氮中剪碎研磨成细粉末状,提取总蛋白。按操作步骤进行电泳、转膜,分别加入Gimap4(1∶500)、Gtf2f2(1∶1000)、CNPY4(1∶500)、P3h1(1∶500)一抗,二抗,成像仪中曝光、拍照。

2 结果

2.1 蛋白质控基本分析

为了提高分析结果质量，降低假阳性率，对采集的质谱上机数据检索结果做过滤：选择可信度99%以上谱肽，至少包含1个unique肽段的蛋白。只保留可信的谱肽和蛋白，过滤FDR大于1%的肽段和蛋白。进行先验的鉴定肽段质量偏移统计，发现质量偏移误差主要集中在低于±20 ppm的范围内，质量偏差控制较好，见插页Ⅵ图1。

绝大部分质谱鉴定到的蛋白所对应的肽段长度分布在8～35个氨基酸残基之间，提示样本制备达到标准，见插页Ⅵ图2。先验的蛋白分子量与pI等电点统计数据显示，蛋白的pI值在4～9之间，分子量为0～200 kDa（图3）。

2.2 蛋白鉴定分析

在本项目实验中，采用：（1）Unique peptide≥1；（2）蛋白至少在50%样本中有定量值。对数据进行质控处理。最终鉴定到6368个蛋白，可定量的蛋白为5818（占鉴定总数的91.4%）。各样本中鉴定到的蛋白数目如插页Ⅵ图4所示。

2.3 蛋白定量分析

蛋白定量值采用中位数法进行归一化处理，消除样本间信号误差，KNN算法填充缺失值。通过箱线图展示各样本中蛋白表达量分布情况和矫正前后数据分布的分散程度。矫正后各样本蛋白定量值水平保持一致，提示矫正结果较好。见插页Ⅶ图5。

样本间蛋白表达的相关性分析：右上三角为样本之间Pearson相关性值颜色表示，颜色值参考右边标尺图。左下三角为相关性系数值，值越高，说明相似程度越高（最大值为1，最小值为－1）（插页Ⅶ图6A）。插页Ⅶ图6B为采用欧式距离进行层次聚类分析图，该图能够直接反映每个样本之间的关系。利用热图，以欧式距离为矩阵计算公式，对样本表达蛋白和样本同时进行层次聚类（插页Ⅶ图6C）。通过蛋白表达量层次聚类树图和蛋白表达量层次聚类热图可见正常组、模型组、三七低剂量组、三七高剂量组、阳性对照组均有2个或以上的样品聚集，说明上述各组表达模式组内较接近。

2.4 差异蛋白筛选统计分析

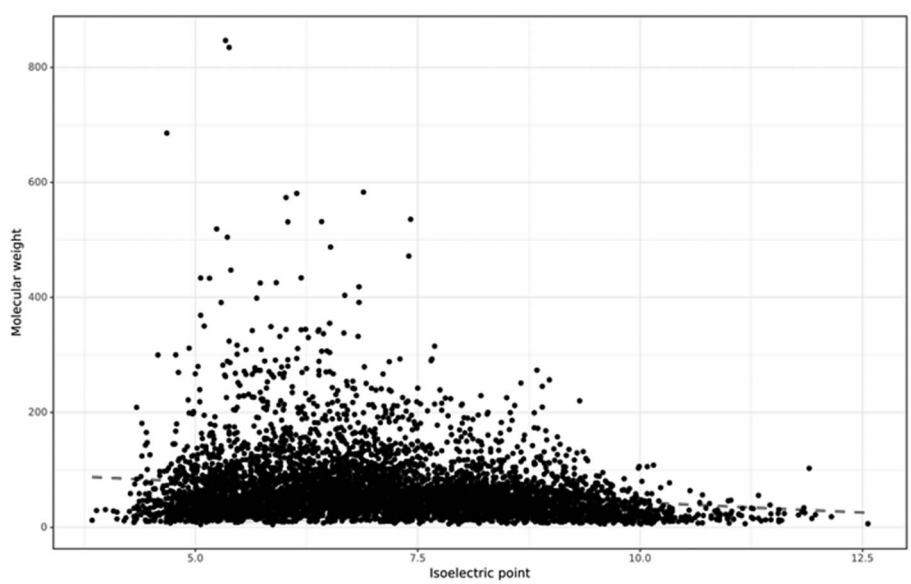
将每个蛋白在两组相互比较的样本中所有生物学测量均值的比值作为差异倍数（fold change，FC）。FC绝对值越高差异越显著。各组间差异蛋白统计分析如表1所示。

表1 差异蛋白表达

两组比对	上调	下调	总差异数
M vs N	146	332	478
LD vs M	62	49	111
MD vs M	76	104	180
HD vs M	267	210	477
LD vs N	282	484	766
MD vs N	217	431	648
HD vs N	459	607	1066
P vs N	394	628	1022
P vs LD	54	47	101
P vs MD	121	95	216
P vs HD	221	264	485
HD vs MD vs LD vs M vs N	/	/	1143
P vs HD vs MD vs LD vs M vs N	/	/	1242

注：N为正常对照组；M为模型组；LD为三七低剂量组；MD为三七中剂量组；HD为三七高剂量组；P为阳性对照组。

为了进一步分析三七对肾纤维化的影响，选取模型组与正常组以及三七中剂量组与模型组对比差异表达蛋白列出数据如表2、表3所示；差异蛋白火山图及热图如插页Ⅷ图7所示。对模型组与正常组相比及三七中剂量组与模型组对比差异表达蛋白进行交集分析如插页Ⅷ图8所示，共分出得到7个三七可能作用的模型诱导变化差异的蛋白：RT1－Ba、Gtf2f2、Gimap4、Loc681410、P3h1、Cnpy4和Pdcd11，具体信息如表4所示。



注：X轴示鉴定蛋白等电点Isoelectric point（pI），Y轴示鉴定蛋白分子量Molecular weight（MW）。
红色虚线为散点趋势回归线，该回归线斜率越接近于0，提示分子量与等电点越接近正常分布。

图3 蛋白分子量与pI等电点散点图

表 2 模型组 VS 正常对照组差异蛋白列表(部分)

