

## 论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2023.14.003

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms2/detail/50.1097.R.20230706.1625.002.html\(2023-07-07\)](https://kns.cnki.net/kcms2/detail/50.1097.R.20230706.1625.002.html(2023-07-07))

## Serp1b1a 蛋白表达与小鼠酒精性脂肪肝发生及白藜芦醇干预作用的相关性研究\*

韩敏<sup>1</sup>, 易旭<sup>2△</sup>

(1. 贵州中医药大学基础医学院, 贵阳 550025; 2. 贵州中医药大学第二附属医院临床医学实验室, 贵阳 550003)

**[摘要]** **目的** 探讨白藜芦醇干预前后酒精性脂肪肝(AFLD)小鼠肝组织丝氨酸蛋白酶抑制剂 B1a(Serp1b1a)蛋白的表达变化, 以及其与 AFLD 发生和白藜芦醇干预作用的相关性。**方法** 将 9 只雄性 C57BL/6J 小鼠分为正常对照组(C 组)、模型组(M 组)和白藜芦醇干预组(R 组), 每组各 3 只。小鼠自由摄取乙醇液体饲料 15 d 后, 灌胃给予 1 次 95% 乙醇制备 AFLD 小鼠模型, 经鉴定模型制备成功后, R 组灌胃给予白藜芦醇溶液(400 mg/d)。9 d 后收集各实验小鼠肝组织, 采用 4D 非标记定量蛋白质组学方法鉴定并定量肝组织中 Serp1b1a 蛋白表达水平。经 UniProt-GOA 数据库的基因本体论(GO)分类了解蛋白质的生物学作用。使用基于质谱的靶向蛋白质组定量技术验证 M 组小鼠肝组织中 Serp1b1a 蛋白表达。**结果** 运用 4D 非标记定量蛋白质组学方法鉴定, 各实验小鼠肝组织中均表达 Serp1b1a 蛋白。与 C 组比较, M 组小鼠肝组织 Serp1b1a 蛋白相对表达水平下调 0.08 倍( $P=0.002$ ); 与 M 组比较, R 组小鼠 Serp1b1a 蛋白相对表达水平上调 6.00 倍( $P=0.004$ )。GO 富集分析显示, Serp1b1a 蛋白涉及 8 个分子功能、20 个细胞组成和 59 个生物过程。靶向蛋白质组定量技术验证结果显示, M 组小鼠肝组织 Serp1b1a 蛋白表达水平较 C 组下调 0.21 倍, 其表达模式与 4D 非标记定量蛋白质组学定量结果一致。**结论** Serp1b1a 表达水平的变化参与了 AFLD 的发生及白藜芦醇的抗 AFLD 作用。

**[关键词]** 酒精性脂肪肝; 白藜芦醇; 丝氨酸蛋白酶抑制剂 B1a; 自噬; 叉头框蛋白 O1; 信号转导及转录激活因子 3

[中图法分类号] R285.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2023)14-2094-07

## Study on correlation between Serp1b1a protein expression with alcoholic fatty liver occurrence in mice and resveratrol intervention effect\*

HAN Min<sup>1</sup>, YI Xu<sup>2△</sup>

(1. School of Basic Medicine, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou 550025, China; 2. Clinical Medical Laboratory, Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou 550003, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the change of serine protease inhibitor differentiation branch B1a (Serp1b1a) protein expression in liver tissue of alcoholic fatty liver disease (AFLD) mice before and after the resveratrol intervention, and its correlation with the AFLD occurrence and resveratrol intervention effect. **Methods** Nine male C57BL/6J mice were divided into the normal control group (group C), model group (group M) and resveratrol intervention group (group R), 3 cases in each group. After 15 d free intake of ethanol liquid feed, the mice were given 95% ethanol once to prepare the AFLD mouse model. After successful preparation of the model by identification, the resveratrol solution (400 mg/d) was given by gavage in the group R. After 9 d, the liver tissues of experimental mice were collected, and the Serp1b1a protein expression level in the liver tissues was verified and quantified by using 4D non-label quantitative proteomics method. The biological role of proteins was understood by using gene ontology (GO) classification through the UniProt-GOA database. The Serp1b1a protein expression in liver tissues of mice in the group M was validated by using mass spectrometry based targeted proteomic quantification technology. **Results** The identification by using 4D non-label quantitative proteomics technology showed that the liver tissues of all experimental mice expressed

\* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81660752)。 作者简介: 韩敏(1996-), 在读硕士, 主要从事肝病的发生与防治基础研究。

△ 通信作者, E-mail: yixu2013@yeah.net。

SerpinB1a protein. Compared with the group C, the relative expression level of SerpinB1a protein in liver tissues of mice in the group M was down-regulated by 0.08 fold ( $P=0.002$ ). Compared with the group M, the relative expression level of SerpinB1a protein in liver tissues of mice in the group R was up-regulated by 6.00 fold ( $P=0.004$ ). The GO enrichment analysis indicated that the SerpinB1a protein was involved in 8 molecular functions, 20 cellular compositions and 59 biological processes. The targeted proteome quantitative technology verification results showed that the SerpinB1a protein expression level in liver tissues of mice in the group M was down-regulated by 0.21 fold compared with the group C, and its expression pattern was consistent with the 4D non-label quantitative proteomics quantitative results. **Conclusion** SerpinB1a expression level change might be involved in the occurrence of AFLD and resveratrol anti-AFLD effect.

