

【 实验研究 】

基于 DARTS 技术与定量蛋白组分析的黄芪甲苷抗糖尿病肾病作用靶标的发现与验证

周应坤¹, 王 群^{1*}, 韩 伟¹, 徐展翅¹, 张 明², 王庆学¹, 李亚辉¹

1. 贵州中医药大学 药学院, 贵州 贵阳 550025

2. 贵州医科大学 贵州省天然产物研究中心 中药功效成分发掘与利用全国重点实验室, 贵州 贵阳 550014

摘 要: **目的** 基于药物亲和反应的靶点稳定性分析技术(DARTS)及液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)研究黄芪甲苷(ASI)在 HK-2(肾小管上皮细胞)上的作用靶标, 并进行验证。**方法** 采用 40 mmol·L⁻¹ 葡萄糖干预 HK-2 细胞 24 h, 制备糖尿病肾病(DKD)细胞模型; 将 HK-2 细胞随机分为: 对照组、甘露醇(等渗对照)组、模型组和 ASI 低、中、高浓度(1.6、3.2、6.4 μmol·L⁻¹)组, 造模后加药干预 24 h; CCK-8 法检测细胞存活率, 流式细胞仪检测细胞凋亡, ELISA 法检测细胞上清液中肿瘤坏死因子(TNF)-α、血管内皮生长因子(VEGF)、肾损伤分子-1(KIM-1)水平。运用 DARTS 技术联合定量蛋白组学分析筛选出肾小管上皮细胞中可能与 ASI 发生结合的蛋白。基于差异蛋白筛选结果, 与 GeneCard、DisGeNET 和 OMIM 数据库中筛选的“糖尿病肾病”“细胞凋亡”靶标取交集, 选取与 DKD 相关的蛋白, 采用分子对接、DARTS 联合 Western blotting 实验及生物膜干涉技术对其进行验证。**结果** 与模型组比, ASI 能提高高糖诱导下的 HK-2 细胞活力, 并抑制细胞凋亡及 TNF-α、VEGF、KIM-1 的分泌($P<0.05$ 、 0.01)。DARTS 联合定量蛋白组学分析鉴定出 32 个差异蛋白, 其中线粒体凋亡诱导因子 1(AIFM1)、2,4-双烯酰辅酶 A 还原酶 1(DECRI)与“糖尿病肾病”“细胞凋亡”相关; 分子对接显示, ASI 与 AIFM1 的结合活性更强; DARTS-Western blotting 实验显示, ASI 能提高 AIFM1 的酶解稳定性; 生物膜干涉实验显示, ASI 与 AIFM1 具有良好的亲和性。**结论** ASI 可能通过靶向作用于 HK-2 细胞上的 AIFM1 发挥细胞保护作用。

关键词: 黄芪甲苷; DARTS 技术; 生物膜干涉技术; 肾小管上皮细胞; 凋亡; 靶蛋白; 糖尿病肾病

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2026)09-3010-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.09.003

Identification and validation of astragaloside IV targets against diabetic kidney disease based on DARTS technology and quantitative proteomic analysis

ZHOU Yingkun¹, WANG Qun¹, HAN Wei¹, XU Zhanchi¹, ZHANG Ming², WANG Qingxue¹, LI Yahui¹

1. School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

2. State Key Laboratory of Effective Substances Discovery and Utilization for Traditional Chinese Medicine, Guizhou Provincial Research Center for Natural Products, Guizhou Medical University, Guiyang 550014, China

Abstract: Objective To investigate the target proteins of astragaloside IV (ASI) in HK-2 cells (renal tubular epithelial cells) using drug affinity responsive target stability (DARTS) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), and to validate these targets. **Methods** HK-2 cells were treated with 40 mmol·L⁻¹ glucose for 24 h to establish a diabetic kidney disease (DKD) cell model. Cells were randomly divided into control, mannitol (isotonic control), model, and ASI low-, medium-, and high-dose groups (1.6, 3.2, and 6.4 μmol·L⁻¹), respectively. After modeling, drugs were added and incubated for 24 h. Cell viability was assessed by CCK-8 assay, apoptosis was analyzed by flow cytometry, and levels of tumor necrosis factor-α (TNF-α), vascular endothelial