基因名称	M 均值	N 均值	log2_FC	*P* 值
Actn3	2 270 454.34	19 353 392.07	-3.058 893 689 053 568 7	0.038 704 001 359 037 490 00
Tmem144	43 296 294.78	5 492 714.60	2.978 195 629 681 652 0	0.043 828 324 229 953 065 00
Smim24	8 357 310.80	59 997 164.39	-2.836 501 267 717 120 6	0.016 804 100 123 452 386 00
Cd81	130 991 223.05	19 734 186.13	2.731 183 241 572 200 0	0.000 190 470 135 276 505 34
Gsr	68 150 872.12	11 317 495.57	2.589 763 486 984 977 3	0.042 393 214 240 128 480 00
Cyp2c11	11 349 147.43	68 371 647.71	-2.556 393 348 524 385 3	0.046 444 938 010 828 170 00
Pvalb	15 612 895.17	83 802 561.18	-2.395 928 676 331 139 0	0.007 239 166 878 898 701 00
A2m	14 428 021.17	2 869 096.35	2.330 558 400 030 802 6	0.027 876 811 979 023 357 00
RT1 - Ba	127 816 064.43	25 904 279.80	2.301 587 646 603 187 0	0.003 180 923 408 435 022 80
Cd63	36 929 758.34	173 705 401.60	-2.251 538 766 995 964 6	0.021 875 837 432 917 582 00
Golph3	61 787 107.36	299 439 819.56	-2.251 538 766 995 964 6	0.008 214 107 995 128 153 00
Ctsz	30 526 462.32	6 586 857.57	2.211 012 193 485 512 0	0.006 383 468 967 814 837 00
Scrn1	77 159 209.52	347 012 197.77	-2.184 424 571 137 427 5	0.023 776 573 181 181 117 00
Gtf2f2	4 894 545.25	22 038 203.77	-2.184 424 571 137 427 5	0.000 392 638 061 863 824 10
Gimap4	72 025 224.04	15 956 626.64	2.173 127 433 480 656 3	0.008 363 475 048 171 866 00
Lgals3bp	46 643 924.02	10 410 948.65	2.163 498 732 282 879 4	0.013 188 180 247 540 201 00
Acta1	6 385 608.24	28 295 699.73	-2.120 294 233 717 711 8	0.022 730 797 390 033 890 00
Pdcd11	8 567 384.61	3 536 754.85	1.275 007 047 499 869 8	0.012 057 696 212 991 837 00
P3h1	18 116 874.14	49 780 017.78	-1.473 931 188 332 412 4	0.004 675 209 552 196 090 00
Cnpy4	23 204 597.66	8 808 912.73	1.395 062 799 517 577 7	0.039 261 129 235 503 590 00
LOC681410	20 970 862.79	60 474 493.35	-1.514 573 172 829 758 5	0.046 805 994 002 032 400 00

注:N 为正常对照组;M 为模型组。

表 3 三七中剂量组 VS 模型组差异蛋白列表(部分)

基因名称	MD 均值	M 均值	log2_FC	*P* 值
Myo1f	2 259 348.85	2 270 454.34	-2.836 501 267 717 120 6	0.028 531 850 071 460 690 0
H1 - 1	6 519 369.33	43 296 294.78	-2.836 501 267 717 120 6	0.012 073 853 817 977 391 0
Bid	37 387 623.06	8 357 310.80	-2.473 931 188 332 412 0	0.002 375 987 222 535 338 0
Man1a1	83 988 657.41	130 991 223.05	2.419 538 891 513 784 8	0.049 397 331 745 678 020 0
Mvd	56 908 034.58	68 150 872.12	2.198 494 153 639 083 4	0.041 108 655 300 419 010 0
Gsto1	1 887 438.72	11 349 147.43	-2.184 424 571 137 427 5	0.025 025 233 479 781 120 0
Akt1s1	22 063 938.31	15 612 895.17	2.150 559 676 575 381 4	0.018 650 774 260 188 230 0
Agrn	12 723 476.12	14 428 021.17	2.147 306 698 780 293 6	0.045 154 976 445 969 830 0
Lmod1	2 853 520.95	36 929 758.34	-2.000 000 000 000 000 0	0.006 803 148 987 504 981 0
Akr1b8	69 442 904.85	61 787 107.36	-2.000 000 000 000 000 0	0.027 956 417 122 435 980 0
Col4a5	2 393 779.73	30 526 462.32	-1.943 416 471 633 632 4	0.045 095 598 188 169 606 0
Sdf4	1 764 721.88	77 159 209.52	-1.943 416 471 633 632 4	0.003 604 258 407 996 855 0
Usp7	1 124 686 067.03	4 894 545.25	1.867 896 463 992 655 0	0.047 955 316 457 312 760 0
RT1 - Ba	35 804 047.55	127 816 064.43	-1.836 501 267 717 120 4	0.008 320 130 918 151 678 0
Gtf2f2	17 036 995.44	4 894 545.25	1.799 087 306 074 003 6	0.022 695 050 837 067 090 0
Cnpy4	5 332 635.92	23 204 597.66	-2.120 294 233 717 711 8	0.002 269 919 918 404 743 8
Pdcd11	3 343 859.73	8 567 384.61	-1.358 453 970 912 476 3	0.010 802 540 710 225 180 0
P3h1	7 172 107.81	18 116 874.14	-1.321 928 094 887 362 2	7 172 107.810 000 000 000 000 000 0
Gimap4	30 831 494.50	72 025 224.04	-1.217 591 435 072 627 0	0.020 270 072 193 526 424 0
LOC681410	61 369 389.44	20 970 862.79	1.550 900 664 647 523 4	0.047 888 574 806 612 905 0

注:M 为模型组;MD 为三七中剂量组。

2.5 差异蛋白 GO 富集分析

模型组与正常组相比及三七中剂量组与模型组对比 GO 富集分析条形图如插页Ⅸ图 9,根据富集结果,按照富集分析的显著性 *P* 值从小到大排序,重点筛选与线粒体功能相关的富集功能条目绘制条形图。

模型组与正常组相比,细胞成分富集项表明,与线粒体有关的差异蛋白位于线粒体呼吸链复合体Ⅳ、线粒体相关内质网膜、线粒体膜、线粒体内膜;与线粒体有关的差异蛋白分子功能主要包括柠檬酸盐跨膜转运蛋白活性、细胞色素 C 氧化酶活性、NAD + 辅助因子底物、氧化还原酶活性;与线粒体有关的生物学过程主要有柠檬酸转运、线粒体去极化调节、线粒体细胞色素 C 氧化酶组装、线粒体释放细胞色素 C 的正向调控、呼吸链复合体Ⅳ装配、线粒体电子传递,细胞色素 C 向氧传递、线粒体膜通透性的调节参与程序性坏死细胞死亡等。

表 4 三七可能作用的模型诱导变化差异的蛋白信息

蛋白编号	基因名称	蛋白名称
Q6MGA0	RT1 – Ba	MHC class Ⅱ antigen (RCG60724, isoform CRA_a) (RT1 class Ⅱ, B alpha) (RT1 class Ⅱ, locus Ba) (RT1 – Ba Rano class Ⅱ histocompatibility antigen, B alpha chain)
Q01750	Gtf2f2	General transcription factor IIF subunit 2 (EC 3.6.4.12) (ATP – dependent helicase GTF2F2) (Transcription initiation factor IIF subunit beta)
Q8K3K9	Gimap4	GTPase IMAP family member 4 (Immunity – associated nucleotide 1 protein) (IAN – 1) (Immunity – associated protein 4)
D3ZNI3	Pdcd11	Programmed cell death 11
Q9R1J8	P3h1	Prolyl 3 – hydroxylase 1 (EC 1.14.11.7) (Leucine – and proline – enriched proteoglycan 1) (Leprecan – 1)
B1WC84	Cnpy4	Canopy 4 homolog (Zebrafish) (Canopy FGF – signaling regulator 4) (Uncharacterized protein RGD1307636_predicted)
F1M3H8	LOC681410	Hypothetical protein LOC681410