**[Key words]** alcoholic fatty liver disease; resveratrol; SerpinB1a; autophagy; forkhead box protein O1; signal transduction and activator of transcription 3

研究表明,长期慢性酒精摄入能够通过异常酒精代谢导致的还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸/烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH/NAD<sup>+</sup>)百分比增加、氧化应激诱导、脂质代谢紊乱、抑制自噬等机制诱发肝细胞的脂肪变性<sup>[1]</sup>,从而形成酒精性脂肪肝(alcoholic fatty liver disease, AFLD)<sup>[2]</sup>。自噬作为各种生理和疾病条件下细胞适应和生存的一种重要机制,在维持细胞稳定性中有着重要作用<sup>[3]</sup>。研究发现,慢性酒精摄入能够激活 FK-506 结合蛋白(FKBP)-哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物 1(mTORc1)和抑制腺苷酸激活蛋白激酶表达,通过抑制下游的 Unc-51 样激酶 1(ULK1)复合体形成导致自噬的抑制,出现肝细胞中脂质的积累、线粒体稳态失调和核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NLIP3)炎症小体活化增多等从而促进脂肪肝的形成<sup>[4-5]</sup>。因此,调节自噬是 AFLD 的一种潜在治疗策略,这一认识已在白藜芦醇通过增加自噬体数量,上调微管相关蛋白 1 轻链 3-II(LC3 II)、Beclin1 表达,下调 p62 蛋白表达发挥抗 AFLD 的治疗作用中得到验证<sup>[6]</sup>。研究发现,酒精暴露还可以抑制自噬激活的另一重要调节分子叉头框蛋白 O1(FOXO1)的表达,导致固醇调节元件结合蛋白-1c(SREBP-1c)与脂肪酸合成酶表达水平上调,从而增加脂质生成和诱导肝细胞坏死<sup>[7-9]</sup>。但酒精如何介导 FOXO1 表达抑制仍不清楚。LIANG 等<sup>[10]</sup>发现,主要在肝脏合成的丝氨酸蛋白酶抑制剂 B1a(SerpinB1a)表达抑制会下调 FOXO1 表达水平,减弱 FOXO1 的抗氧化应激作用,从而加重糖尿病性肾病中的氧化应激反应。这提示 SerpinB1a 对 FOXO1 表达水平的正向调控作用,但 SerpinB1a 是否参与 AFLD 的发生尚缺少文献报道。已知磷酸化信号转导和转录激活因子 3(pSTAT3)可以通过对 Bcl-2 家族成员、自噬相关基因 BECN1、磷脂酰肌醇 3 激酶 C3(PIK3C3)等与自噬相关基因的转录调节参与自噬的抑制或活化<sup>[11]</sup>。运用乙醛脱氢酶 2(ALDH2)基因敲除小鼠,发现激活 STAT3 可以通过减弱 SREBP-1c 基因转录、抑制脂肪酸合成和影响脂肪肝发展来减轻乙醇摄入引起的脂肪肝<sup>[12]</sup>。此外,pSTAT3 在 AFLD 中通过上调自

噬相关基因 5(ATG5)的表达促进自噬以发挥保护作用<sup>[13]</sup>。XU 等<sup>[14]</sup>通过慢病毒转染抑制猪胰腺细胞 SerpinB1a 蛋白表达,引起 pSTAT3 表达水平下调,相反,过表达 SerpinB1a 蛋白则可以通过上调 pSTAT3 表达来调节细胞周期以促进猪胰腺细胞增殖,提示了 SerpinB1a 与 pSTAT3 存在正调控关系。但尚未见肝脏相关疾病中有关 SerpinB1a 与 pSTAT3 调控关系的研究报道。

基于 AFLD 病理阶段存在 FOXO1 和 pSTAT3 介导的肝脏自噬抑制作用及其分别与 SerpinB1a 的调控关系的研究认识,设想 SerpinB1a 在肝组织表达水平的变化可能与 AFLD 的发生有关。因此,本文采用 4D 非标记定量蛋白质组学技术鉴定、分析了 SerpinB1a 蛋白在 AFLD 小鼠肝组织中的表达水平及其在白藜芦醇抗 AFLD 干预机制中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

选取雄性无特殊病原体(SPF)级 C57BL/6J 小鼠 9 只[北京唯尚立德, SCXK(京)2016-0009],体重 20~24 g,在有适宜温度、湿度、光照的独立通风笼具(IVC)系统的动物房内饲养。将小鼠随机分为 3 组:正常对照组(C 组)、模型组(M 组)、白藜芦醇干预组(R 组),每组各 3 只。