收稿日期: 2026-04-23

基金项目: 贵州省卫生健康委科学技术基金项目(gzwbkj2024-514); 贵州省基础研究计划(自然科学)面上项目(黔科合基础 MS[2025]172); 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题(QZYY-2025-012, QZYY-2026-096); 贵州省科技计划项目(黔科合基础 MS[2026] 647); 贵州中医药大学青年扬帆计划(贵中医科合-QNYFZK[2025] 16 号)

作者简介: 周应坤, 研究方向为中药及民族药药物新制剂。E-mail: 2389909974@qq.com

***通信作者:** 王 群(1988—), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中药药效物质基础与药动学。E-mail: gywq198856@163.com

growth factor (VEGF), and kidney injury molecule-1 (KIM-1) in cell supernatants were measured by ELISA. DARTS combined with quantitative proteomics was used to identify potential proteins interacting with ASI in renal tubular epithelial cells. Based on differentially expressed proteins, intersection analysis was performed with targets related to “diabetic kidney disease” and “apoptosis” from GeneCard, DisGeNET, and OMIM databases to select DKD-related proteins. These candidates were further validated through molecular docking, DARTS-Western blotting, and bioluminescence resonance energy transfer (BRET) assays. **Results** Compared with the model group, ASI significantly improved cell viability, inhibited apoptosis, and reduced secretion of TNF- α , VEGF, and KIM-1 under high-glucose conditions ($P < 0.05, 0.01$). DARTS combined with quantitative proteomics identified 32 differentially expressed proteins, among which mitochondrial apoptotic inducer 1 (AIFM1) and 2,4-dienoyl-CoA reductase 1 (DECR1) were associated with “diabetic kidney disease” and “apoptosis”. Molecular docking showed stronger binding affinity between ASI and AIFM1. DARTS-Western blotting revealed that ASI enhanced the enzymatic stability of AIFM1. BRET experiments confirmed strong binding affinity between ASI and AIFM1. **Conclusion** ASI may exert its protective effects on HK-2 cells by targeting AIFM1.

Key words: astragaloside IV; drug affinity responsive target stability (DARTS); bilayer Interferometry (BLI); HK-2 cells; apoptosis; target protein; diabetic kidney disease

糖尿病肾病 (DKD) 是糖尿病常见的微血管并发症, 如果得不到及时有效的治疗, 最终可能发展为末期肾衰竭, 严重危及生命。目前 DKD 的治疗措施主要包括控制血糖、血压及抑制肾素-血管紧张素醛固酮系统等。但这些治疗方式对改善肾功能损伤的作用有限, 临床治疗效果不佳^[1-2]。近年研究显示^[3-5], 肾小管上皮细胞 (RTECs) 损伤是 DKD 发生的关键环节。受损的 RTECs 会产生促炎因子、趋化因子、促纤维化因子、活性氧等, 这些物质会加剧肾小管间质炎症及纤维化, 从而加重肾功能损伤。黄芪甲苷 (ASI) 是中药黄芪的主要成分, 研究表明, 其可以通过抑制 RTECs 凋亡及转分化, 进而延缓 DKD 的发展进程^[6-7]。但 ASI 如何发挥 RTECs 的保护, 以及抗 DKD 作用的机制尚不明确, 影响其深层次开发与利用。

有研究表明^[8-10], 中药对疾病的治疗, 实质上是其通过其活性成分直接作用于细胞上的特定靶标, 并调节其生物活性, 进而调控靶点分子下游的细胞信号通路, 从而引起生物体整体功能状态的改变, 发挥疾病治疗作用。为此, 获取 ASI 在 RTECs 上的靶标是明确其作用机制需要解决的关键问题。基于药物亲和反应的靶点稳定性分析技术 (DARTS) 作为非化学修饰的药物靶标识别技术, 可结合质谱作为筛选药物靶标的手段; 也可联合 Western blotting 用于作用靶标的验证。由于其不需改变药物的分子结构, 在中药直接作用靶标的鉴定研究中表现出了显著的优势^[11-14]。故本实验拟采用 DARTS 技术联合定量蛋白组学分析筛选出 RTECs 中可能与 ASI 发生结合的蛋白质。并基于差异蛋白筛选结果, 采用分子对接、DARTS-Western blotting 实验及

生物膜干涉技术 (BLI) 对筛选出的靶标蛋白进行验证, 为后期基于该靶标阐释 ASI 抗 DKD 的作用机制提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