三七中剂量组与模型组对比,与线粒体有关的生物学过程主要有线粒体 ATP 合成耦合电子传递、活性氧代谢过程的负调控;细胞成分、分子功能富集未见明确与线粒体有关,可能与三七调控线粒体能量代谢有关。详见插页Ⅸ图 9。

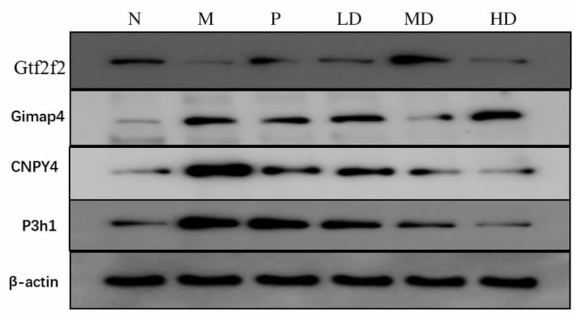
2.6 差异蛋白 KEGG 富集分析

差异蛋白数目分析:统计富集 KEGG 通路对应的上下调差异蛋白数目,并绘制柱形图。富集条形图:根据富集结果,按照富集分析的 *P* 值从小到大排序,默认取前 20 条富集通路绘制条形图,不足 20 条,显示全部结果。通路富集和弦图:采用和弦图来展示富集通路与差异蛋白之间的所属关系。按照 *P* 值从小到大排序,默认取前 10 条富集通路(该通路上差异蛋白数大于 5),制作和弦图。富集通路网络图:基于通路富集结果,构建通路与差异蛋白的相互作用关系网络图,展示差异蛋白与通路之间的联系。如插页Ⅸ图 10、插页Ⅹ图 11。KEGG 通路富集结果显示最为显著的是能量代谢通路 Metabolic pathways。

2.7 验证肾组织差异蛋白表达水平

因筛选的差异蛋白较为少见,目前有 4 个蛋白:Gtf2f2、CNPY4、P3h1、Gimap4 可联系到 WB 抗体,为进一步验证差异蛋白在肾纤维化肾脏中的表达情况,因此,采用 Western blot 的方法对 Gtf2f2、CNPY4、P3h1、Gimap4 这 4 种蛋白质进行验证。

差异蛋白质的 Western blot 验证结果如图 12 所示,非靶筛选和验证结果一致的蛋白质为:Gimap4、Gtf2f2、CNPY4,非靶筛选和验证结果不一致的有:P3h1。



注:N 为正常组;M 为模型组;LD 为三七低剂量组;MD 为三七中剂量组;HD 为三七高剂量组;P 为阳性对照组。

图 12 各组大鼠肾组织 Gtf2f2、CNPY4、P3h1、Gimap4 蛋白的表达

3 讨论

CKD 最终会导致肾功能衰竭的不可逆变化,是高病死率的主要健康问题之一。疾病早期无明显临床症状,直至发生严重损害。因此,强调在 CKD 的早期阶段更广泛地实施筛查和低成本治疗至关重要,一旦患者达到 ESKD,唯一的治疗选择是持续透析或肾移植,这两者都有非常高的成本。目前对肾功能的评估主要依赖于测量估计的肾小球滤过率,尽管已在临床环境中被广泛使用,但其早期发现和预测疾病进展的能力有限,因为它更多地反映了肾脏损害。肾组织有肾小球细胞、内皮细胞和小管细胞,蛋白组学检查具有明显的优势,提供了特定时间和地点的生物学信息,更“接近”疾病表型。

蛋白组学已运用于肾脏疾病的诊断与预后生物标志物的筛查。有学者[7]利用 CE – MS 技术,研究比较了 230 名 CKD 患者和 379 名肾功能正常的对照组的尿液,将 CKD 和健康对照之间的 273 个尿肽组合成一个称为 CKD273 的尿肽标记集合;CKD273 的主要成分包括胶原蛋白片段,可能表明了肾内细胞外基质的积累,以及参与炎症和组织修复的血源性蛋白片段。SIWY J 等[8]在分析 1180 名受试者的尿液样本时进一步采用了这种方法,通过支持向量机分析,可以区分 CKD 的 7 种不同病因。MAGALHÃES P 等[9]研究比较了 42 例肾脏活检的分析与使用尿液蛋白组学(CKD273 分类器)的结果,发现尿胶原蛋白碎片与活检材料纤维化程度之间的显著相关性。一项在 5/6 肾切除术 CKD 大鼠中聚焦于肾小球硬化蛋白质表达谱的研究[10],通过激光捕获显微解剖分离硬化和非硬化肾小球,通过 MALDI – TOF/MS 技术获得肾小球蛋白表达谱,并与来自正常基线肾切除术的对照肾小球进行比较。这项研究表明,特定的蛋白组学模式可以准确地分类非硬化性和硬化性肾小球。胸腺素 β4 被确定为促进肾小球硬化的关键蛋白。免疫染色分析显示,胸腺素 β4 在硬化性肾小球中表达增加,尤其是内皮细胞表达增加。这些发现表明胸腺素 β4 可以被认为是肾损伤的早期生物标志物,并可能导致硬化症。一项对糖尿病小鼠和非糖尿病小鼠肾小球进行的蛋白组学分析研究,共鉴定出 190 个蛋白,其中有 40 个蛋白的表达增加,包括过氧还蛋白 1、过氧还蛋白 3、谷胱甘肽过氧化物酶 1、SOD – 1 和乙二醛酶 I,即提示对氧化应激的适应性反应的变化[11]。

本研究应用 LC – MS 技术同时结合生物信息学分析,对各实验组动物肾组织进行蛋白组学检测分析。各组样本共鉴定出 6368 个蛋白,对其中的 5818 个蛋白进行了定量。肾纤维化模型与正常组相比差异具有统计学意义的共有 478 个蛋白,其中 146 个蛋白表达上调,332 个蛋白表达下调。三七中剂量组与模型组相比有 180 个差异蛋白,包括 76 个蛋白表达上调,104 个蛋白表达下调。进一步对三七中剂量组、模型组、正常组比较分析得出三七治疗可能作用的差异蛋白共 7 个:RT1 – Ba、Gtf2f2、Cnpy4、Pdcd11、P3h1、Gimap4 和 LOC681410。其中三七可能上调的蛋白为 Gtf2f2 和 LOC681410;可能下调的蛋白