#### 1.1.2 主要试剂

95%乙醇(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);胰酶[普洛麦格(北京)生物技术有限公司];丙酮(浙江汉诺化工科技有限公司);蛋白酶抑制剂(美国 Merck Millipore 公司);碘乙酰胺、尿素、烟酰胺、二硫苏糖醇、三氯乙酸及四乙基溴化铵(美国 Sigma 公司);甲酸(美国 Fluka 公司);去乙酰化酶抑制剂(美国 MedChemExpress 公司);乙腈(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);超纯水(美国 Fisher Chemical 公司)等。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 AFLD 小鼠模型建立及白藜芦醇干预

参考文献[15]方法进行 AFLD 模型制备,即使用江苏南通特洛菲标准型 Lieber-DeCarli 乙醇液体、对照液体饲料适应性喂养 5 d 后,自由进食 10 d 乙醇液体饲料,第 16 天灌胃给予 1 次 95%乙醇。经鉴定模型制备成功后,按 1 次/d、400 mg/次灌胃给予白藜芦醇溶液(美国 Sigma 公司,使用灭菌的 30% Kolliphor HS15 溶液配制),9 d 后收集肝组织标本,置于 -80 °C 超低温冰箱中以备蛋白质组学检测用。

### 1.2.2 SerpinB1a 蛋白的 4D 非标记定量蛋白质组学分析

#### 1.2.2.1 鉴定思路

构建 UniProt 数据库来源的小鼠肝组织标本特异性蛋白数据库,进行标本总蛋白提取和胰酶酶解后的蛋白肽段制备,经基于高效液相色谱-质谱联用的 4D 非标记定量蛋白质组学技术获得并分析标本中肽段的质量与信号强度,以及肽段碎裂后碎片离子的质量和信号强度。利用 Maxquant 软件(v1.6.15.0)进行二级质谱数据的检索,通过算法打分过滤后获得正确匹配的理论肽段序列。

#### 1.2.2.2 肝组织中总蛋白提取、胰酶消化

称取适量小鼠肝组织样品于液氮中充分研磨成粉状并转移至 5 mL 的离心管。然后,加入 4 倍体积的组织裂解液(含 50 mmol/L 烟酰胺,3 μmol/L 去乙酰化酶抑制剂,1%蛋白酶抑制剂及 8 mol 尿素)超声下裂解。在 4 °C 下,12 000×g 离心 10 min,去除剩余碎片,收集上清液,采用 BCA 法测定蛋白质水平。在胰蛋白酶消化过程中,首先向离心管中加入适量标准蛋白,再加入裂解液以调整体积至一致,缓慢向其中加入 20%的三氯乙酸,利用涡旋混匀仪振荡、混匀,4 °C 静置 2 h 以充分沉淀。4 500×g 离心 5 min 后,用预冷的丙酮 3 次洗涤所得蛋白沉淀,晾干后加入 200 mmol/L 的四乙基溴化铵并于超声仪中充分打散,经酶底比 1:50(m/m)的胰酶消化过夜。先后加入 5 mmol/L 二硫苏糖醇 56 °C 还原 30 min、11 mmol/L 碘乙酰胺室温暗孵育 15 min。

#### 1.2.2.3 液相色谱-质谱联用分析

用 NanoElute 超高效液相系统分离溶解于液相色谱流动相 A 相(含 2%乙腈和 0.1%甲酸)中的样品蛋白肽段。配制含 0.1%甲酸和 100%乙腈溶液的流动相 B,以 0~1 min,2%~5% B; >1~76 min, >5%~27% B; >76~82 min, >27%~35% B; >82~86 min, >35%~85% B 梯度,300 nL/min 流速洗脱多肽。分离后的多肽被注入 Capillary 离子源(电压 1.75 kV)中进行电离和随后的飞行时间(time-of-flight, TOF)质谱 timsTOF Pro 分析。采用高分辨的 TOF 质谱检测和分析肽段母离子及其二级碎片。参考文献[16]方法进行二级质谱扫描和数据收集。

#### 1.2.2.4 定量分析

根据质谱数据的搜库分析结果给出的每个肽段

在不同样品中的信号强度信息计算蛋白的相对定量。即首先将信号强度值(I)通过中心化变化后,按公式  $R_{ij} = I_{ij} / \text{Mean}(I_j)$  得到肽段在不同样品中的相对定量值(R),i 表示样品,j 表示肽段;然后采用中位数归一化方法对得到的肽段相对定量值进行校正(NR)以消除不同样品在质谱检测中上样量的系统误差,计算公式:  $NR_{ij} = R_{ij} / \text{Median}(R_i)$ ;最后采用蛋白对应特异性肽段相对定量值的中值表示蛋白的相对定量值。计算公式:  $R_{ik} = \text{Median}(NR_{ij}, j \text{ in } k)$ ,k 表示蛋白,j 表示蛋白所属的特异性肽段。分别采用 Person 相关性、主成分分析和相对标准差 3 种统计分析方法评估蛋白定量重复性。

