

基于 nano-LC-LTQ/Orbitrap-MS 筛选黄芩-黄连药对干预 2 型糖尿病 KKAY 小鼠的骨骼肌差异表达蛋白

刘彤彤¹, 肖琴¹, 盛军庆², 涂秀英¹, 孙军¹, 魏学鑫¹, 于梅¹, 章常华^{1*}

(1. 江西中医药大学药学院, 南昌 330004; 2. 南昌大学生命科学学院, 南昌 330031)

[摘要] 目的:采用 nano-LC-LTQ/Orbitrap-MS 鉴定 2 型糖尿病 KKAY 小鼠模型组与给药组的骨骼肌差异表达蛋白,推测黄芩-黄连药对(SC)防治 2 型糖尿病的作用机制。方法:取 20 只 8~10 周龄的雄性 KKAY 小鼠,给予全价高脂饲料,随机等分为 2 组,分别为黄芩-黄连药对组(27 g·kg⁻¹)和模型组(灌胃等量水)。2 组均连续灌胃 8 周,于最后 1 次给药后 1 h 处死小鼠,取骨骼肌在液氮中进行研磨,加裂解液及蛋白酶抑制剂提取蛋白,测定蛋白浓度,再进行蛋白变性、还原、烷基化、酶解及脱盐,利用 nano-LC-LTQ/Orbitrap-MS 检测,利用 Xcalibur 2.2 软件和 Proteome Discoverer 1.4.0.288 进行数据处理,采用 Sieve v2.1(×64)进行无标样定量分析寻找相关差异蛋白,筛选并鉴定差异表达蛋白,并对差异表达蛋白进行生物信息学分析。结果:黄芩-黄连药对组与模型组共鉴定出 107 个差异表达蛋白质,经生物学分析筛选出与糖尿病相关的差异蛋白共 5 个,其中上调 4 个(5'-磷酸腺苷激活的蛋白激酶-脂联素等),下调 1 个(脂肪细胞型脂肪酸结合蛋白 4)。分析显示差异蛋白质主要涉及炎症反应、信号通路调节等生物过程。结论:通过有效的比较与分析,得到了一些参与胰岛素信号转导等通路的差异表达蛋白质,为研究黄芩-黄连药对防治胰岛素抵抗的分子机制提供了新靶点。

[关键词] 黄芩-黄连; 药对; KKAY 小鼠; 蛋白质组学; 差异表达蛋白

[中图分类号] R22;R289;R969.1;R284;R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)17-0126-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181610

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180524.1001.003.html>

[网络出版时间] 2018-05-24 16:57

Screening of Differentially Expressed Proteins in Skeletal Muscle of Type 2 Diabetes KKAY Mice Treated with Couplet Medicines of Scutellariae Radix and Coptidis Rhizoma Based on nano-LC-LTQ/Orbitrap-MS

LIU Tong-tong¹, XIAO Qin¹, SHENG Jun-qing², TU Xiu-ying¹, SUN Jun¹,
WEI Xue-xin¹, YU Mei¹, ZHANG Chang-hua^{1*}

(1. School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

2. School of Life Sciences, Nanchang University, Nanchang 330031, China)

[Abstract] **Objective:** To identify the differentially expressed proteins in skeletal muscle of type 2 diabetes KKAY mice from the model group and the administration group by nano-LC-LTQ/Orbitrap-MS, and speculate mechanism of couplet medicines of Scutellariae Radix and Coptidis Rhizoma against type 2 diabetes. **Method:** Twenty male KKAY mice aged 8-10 weeks were used. KKAY mice were given full-fledged high-fat diet and randomly divided into 2 groups, included Scutellariae Radix and Coptidis Rhizoma group (27 g·kg⁻¹) and model group (the same amount of distilled water). Mice in the two groups were continuous intragastric

[收稿日期] 20171218(021)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81460622,81774194,81260660);江西省自然科学基金项目(20171BAB205095,20151BAB205079,20151BAB205077);江西省卫生计生委科研计划项目(2016A024)