为 RT1 - Ba、Cnpy4、Pdcd11、Gimap4、P3h1。RT1 - Ba 属于 MHC Ⅱ基因类 α 链副核苷酸,在自身免疫系统中发挥核心作用[12]。GTF2F2 是一种依赖于 ATP 的 DNA 解旋酶,它与另一种通用转录因子 GTF2F1 作为异源二聚体存在该复合物在转录的起始和延伸阶段都有活性,控制 RNA 聚合酶Ⅱ的活性[13]。Cnpy4 与细胞内信号通路相关的各种细胞过程有关,Cnpy4 的缺失会在体内和细胞中过度激活 hedgehog 转录通路,调节膜固醇脂质的水平[14]。PDCD11 是一种 NF - kB 结合蛋白,是 Fas 配体表达所必需的辅助因子,PDCD11 过表达可诱导 FasL 的转录,通过 Fas/FasL/caspase 死亡途径诱导细胞凋亡,临床上是脑卒中的独立危险因素[15]。人类 GIMAP 家族由 8 个基因组成,其中 7 个基因以功能蛋白的形式表达。研究发现,整个 GIMAP 家族在免疫系统的细胞中高度表达,并且与 T 细胞分化密切相关。与该家族的其他成员相比,GIMAP4 有两个独有的特征:有三磷酸鸟苷(guanosine triphosphate,GTP)酶活性和参与钙信号传导的钙调蛋白结合 IQ 结构域,其成为 Th 细胞研究中一个有趣的靶点。GIMAP4 调节早期分化的人 $CD4^+$ Th 淋巴细胞的细胞因子分泌,特别是对干扰素 - γ 的分泌有重要作用[16]。P3H1 蛋白的缺失是成骨不全的重要因素[17]。本研究利用非靶蛋白组学筛选出 7 个蛋白与三七可能作用于肾纤维化相关,采用 Western blot 方法对 Gtf2f2、CNPY4、P3h1、Gimap4 这 4 种蛋白质进行验证,结果显示 3 个蛋白与筛选结果一致,1 个蛋白不一致,表明凝胶图谱联合质谱鉴定结果真实可靠,差异蛋白真实存在,为开展三七治疗血瘀证肾纤维化相关靶标的筛选,提供了实验基础。目前,这 7 个差异蛋白在肾脏疾病中的作用研究处于空白阶段,三七调控 RT1 - Ba、Gtf2f2、Cnpy4、Pdcd11、Gimap4、LOC681410 和 P3h1 等蛋白的表达改善阿霉素致肾纤维化的具体机制需要进一步探讨,目前课题组正在进行初步的研究。

线粒体是体内腺嘌呤核苷三磷酸(Adenosine triphosphate,ATP)合成的主要场所,是能量代谢的“动力工厂”。肾脏富含线粒体,正常肾脏功能的维持需要消耗大量的能量,线粒体稳态对维持肾脏结构与功能起到关键性的作用[18]。线粒体氧化应激、过度分裂和融合、自噬异常、ATP 合成减少等功能障碍在 CKD 发生、发展中具有重要作用[19]。本项目的 KEGG 通路富集结果显示最为显著的是 Metabolic pathways。Metabolic pathways 包括糖酵解、糖异生、柠檬酸循环、脂肪酸生物合成、脂肪酸降解、氨基酸代谢、氧化磷酸化等多个能量代谢通路,是重要的能量代谢通路。GO 富集分析结果大部分涉及线粒体功能相关的生物信息。从而提示线粒体功能障碍参与血瘀证阿霉素大鼠肾纤维化进程,三七可能通过改善线粒体功能障碍延缓肾纤维化进程。其中具体的机制课题组正在进一步研究。

参考文献

[1] LIU B C, TANG T T, LV L L, et al. Renal tubule injury: a driving force toward chronic kidney disease[J]. Kidney Int, 2018, 93(3): 568 - 579.

[2] WILLIAM SCHNAPER H. The tubulointerstitial pathophysiology of progressive kidney disease[J]. Adv Chronic Kidney Dis, 2017, 24(2): 107 - 116.

[3] 陈艳琼, 陈明. 慢性肾衰竭“肾络瘀阻”的研究近况[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(72): 92 - 93.

[4] 吴光华, 黄岩杰, 李晓丽, 等. 三七活血与止血机制及其改善肾脏病血瘀证的作用特点[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(7): 3140 - 3142.

[5] 黄志敏, 黄仁发, 唐宇, 等. 三七注射液对阿霉素肾纤维化大鼠炎症启动因子和终止因子的影响[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(5): 175 - 178.

[6] 赵玲, 魏海峰, 李雅莉, 等. 从血液流变学的改变分析肾上腺素致血瘀证大鼠模型的建立[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2010, 8(2): 188 - 190.

[7] PONTILLO C, MISCHAK H. Urinary peptide - based classifier CKD273: towards clinical application in chronic kidney disease[J]. Clin Kidney J, 2017, 10(2): 192 - 201.

[8] SIWY J, ZÜRBIG P, ARGILES A, et al. Noninvasive diagnosis of chronic kidney diseases using urinary proteome analysis[J]. Nephrol Dial Transplant, 2017, 32(12): 2079 - 2089.

[9] MAGALHÃES P, PEJCHINOVSKI M, MARKOSKA K, et al. Association of kidney fibrosis with urinary peptides: a path towards non - invasive liquid biopsies? [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 16915.

[10] XU B J, SHYR Y, LIANG X B, et al. Proteomic patterns and prediction of glomerulosclerosis and its mechanisms[J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16(10): 2967 - 2975.

[11] BARATI M T, MERCHANT M L, KAIN A B, et al. Proteomic analysis defines altered cellular redox pathways and advanced glycation end - product metabolism in glomeruli of db/db diabetic mice[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2007, 293(4): F1157 - F1165.

[12] ETTINGER R A, MOUSTAKAS A K, LOBATON S D. Open reading frame sequencing and structure - based alignment of polypeptides encoded by RT1 - Bb, RT1 - Ba, RT1 - Db, and RT1 - Da alleles[J]. Immunogenetics, 2004, 56(8): 585 - 596.

[13] MINCHENKO O H, TSYMBAL D O, MINCHENKO D O, et al. Hypoxic regulation of *MYBL1 MEST TCF3 TCF8 GTF2B GTF2F2* and SNAI2 genes expression in U87 glioma cells upon IRE1 inhibition[J]. Ukr Biochem J, 2016, 88(6): 52 - 62.

[14] LO M, SHARIR A, PAUL M D, et al. CNPY4 inhibits the Hedgehog pathway by modulating membrane sterol lipids[J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 2407.

[15] YOSHIDA Y, WANG H, HIWASA T, et al. Elevation of autoantibody level against PDCD11 in patients with transient ischemic attack [J]. Oncotarget, 2018, 9(10): 8836 - 8848.

[16] HEINONEN M T, KANDURI K, LÄHDESMÄKI H J, et al. Tubulin - and actin - associating GIMAP4 is required for IFN - γ secretion during Th cell differentiation[J]. Immunol Cell Biol, 2015, 93(2): 158 - 166.

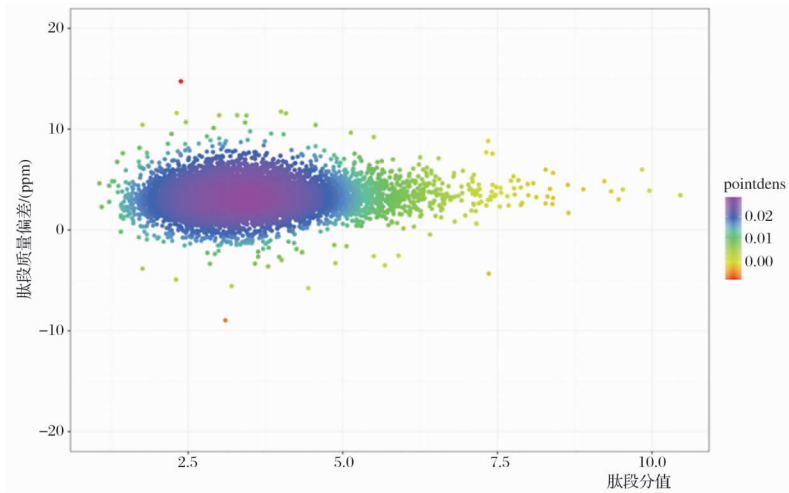
[17] WU J W, ZHANG W T, XIA L, et al. Characterization of PPIB interaction in the P3H1 ternary complex and implications for its pathological mutations [J]. Cell Mol Life Sci, 2019, 76(19): 3899 - 3914.