#### 1.2.2.5 SerpinB1a 蛋白基因本体论(GO)功能富集分析

采用 UniProt-GOA 数据库的 GO 分类分析方法,从分子功能、细胞组成和生物进程等角度对 SerpinB1a 蛋白的生物学作用进行注释,并结合当前 AFLD 发生机制相关国内外研究文献推测涉及 AFLD 发生、发展的内容。

### 1.2.3 SerpinB1a 蛋白表达的验证

#### 1.2.3.1 总体思路

采用基于质谱技术的靶向蛋白质组定量分析方法。将上述蛋白组学获得的含 SerpinB1a 蛋白的肽段分别进行 EASY-nLC 1000 超高效液相系统分离和电离后的 Q-Exactive™ Plus 质谱分析,经 Max-Quant 软件(v1.6.15.0)数据库搜索后进行数据处理。

#### 1.2.3.2 液相色谱-质谱联用分析

SerpinB1a 蛋白肽段来自上述蛋白组学剩余肽段,经液相色谱流动相 A 相(含 0.1%甲酸和 2%乙腈的水溶液)溶解后,使用 EASY-nLC 1000 超高效液相系统进行分离。流动相 B 为含 0.1%甲酸和 90%乙腈的水溶液。液相梯度设置:0~16 min,7%~25% B; >16~22 min, >25%~35% B; >22~26 min, >35%~80% B; >26~30 min, >80% B,流速维持在 500 nL/min。肽段经由超高效液相系统分离后被注入纳米喷雾电离(NSI)离子源中进行电离,然后用 Q Exactive™ Plus 质谱进行分析。离子源电压设置为 2.1 kV,肽段母离子及其二级碎片都使用高分辨的 Orbitrap 进行检测和分析。一级质谱扫描范围设置为 360~1 020 m/z,扫描分辨率设置为 70 000;二级质谱 Orbitrap 扫描分辨率设置为 17 500。数据采集模式使用数据非依赖型扫描(DIA)程序,高能碰撞离解(HCD)碰撞池的碎裂能量设置为 27。一级质谱自动增益控制(AGC)设置为 3E6,最大离子注入时间(maximum IT)设置为 50 ms;二级质谱 AGC 设置为 1E5,maximum IT 设置为 250 ms,隔离窗口设置为 1.6 m/z。

#### 1.2.3.3 数据处理

肽段参数设置:蛋白酶为胰蛋白酶[KR/P],K、



R、P 分别代表赖氨酸、精氨酸、脯氨酸，最大漏切位点数为 0，肽段长度为 7~25 个氨基酸残基，设置半胱氨酸烷基化为固定修饰。Transition 参数设置：母离子电荷为 2,3；子离子电荷为 1；离子类型为 b,y。碎片离子选择从第 3 个开始至最后 1 个，并设置离子匹配的质量误差容忍度为 0.02 Da。

### 1.3 统计学处理

所有数据均采用 SPSS26.0 软件进行统计分析。为了让检验数据符合 *t* 检验需求的正态分布，检验前，蛋白相对定量值经过 Log<sub>2</sub> 对数转换。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示，组间比较采用 Student's *t* 检验，以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 SerpinB1a 蛋白的 4D 非标记定量蛋白质组学鉴定与定量结果

经课题组前期造模成功后，在蛋白组学中各实验组肝组织中均鉴定到 SerpinB1a 蛋白，蛋白质登记号：Q9D154，肽段：FQSLNAEVSK。以 3 组中 SerpinB1a 蛋白质重复测量平均值比值作为差异倍数，当 *P* ≤ 0.05 且差异倍数 ≥ 2 或 ≤ 0.5 时被认为具有明显差异。与 C 组 (2.18 ± 0.51) 比较，M 组 SerpinB1a 蛋白相对表达水平 (0.18 ± 0.09) 明显下降 (*P* = 0.002)，下调表达 0.08 倍；与 M 组比较，R 组 SerpinB1a 蛋白相对表达水平 (1.08 ± 0.07) 明显升高 (*P* = 0.004)，上调表达 6.00 倍。

### 2.2 SerpinB1a 蛋白的 GO 富集分析结果

经 GO 富集分析，显示 SerpinB1a 蛋白共涉及 8 个分子功能、20 个细胞组成和 59 个生物进程，进一步推测其中的 2 个分子功能、3 个细胞组成和 12 个生物进程涉及 AFLD 的发生、发展，见表 1。