[第一作者] 刘彤彤,在读硕士,从事中药与天然产物药理研究,E-mail:704837468@qq.com

[通信作者] *章常华,博士,副教授,从事药理学教学科研工作,Tel:0791-87118919,E-mail:zhangch305@126.com

administrated for 8 weeks. After the last administration for 1 hour, mice were sacrificed, skeletal muscle was taken and placed in $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ refrigerator. Skeletal muscles of the model group and administration group were ground in liquid nitrogen, lysate and protease inhibitors were added to extract the protein, the concentration of protein was determined, and then protein denaturation, reduction, alkylation, enzymolysis and desalting, the samples were identified by nano-LC-LTQ/Orbitrap-MS. Data were processed by Xcalibur 2.2 software and Proteome Discoverer 1.4.0.288, and Sieve v2.1 ($\times 64$) was adopted to analyze and find relevant differential proteins with quantitative analysis of non-standard samples, differentially expressed proteins were screened and identified, and bioinformatics analysis of the differentially expressed proteins was carried out. **Result:** A total of 107 differentially expressed proteins were identified from *Scutellariae Radix* and *Coptidis Rhizoma* group and model group, and five differential proteins related to diabetes were screened out by biological analysis, including 4 up-regulated [5'-adenosine-activated protein kinase (AMPK), adiponectin (APN), etc] and 1 down-regulated [adipocyte type fatty acid binding protein4 (FABP4)]. The differential proteins mainly involved in inflammatory reactions, signal pathway regulation and other biological processes. **Conclusion:** Through effective comparison and analysis, we obtain some differentially expressed proteins involved in insulin signal transduction and other pathways, this paper can provide a new target for the study on the molecular mechanism of *Scutellariae Radix* and *Coptidis Rhizoma* against insulin resistance.

[**Key words**] *Scutellariae Radix* and *Coptidis Rhizoma*; couplet medicines; KK_{Ay} mice; proteomics; differentially expressed proteins

2 型糖尿病 (T2DM) 是目前最普遍的慢性病之一, 在过去几十年里发病人数逐年增加^[1]。T2DM 普遍存在胰岛素抵抗^[2]。中医认为, T2DM 为中满内热, 治疗应清热泻火^[3]。黄芩-黄连药对出自《伤寒论》, 已成为目前临床最常用的清热解毒药对之一, 也是中医临床上治疗糖尿病的常用药对^[4]。动物试验研究表明黄芩-黄连药对及其主要成分具有降血糖作用^[5], 且本课题组其他实验已证实黄芩-黄连药对具有防治 T2DM 胰岛素抵抗作用。体外实验表明黄连具有改善胰岛素抵抗的作用^[6], 而黄连与黄芩配伍后黄芩苷、小檗碱等主要成分的含量在一定程度上都有所增加^[7], 故黄芩与黄连联用后药效增强。但目前黄芩-黄连药对防治胰岛素抵抗的机制尚未完全明晰, 其系统性作用机制应进一步深入研究。

蛋白质组学是从整体水平上研究细胞、组织或生物体蛋白质组成及变化规律的科学, 而各种定量蛋白质组学技术也成为当前发现新的生物标志物的重要途径, 蛋白质组学作为系统生物学重要组成部分, 在中医药领域得到了广泛应用^[8-9], 并且已被应用于中医药机制研究和药物靶标筛选^[10]。本课题组在现有研究基础上, 充分利用蛋白质组学等现代研究方法, 深入研究黄芩-黄连药对防治 T2DM 的作用机制。自发性 KK_{Ay} 小鼠是将黄色肥胖基因 *Ay* 转至遗传性糖尿病 KK 小鼠培育而得, 与人类 T2DM

的表现极为相似, 是 T2DM 理想动物模型^[11]。骨骼肌在机体中起到摄取和利用葡萄糖、脂肪酸的作用, 是胰岛素发挥生物效应的重要靶器官之一^[12]。故本实验采用蛋白质组学技术筛选并鉴定 T2DM 胰岛素抵抗模型 KK_{Ay} 小鼠模型组、给药组的骨骼肌差异表达蛋白, 以研究黄芩-黄连药对防治胰岛素抵抗作用的分子机制。