[18] LI Q, XING C Y, YUAN Y G. Mitochondrial targeting of herbal medicine in chronic kidney disease[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 632388.

[19] 张栩铭, 周嘉宝, 杨枫, 等. 线粒体功能障碍调控慢性肾脏病机制及中药治疗的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2024, 42(3): 198 - 202, 287 - 288.

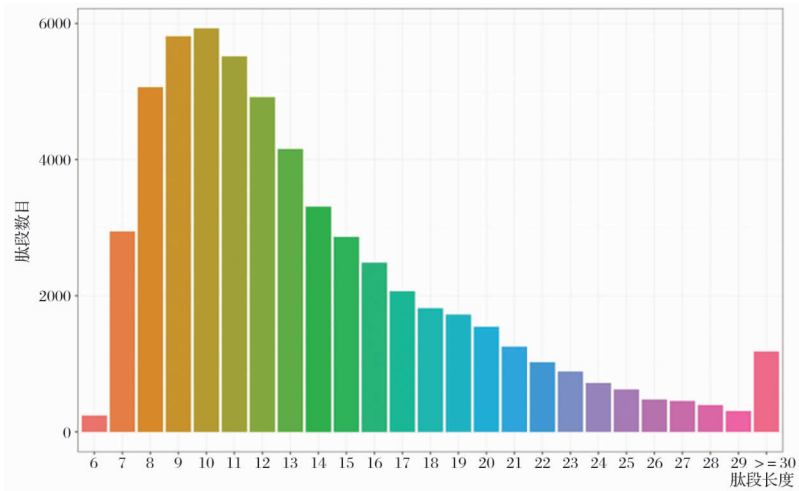
基于蛋白组学探讨三七改善血瘀证阿霉素肾纤维化模型大鼠的作用机制

（正文见 7－12 页）



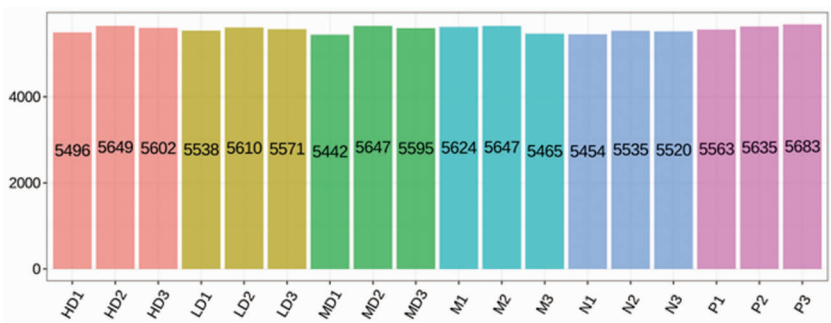
注：X 轴表示肽段分值，分值越高，可信度越高；Y 轴表示鉴定肽段比对质量偏差，图中颜色代表散点密度分布。

