

棕榈酸诱导 HepG2 细胞脂毒性模型的 深度蛋白质组学

郭佳鸣¹, 陈光云¹, 谢文凡², 徐亦阳¹, 王宇秋^{1,3}, 王诗盛⁴, 王贺瑶¹,
朱洪文⁵, 周 虎^{1,3}

(1. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203; 2. 南京中医药大学中药学院, 江苏 南京 210023;

3. 中国科学院杭州高等研究院, 浙江 杭州 310024; 4. 四川大学华西医院, 四川 成都 610041;

5. 广州大学生命科学学院精准基因工程中心, 广东 广州 510006)

摘要: 由持续性脂质暴露诱导的肝脏脂毒性 (hepatic lipotoxicity) 已成为影响人类健康的重要问题。以棕榈酸 (palmitic acid, PA) 处理的人源性肝癌细胞系 HepG2 是该领域广泛应用且成熟的体外实验模型。然而, 针对该模型的深度组学数据资源仍相对匮乏, 从而限制了相关生物学机制的系统解析及潜在治疗靶点的发现。本研究采用 3 种蛋白质组学样品制备策略, 即过滤辅助样品制备 (filter-aided sample preparation, FASP) 法、溶剂沉淀辅助的单管固相增强样品制备 (solvent precipitation, single-pot, solid-phase-enhanced sample preparation, SP4) 法以及基于沉淀的溶液内酶解 (precipitation-based in-solution digestion) 法, 全面描绘 PA 处理 HepG2 细胞的蛋白质组学变化, 并提升差异表达蛋白 (differentially expressed proteins, DEPs) 鉴定的准确性与可靠性。功能富集分析结果表明, PA 处理后, 上调蛋白显著富集于细胞外基质组织、黏着斑、补体与凝血级联反应、脂肪酸代谢及 PPAR 信号通路, 而下调蛋白主要富集于核糖体与剪接体相关通路。本研究不仅系统性地鉴定并扩展了 HepG2 细胞脂毒性模型中的潜在治疗靶点, 还从转录因子活化、细胞器功能障碍以及钙离子稳态失衡等方面揭示了新的分子机制, 为脂毒性及肝毒性相关研究提供了重要的数据支撑与理论参考。

关键词: 脂毒性; 棕榈酸 (PA); HepG2 细胞; 蛋白质组学

中图分类号: O657.63 文献标志码: A 文章编号: 1004-2997(2026)03-0464-11

DOI: 10.7538/zpxb.2025.0158

CSTR: 32365.14.zpxb.2025.0158

A Deep-coverage Proteomic Dataset Resource for Palmitic Acid-Induced Lipotoxicity Model in HepG2 Cells

GUO Jia-ming¹, CHEN Guang-yun¹, XIE Wen-fan², XU Yi-yang¹, WANG Yu-qiu^{1,3}, WANG Shi-sheng⁴,
WANG He-yao¹, ZHU Hong-wen⁵, ZHOU Hu^{1,3}

(1. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China;

2. School of Chinese Materia Medica, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;

3. Hangzhou Institute for Advanced Study, University of Chinese Academy of Sciences, Hangzhou 310024, China;

4. West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China;

5. Precise Genome Engineering Center, School of Life Sciences, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Hepatic lipotoxicity, driven by chronic exposure to excess fatty acids, represents a central pathogenic mechanism underlying a broad spectrum of metabolic liver disorders, most notably non-

alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its progressive advanced forms. Palmitic acid (PA), the most abundant circulating saturated fatty acid in humans, has been widely used to induce lipotoxic stress in hepatocyte-derived cell models, including HepG2 cells. Despite the extensive use of this *in vitro* model, comprehensive and high-depth proteomic datasets capturing PA-induced cellular remodeling remain scarce. Such detailed molecular profiling is essential for elucidating the underlying biological mechanisms and for identifying high-confidence therapeutic targets. In this study, a comparative, multi-method sample preparation strategy prior to liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis was employed. The performance of three sample preparation strategies was systematically compared, including filter-aided sample preparation (FASP), solvent precipitation-based single-pot, solid-phase-enhanced sample preparation (SP4), and protein precipitation-based in-solution digestion. By integrating these approaches, the aim was to minimize methodological bias, enhance overall proteome coverage, and improve the robustness of differentially expressed protein (DEP) identification. HepG2 cells were treated with PA to induce lipotoxic stress, which was followed by label-free quantitative proteomic profiling using high-resolution mass spectrometry. Comparative analysis across the different preparation methods revealed substantial overlap in protein identifications, while each method uniquely contributed additional protein groups, collectively enabling deeper proteome coverage. Integration of the datasets significantly increased the confidence and robustness of DEP detection. Functional enrichment analysis demonstrated that PA treatment induced up-regulation of proteins involved in extracellular matrix organization, focal adhesion, complement and coagulation cascades, as well as fatty acid metabolism and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) signaling pathways. These findings indicate extensive extracellular remodeling, inflammatory activation, and metabolic reprogramming in response to lipotoxic stress. In contrast, down-regulated proteins were predominantly enriched in ribosome biogenesis, translational machinery, and spliceosome-associated pathways, suggesting a global suppression of protein synthesis and RNA processing under sustained lipid overload. This study not only systematically identified and broadened the spectrum of potential therapeutic targets in a lipotoxic HepG2 cell model, but also uncovered novel molecular mechanisms related to transcription factor activation, organelle dysfunction, and calcium homeostasis dysregulation, thereby offering valuable data resources and mechanistic insights for studies on lipotoxicity and hepatotoxicity.

Key words: lipotoxicity; palmitic acid (PA); HepG2 cells; proteomics

由久坐与高脂高糖饮食共同驱动的能量失衡问题日益突出, 导致全球代谢性疾病的发病率持续上升^[1-2]。在此背景下, 代谢相关脂肪性肝病 (metabolic dysfunction-associated fatty liver disease, MAFLD)/非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 已成为全球肝病发病与死亡的主要负担, 并逐渐演变为最重要的驱动因素^[3]。长期暴露于高水平游离脂肪酸的肝细胞会经历一系列病理级联反应, 包括脂质蓄积^[4]、胰岛素抵抗^[5]、炎症、纤维化以及肝硬化^[6], 这些改变由多种分子机制共同驱动, 其中氧化应激^[7]、内质网应激^[8]和线粒体功能障碍^[9]