1 材料

EASY-Spray PepMap C₁₈ 色谱柱 (75 μm \times 15 cm, 3 μm , 批号 142879), LTQ Orbitrap Elite 型组合式质谱仪, EASY-nLC 1000 型纳升级超高效液相色谱仪和 D37520 低温高速离心机 (美国 Thermo 公司); Milli-Q 型超纯水机 (美国 Millipore 公司), CentriVap 型 DNA 浓缩仪 (美国 Labconco 公司)。

黄芩、黄连饮片购自江西樟树台属药材公司, 批号分别为 141203 和 141221, 经江西中医药大学药学院邓可众副教授鉴定, 分别为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* 的干燥根、毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* 的干燥根茎; RIPA 裂解液 (碧云天生物技术研究所, 批号 P0013B), 测序级胰蛋白酶和二巯基苏糖醇 (DTT) (美国 Promega 公司, 批号分别为 0000160400, 0000085706), 碳酸氢铵、碘乙酰胺 (IAA) 和尿素 (美国 Sigma 公司, 批号分别为 WXBB1027V, SLBJ4716V, WY88J105W), 三羟甲基氨基甲烷 [Tris, 生工生物工程 (上海) 股份有限公

司,批号 MC0514B10011Z], C_{18} 脱盐小柱(美国 Thermo 公司,批号 QD214322), 3-[3-(胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐(CHAPS)和苯甲基磺酰氟(PMSF)(Solarbio 公司,批号分别为 627A0411, 20140708),水为去离子水,甲酸、甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

SPF 级雄性 KKAy 小鼠 20 只,8~10 周龄,体重(180±20)g,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,合格证号 SCXK(京)2014-0004;动物以高脂饲料饲养,饲料由北京华阜康生物科技股份有限公司提供。动物实验经江西中医药大学动物实验伦理委员会批准,批准号 JZLLSC2015006。

2 方法与结果

2.1 黄芩-黄连药对提取物的制备

按文献[13]的方法制备黄芩-黄连药对提取物。

2.2 骨骼肌组织的制备

取雄性 KKAy 小鼠 20 只,全部给予全价高脂饲料。将高脂饮食的 KKAy 小鼠随机等分为 2 组,依次为黄芩-黄连药对组(灌胃黄芩-黄连药对提取物,27 g·kg⁻¹)和模型组(灌胃等量水)。2 组小鼠均连续灌胃 8 周,于最后 1 次给药后 1 h 处死小鼠,取骨骼肌,置 -80 °C 冰箱,备用。每组随机选取 3 只动物骨骼肌样品,作为蛋白质组学数据分析的生物复本。

2.3 蛋白质组学分析

2.3.1 蛋白变性、还原、烷基化、酶解及脱盐

在参考文献[14-17]的基础上加以改进,将模型组、黄芩-黄连药对组小鼠骨骼肌从 -80 °C 冰箱中取出,在液氮中进行研磨后加入蛋白酶抑制剂,加入 RIPA 裂解液,匀浆(冰上操作),于 12 000 ×g,4 °C 离心 10 min,收集上清液;加入 6 倍量冰丙酮,4 °C 沉淀 2 h;于 12 000 ×g,4 °C 离心 30 min,挥干,沉淀用水溶解;再以尿素缓冲液(8 mol·L⁻¹ 尿素,4% CHAPS,40 mmol·L⁻¹ Tris 和 65 mmol·L⁻¹ DTT)对蛋白质变性,加入适量 DTT 溶液,保证其终浓度为 10 mmol·L⁻¹,于 37 °C 恒温水浴还原 1 h,加入适量 IAA 溶液,保证其终浓度为 55 mmol·L⁻¹,室温避光烷基化 45 min。加 5 倍量冰丙酮沉淀 5 h,于 14 000 ×g,4 °C 离心 10 min,吸弃上清液,将蛋白质沉淀溶于 25 mmol·L⁻¹ 碳酸氢铵溶液中,加入测序级胰蛋白酶,37 °C 酶解过夜;利用 C_{18} 小柱进行脱盐;真空冷冻干燥,加入 0.1% 甲酸水溶液 100 μL,于 13 000 ×g,4 °C 离心 10 min,取上清液进行分析。