图 1　肽段质量偏移



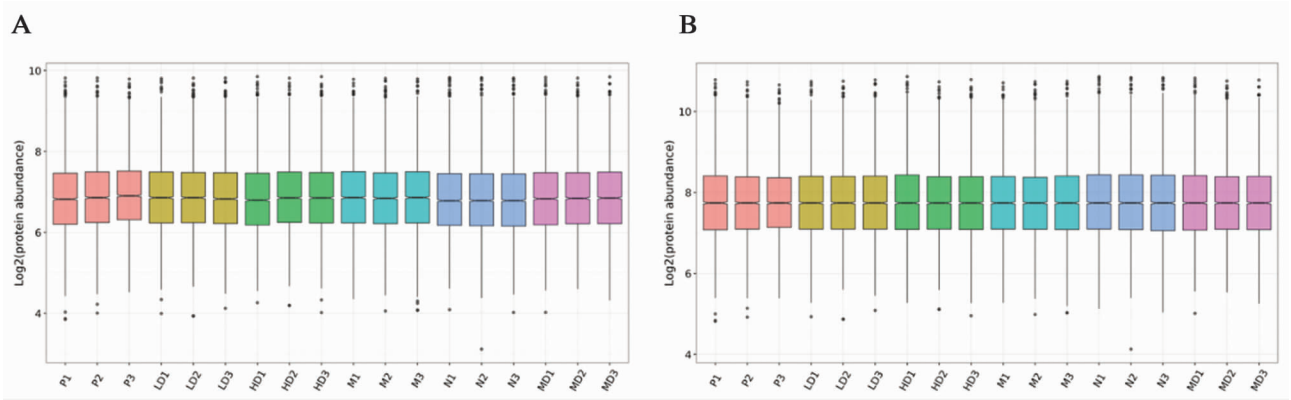
注：X 轴示肽段长度；Y 轴示当前肽段长度下肽段数目。

图 2　肽段长度分布



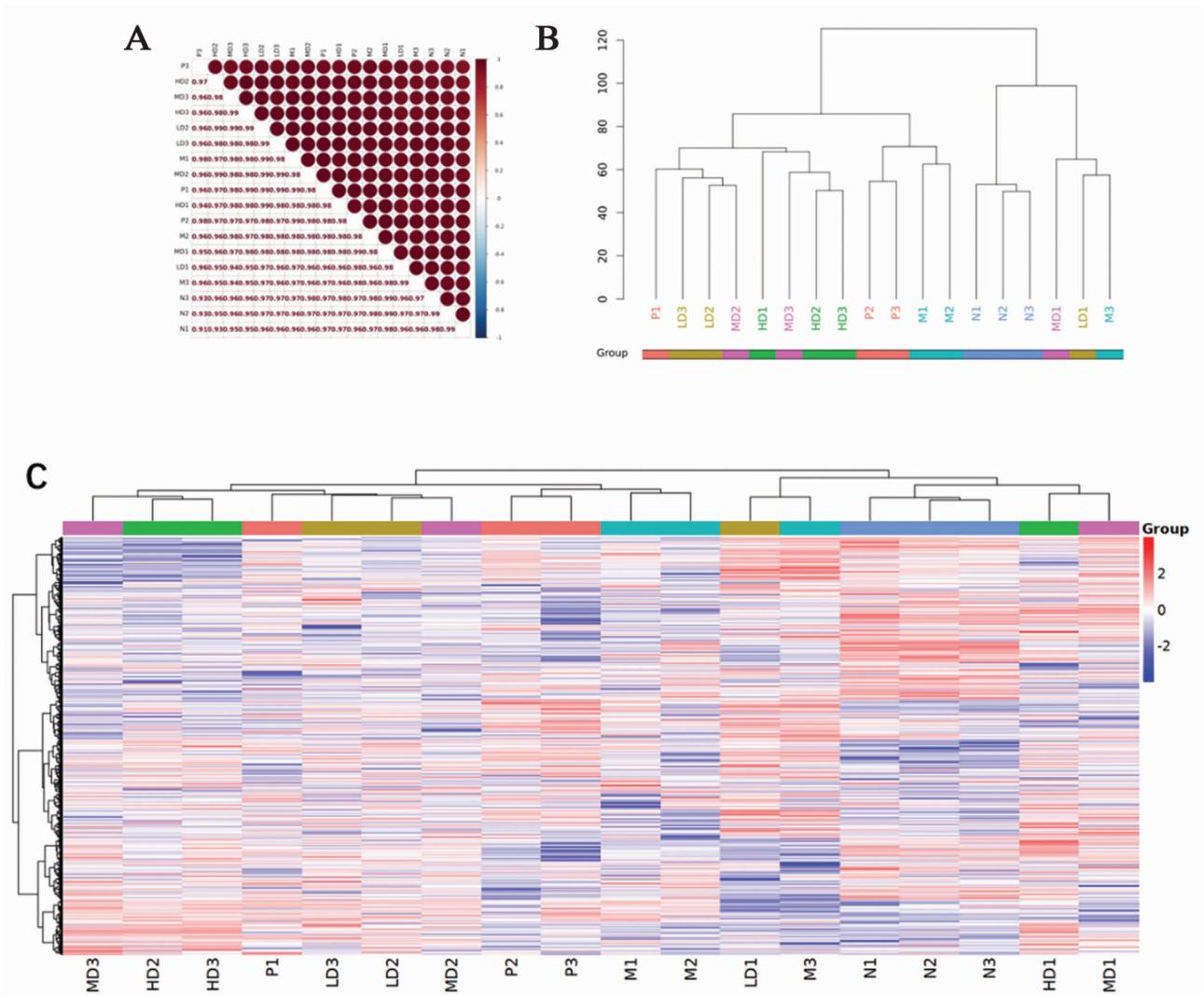
注：N 为正常组；M 为模型组；LD 为三七低剂量组；MD 为三七中剂量组；HD 为三七高剂量组；P 为阳性对照组。X 轴表示样本，Y 轴表示蛋白数目，颜色表示不同组别，柱形图上数字表示当前样本中鉴定蛋白数目。

图 4　样本中蛋白鉴定数目统计



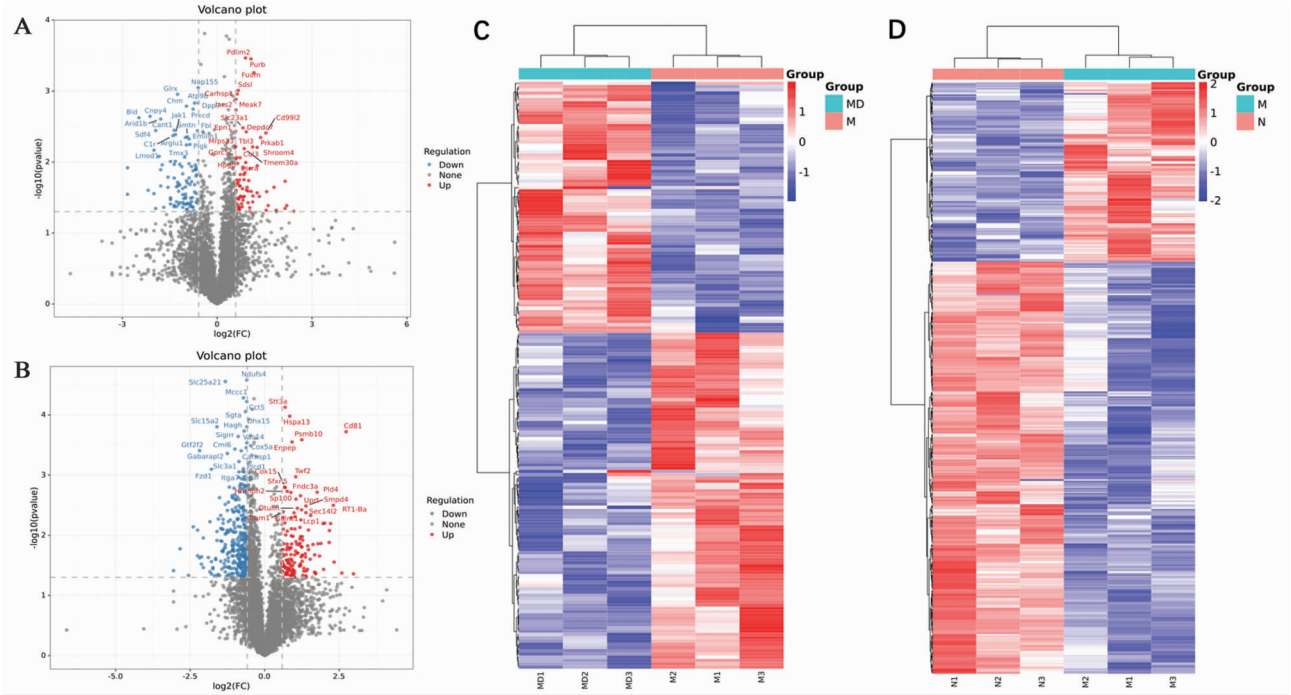
注：N 为正常组；M 为模型组；LD 为三七低剂量组；MD 为三七中剂量组；HD 为三七高剂量组；P 为阳性对照组。A 蛋白原始定量值分布；B 蛋白定量值矫正后分布。X 轴表示样本，Y 轴表示经过对数转换后的蛋白相对丰度。