是关键病理触发因素。棕榈酸 (palmitic acid, PA) 是体内最常见的饱和游离脂肪酸, 可转化为棕榈酰辅酶 A (palmitoyl-CoA), 其在维持能量稳态、细胞膜完整性及蛋白质棕榈酰化等过程中发挥关键作用^[10]。以 PA 诱导人肝癌细胞系 HepG2 构建的细胞脂毒性模型已成为研究肝脏脂毒性的常用体外实验体系^[11-15]。然而, 受传统质谱仪检测灵敏度有限和样品制备方法单一等因素的影响, 基于该模型的系统性蛋白质组学研究仍不足, 表现为蛋白质组覆盖度有限且存在方法学偏倚。

近年来, 质谱技术的快速发展推动了蛋白质

组学迈入新阶段。其中,具有代表性的4D-平行累积-串行碎裂(4D-parallel accumulation-serial fragmentation, 4D-diaPASEF)技术将数据非依赖采集(data-independent acquisition, DIA)与肽段的第四维碰撞截面(collision cross section, CCS)信息相结合,实现了更高效的肽段分离与鉴定,从而显著提升了质谱分析的深度与定量精度^[16]。

本研究基于 timsTOF Pro 质谱仪的 4D-diaPASEF 技术,对 PA 诱导的 HepG2 细胞脂毒性模型进行系统地蛋白质组学分析。为全面评估不同样本前处理策略可能引入的方法学偏差,采用滤膜辅助样品制备(filter-aided sample preparation, FASP)法、溶剂沉淀辅助的单管固相增强样品制备(solvent precipitation, single-pot, solid-phase-enhanced sample preparation, SP4)法^[17]以及基于沉淀的溶液内酶解(precipitation-based in-solution digestion)法 3 种常用的样本制备策略。借助先进的质谱采集技术与多流程的样品制备体系,以获得覆盖度高、重复性好的蛋白质组数据集,旨在为后续的机制解析奠定坚实的基础。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

timsTOF Pro 质谱仪、nanoElute 液相分离系统:德国 Bruker 公司产品;真空离心浓缩仪、高速冷冻离心机:德国 Eppendorf 公司产品;非接触式超声破碎仪:比利时 Diagenode 公司产品;10 ku 超滤离心管:美国 Millipore 公司产品;C18 固相萃取柱:美国 Waters 公司产品;CO₂ 培养箱:美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品;超净工作台:新加坡 ESCO 公司产品;倒置显微镜:日本 Olympus 公司产品。

1.2 主要材料与试剂

HepG2 细胞株:由上海细胞库提供;DMEM 高糖培养基(4.5 g/L 葡萄糖)、胎牛血清(FBS)、青链霉素混合溶液(P/S):美国 Gibco 公司产品;牛血清白蛋白(BSA)、棕榈酸、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、三(2-羧乙基)膦(tris(2-carboxyethyl) phosphine, TCEP)、2-氯乙酰胺(2-chloroacetamide, CAA):美国 Sigma 公司产品;C18 脱盐柱:美国 Waters 公司产品;甲酸(formic acid, FA)、乙腈(acetonitrile, ACN)、三氟

乙酸(trifluoroacetic acid, TFA):均为质谱级,美国 Sigma 公司产品;胰蛋白酶(trypsin):质谱级,美国 Promega 公司产品。

1.3 实验条件

1.3.1 细胞培养及脂毒性模型建立 首先,将 HepG2 细胞在含 10%FBS 和 1%青链霉素的 DMEM 高糖培养基中培养,置于 37 °C、5%CO₂ 恒温恒湿细胞培养箱内维持生长;然后,将细胞接种于 15 cm 培养皿中,分别使用含 0.25 mmol/L PA 的 BSA 复合物培养基(处理组),或含等浓度 BSA 载体但不含 PA 的培养基(对照组)处理 24 h,以构建 HepG2 细胞脂毒性模型。BSA/PA 工作液按照 30% BSA:20 mmol/L PA:MEM 培养基=3.3:3:3.7(V/V/V)配制,并过 0.22 μm 滤膜,以确保无菌。

1.3.2 蛋白质组学样品制备 将 PA 处理后的 HepG2 细胞以预冷的磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗涤 3 次,随后加入裂解液(100 mmol/L Tris-HCl 溶液, pH 8.0, 含 4% SDS、10 mmol/L TCEP、40 mmol/L CAA),使用非接触式超声仪于 4 °C 超声 10 min 裂解细胞,并于 95 °C 加热 10 min,以确保蛋白质充分变性。采用色氨酸定量法测定各组样本的蛋白质浓度,以确保后续酶解体系中的蛋白质投料量一致。

滤膜辅助样品制备法:将蛋白质裂解液转移至 10 ku 超滤离心管中,室温下以 11 481 r/min 离心去除裂解液。随后使用尿素缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl 溶液, pH 8.5, 含 8 mol/L 尿素)洗涤 6 次,再用 100 mmol/L 碳酸氢铵溶液洗涤 3 次。更换收集管后,以酶:蛋白质(1:50, w/w)加入胰蛋白酶,于 37 °C 酶解 16 h,以 1:100 补加胰蛋白酶,于 37 °C 酶解 4 h,然后向酶解体系内加入三氟乙酸进行酸化,终止酶解。采用 C18 固相萃取柱进行脱盐,使用甲醇活化 C18 脱盐柱,并使用缓冲液(70%乙腈,含 0.2%TFA)进行柱平衡,随后以洗涤液(含 0.2%TFA 的水溶液)进行预洗。将肽段样品加载至柱上后,用同一洗涤液清洗 2 次以去除杂质,最后用洗脱液(90%乙腈,含 0.2%TFA)洗脱肽段。所得肽段经真空离心干燥后,备用。

溶剂沉淀辅助的单管固相增强样品制备法:向玻璃微珠中加入 Milli-Q 水,然后依次使用乙腈、100 mmol/L 碳酸氢铵溶液、Milli-Q 水清洗微珠。按照微珠:蛋白质=10:1(w/w)的比

例加入蛋白质样本, 并加入 4 倍体积的预冷乙腈沉淀蛋白质。使用预冷的 80%乙醇清洗富集有蛋白质沉淀的微珠 3 次, 随后加入 100 mmol/L 碳酸氢铵溶液重悬, 以酶:蛋白质=1:50(w/w)加入胰蛋白酶, 于 37 °C 酶解 16 h, 然后以 1:100 补加胰蛋白酶, 于 37 °C 酶解 4 h。最后在室温下以 12 274 r/min 离心 2 min, 将肽段与玻璃微珠分离, 收集含有肽段的上清液进行酸化、脱盐。