2.3.2 质谱分析^[18]

利用 nano-LC-LTQ/Orbitrap-MS 进行蛋白质组学研究。每组 3 个样品各平行进

样 6 次。色谱条件为进样量选择 1 μL,流速设定 0.3 μL·min⁻¹,流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-0.1% 甲酸乙腈溶液(B)梯度洗脱(0~10 min,5%~10% B;10~65 min,10%~22% B;65~100 min,22%~32% B;100~110 min,32%~90% B;110~120 min,90% B)。质谱条件为电喷雾离子源(ESI),喷雾电压 1.8 kV,毛细管温度设定 250 °C,碰撞诱导解离,碰撞能量 35%,正离子模式;一级和二级的切换由 Tune 和 Xcalibur 2.2 控制软件根据数据依赖的自动模式实施,一级质谱使用全质量模式, m/z 300~1 800。见图 1。

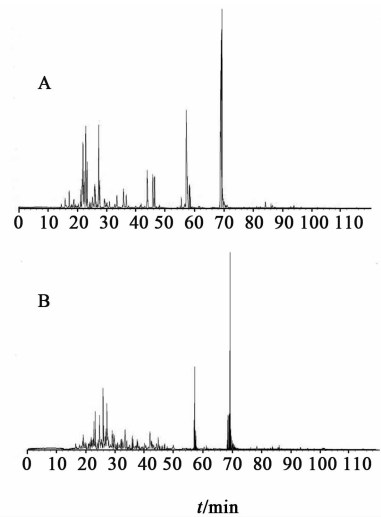


图 1 黄芩-黄连药对组(A)和模型组(B)小鼠骨骼肌组织的总离子流

Fig. 1 Total ion current of Scutellariae Radix and Coptidis Rhizoma group(A) and model group(B)

2.3.3 数据处理及生物信息学分析^[18]

采用 Proteome Discoverer 1.4.0.288 软件(内带 SEQUEST 搜库软件)对数据进行检索,搜库参数设置为母离子质量偏差 ±10 ppm,碎片离子质量偏差 ±0.6 Da,最多允许 2 个漏切位点,肽序列的固定修饰为半胱氨酸(烷基化)+57.0215 Da,可变修饰为甲硫氨酸(氧化)+15.995 Da,假阳性率(FDR)为 0.01;采用 Sieve v2.1(×64)软件进行无标样定量分析寻找相关差异蛋白,视差异蛋白的标准为 R (实验组与对照组的表达量差异比率)1.5 倍以上(即 <0.7 或 >1.5),且统计检验 $P < 0.05$ 。选用 DAVID 在线分析软件进行基因本体(gene ontology, GO)注释的索取及生物学功能富集的统计分析^[19-20],寻找与 2 型糖尿病胰岛素抵抗相关差异蛋白;利用京都基因和基因组百科全书(KEGG)数据库进行信号通路分析,分析黄芩-黄连药对治疗 2 型糖尿病胰岛素抵抗作

用可能的信号转导机制。

经上述质谱和生物信息学分析,共获得个 107 个差异蛋白质,筛选出与糖尿病相关的差异蛋白上调差异蛋白质 4 个($R > 1.5$),下调差异蛋白质 1 个($R < 0.7$)。其中上调蛋白 5'-磷酸腺苷激活的蛋白

激酶(AMPK, 编号 Q8BRK8),脂联素(APN, 编号 Q60994)等以及下调蛋白脂肪细胞型脂肪酸结合蛋白 4(FABP4, 编号 P04117)等可能参与了 AMPK 信号通路等与胰岛素抵抗相关的信号转导通路,见表 1。

表 1 黄芩-黄连药对组与模型组骨骼肌中参与胰岛素信号转导等通路的差异表达蛋白

Table 1 Differentially expressed proteins involved in insulin signal transduction and other pathways in skeletal muscle of mice from Scutellariae Radix and Coptidis Rhizoma group and model group