DMI1 倒置生物显微镜 (德国徕卡微系统股份公司); TDZ4-WS 台式低速离心机 (长沙湘仪离心机仪器有限公司); 311 二氧化碳培养箱、Varioskan Lux 多功能酶标仪、Easy-nLC 1200/QExactive 液相色谱-质谱仪 (Thermo Fisher Scientific); DSX-280B 压力蒸汽灭菌器 (上海申安医疗器械厂); UPH-10T 优谱超纯水制造系统 (成都超纯科技有限公司); Cytoflex 流式分析仪 (Beckman 公司); XH-B 旋涡混合器 (江苏康健医疗用品有限公司); SCG-W2000 化学发光成像仪 (武汉赛维尔生物科技有限公司); WIX-miniPRO4 迷你垂直电泳槽、WIX-EP300 基础电泳仪电源、WIX-miniBLOT 迷你转印槽均购于北京韦克斯科技有限公司; Octet R4 BLI 分子互作仪、18-5021 SA 传感器 (德国 Sartorius 公司)。

1.2 细胞、药物及主要试剂

人肾皮质近曲小管上皮细胞 (HK-2, 货号 CL-0109, 武汉普诺赛生命科技有限公司); ASI (中国食品药品检定研究院, 质量分数 $\geq 97\%$, 批号 C15650724); HK-2 细胞专用培养基 (货号 CM-0109)、磷酸盐缓冲液 (PBS, 货号 PB180327) 购于武汉普诺赛生命科技有限公司; 胎牛血清 (货号 C04001-500, 上海逍鹏生物科技有限公司); S110JV 双抗 (源培生物科技股份有限公司); 链霉蛋白酶 (货号 S10014) 购于上海源叶生物科技有限公司; Annexin V-APC 双染细胞凋亡检测试剂盒 (货号

KGA1030, 凯基生物技术股份有限公司); CCK-8 试剂盒 (货号 C0005, 上海陶术生物科技股份有限公司); 青链霉素混合液 (货号 G4003, 赛维尔生物科技有限公司), D-无水葡萄糖 (货号 G8150)、甘露醇 (货号 IM0040) 购于索莱宝生物科技有限公司; 脱色液 (货号 BTP-YST-20250106-01) 购于北京百泰派克生物科技有限公司; 三氟乙酸 (货号 T818782) 购于成都麦克林生物科技有限公司; 线粒体凋亡诱导因子 1 (AIFM1) 重组蛋白购于 MedChemExpress 公司; M-PERTM 蛋白提取试剂 (货号 78501) 购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司; AIF 兔单克隆抗体 (货号 R380680) 购于成都正能生物技术有限责任公司; HRP 标记的羊抗兔 IgG (货号 RS0002) 购于 ImmunoWay 生物技术公司。

2 方法

2.1 细胞培养

用含 10% 胎牛血清、1% 青霉素和链霉素的 HK-2 细胞专用培养基, 将 HK-2 细胞置于 37 °C、5% 浓度 CO₂ 的培养箱中培养, 待细胞密度为 80% 左右时, 以 1:3 传代, 取对数生长期的 HK-2 细胞进行实验。

2.2 ASI 对高糖刺激的 HK-2 细胞保护作用的考察

2.2.1 CCK-8 法检测细胞活性

(1) ASI 给药浓度的筛选: 取对数生长期的 HK-2 细胞, 胰酶消化后终止反应, 以 1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 收集细胞。以密度为每孔 3×10³ 个、每孔终体积 100 μL 将细胞接种在 96 孔板上, 置 37 °C、5% 浓度 CO₂ 的培养箱中培养。待细胞生长密度达到 80%~90%, 给予不同浓度的 ASI (0.4、0.8、1.6、3.2、6.4、12.8、25.6 μmol·L⁻¹) 干预 24 h, 对照组加入等体积的二甲基亚砷 (DMSO, 空白溶剂), 空白组不接种细胞。各孔加入 10 μL 的 CCK-8 试剂, 孵育 2 h, 用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