溶液内酶解法: 向细胞裂解液中加入 5 倍的冷蛋白质沉淀缓冲液 (50%丙酮-50%乙醇, 含 0.1%乙酸), -20 °C 过夜沉淀蛋白质, 于 4 °C 以 13 018 r/min 离心 40 min, 去除上清液, 收集蛋白质沉淀。然后, 依次用 100%丙酮和 70%乙醇洗涤蛋白质, 再用 100 mmol/L 碳酸氢铵溶液溶解蛋白质, 以酶:蛋白质=1:50(w/w)加入胰蛋白酶, 于 37 °C 酶解 16 h, 再以 1:100 补加胰蛋白酶, 于 37 °C 酶解 4 h, 按照前述步骤进行酸化、脱盐。

1.3.3 数据采集 采用 nanoElute 超高效液相色谱仪与 timsTOF Pro 质谱仪 (配备电喷雾电离源 (ESI) 与 4D-dia-PASEF 数据采集模式) 联用采集数据。

色谱条件: 样品上样量 200 ng, 在自填装 20 cm 色谱柱 (内径 75 μ m, 1.5 μ m C18 填料) 进行分离; 流动相: A 为 0.1%甲酸水溶液, B 为 0.1%甲酸乙腈溶液; 梯度洗脱程序: 0~1 min(2%~4%B), 1~48 min(4%~26%B), 48~53 min(26%~32%B), 53~55 min(32%~90%B), 55~60 min(90%B); 流速 250 nL/min。

质谱条件: 正离子模式, DIA 的 4D-diaPASEF 模式; 质量扫描范围 m/z 100~1 700; 隔离窗口宽度 m/z 25; $1/K_0$ 起始 0.6 Vs/cm², 终止 1.6 Vs/cm²; 每个 PASEF 扫描 100 ms, 总循环时间 1.59 s。

1.3.4 数据分析 采用 Spectronaut v18 (Biognosys) 软件结合 Swiss-Prot 人类数据库 (共 20 588 条序列, 2023 年 8 月下载) 分析数据。蛋白质水解酶为胰蛋白酶, 每个肽段最多允许 2 个位点漏切, 以 Cys 羧甲基化为固定修饰, 甲硫氨酸氧化和 N-乙酰化为可变修饰, 蛋白质和肽段的假发现率 (FDR) 设为 0.01。

对数据以中位数进行归一化后, 基于 StatsPro 平台整合 11 种统计检验方法进行差异蛋白分析。差异蛋白筛选标准为: 在不少于 3 种算法中, 同时满足显著性 (p) ≤ 0.05 且差异倍数 (FC) \geq

1.2 或 ≤ 0.83 。使用 R 语言中的 clusterprofiler 包进行基因本体 (gene ontology, GO) 富集分析; GSEABase 包进行基因富集分析 (gene set enrichment analysis, GSEA); GSVA 包进行单样本基因富集分析 (single-sample gene set enrichment analysis, ssGSEA); decoupleR 包进行转录因子 (TFs) 活性计算。通过 TMHMM 2.0 预测蛋白跨膜结构, 基于 Human Protein Atlas (HPA) 数据库注释亚细胞定位。在 STRING 网站构建蛋白质互作 (protein-protein interaction, PPI) 网络, 并使用 Cytoscape 软件进行可视化分析。

2 结果与讨论

2.1 HepG2 细胞脂毒性模型建立及蛋白质组学数据采集

以 0.25 mmol/L BSA-PA 构建 HepG2 细胞脂毒性模型, 并以等体积 BSA 水溶液作为对照。每个处理条件设置 3 个生物学重复, 并平行采用 3 种常用的蛋白质组学样本前处理策略制备肽段, 示于图 1a、1b^[18]。数据质控结果表明, 样本间 Spearman 相关系数均大于 0.95, 且超过 95% 的蛋白质变异系数 (CV) 低于 20%, 表明该数据具备良好的定量精度和高度重复性, 示于附图 1a~1d (请登录《质谱学报》官网 <https://zpxb.xml-journal.net> 下载, 下同)。同时, 相较于既往通常仅鉴定 620~5 548 种蛋白质的数据集, 本研究共鉴定到 8 519 种蛋白质, 提升了约 1.5~3 倍的覆盖深度, 覆盖 5 个数量级的定量动态范围, 结果示于附图 1e、附表 1^[19-21]。此外, 本研究在代谢相关蛋白质、激酶及转录因子等关键功能蛋白质的覆盖方面均有显著提升, 示于图 1c。进一步分析发现, 尽管仅有 45.4% 肽段在 3 种酶解方法中均被检出 (表明方法存在偏好性), 但 87.1% 蛋白质被这 3 种方法共同鉴定, 示于图 1d。

2.2 HepG2 细胞脂毒性模型中 3 种酶解方法的比较

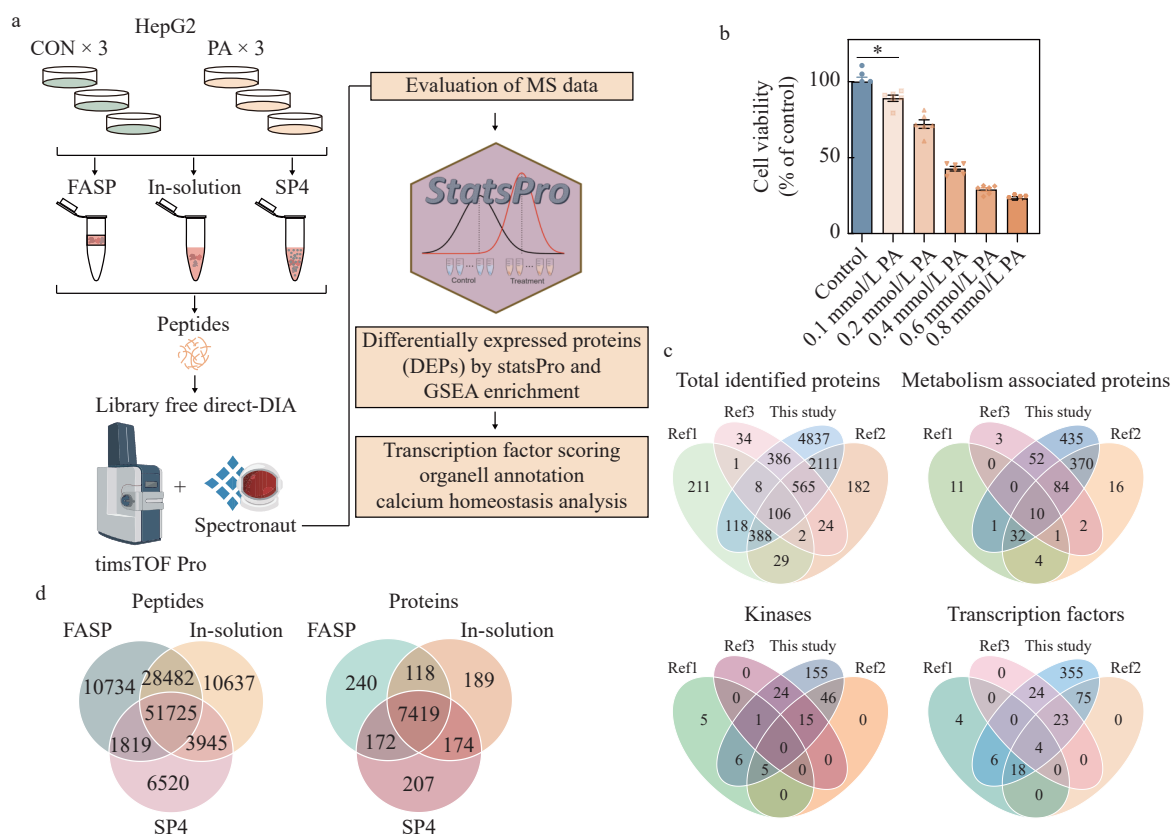
主成分分析 (PCA) 结果表明, 在同一处理组内, 不同酶解方法所得样本在 PCA1 和 PCA2 两个维度上均呈现明显分离, 提示不同酶解策略获得的肽段存在差异, 示于图 2a。进一步对 3 种方法获得的肽段进行理化性质评估发现, 溶液内酶解法更倾向于获得疏水性更强、分子质量更大且肽链更长的肽段, 并且能够鉴定出更高比例的