### 2.3 SerpinB1a 蛋白表达的验证

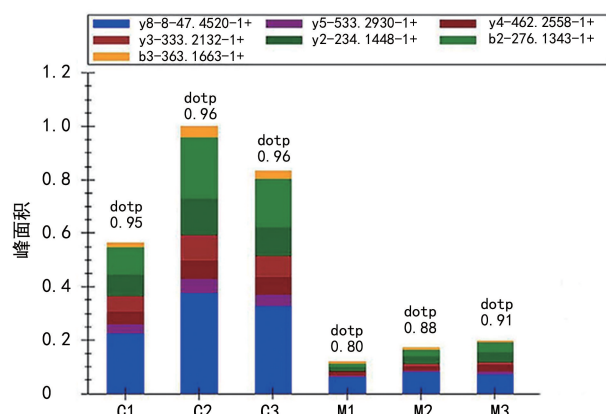
利用以质谱技术为基础的靶向蛋白质组定量技术对 SerpinB1a 蛋白表达水平进行验证。采用峰面积进行定量，呈现的 7 种颜色条带分别对应肽段在质谱仪中裂解后的 7 种特异性氨基酸序列，见图 1。结果显示：与 C 组比较，M 组 SerpinB1a 蛋白表达水平下调 0.21 倍，与上述 4D 非标记定量蛋白质组学的定量结果一致。

表 1 SerpinB1a 蛋白的 GO 富集分析

功能	名称	GO_ID
分子功能	丝氨酸型内蛋白酶抑制剂活性	GO:0004867
	分子效能调控剂	GO:0098772
细胞组成	细胞内	GO:0005622
	细胞器	GO:0043226
	细胞内细胞器	GO:0043229
生物进程	细胞激活	GO:0001775
	免疫系统过程	GO:0002376

续表 1 SerpinB1a 蛋白的 GO 富集分析

功能	名称	GO_ID
	代谢过程负调控	GO:0009892
	分解代谢过程调节	GO:0009894
	细胞过程	GO:0009987
	大分子代谢过程负调节	GO:0010605
	代谢过程调节	GO:0019222
	细胞代谢过程调节	GO:0031323
	细胞代谢过程负调控	GO:0031324
	蛋白水解负调控	GO:0045861
	生物过程负调控	GO:0048519
	细胞过程负调控	GO:0048523



C1~C3: C 组; M1~M3: M 组。

图 1 SerpinB1a 蛋白样品中肽段 FQSLNAEVSK 碎片离子峰面积分布图

## 3 讨论

近年来，日益发展的蛋白质组学技术在基因组学等其他“组学”技术基础上进一步表明了生物个体蛋白的身份、识别蛋白质的分子构成，为探究疾病的发病机制、寻找分子标志物和了解药物作用靶点等提供了重要线索<sup>[17-18]</sup>。运用蛋白质组学方法在非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 小鼠模型和相应的临床患者肝脏中均发现自噬相关基因 3 (ATG3) 是与脂肪变性发生有关的新分子，其表达与 NAFLD 脂肪变性分级和活动评分呈正相关<sup>[19]</sup>。CARLSSON 等<sup>[20]</sup> 运用蛋白质组学方法发现，生长分化因子 15 是糖尿病肾病和心血管事件发生的潜在生物标志物，为糖尿病肾病和心血管疾病的机制研究提供了新的见解。DING 等<sup>[21]</sup> 运用等压标记定量蛋白质组学技术，发现超氧化物歧化酶 2 (SOD2) 在唾液中可能作为肝细胞癌的潜在生物标志物，提供了一种无创、廉价的唾液检测方法检测肝细胞癌。本研究借助蛋白质组学技术的优势，采用 4D 非标记定量蛋白质组学技术检测和分析了乙醇喂养 AFLD 小鼠和经白藜芦醇干预后的小鼠肝组织 SerpinB1a 蛋白表达水平变化。结果显示，M 组小鼠肝组织 SerpinB1a 蛋白表达水平较 C 组下调 0.08 倍，

经白藜芦醇干预后上调 6.00 倍。表明慢性酒精摄入可以引起肝组织 SerpinB1a 蛋白表达水平下降,提示该蛋白可能同时参与了 AFLD 的发生和白藜芦醇的 AFLD 保护作用。目前,尚未发现 SerpinB1a 蛋白与酒精性肝损伤及白藜芦醇保护作用相关文献报道,值得进一步关注和探讨。