(2) 细胞分组与给药: 采用 40 mmol·L⁻¹ 葡萄糖干预 HK-2 细胞 24 h, 制备 DKD 细胞模型^[15]。将 HK-2 细胞随机分为: 对照组、甘露醇组、模型组和 ASI 低、中、高浓度 (1.6、3.2、6.4 μmol·L⁻¹) 组。将细胞以每孔 3×10³ 个、每孔终体积 100 μL 接种在 96 孔板上, 待细胞密度达到 80%~90% 后, 对照组不造模; 甘露醇组为低糖培养基 (5.5 mmol·L⁻¹

葡萄糖) 中加入 34.5 mmol·L⁻¹ 甘露醇, 使其渗透压与 40 mmol·L⁻¹ 葡萄糖组一致, 作为等渗对照组; 模型组及各给药组在高糖环境下 (40 mmol·L⁻¹ 葡萄糖) 培养 24 h 后, 给药组给予相应浓度 ASI 干预 24 h, 对照组和模型组给予等体积空白溶剂。干预结束后, 各孔加入 10 μL 的 CCK-8 试剂, 测定 A 值, 计算各组细胞存活率, 并采用显微镜观察各组细胞形态。

2.2.2 流式细胞术检测细胞凋亡率 取对数生长期的 HK-2 细胞, PBS 洗涤, 胰酶消化后, 以每孔 1×10⁵ 个接种于 6 孔板中, 37 °C、5% CO₂ 恒温培养。分组与给药同 “2.2.1 (2)” 项下, 各组给药干预 24 h, 胰酶消化后, 收集细胞, 250×g 离心 5 min, 吸弃上清, 获得细胞沉淀。用 500 μL 的 Binding Buffer 重悬细胞后, 加入 5 μL Annexin V-APC 轻轻吹匀, 再加入 5 μL 的 PI 混匀; 避光室温反应 15 min, 流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

2.2.3 ELISA 法测定细胞上清液中肿瘤坏死因子 (TNF)-α、血管内皮生长因子 (VEGF)、肾损伤分子-1 (KIM-1) 水平 细胞接种、分组与给药同 “2.2.2” 项下, 各组给药干预 24 h 后, 收集各组细胞上清液, 按照 ELISA 检测试剂盒说明书操作, 使用酶标仪在 450 nm 波长下测定 VEGF、KIM-1 A 值, 570 nm 波长下测定 TNF-α A 值, 计算各组细胞上清液中 TNF-α、VEGF、KIM-1 的含量。

2.3 DARTS 结合 LC-MS 技术检测 ASI 在 HK-2 细胞上的作用靶标

2.3.1 HK-2 细胞蛋白的提取 选取生长状态良好的 HK-2 细胞, 弃去培养基, 预冷 PBS 液洗涤 3 次。细胞蛋白按照 M-PERTM 试剂说明书进行提取, 加入含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的提取缓冲溶液 1 mL, 冰上孵育 10 min, 涡旋 5 min, 以 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清, BCA 法测定其蛋白浓度, 进行后续实验。

2.3.2 ASI 浓度的考察 取质量浓度为 5 μg·μL⁻¹ 的蛋白样品 20 μL, 共 9 份。分别加入 2 μL 不同终浓度的 ASI, 使终浓度为 0 (对照组)、1.25、2.50、5.00、10.00、20.00、40.00、80.00、100.00 μmol·L⁻¹, 混匀后室温孵育 60 min 后, 分别加入 2 μL 0.01% 的链霉蛋白酶溶液, 混匀、25 °C 下消化 15 min。取各组蛋白样品与适量 5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液混匀, 煮沸 10 min 变性后, 经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离。将分离胶浸没于考马斯亮蓝染色液中, 摇床上振摇

1 h。染色结束后,加入洗脱液,振荡洗脱至凝胶背景透明,无蓝色,取出凝胶,并用凝胶成像仪扫描成像,筛选与对照组相比蛋白质灰度明显变化的差异蛋白条带。

2.3.3 链霉菌蛋白酶用量考察 取质量浓度为 $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的蛋白样品 $20\text{ }\mu\text{L}$,共 9 份。1 份作为对照组,其余 8 份分别加入 $2\text{ }\mu\text{L}$ ASI 溶液,使终浓度为 $80\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,混匀、室温孵育 60 min 后,分别加入 $2\text{ }\mu\text{L}$ 不同浓度的链霉菌蛋白酶溶液 (0、0.01%、0.02%、0.03%、0.10%、0.30%、1.00%、3.00%),混匀、 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下消化 15 min。取各组蛋白样品与适量 $5\times\text{SDS-PAGE}$ 蛋白上样缓冲液混匀,煮沸 10 min,后续同“2.3.2”项下操作。筛选与对照组相比蛋白质灰度明显变化的差异蛋白条带。