跨膜结构域(TMD)蛋白,示于图2b、2c。此外,通过比较不同酶解策略得到的肽段等电点(pI)分布发现,SP4法更倾向于获得酸性肽段,而溶液内酶解法则产生较多的碱性肽段,结果示于图2b。

为深入解析可能参与肝脏脂质代谢稳态调控的关键DEPs,本研究整合了3种酶解策略的数据,并利用此前发布的StatsPro平台进行系统的DEPs筛选。筛选标准为:在不少于3种统计检验方法中,同时满足 $p \leq 0.05$ 且 $FC \geq 1.2$ 或 ≤ 0.83 。结果表明,FASP法鉴定到765个上调蛋白和776个下调蛋白;SP4酶解法鉴定到556个上调蛋白和631个下调蛋白;溶液内酶解法鉴定到599个上调蛋白和551个下调蛋白。整合3种方法后,共获得1203个上调DEPs和1369个下调DEPs(至少在1种方法中被检出),其中221个上调DEPs和140个下调DEPs在3种酶解方法中均被检出,示于图2d、附表2a~2d。随后,开展基因本体论细胞组分(gene ontology

cellular component, GOCC)富集分析,以进一步探索不同酶解策略所鉴定到的特异性DEPs是否存在特定的亚细胞定位偏好。结果表明,在FASP法中,上调DEPs主要富集于溶酶体、内质网及乙酰转移酶相关结构,而下调DEPs则集中于多核糖体、核糖体、剪接体及N-连接糖基化相关组分;在SP4法中,上调DEPs主要定位于运输囊泡及细胞呼吸相关结构,而下调DEPs未见显著富集条目;在溶液内酶解法中,上调DEPs主要富集于PcG蛋白复合体及线粒体膜相关结构,下调DEPs主要归属于蛋白酶体与内肽酶复合体,具体结果示于图2e。综上,不同的样本制备策略在DEPs鉴定及其后续的生物解释方面均表现出系统性差异,提示仅依赖单一样本制备方法可能导致对生物学过程的理解产生偏倚。

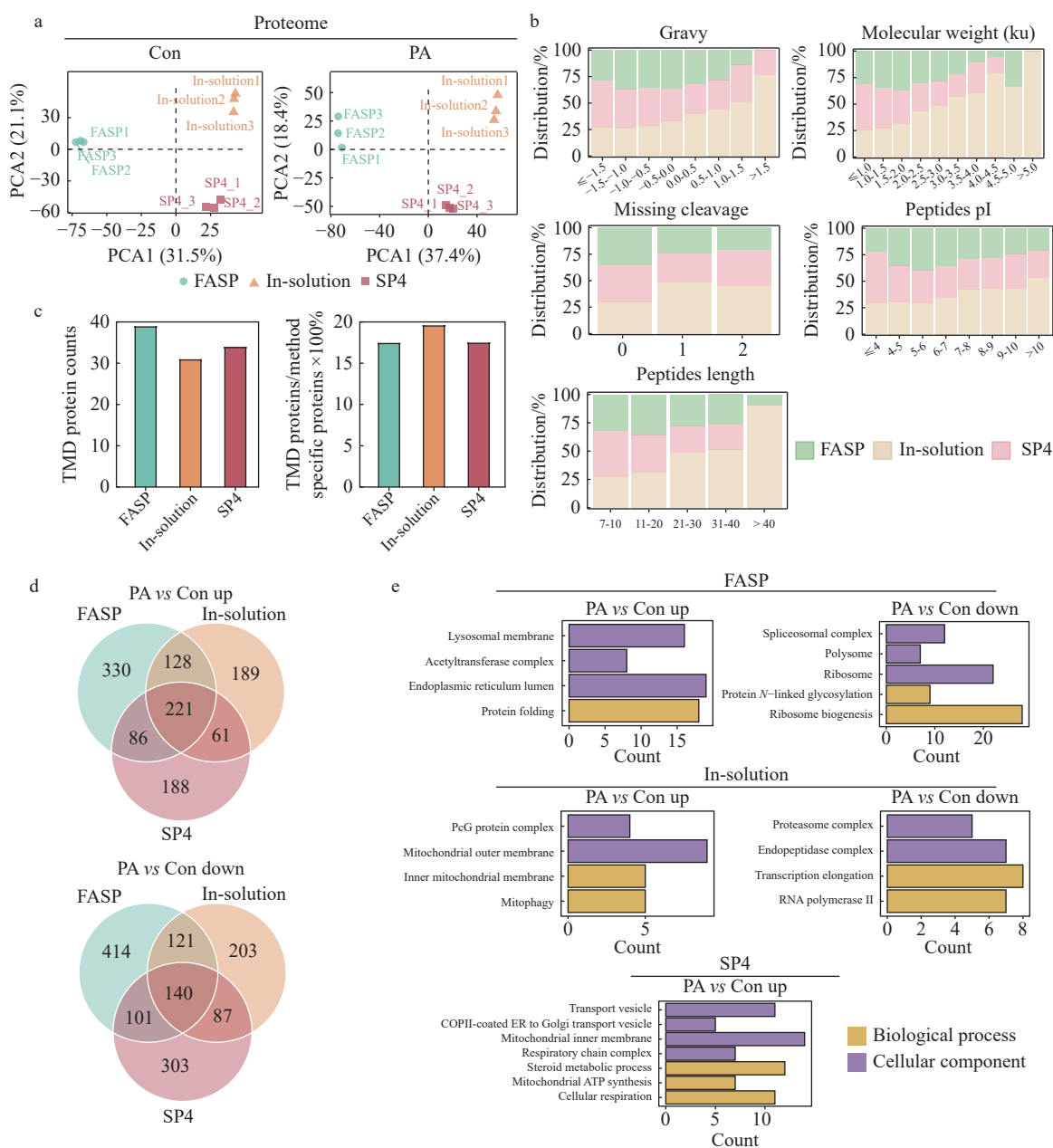
基因富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)结果表明,细胞外基质(ECM)-受体相互作用、补体与凝血级联、细胞黏附和DNA错配修复等通路在3种酶解方法中均呈一致的活性