蛋白编号	蛋白描述	蛋白名称	差异倍数/倍	唯一肽段数/条	相对分子质量/kDa	等电点	趋势
Q8BRK8	5'-AMP-activated protein kinase catalytic subunit alpha-2 OS = Mus musculus GN = Prkaa2 PE = 1 SV = 3-[AAPK2_MOUSE]	AMPK	2.25	1	62.0	7.87	↑
Q60994	Adiponectin OS = Mus musculus GN = Adipoq PE = 1 SV = 2-[ADIPO_MOUSE]	APN	7.97	2	26.8	5.57	↑
Q9R0H0	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1 OS = Mus musculus GN = Acox1 PE = 1 SV = 5-[ACOX1_MOUSE]	过氧化物酶酰基辅酶 A 氧化酶 1 (ACOX1)	2.20	1	74.6	8.48	↑
Q00623	Apolipoprotein A-I OS = Mus musculus GN = Apoal1 PE = 1 SV = 2-[APOA1_MOUSE]	载脂蛋白 A-I (ApoA-I)	20.76	6	30.6	5.73	↑
P04117	Fatty acid-binding protein, adipocyte OS = Mus musculus GN = Fabp4 PE = 1 SV = 3-[FABP4_MOUSE]	FABP4	0.20	1	14.6	8.40	↓

3 讨论

蛋白质组学是在整体水平上研究细胞内蛋白组成及其活动规律的学科,已在中医药复杂系统研究具有重要地位。本实验通过利用 nano-LC-LTQ/Orbitrap-MS 分析模型组和黄芩-黄连药对组小鼠骨骼肌组织标本,经分析得到 107 个差异表达蛋白,利用生物信息学方法筛选差异表达蛋白,结果发现与糖尿病相关的差异蛋白共 5 个,其中 4 个上调差异蛋白质,1 个下调差异蛋白质,为研究该药对防治胰岛素抵抗的分子机制提供了新靶点。

AMPK 是由 α, γ, β 共 3 个亚基组成的异三聚体,这 3 个亚基又各有不同的亚型,骨骼肌细胞以 $\alpha 2$ 表达较多。AMPK 被称为骨骼肌的能量感受器,能够促进葡萄糖摄取和氧化、抑制肌糖原合成并促进其分解,对调节运动骨骼肌糖代谢具有一定的作用^[21-22]。研究提示 AMPK 激活的降糖机制为通过促进骨骼肌葡萄糖转运子 4 (GLUT4) 的表达及转位,使葡萄糖的摄取增加^[23-24],并抑制肝糖的输出^[25]。本研究中 AMPK 表现为上调,说明黄芩-黄连药对组激活了 AMPK,从而促进降糖,这为 2 型糖尿病的治疗提供了一个崭新的药理靶向,可为相关

新药的研发提供参考。黄芩-黄连药对可以提高 APN 的释放,APN 是由脂肪细胞分泌的一种细胞因子,能明显提高肝脏、肌肉对胰岛素的敏感性,促进糖代谢和脂肪代谢^[26]。目前,APN 水平降低已被研究者们认为是胰岛素抵抗的一个可信赖的生物标记。APN 和胰岛素信号通路间的交互作用主要通过脂联素受体结合蛋白 (APPL1),AMPK,磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) 等多个信号分子实现^[27]。由于 APN 是唯一一个在胰岛素相关性疾病中水平下调的脂肪因子,因此不存在抵抗的问题^[28]。因此以 APN 为靶点改善胰岛素抵抗是治疗 2 型糖尿病的另一方向。

FABPs 是编码 15 kDa 蛋白质的多基因家族的成员,根据他们在特定组织的高表达可分为 9 种类型^[29],其中在本研究中 FABP4 表现为下调。有研究表明,敲除小鼠脂肪细胞中的 FABP4 基因,能使机体巨噬细胞中的炎症因子表达降低,而敲除巨噬细胞中 FABP4 却使胰岛素信号和葡萄糖摄取增强,说明 FABP4 在脂肪细胞和巨噬细胞中存在交互作用,尤其对脂肪组织中的炎症反应起重要作用,这种炎症反应能导致肥胖的发生^[30]。而研究发现肥胖