2.3.4 DARTS 实验识别差异结合蛋白 取质量浓度为 $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的蛋白样品 $20\text{ }\mu\text{L}$,分为对照 (等体积 DMSO) 组与 ASI ($80\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组,室温孵育 60 min 后,分别加入 0.03% 的链霉菌蛋白酶溶液 $2\text{ }\mu\text{L}$;混匀、 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下消化 15 min。取各组蛋白样品与适量 $5\times\text{SDS-PAGE}$ 蛋白上样缓冲液混匀,煮沸 10 min,后续同“2.3.2”项下操作。筛选 ASI 组与对照组相比蛋白质灰度明显变化的差异蛋白条带。

2.3.5 定量蛋白组分析研究

(1) 蛋白条带的前处理方法:将差异蛋白条带切下,分别切成 1 mm^3 的胶粒,分别装入 1.5 mL EP 管中。加入 1 mL 的 50% ACN-50% $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NH_4HCO_3 溶液对胶粒进行脱色,再加入 1 mL 的 100% ACN,待胶粒呈白色缩至团状,弃去 ACN,室温放置干燥。再依次进行还原烷基化、胶内酶切及肽段提取等处理。最后,用 C18 stage-tip 进行脱盐处理,于 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 真空干燥。检测前,用含 0.1% 甲酸的 80% 乙腈复溶,涡旋混匀 30 min,离心取上清过 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜,即得。

(2) 定量蛋白组分析:液相色谱条件:预柱为 ReproSil-Pur 120 C₁₈-AQ ($50\text{ mm}\times 150\text{ }\mu\text{m}$, $3\text{ }\mu\text{m}$);分析柱为,packing: ReproSil-Pur 120 C₁₈-AQ ($170\text{ mm}\times 150\text{ }\mu\text{m}$, $1.9\text{ }\mu\text{m}$);体积流量 $600\text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$;流动相为 0.1% 甲酸 (A) 与含 0.1% 甲酸的 80% 乙腈 (B);梯度洗脱 (0~2 min, 4%→8% B; 2~35 min, 8%→28% B; 35~55 min, 28%→40% B; 55~56 min, 40%→95% B; 56~66 min, 95% B)。

质谱条件:一级质谱参数为 Resolution: 70 000; AGC target: 3×10^6 ; MaximumIT: 100 ms; Scanrange:

300 to $1\text{ }800\text{ m/z}$ 。二级质谱参数为 Resolution: 17 500; AGC target: 1×10^5 ; MaximumIT: 50 ms; TopN: 20; NCE/steppedNCE: 28。

质谱原始文件使用 MaxQuant 软件检索目标蛋白数据库,检索参数为固定修饰 (Fixed modifications): Carbamidomethyl (C);可变修饰 (Variable modifications): Oxidation (M), Acetyl (Peptide N-term);酶 (Enzyme): Trypsin;数据库 (Database): Homo_sapiens;遗漏酶切位点 (Maximum Missed Cleavages): 2;一级质谱偏差 (Peptide Mass Tolerance)与二级质谱偏差 (Fragment Mass Tolerance)均设置为 2×10^{-5} 。结合蛋白相对分子质量、肽段可信度的综合评分对结合蛋白进行鉴定。并筛选相对于对照组蛋白表达量增加的蛋白,这些蛋白可能是 ASI 在 HK-2 细胞中的潜在结合蛋白。并基于 DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>)、UniProt (<https://www.uniprot.org/>) 和 OMIM (<https://omim.org/>) 等检索得到“糖尿病肾病”“凋亡”相关靶标。采用 Venny 工具将鉴定出的潜在“结合蛋白”与数据库检索得到的靶标取交集,筛选关键靶标进行验证。