注: a. 实验流程设计; b. 经PA处理的HepG2细胞活力变化; c. 与已发表的数据集蛋白质鉴定结果比较; d. 3种酶解方法中蛋白质及肽段鉴定情况

图1 实验流程、模型验证及蛋白质鉴定结果比较

Fig. 1 Experimental workflow, model validation and identified proteins comparison



注: a. 蛋白质组学数据的 PCA 分析; b. 特异性肽段的理化性质分布差异; c. 跨膜区(TMD)蛋白比较; d. 差异蛋白比较; e. 特异性差异蛋白的 GO 富集分析

图 2 HepG2 细胞脂毒性模型中 3 种酶解方法差异蛋白的比较
 Fig. 2 DEPs comparison of PA treatment among three digestion methods

上调(标准化富集分数, NES>0), 提示上述生物过程在不同的样本制备策略下表现出相同的上调趋势, 示于附图 2a、附表 3。此外, 还观察到方法特异性的通路富集特征: SP4法特异性检测到丙酮酸代谢和亮氨酸代谢通路上调; FASP 法特异性富集与免疫相关的细胞因子-受体相互作用通路; 溶液内酶解法对 PPAR信号通路显著增强。值得注意的是, 脂肪酸代谢通路在 SP4 法和

溶液内酶解法中均上调; 下调通路方面, 剪接体与核糖体功能通路在 FASP 法和溶液内酶解法中均表现出活性下调, 但在 SP4 法中未见该通路富集。整体而言, 不同的样本制备策略会对通路富集结果产生影响, 提示在蛋白质组学研究中需充分考虑样本制备方法的选择。为验证本研究通路层面结果的可靠性, 进一步将富集结果与 3 项独立的、具有可比脂毒性模型的外部数据集

进行比较^[19,21-22]。跨数据集分析显示,脂肪酸代谢、黏着斑、补体激活、三羧酸(tricarboxylic acid cycle, TCA)循环及PPAR信号通路在各数据集中均呈一致上调,而核糖体识别起始密码子过程及氨酰-tRNA生物合成等通路则普遍下调,示于附图2b、2c。这一结果验证了本研究所揭示的通路变化具有较高的可重复性和可靠性。

2.3 整合3种酶解方法构建HepG2细胞脂毒性模型蛋白质组图谱

为尽可能消除不同酶解策略带来的方法学偏差,将3种酶解方法获得的蛋白质组学数据进行整合,并采用与单一酶解策略相同的统计流程开展系统分析。PCA结果表明,PA处理组与对照组在PCA1和PCA2两个维度上呈明显分离,示于附图3a。此外,按照与各单独酶解策略相同的差异蛋白筛选标准对整合数据进行差异分析,共鉴定到532个上调DEPs和513个下调DEPs。其中,整合数据筛选得到的上调和下调DEPs分别占3种酶解方法单独鉴定DEPs并集的98.7%和98.1%,结果示于图3a、附表2e。关键上调DEPs包括PLIN2(脂滴形成^[23])、PCSK9(胆固醇调控^[24])、LDLR(胆固醇调控^[24])以及CD36(脂肪酸摄取^[25]),提示在高脂质负荷条件下肝脏细胞代谢应答显著增强,示于附图3b。