病人出现的急性心肌收缩功能减低与血清 FABP4 升高有关^[30]。FABP4 对调节糖脂代谢及胰岛素抵抗形成起着重要作用,本研究中黄芩-黄连药对组的 FABP4 下调,这与张丽等^[31]的研究结果相一致, FABP4 已成为治疗 2 型糖尿病及其相关疾病的潜在靶标。ApoA-I 是在肝脏和小肠中合成的,是高密度脂蛋白(HDL)的主要蛋白成分,ApoA-I 通过 G 蛋白-环磷酸腺苷-蛋白激酶 A-叉头框蛋白 O1(FoxO1)途径促进胰岛 β 细胞株 INS-1E 细胞合成和胰岛素分泌,且这种促进作用呈剂量依赖性^[32]。黄芩-黄连药对组的 ApoA-I 上调,促进了糖代谢,提示该蛋白可能是治疗糖尿病的靶点。ACOX1 是脂肪酸 β -氧化过程中的关键限速酶,是过氧化物酶体增殖剂激活受体 α (PPAR α)的下游靶基因,其主要调节脂肪酸在线粒体和过氧化物酶体中的 β -氧化过程,促进脂肪酸的代谢^[33],本实验中该蛋白上调有助于脂肪的代谢。

综上所述,分析本实验结果后发现,差异蛋白质主要涉及炎症反应、信号通路调节等生物过程。其中 APN 和 ApoA-I 等蛋白明显上调及 FABP4 差异蛋白明显下调,这说明黄芩-黄连药对通过参与 AMPK 信号通路等胰岛素抵抗相关通路来发挥治疗糖尿病的作用。采用蛋白质组学筛选技术发现了一些与黄芩-黄连药对防治胰岛素抵抗作用密切相关的差异表达蛋白,这将有助于筛选出与防治胰岛素抵抗作用相关的生物标记物,并有利于阐明中药防治胰岛素抵抗作用的分子机制。

[参考文献]

[1] 刘永贵,解学星,吴疆,等. 治疗 2 型糖尿病的新靶点药物研究进展[J]. 现代药物与临床,2015,30(2): 222-227.

[2] 朱小花. 香蕉粉对型糖尿病胰岛素抵抗的改善作用及其机制研究[D]. 广州:华南农业大学,2016.

[3] TONG X L, ZHAO L H, LIAN F M, et al. Clinical observations on the dose-effect relationship of gegen qin lian decoction on 54 out-patients with type 2 diabetes [J]. J Tradit Chin Med,2011,31(1):56-59.

[4] 冯谨. 黄芩-黄连药对药代动力学及相互作用研究[D]. 上海:第二军医大学,2010.

[5] 徐君. 黄芩-黄连药对与肠道菌群的相互作用研究[D]. 南京:南京中医药大学,2014.

[6] 李佳川,孟宪丽,范昕建,等. 黄连改善胰岛素抵抗药效物质基础研究[J]. 中国中药杂志,2010,35(14): 1855-1858.

[7] 赵晓娟,胡律江,郭慧玲,等. 相须药对黄芩与黄连分煎液配伍后主要成分含量变化规律研究[J]. 江西中医学院学报,2009,21(4):46-48.

[8] Bensimon A, Heck A J, Aebersold R. Mass spectrometry-based proteomics and network biology [J]. Annu Rev Biochem,2012,81:379-405.

[9] ZHAO L, Nicholson J K, LU A, et al. Targeting the human genome microbiome axis for drug discovery: inspirations from global systems biology and traditional Chinese medicine [J]. J Proteome Res,2012,11(7): 3509-3519.

[10] 尹稳,伏旭,李平. 蛋白质组学的应用研究进展[J]. 生物技术通报,2014(1):32-38.

[11] 邓振德,黄勇志,潘丽莎,等. 柿叶黄酮对 KKAy 小鼠视网膜病变 CTGF, VEGF, HIF-1 α 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(2):115-119.

[12] 叶金甜,梁凤霞,雷胜龙,等. 研究防治胰岛素抵抗的新切入点:骨骼肌线粒体功能障碍与胰岛素抵抗[J]. 医学争鸣,2017,8(3):49-52.

[13] 盛军庆,章常华,熊淑平,等. HPLC 法测定“黄芩-黄连”药对提取物中黄芩 4 种成分含量[J]. 中药新药与临床药理,2016,27(2):259-262.