2.4 直接作用靶标的验证

2.4.1 分子对接 通过 Pubchem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载 ASI 的 SDF 格式文件,并用 Open Babel 软件将其转换成 mol2 格式。在 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 中下载靶标蛋白结构,使用 PyMOL 2.1.0 软件对靶标蛋白进行清除水分子和小分子配体等优化处理,并采用 AutoDock Tools-1.5.6 进行加氢与电荷处理,并另存为 pdbqt 格式。以关键靶标蛋白为受体,以 ASI 作为配体,利用 PyRx 软件内部的 vina-2.0 进行分子对接,计算 ASI 与各蛋白的结合能并输出结果文件。

2.4.2 DARTS 结合 Western blotting 验证作用靶标 取质量浓度为 $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的蛋白样品,分为对照组和 ASI 组。ASI 组蛋白提取液中分别加入 20、40、 $80\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 ASI 溶液,对照组加入等量的 DMSO。混匀、室温孵育 60 min 后,加入 $2\text{ }\mu\text{L}$ 浓度为 0 或 0.03% 的链霉菌蛋白酶溶液,对照组加入等量的 DMSO。混匀、 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下消化 15 min 后。取蛋白样品与 $5\times$ 蛋白上样缓冲液混匀,煮沸 10 min 变性后,采用靶标蛋白的抗体经 Western blotting 实验对其进行相对定量,通过对比 ASI 组与对照组中“靶标”蛋白表达量的差异,进一步验证 ASI 与靶标的结合。

2.4.3 生物膜干涉实验 取 100 μL 质量浓度为 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 AIFM1 蛋白, 加入适量体积生物素化试剂, 室温孵育 60 min。将混合液加入脱盐柱, 去除游离的生物素, 得生物素化的 AIFM1 蛋白溶液。取 2 根 SA 传感器, 将其浸入 PBS 中预湿 10 min, 96 孔板对应孔分别加入 200 μL 的 PBS 和生物素化 AIFM1 蛋白, 并采用 Octet® R4 分子互作分析仪固定蛋白。另取 4 根 SA 传感器用 PBS 预湿 10 min 以上, 2 根固定生物素化 AIFM1 蛋白, 2 根作为参比; 样品板第 1 列加 PBS, 第 2 列加 AIFM1 蛋白。用含 0.2% DMSO 的 PBS 溶液将 ASI 稀释为 6 个浓度 (50.00、25.00、12.50、6.25、3.13、1.56 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。用固定 AIFM1 的 SA 传感器对样品进行检测分析, 检测流程包含 3 个连续阶段: 平衡、结合与解离, 每个浓度设置独立循环, 各阶段时长均为 60 s, 温度恒定于 30 $^{\circ}\text{C}$ 。使用 Octet BLI Discovery 分析软件收集和分析数据。亲和力常数 (K_D 值) 越小亲和力越强。

2.5 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 IBM SPSS Statistics 26.0 开展组间差异检验; GraphPad Prism 10.0 完成全部统计图绘制、数据可视化。

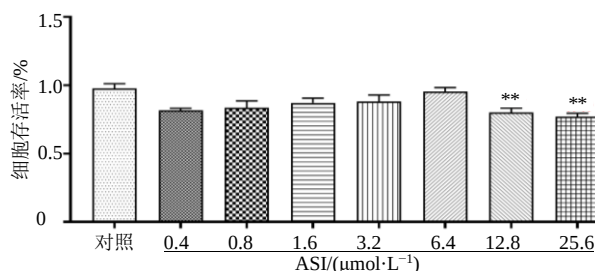
3 结果

3.1 ASI 对高糖刺激的 HK-2 细胞保护作用

3.1.1 CCK8 法检测细胞活性 与对照组比较, 当 ASI 给药浓度大于 6.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 细胞存活率呈下降趋势 ($P < 0.01$), 故选择 1.6、3.2 和 6.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为后续 ASI 低、中、高给药浓度, 结果见图 1。

与对照组比较, 模型组细胞活性显著降低 ($P < 0.01$); 甘露醇组无统计学差异 ($P > 0.05$), 显示高渗环境对 HK2 细胞活力影响不明显; 与模型组比

较, ASI 给药各组细胞活性均显著升高 ($P < 0.01$)。ASI 可显著提高 HK-2 细胞模型的细胞活性, 并且呈现剂量相关性。CCK-8 检测结果见图 2。

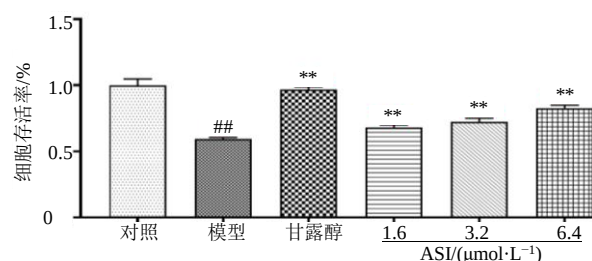


与对照组比较: ** $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group.