图 5 蛋白定量值分布图



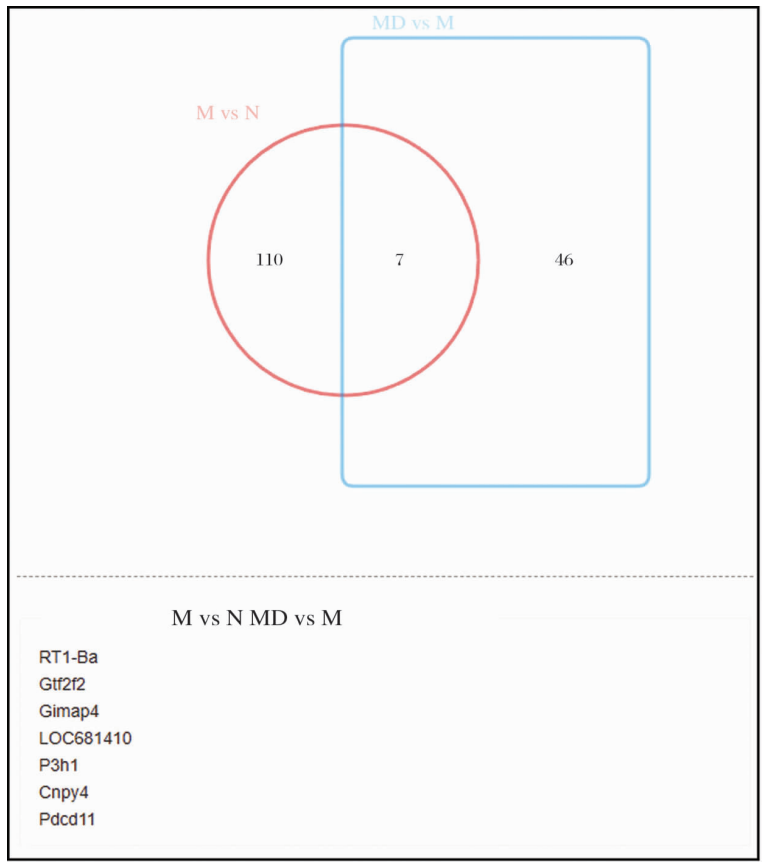
注：N 为正常组；M 为模型组；LD 为三七低剂量组；MD 为三七中剂量组；HD 为三七高剂量组；P 为阳性对照组。A 样本相关性列表；X 和 Y 轴分别表示样本。颜色表示相关性系数。颜色标尺中颜色越红表示正相关性越高，颜色越蓝表示负相关性越高。B 蛋白表达量层次聚类树图；X 轴代表样本，Y 轴代表蛋白的聚类分支及距离，样本间彼此靠得越近表示样本的表达谱越相似，颜色表示不同样本组别。C 蛋白表达量层次聚类热图；X 轴表示样本，Y 轴每列表示一个样本，每个横条表示一个蛋白，红色表示高表达，蓝色表示低表达。Y 轴左侧纵向树状图是蛋白聚类，横向树状图是样本聚类，聚类枝越短代表相似性越高。从纵向聚类可以看出样本间蛋白含量的表达模式。

图 6 蛋白表达的相似性



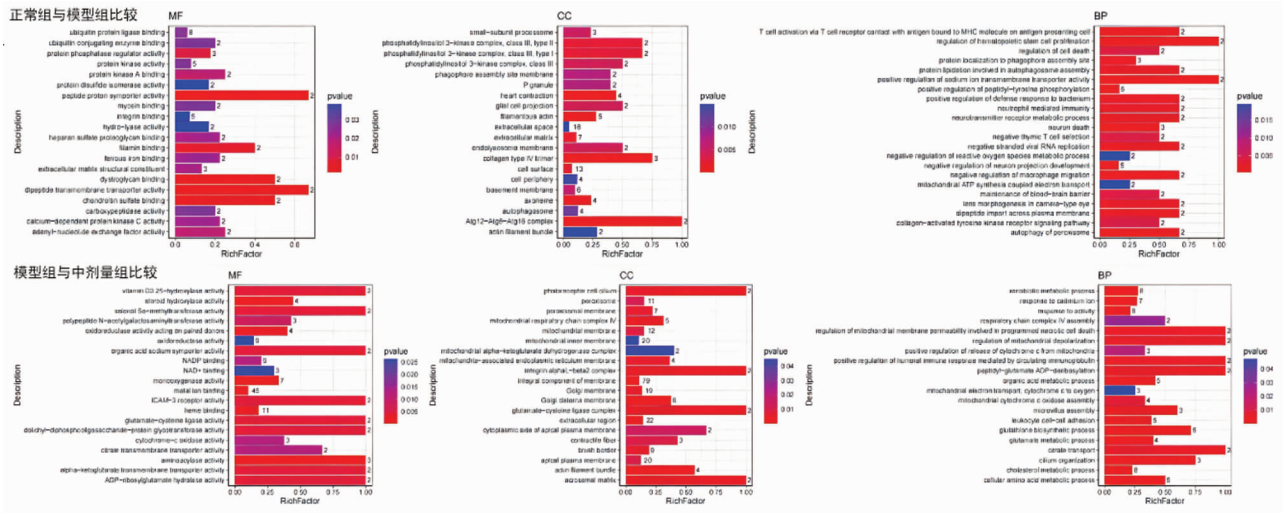
注：A 三七中剂量组 vs 模型组差异蛋白火山图；X 轴代表差异表达倍数，Y 轴代表统计显著性。B 模型组 vs 正常组差异蛋白火山图；X 轴代表差异表达倍数，Y 轴代表统计显著性。C 三七中剂量组（MD）vs 模型组（M）差异蛋白聚类热图；X 轴表示样本，Y 轴每列表示 1 个样本，每个横条表示 1 个蛋白。Y 轴左侧纵向树状图是蛋白聚类，横向树状图是样本聚类。D 模型组（M）vs 正常组（N）差异蛋白聚类热图。X 轴表示样本，Y 轴每列表示 1 个样本，每个横条表示 1 个蛋白。Y 轴左侧纵向树状图是蛋白聚类，横向树状图是样本聚类。