[14] Wiśniewski J R, Zougman A, Nagaraj N, et al. Universal sample preparation method for proteome analysis [J]. Nat Methods,2009,6(5):359-362.

[15] 马慧. 10Gy X 线照射鼻咽癌移植瘤组织差异蛋白质的初步筛选[D]. 南宁:广西医科大学,2014.

[16] 袁首道,王凤琴,张娇,等. 宫颈腺癌细胞与宫颈鳞癌细胞蛋白表达差异的质谱分析[J]. 山东大学学报:医学版,2014,52(8):14-21+51.

[17] Capriotti A L, Caruso G, Cavaliere C, et al. Proteomic characterization of human platelet-derived microparticles [J]. Anal Chim Acta, 2013,776:57-63.

[18] 章常华,涂秀英,熊淑平,等. 基于蛋白质组学技术筛选葛根黄连汤防治胰岛素抵抗作用的血清差异表达蛋白[J]. 中药新药与临床药理,2016,27(1):81-85.

[19] HUANG D W, Sherman B T, Lempicki R A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources [J]. Nat Protoc, 2009, 4(1): 44-57.

[20] Dennis G, Sherman B T, Hosack D A, et al. DAVID: database for annotation, visualization, and integrated discovery [J]. Genome Biol,2003,4(5):P3.

[21] Buhl E S, Jessen N, Schmitz O, et al. Chronic treatment with 5'-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside increases insulin-stimulated glucose uptake and GLUT4 translocation in rat skeletal muscles in a fiber type-specific manner [J]. Diabetes, 2001, 50

- (1):12-17.
- [22] Jorgensen S B, Viollet B, Andreelli F, et al. Knockout of the alpha2 but not alpha1 5'-AMP-activated protein kinase isoform abolishes 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside but not contraction-induced glucose uptake in skeletal muscle [J]. *J Biol Chem*, 2003, 279(2):1070-1079.
- [23] Buhl E S, Jessen N, Pold R, et al. Long-term AICAR administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in rats displaying features of the insulin resistance syndrome [J]. *Diabetes*, 2002, 51(7):2199-2206.
- [24] Kurth-Kraczek E J, Hirshman M F, Goodyear L J, et al. 5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle [J]. *Diabetes*, 1999, 48(8):1667-1671.
- [25] ZHOU G, Myers R, LI Y, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action [J]. *J Clin Invest*, 2001, 108(8):1167-1174.
- [26] 章常华, 李冰涛, 屈飞, 等. 小檗碱对白介素-6 诱导胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞脂联素表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(23):164-167.
- [27] 郭晓红, 吴立玲, 李丽. 脂联素调节糖脂代谢相关信号通路的研究进展 [J]. *生理科学进展*, 2010, 41(6):471-474.
- [28] 刘畅, 康湘萍, 金国琴, 等. 脂联素与胰岛素抵抗的关系及中药对其影响的研究进展 [J]. *上海中医药杂志*, 2014, 48(10):103-106.
- [29] 田鑫, 张昌军, 刁红录. 脂肪酸结合蛋白研究进展 [J]. *生命科学*, 2017, 29(2):164-169.
- [30] 隋少华, 白洁. 脂肪细胞型脂肪酸结合蛋白与代谢性疾病及动脉粥样硬化研究进展 [J]. *济宁医学院学报*, 2011, 34(2):139-141.
- [31] 张丽, 皇甫建, 肖瑞. 脂肪细胞型脂肪酸结合蛋白与 2 型糖尿病及其相关疾病的研究进展 [J]. *医学综述*, 2016, 22(10):1941-1944.
- [32] Cochran B J, Bisioendial R J, HOU L, et al. Apolipoprotein A-I increases insulin secretion and production from pancreatic β -cells via a G-protein-cAMP-PKA-FoxO1-dependent mechanism [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(10):2261-2267.
- [33] 全巧云, 葛存锦, 郑世华. PPAR α 及 Acox1 在酒精性脂肪肝中的表达 [J]. *华中科技大学学报:医学版*, 2016, 45(3):288-291.

[责任编辑 刘德文]