图 1 ASI 给药浓度筛选 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 1 Screening of optimal administration concentration of ASI ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)



与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: ** $P < 0.01$ 。

$P < 0.01$ vs control group; ** $P < 0.01$ vs model group.

图 2 各组细胞活性检测结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 2 Detection results of cell viability in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

采用倒置显微镜观察各组细胞形态, 结果见图 3。对照组细胞形态似椭圆形或圆形, 细胞间连接紧密、分布均匀; 模型组部分细胞形态发生明显变化、呈长梭状, 间隙明显变大, 细胞数量减少; ASI 给药组处理 (1.6、3.2、6.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组细胞形态逐渐趋向于正常、数量显著增加。

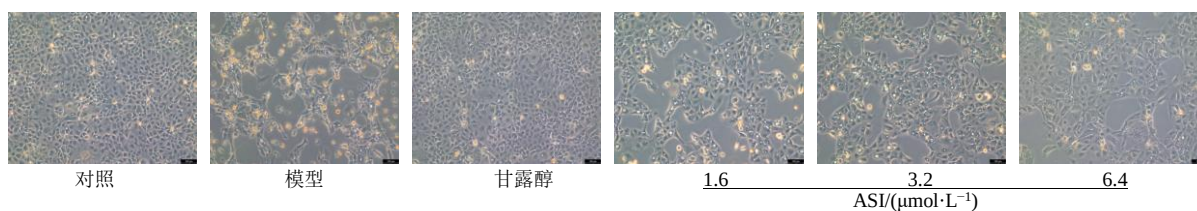


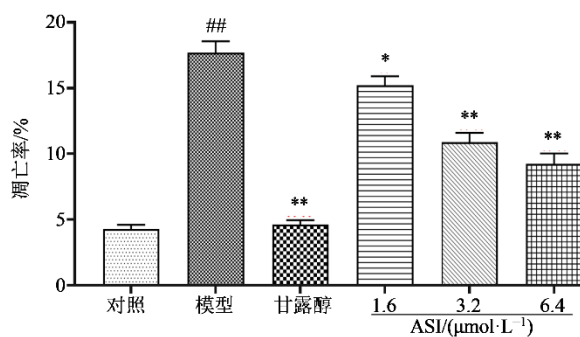
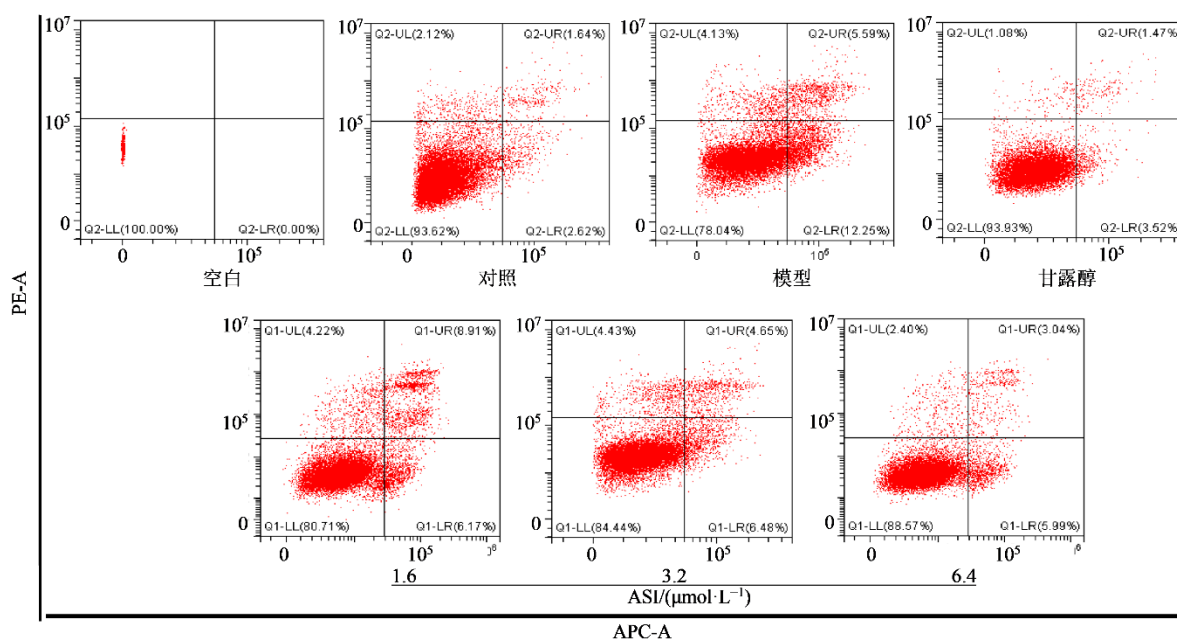
图 3 倒置显微镜观察各组细胞形态