图 7 差异蛋白火山图和聚类热图



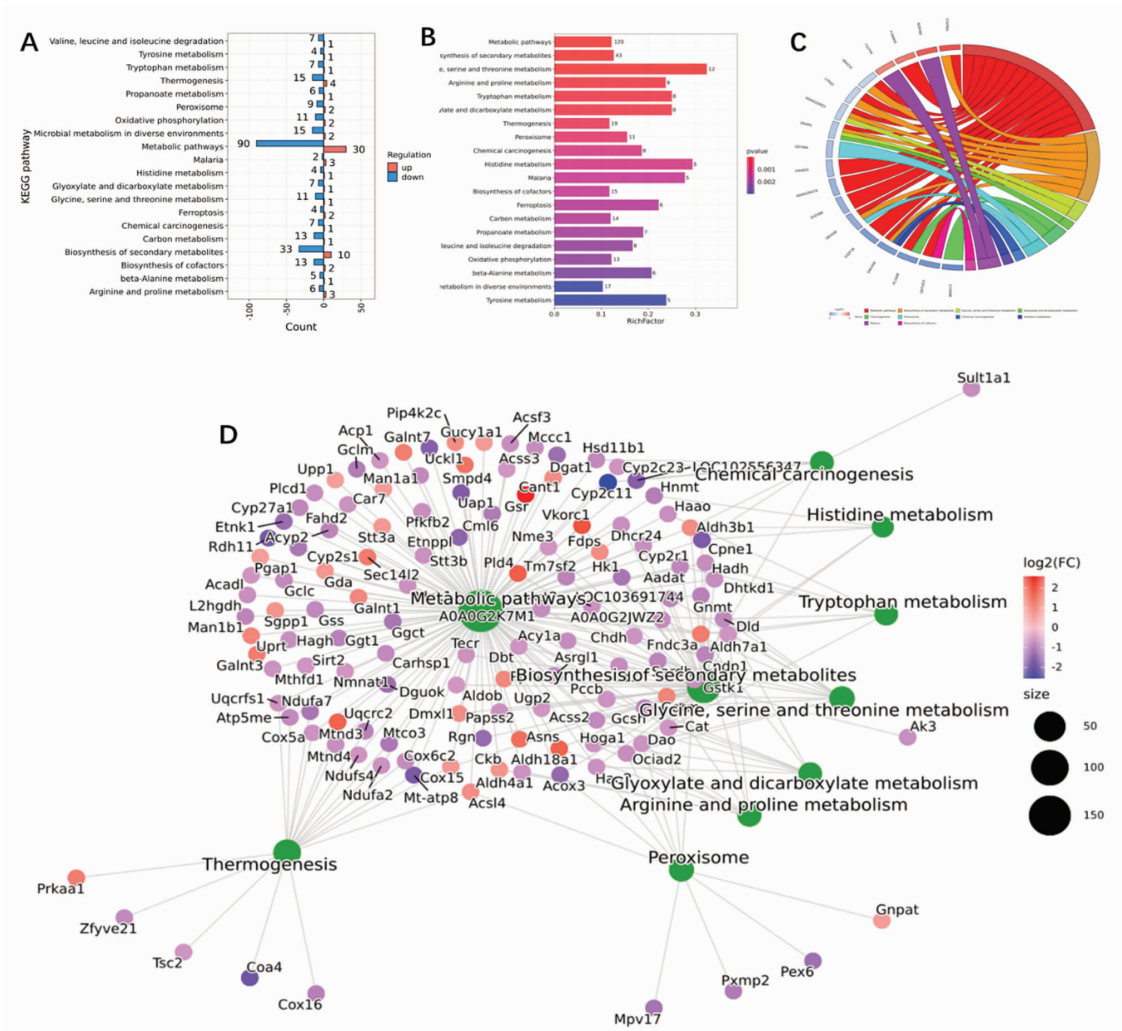
注：M 为模型组；N 为正常组；MD 为三七中剂量组。

图 8 模型组 vs 正常组与三七中剂量组 vs 模型组差异表达蛋白 Venn 图



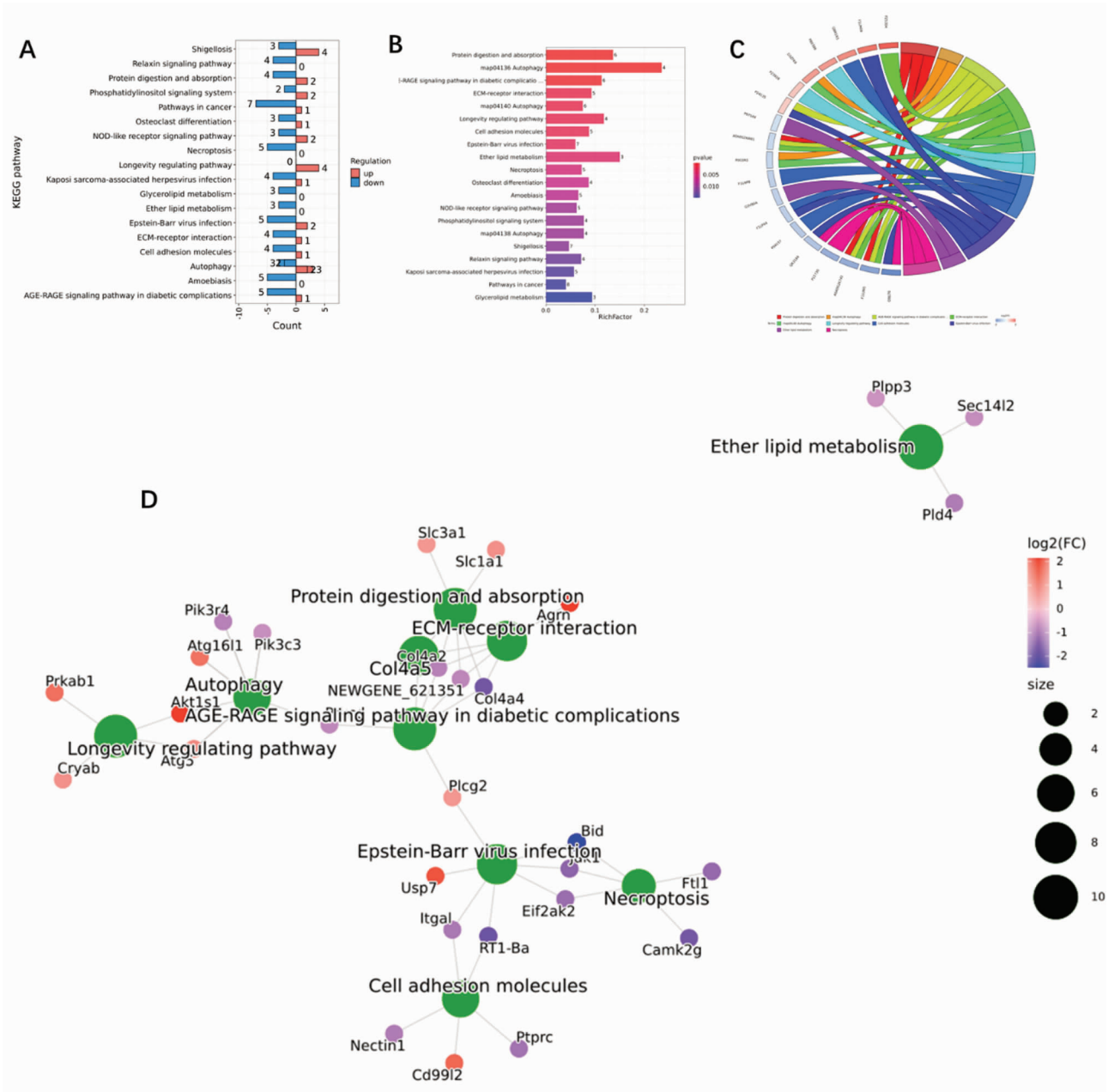
注：X 轴表示富集因子，Y 轴表示富集的 GO 条目。Rich Factor 指富集因子值，是注释上某一通路的前景值（差异蛋白个数）与注释上某一通路的背景值（所有蛋白个数）之商，数据越大，说明富集结果越明显；颜色代表 *P* 值，颜色越红表示富集越显著；图中数字表示 GO 条目上对应的差异蛋白数，BP 表示生物过程，CC 表示细胞组分，MF 表示分子功能。

图 9　GO 富集条形图



注：A 为 Pathway 富集对应上下调差异蛋白数目统计，X 轴表示差异蛋白数目（Count），Y 轴表示通路名称（Pathway）。B 为 Pathway 富集条形图，X 轴通常代表统计显著性，Y 轴表示通路名称；C 为 Pathway 富集条目与差异蛋白和弦图；D 为 Pathway 富集与差异蛋白网络图。

图 10　模型组 VS 正常组 KEGG 富集分析



注：A 为 Pathway 富集对应上下调差异蛋白数目统计，X 轴表示差异蛋白数目（Count），Y 轴表示通路名称（Pathway）。B 为 Pathway 富集条形图，X 轴通常代表统计显著性，Y 轴表示通路名称；C 为 Pathway 富集条目与差异蛋白和弦图；D 为 Pathway 富集与差异蛋白网络图。

图 11　三七中剂量组 VS 模型组 KEGG 富集分析