白藜芦醇是一种存在于多种植物中的天然多酚,作为沉默信息调节因子 1(SIRT1)激动剂<sup>[22]</sup>,具有抗炎、抗缺血、抗氧化、抗癌、心脏保护等调节作用<sup>[23]</sup>。研究发现,白藜芦醇可通过促进自噬以减少酒精诱导的肝脏脂肪变性<sup>[6]</sup>,下调缺氧诱导因子和细胞色素 P450E1(CYP2E1)表达,减少活性氧(ROS)等有害物质产生<sup>[24]</sup>,加速巨噬细胞极化以抗凋亡<sup>[25]</sup>,发挥酒精性肝损伤保护作用。但截至目前,其具体的分子干预机制尚不清楚。人类 SerpinB1(小鼠 SerpinB1a 的功能同源物)与多种疾病有关,如 2 型糖尿病患者血清 SerpinB1 水平明显升高与胰岛 B 细胞功能障碍、血糖控制和血脂异常有关<sup>[26]</sup>,SerpinB1 通过调控生长因子信号通路促进胰岛 B 细胞增殖以应对胰岛素抵抗<sup>[27]</sup>。MOURAD 等<sup>[28]</sup>检测了葡聚糖硫酸酯钠诱导的炎症性结肠炎模型小鼠的结肠蛋白表达情况,发现 SerpinB1a 表达上调并参与先天免疫反应。运用蛋白组学串联质谱标签(TMT)和生物信息学技术发现早期大鼠急性胰腺炎中 SerpinB1a 低表达,并通过减弱对弹性蛋白酶的抑制发挥抗炎作用<sup>[29]</sup>。在癌症领域也显示,过表达 SerpinB1 会促进口腔癌细胞在侵袭性口腔鳞状细胞癌中的转移<sup>[30]</sup>,相反地,在乳腺癌、肺癌与肝细胞癌等癌组织中 SerpinB1 表达增强并抑制基质金属蛋白酶 2 活性,从而发挥抑癌作用<sup>[31-32]</sup>。由此可见,SerpinB1a 与多种疾病发生或保护作用有关,涉及免疫防御、蛋白水解、抑癌或促进癌细胞扩散等多种反应,在不同疾病中存在正性或负性表达的差异性。本研究发现在慢性酒精摄入后,肝脏 SerpinB1a 表达水平明显下调和经白藜芦醇干预后 SerpinB1a 表达水平明显上调,这提示有必要进一步证实其是否真的参与了 AFLD 发生的保护作用及其机制。

与 4D 非标定量蛋白质组学检测结果模式一致,靶向蛋白质组定量技术验证了 SerpinB1a 蛋白表达在 AFLD 小鼠肝组织明显下调,提示该蛋白在 AFLD 发生中的保护作用,白藜芦醇干预后 SerpinB1a 蛋白表达明显上调可初步证明这一点。根据前言所述,在研究基于 AFLD 疾病阶段的肝脏自噬抑制作用,以及经 FOXO1 和 pSTAT3 介导的酒精摄入引起的肝损伤与 SerpinB1a 的调控关系基础上,作者提出了 SerpinB1a 在酒精诱导的肝损伤保护中可能通过 FOXO1-STAT3 介导的自噬信号通路发挥作用。已知 FOXO1 通过正向调控应激诱导蛋白 3 以抑制 mTORc1、增强自噬相关基因(ATGs)的表达,实现自

噬诱导的调控<sup>[11]</sup>。SINGH 等<sup>[33]</sup>在肝细胞中对 ATG7 基因进行特异性敲除,并检测了肝组织中甘油三酯水平,以研究自噬是否参与了脂质分解代谢,结果显示:在抑制自噬后肝脏中甘油三酯积累明显增多。相反,激活自噬有助于肝细胞中脂质的分解,通过脂吞噬或微脂噬两种自噬形式,从而减少肝细胞中脂肪变性<sup>[34]</sup>。除了参与调控自噬和脂质分解代谢的调节,FOXO1 还能降低过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )的转录活性,减少游离脂肪酸的摄取,并抑制脂肪酸合成酶和乙酰辅酶 a 羧化酶 1 的表达,从而抑制脂肪的合成并减少肝脏中甘油三酯的积累<sup>[35-36]</sup>。此外,FOXO1 的表达下调会降低超氧化物歧化酶(SOD)生成,加重氧化应激发生<sup>[37]</sup>。基于 SerpinB1a 与 FOXO1、PPAR $\gamma$  的关系<sup>[10-11,35-36]</sup>,以及抗氧化应激、自噬诱导在白藜芦醇抗酒精性肝损伤的研究发现<sup>[6,24]</sup>,作者认为上调 SerpinB1a 的表达、经 FOXO1 介导的 PPAR $\gamma$  拮抗作用及自噬诱导可能是白藜芦醇发挥 AFLD 保护作用的重要机制。此外,作为肝保护信号的信号转导和转录激活因子 3(STAT3),既可以通过上调 Bcl-2 互作蛋白 3 的表达诱导自噬<sup>[11]</sup>,进而促进脂肪分解,减少脂肪变性,还可以通过抑制 SREBP-1c 的表达来抑制脂肪合成<sup>[38]</sup>。因此,SerpinB1a 的肝脏保护作用也可能是通过激活肝细胞中的 STAT3,进一步激活自噬以加快脂肪分解,并抑制 SREBP-1c 表达以减少脂肪生成来发挥的。

综上所述,本文探讨了 SerpinB1a 表达水平与 AFLD 发生的关系,提出了 SerpinB1a 可能作为 FOXO1、STAT3 介导的自噬诱导上游调控因子,其表达水平的变化参与了 AFLD 的形成及白藜芦醇的抗 AFLD 作用,但还需要进一步验证。总之,本文为完善 AFLD 发生的分子机制及探讨白藜芦醇的 AFLD 保护机制提供了科学的实验室依据。

## 参考文献

- [1] SEITZ H K, BATALLER R, CORTEZ-PINTO H, et al. Alcoholic liver disease[J]. Nat Rev Dis Primers, 2018, 4(1): 16.
- [2] KOELMEL J P, TAN W Y, LI Y, et al. Lipidomics and redox lipidomics indicate early stage alcohol-induced liver damage[J]. Hepatol Commun, 2022, 6(3): 513-525.
- [3] CHAO X, DING W X. Role and mechanisms of autophagy in alcohol-induced liver injury[J]. Adv Pharmacol, 2019, 85: 109-131.
- [4] WILLIAMS J A, DING W X. Role of autophagy in alcohol and drug-induced liver injury[J].