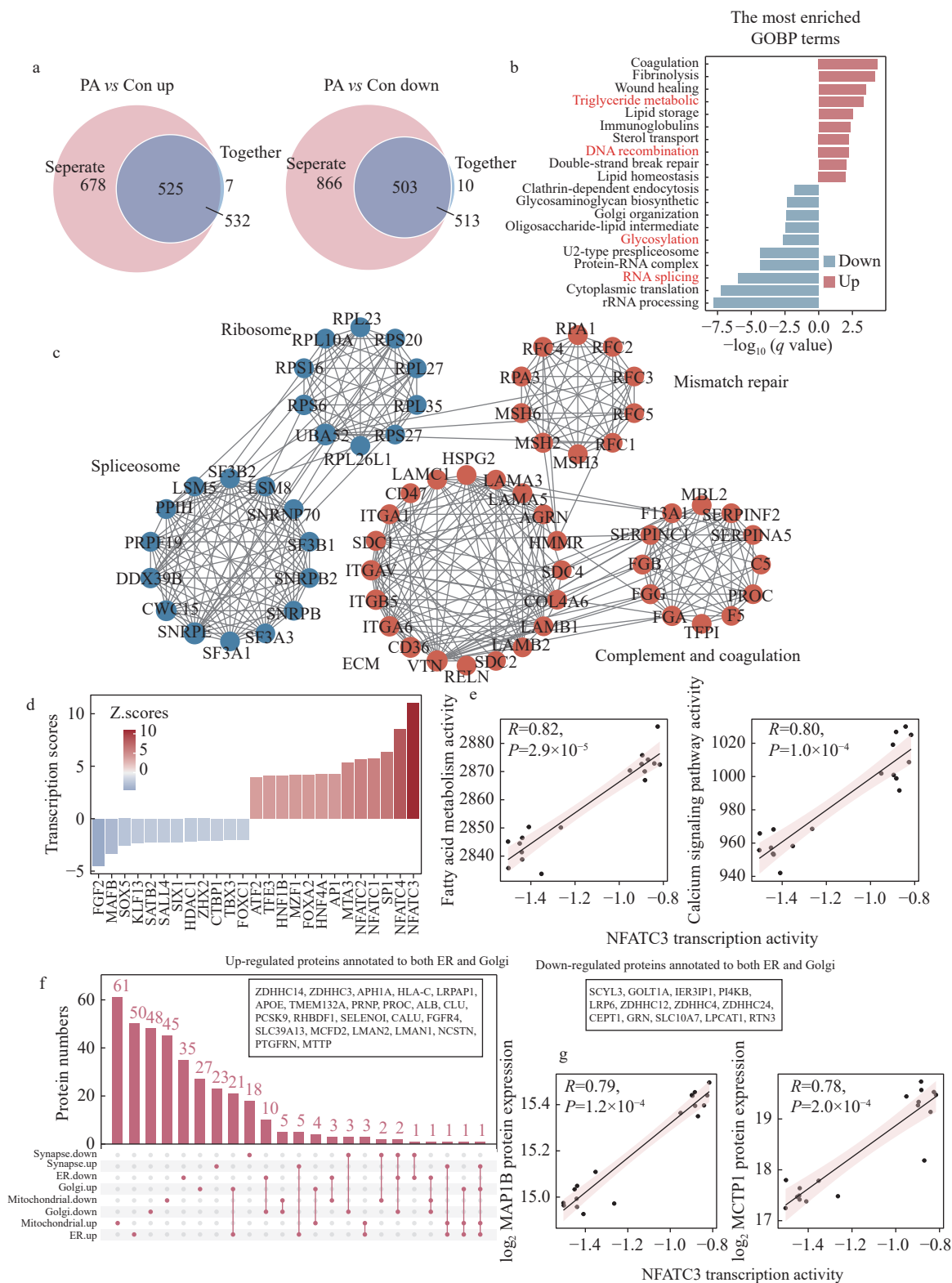
基因本体论生物过程(gene ontology biological process, GOBP)富集分析结果显示,上调DEPs主要富集于甘油三酯代谢、脂质储存和固醇转运通路等脂质代谢相关通路,这与已有报道^[26-27]高度一致,结果示于图3b。相比之下,胞质翻译、rRNA加工及蛋白-RNA相互作用、网格蛋白介导的转运与高尔基体组织等通路显著下调,提示在PA处理条件下,细胞的蛋白翻译能力和分子运输功能显著受损。

为从蛋白质复合物层面进一步解析脂毒性条件下细胞的变化,本研究构建并分析了蛋白-蛋白互作(protein-protein interaction, PPI)网络。结果表明,与ECM相关的糖蛋白,如LAMA3、LAMA5、LAMB1、LAMB2和LAMC1,在PA处理组显著上调,这些蛋白与ECM结构维持、黏着斑形成和纤维化密切相关。同时, COL4A6、ITGA1、ITGAV和ITGB5等蛋白与上述ECM糖蛋白呈紧密互作,提示它们可能作为功能模块协同调控脂毒性条件下肝细胞的脂质稳态,示于

图3c。进一步的PPI子网络分析显示,TFPI、SERPINF2、SERPINC1等凝血调控因子与C5等补体成分之间存在功能协同,提示二者可能共同参与调控脂毒性条件下细胞的炎症反应过程。此外,DNA复制及错配修复相关蛋白质,如RFC、RFA、MSH复合体等显著上调,表明细胞在脂毒性损伤下可能启动了基因组保护机制。相比之下,与剪接体和核糖体相关的组分持续下调,提示RNA加工与蛋白质合成体系在脂毒性状态下受到广泛抑制,示于图3c。

2.4 深度蛋白质组学系统性揭示高脂细胞模型下的细胞器功能紊乱

为进一步探究脂毒性条件下细胞的转录调控机制,开展了转录因子(TFs)活性预测分析。结果显示,NFATC家族成员(NFATC1/2/3/4)呈现出显著的活性升高,示于图3d。研究表明^[28-29],NFATC家族能够响应细胞内的钙信号,在小鼠高脂饮食模型中,抑制NFATC家族活性可显著延缓非酒精性脂肪性肝炎的病理进程。为探究NFATC家族活性升高的潜在分子机制,本研究进行了单样本基因通路富集分析(single-sample gene set enrichment analysis, ssGSEA),结果显示,NFATC家族活性与脂肪酸代谢以及钙信号通路呈显著正相关,示于图3e,进一步支持了转录因子在脂毒性应答过程中的关键作用,NFATC家族各成员活性与不同通路的相关性列于附表4a。综合上述功能富集结果可知,PA诱导的HepG2细胞脂毒性模型在能量代谢、蛋白运输及钙信号调控方面均表现出显著变化,提示线粒体、内质网和高尔基体等细胞结构受到不同程度的损伤,并伴随信号传导功能紊乱。这些变化共同驱动了细胞稳态的失衡并诱发脂毒性相关表型的产生。为进一步验证上述假设,将本研究中鉴定到的DEPs与GOCC数据库中注释于相关细胞结构的蛋白质进行对比分析,结果示于图3f、附表5。PA处理后,线粒体相关DEPs显著上调,其中包括呼吸链复合体I(NDUFA亚基)与复合体V(ATP5亚基)蛋白,提示细胞在脂毒性刺激下启动了代偿响应机制。然而,三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)合酶装配因子DMAC1及复合体II装配因子SDHAF4的表达却受到显著抑制,表明尽管呼吸链核心亚基的表达整体上调,其功能性装配却受到损害。该结果



注: a. 3种酶解方法单独鉴定 DEPs 的并集与整合去批次数据集 DEPs 的重叠情况; b. DEPs 的 GO 富集分析; c. 蛋白互作网络分析; d. PA 处理条件下转录因子 (TFs) 活性变化; e. NFATC3 活性与钙信号通路及脂肪酸代谢通路得分呈正相关 (Spearman 相关系数); f. DEPs 的细胞器蛋白注释结果; g. NFATC3 活性与 MAP1B 和 MCTP1 蛋白表达呈正相关 (Spearman 相关性)