- Food Chem Toxicol, 2020, 136:111075.
- [5] Al-BARI M A A, XU P. Molecular regulation of autophagy machinery by mTOR-dependent and -independent pathways[J]. Ann N Y Acad Sci, 2020, 1467(1):3-20.
- [6] 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.
- [7] ZHANG J, NG S, WANG J, et al. Histone deacetylase inhibitors induce autophagy through FOXO1-dependent pathways [J]. Autophagy, 2015, 11(4):629-642.
- [8] HEO M J, KIM T H, YOU J S, et al. Alcohol dysregulates miR-148a in hepatocytes through FoxO1, facilitating pyroptosis via TXNIP over-expression[J]. Gut, 2019, 68(4):708-720.
- [9] ZUO Z, LI Y, ZENG C, et al. Integrated analyses identify key molecules and reveal the potential mechanism of miR-182-5p/FOXO1 axis in alcoholic liver disease [J]. Front Med (Lausanne), 2021, 8:767584.
- [10] LIANG X, SUY, HUO Y. Forkhead box protein O1 (FoxO1)/SERPINB1 ameliorates ROS production in diabetic nephropathy[J]. Food Sci Nutr, 2020, 9(1):44-51.
- [11] YOU L, WANG Z, LI H, et al. The role of STAT 3 in autophagy[J]. Autophagy, 2015, 11(5):729-739.
- [12] KWON H J, WON Y S, PARK O, et al. Aldehyde dehydrogenase 2 deficiency ameliorates alcoholic fatty liver but worsens liver inflammation and fibrosis in mice[J]. Hepatology, 2014, 60(1):146-157.
- [13] ZHANG G, LIU Q, LI Y, et al. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor alleviates alcohol induced hepatic steatosis via activating Stat3-mediated autophagy[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 550:197-203.
- [14] XU S, QIN D, YANG H, et al. SerpinB1 promotes the proliferation of porcine pancreatic stem cells through the STAT3 signaling pathway[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2020, 198:105537.
- [15] BERTOLA A, MATHEWS S, KI S H, et al. Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model)[J]. Nat Protoc, 2013, 8(3):627-637.
- [16] 李琳, 王磊, 王文静, 等. 基于串联质谱标签法和平行反应监测技术的氟喹诺酮耐药沙门菌蛋白质组学分析[J]. 微生物学通报, 2018, 45(7):1535-1545.
- [17] MOURAD F H, YAU Y, WASINGER V C, et al. Proteomics in inflammatory bowel disease: approach using animal models[J]. Dig Dis Sci, 2017, 62(9):2266-2276.
- [18] AEBERSOLD R, MANN M. Mass spectrometry-based proteomics [J]. Nature, 2003, 422(6928):198-207.
- [19] DA SILVA LIMA N, FONDEVILA M F, NÓVOA E, et al. Inhibition of ATG3 ameliorates liver steatosis by increasing mitochondrial function[J]. J Hepatol, 2022, 76(1):11-24.
- [20] CARLSSON A C, NOWAK C, LIND L, et al. Growth differentiation factor 15 (GDF-15) is a potential biomarker of both diabetic kidney disease and future cardiovascular events in cohorts of individuals with type 2 diabetes: a proteomics approach[J]. Ups J Med Sci, 2020, 125(1):37-43.
- [21] DING F, SUN K, SUN N, et al. iTRAQ-based proteomics reveals SOD2 as a potential salivary biomarker in liver cancer [J]. Int J Biol Markers, 2019, 34(3):221-231.
- [22] LI T, TAN Y, OUYANG S, et al. Resveratrol protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via attenuating ferroptosis [J]. Gene, 2022, 808:145968.
- [23] NOVAKOVIC R, RAJKOVIC J, GOSTIMIROVIC M, et al. Resveratrol and reproductive health[J]. Life (Basel), 2022, 12(2):294.
- [24] PETRELLA C, CARITO V, CARERE C, et al. Oxidative stress inhibition by resveratrol in alcohol-dependent mice [J]. Nutrition, 2020, 79/80:110783.
- [25] HAN Y H, KIM H J, NA H, et al. ROR $\alpha$  induces KLF4-mediated M2 polarization in the liver macrophages that protect against nonalcoholic steatohepatitis[J]. Cell Rep, 2017, 20(1):124-135.
- [26] KRYVALAP Y, CZYZYK J. The role of proteases and serpin protease inhibitors in  $\beta$ -cell biology and diabetes [J]. Biomolecules, 2022, 12(1):67.
- [27] EL OUAAMARI A, DIRICE E, GEDEON N, et al. SerpinB1 promotes pancreatic  $\beta$  cell proliferation

- [J]. *Cell Metab*, 2016, 23(1):194-205.
- [28] MOURAD F H, YAU Y, WASINGER V C, et al. Proteomics in inflammatory bowel disease: approach using animal models[J]. *Dig Dis Sci*, 2017, 62(9):2266-2276.
- [29] GARCÍA-HERNÁNDEZ V, SÁNCHEZ-BERNAL C, SCHVARTZ D, et al. A tandem mass tag (TMT) proteomic analysis during the early phase of experimental pancreatitis reveals new insights in the disease pathogenesis[J]. *J Proteomics*, 2018, 181:190-200.
- [30] TSENG M Y, LIU S Y, CHEN H R, et al. Serine protease inhibitor (SERPIN) B1 promotes oral cancer cell motility and is over-expressed in invasive oral squamous cell carcinoma[J]. *Oral Oncol*, 2009, 45(9):771-776.
- [31] CHOU R H, WEN H C, LIANG W G, et al. Suppression of the invasion and migration of cancer cells by SERPINB family genes and their derived peptides[J]. *Oncol Rep*, 2012, 27(1):238-245.
- [32] CUI X, LIU Y, WAN C, et al. Decreased expression of SERPINB1 correlates with tumor invasion and poor prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. *J Mol Histol*, 2014, 45(1):59-68.
- [33] SINGH R, KAUSHIK S, WANG Y, et al. Autophagy regulates lipid metabolism[J]. *Nature*, 2009, 458(7242):1131-1135.
- [34] QIAN H, CHAO X, WILLIAMS J, et al. Autophagy in liver diseases: a review[J]. *Mol Aspects Med*, 2021, 82:100973.
- [35] CHEN J, LU Y, TIAN M, et al. Molecular mechanisms of FOXO1 in adipocyte differentiation[J]. *J Mol Endocrinol*, 2019, 62(3):239-253.
- [36] SKAT-RØRDAM J, HØJLAND IPSEN D, LYKKESFELDT J, et al. A role of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  in non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2019, 124(5):528-537.
- [37] XING Y Q, LI A, YANG Y, et al. The regulation of FOXO1 and its role in disease progression[J]. *Life Sci*, 2018, 193:124-131.
- [38] 祝娟娟, 程明亮, 周明玉, 等. p-JAK1/P-STAT3 通路在蓝莓益生菌血清干预肝细胞脂肪变性中的作用[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2017, 48(2):203-209.

(收稿日期:2022-11-13 修回日期:2023-03-28)

(编辑:冯甜)

(上接第 2088 页)

- [51] HODGSON K A, OWEN L S, KAMLIN C O F, et al. Nasal high-flow therapy during neonatal endotracheal intubation[J]. *N Engl J Med*, 2022, 386(17):1627-1637.
- [52] HUMPHREYS S, LEE-ARCHER P, REYNE G, et al. Transnasal humidified rapid-insufflation ventilatory exchange (THRIVE) in children: a randomized controlled trial[J]. *Br J Anaesth*, 2017, 118(2):232-238.
- [53] RIVA T, PEDERSEN T H, SEILER S, et al. Transnasal humidified rapid insufflation ventilatory exchange for oxygenation of children during apnoea: a prospective randomised controlled trial[J]. *Br J Anaesth*, 2018, 120(3):592-599.
- [54] LEE J H, JI S H, JANG Y E, et al. Application of a high-flow nasal cannula for prevention of postextubation atelectasis in children undergoing surgery: a randomized controlled trial[J]. *Anesth Analg*, 2021, 133(2):474-482.
- [55] 魏玮, 李想, 徐晓雁, 等. 经鼻高流量氧疗联合早期拔管对小儿腺样体-扁桃体切除术麻醉恢复期呼吸系统不良事件发生率的影响[J]. *中华医学杂志*, 2022, 102(21):1584-1589.
- [56] RAN L, HUANG G, YAO Y, et al. Efficacy of high-flow nasal oxygenation compared with laryngeal mask airway in children undergoing ambulatory oral surgery under deep sedation: a randomized controlled non-inferiority trial[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2022, 9:1001213.
- [57] ZHANG W, WANG J L, FU S, et al. Incidence of oxygen desaturation using a high-flow nasal cannula versus a facemask during flexible bronchoscopy in patients at risk of hypoxemia: a randomised controlled trial[J]. *BMC Pulm Med*, 2022, 22(1):389.
- [58] LI X N, ZHOU C C, LIN Z Q, et al. High-flow nasal cannula oxygen therapy during anesthesia recovery for older orthopedic surgery patients: a prospective randomized controlled trial[J]. *World J Clin Cases*, 2022, 10(24):8615-8624.

(收稿日期:2022-11-18 修回日期:2023-02-22)

(编辑:冯甜)