图 3 PA 诱导的 HepG2 细胞脂毒性模型与对照组间的蛋白质组学分析

Fig. 3 Proteome analysis of PA treated group and control group

解释了脂毒性条件下线粒体质量增加却功能受损,以及细胞内活性氧(ROS)积累这一经典表型^[30]。

鉴于内质网与高尔基体在功能上的紧密关联,本研究进一步筛选了同时注释于这2种细胞结构的DEPs。结果表明,内质网(endoplasmic reticulum, ER)货物受体复合物组分MCFD2及其互作伙伴LMAN家族成员,以及分泌标志蛋白ALB、ER钙结合蛋白CALU和脂质运输蛋白APOE的表达显著升高,提示细胞的分泌负荷可能增加。相反,与ER形态维持相关的RTN3,以及参与磷脂信号调控的PI4KB与LPCAT1蛋白显著下调,提示内质网或高尔基体膜的结构完整性可能受损。值得注意的是,介导蛋白质棕榈酰化修饰的ZDHHC家族成员显著改变,鉴于棕榈酰化在代谢调控中具有关键作用,该结果为理解脂毒性相关的ER-高尔基体功能异常提供了新视角。同时,本研究还观察到多种钙调节蛋白发生了显著改变:GRIN2B、CAPN5、DAG1、MAP1B、MAP1S和MCTP1显著上调,而HIP1、SNAPIN、CPLX2和CHN2显著下调,表明脂毒性参与介导了细胞钙稳态与钙依赖信号过程的扰动。基于前述转录因子NFATC活性增强结果,本研究进一步评估了NFATC活性与钙调蛋白之间的相关性。结果表明,NFATC3活性与MAP1B和MCTP1的表达呈显著正相关,示于图3g、附表4b。这一结果解释了脂毒性诱导的钙信号紊乱的潜在机制,并提示可能恢复钙流与代谢稳态的治疗靶点。

3 结论

本研究基于3种常用的蛋白质组学样本酶解策略,对PA诱导的HepG2细胞脂毒性模型开展了系统、全面且深度的蛋白质组学分析。对比不同酶解策略所得的数据,发现3种策略在差异蛋白的鉴定及由此产生的生物学解释上均存在偏倚或不完全解读。通过整合多酶解策略所得数据,本研究成功构建了一个高深度、高重复性且宽覆盖范围的肝细胞脂毒性模型蛋白质组学数据集,并从中识别出更具生物学一致性的潜在治疗靶点。另外,通过进一步结合功能富集分析、转录因子活性预测、蛋白亚细胞定位及蛋白互作网络等分析策略,揭示了一条由转录因子活性重塑、细胞器功能障碍及钙稳态失衡共同驱

动的脂毒性机制。本研究提出的分析流程为未来肝脏脂毒性相关的生物学及组学研究提供了重要的分析框架和技术参考,有望推动该领域在机制解析及潜在干预靶点发现方面迈向更高精度且全面的研究阶段。

参考文献:

- [1] KASSI E, PERVANIDOU P, KALTSAS G, CHROUSOS G. Metabolic syndrome: definitions and controversies[J]. *BMC Medicine*, 2011, 9(1): 48.
- [2] WIRES E S, TRYCHTA K A, BÄCK S, SULIMA A, RICE K C, HARVEY B K. High fat diet disrupts endoplasmic reticulum calcium homeostasis in the rat liver[J]. *Journal of Hepatology*, 2017, 67(5): 1 009-1 017.
- [3] RIAZI K, AZHARI H, CHARETTE J H, UNDERWOOD F E, KING J A, AFSHAR E E, SWAIN M G, CONGLY S E, KAPLAN G G, SHAHEEN A A. The prevalence and incidence of NAFLD worldwide: a systematic review and meta-analysis[J]. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 2022, 7(9): 851-861.
- [4] CAO Y, SI Y, LI M, FAN D, CAO M, CHEON S H, LIANG J, LU P. Licochalcone E improves insulin sensitivity in palmitic acid-treated HepG2 cells through inhibition of the NLRP3 signaling pathway[J]. *International Immunopharmacology*, 2021, 99: 107 923.
- [5] XIAO H, SUN X, LIN Z, YANG Y, ZHANG M, XU Z, LIU P, LIU Z, HUANG H. Gentiopicroside targets PAQR3 to activate the PI3K/AKT signaling pathway and ameliorate disordered glucose and lipid metabolism[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2022, 12(6): 2 887-2 904.
- [6] ESLAM M, NEWSOME P N, SARIN S K, ANSTEE Q M, TARGHER G, ROMERO-GOMEZ M, ZELBERSAGI S, WAI-SUN WONG V, DUFOUR J F, SCHATTENBERG J M, KAWAGUCHI T, ARRESE M, VALENTI L, SHIHA G, TIRIBELLI C, YKIJÄRVINEN H, FAN J G, GRØNBÆK H, YILMAZ Y, CORTEZ-PINTO H, OLIVEIRA C P, BEDOSSA P, ADAMS L A, ZHENG M H, FOUAD Y, CHAN W K, MENDEZ-SANCHEZ N, AHN S H, CASTERA L, BUGIANESI E, RATZIU V, GEORGE J. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: an international expert consensus statement[J]. *Journal of Hepatology*, 2020, 73(1): 202-209.
- [7] KARIM N, SHISHIR M R I, RASHWAN A K, KE H, CHEN W. Suppression of palmitic acid-induced hepatic oxidative injury by neohesperidin-loaded pectin-chitosan

- decorated nanoliposomes[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 183: 908-917.
- [8] RAO Y, SU R, WU C, CHAI X, LI J, YANG G, WU J, FU T, JIANG Z, GUO Z, XU C, HUANG L. Identification of a natural PLA2 inhibitor from the marine fungus *Aspergillus sp. c1* for MAFLD treatment that suppressed lipotoxicity by inhibiting the IRE-1 α /XBP-1s axis and JNK signaling[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2024, 14(1): 304-318.
- [9] LONGHITANO L, DISTEFANO A, MUSSO N, BONACCI P, ORLANDO L, GIALLONGO S, TIBULLO D, DENARO S, LAZZARINO G, FER-RIGNO J, NICOLOSI A, ALANAZI A M, SALOMONE F, TROPEA E, BARBAGALLO I A, BRAMANTI V, LI VOLTI G, LAZZARINO G, TORELLA D, AMORINI A M. (+)-Lipoic acid reduces mitochondrial unfolded protein response and attenuates oxidative stress and aging in an *in vitro* model of non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2024, 22(1): 82.
- [10] MORIGNY P, BOUCHER J, ARNER P, LANGIN D. Lipid and glucose metabolism in white adipocytes: pathways, dysfunction and therapeutics[J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2021, 17(5): 276-295.
- [11] JIANG Y, ZHANG J, LIU W, QIAN X, ZHUANG X, HU C. *Scutellariae Radix* and *Coptidis Rhizoma* improve NAFLD *via* regulation of SIRT6/ACSL5 pathway and SCD1[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2025, 348: 119 834.
- [12] LV C, ZHAO L, HOU J, SUN H, LI Z, WU Y, SHI P, XIAO Y, XIE Y, SU W, YIN M. Multi-omics reveals total flavones from *Abelmoschus Manihot* (L.) Medik. [Malvaceae] ameliorate MAFLD *via* PI3K/AKT/mTOR-mediated autophagy[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2025, 16: 1 601 707.
- [13] OLIVIERI O, SPEZIALI G, CASTAGNA A, PATTINI P, UDALI S, PIZZOLO F, LIESINGER L, GINDLHUBER J, TOMIN T, SCHITTMAYER M, BIRNER-GRUENBERGER R, CECCONI D, GIRELLI D, FRISO S, MARTINELLI N. The positive association between plasma myristic acid and ApoCIII concentrations in cardiovascular disease patients is supported by the effects of myristic acid in HepG2 cells[J]. *The Journal of Nutrition*, 2020, 150(10): 2 707-2 715.
- [14] SHARMA J, DEY P. Differential modulation of the hepatocellular metabolome, cytoprotective and inflammatory responses due to endotoxemia and lipotoxicity[J]. *Molecular Omics*, 2024, 21(2): 152-163.
- [15] WILLEBRORDS J, PEREIRA I V A, MAES M, CRE-SPO YANGUAS S, COLLE I, van den BOSSCHE B, Da SILVA T C, de OLIVEIRA C P M S, ANDRAUS W, ALVES V A, COGLIATI B, VINKEN M. Strategies, models and biomarkers in experimental non-alcoholic fatty liver disease research[J]. *Progress in Lipid Research*, 2015, 59: 106-125.
- [16] MEIER F, BRUNNER A D, KOCH S, KOCH H, LUBECK M, KRAUSE M, GOEDECKE N, DECKER J, KOSINSKI T, PARK M A, BACHE N, HOERNING O, COX J, RÄTHER O, MANN M. Online parallel accumulation-serial fragmentation (PASEF) with a novel trapped ion mobility mass spectrometer[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2018, 17(12): 2 534-2 545.
- [17] JOHNSTON H E, YADAV K, KIRKPATRICK J M, BIGGS G S, OXLEY D, KRAMER H B, SAMANT R S. Solvent precipitation SP3 (SP4) enhances recovery for proteomics sample preparation without magnetic beads[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(29): 10 320-10 328.
- [18] YANG X, LI L, FANG K, DONG R, LI J, ZHAO Y, DONG H, YI P, HUANG Z, CHEN G, LU F. Wu-Mei-Wan reduces insulin resistance *via* inhibition of NLRP3 inflammasome activation in HepG2 cells[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 2017: 7 283 241.
- [19] SAHA S, VERMA R, KUMAR C, KUMAR B, DEY A K, SURJIT M, MYLAVARAPU S V S, MAITI T K. Proteomic analysis reveals USP7 as a novel regulator of palmitic acid-induced hepatocellular carcinoma cell death[J]. *Cell Death & Disease*, 2022, 13: 563.
- [20] SUN Y, WANG J, GUO X, ZHU N, NIU L, DING X, XIE Z, CHEN X, YANG F. Oleic acid and eicosapentaenoic acid reverse palmitic acid-induced insulin resistance in human HepG2 cells *via* the reactive oxygen species/JUN pathway[J]. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 2021, 19(5): 754-771.
- [21] GINDLHUBER J, SCHINAGL M, LIESINGER L, DARNHOFER B, TOMIN T, SCHITTMAYER M, BIRNER-GRUENBERGER R. Hepatocyte proteome alterations induced by individual and combinations of common free fatty acids[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(6): 3 356.
- [22] YANG W, HE Y, LIU S, GAN L, ZHANG Z, WANG J, LIANG J, DONG Y, WANG Q, HOU Z, YANG L. Integrative transcriptomic analysis of NAFLD animal model reveals dysregulated genes and pathways in

- metabolism[J]. *Gene*, 2016, 595(1): 99-108.
- [23] JIN Y, TAN Y, CHEN L, LIU Y, REN Z. Reactive oxygen species induces lipid droplet accumulation in HepG2 cells by increasing perilipin 2 expression[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(11): 3 445.
- [24] BAO X, LIANG Y, CHANG H, CAI T, FENG B, GORDON K, ZHU Y, SHI H, HE Y, XIE L. Targeting pro-protein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): from bench to bedside[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2024, 9: 13.
- [25] ABUMRAD N A, CABODEVILLA A G, SAMOVSKI D, PIETKA T, BASU D, GOLDBERG I J. Endothelial cell receptors in tissue lipid uptake and metabolism[J]. *Circulation Research*, 2021, 128(3): 433-450.
- [26] LIAN J, BAHITHAM W, PANIGRAHI R, NELSON R, LI L, WATTS R, THIESEN A, LEMIEUX M J, LEHNER R. Genetic variation in human carboxylesterase CES1 confers resistance to hepatic steatosis[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2018, 1 863(7): 688-699.
- [27] PICCININ E, ARCONZO M, MATRELLA M L, CARIELLO M, POLIZZI A, LIPPI Y, BERTRAND-MICHEL J, GUILLOU H, LOISEAU N, VILLANI G, MOSCHETTA A. Intestinal Pgc1 α ablation protects from liver steatosis and fibrosis[J]. *JHEP Reports*, 2023, 5(11): 100 853.
- [28] DU M, WANG X, YUAN L, LIU B, MAO X, HUANG D, YANG L, HUANG K, ZHANG F, WANG Y, LUO X, WANG C, PENG J, LIANG M, HUANG D, HUANG K. Targeting NFATc4 attenuates non-alcoholic steatohepatitis in mice[J]. *Journal of Hepatology*, 2020, 73(6): 1 333-1 346.
- [29] VADAVANATH PRABHAKARAN V, KOZHIPARAMBIL GOPALAN R. Phloretin alleviates arsenic trioxide-induced apoptosis of H9c2 cardiomyoblasts via downregulation in Ca²⁺/calcineurin/NFATc pathway and inflammatory cytokine release[J]. *Cardiovascular Toxicology*, 2021, 21(8): 642-654.
- [30] YOON H, SHAW J L, HAIGIS M C, GREKA A. Lipid metabolism in sickness and in health: emerging regulators of lipotoxicity[J]. *Molecular Cell*, 2021, 81(18): 3 708-3 730.

(收稿日期: 2025-11-24; 修回日期: 2025-12-25)