Fig. 3 Cell morphology of each group observed under inverted microscope

3.1.2 流式细胞法检测细胞凋亡率 结果见图 4, 与对照组比较, 高糖处理组 HK-2 细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, ASI 各处理组细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01)。ASI 可显著抑

制高糖处理的 HK-2 细胞凋亡。

3.1.3 细胞上清液中 TNF- α 、VEGF、KIM-1 等因子的水平检测 ELISA 检测实验结果见图 5, 与对照组比较, 高糖处理模型组 HK-2 细胞 TNF- α 、VEGF、

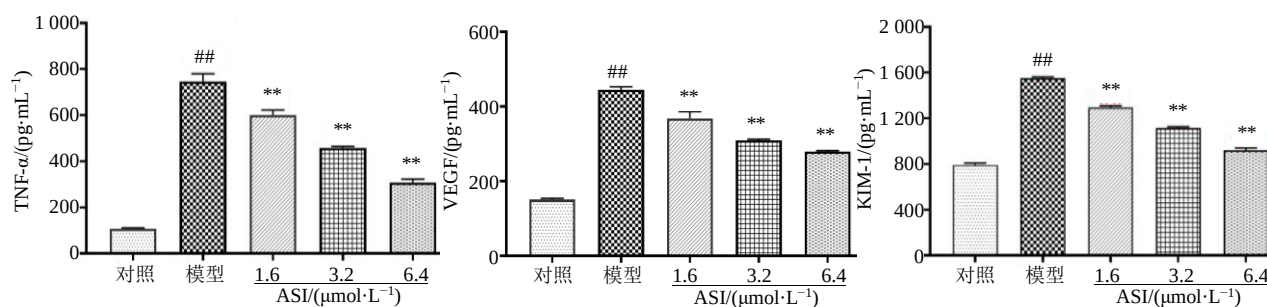


与对照组比较: $##P < 0.01$; 与模型组比较: $*P < 0.05$ $**P < 0.01$ 。

$##P < 0.01$ vs control group; $*P < 0.05$ $**P < 0.01$ vs model group.

图 4 流式细胞术检测各组细胞的凋亡 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 4 Apoptosis of cells in each group detected by flow cytometry ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)



与对照组比较: $##P < 0.01$; 与模型组比较: $*P < 0.05$ $**P < 0.01$ 。

$##P < 0.01$ vs control group; $*P < 0.05$ $**P < 0.01$ vs model group.

图 5 各组细胞上清液中炎症因子的水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 5 Levels of inflammatory factors in cell supernatant of each group ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

KIM-1 水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, ASI 各处理组 TNF- α 、VEGF、KIM-1 水平显著降低

($P < 0.01$)。结果表明, ASI 可显著抑制高糖处理的 HK-2 细胞炎症因子及损伤标志物 KIM-1 的分泌。

3.2 DARTS 技术联合定量蛋白组分析研究作用靶标

3.2.1 ASI 浓度的考察 DARTS 实验中小分子与靶蛋白的结合存在浓度相关性, 因此, ASI 浓度的考察是实验中的重要考察因素。实验结果见图 6, 与对照组比较, ASI 浓度在 $20 \sim 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 蛋白条带呈现出显著差异; 且随着浓度的增加, 差异越明显。当浓度为 80 、 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 出现显著的差异蛋白。为避免化合物的浓度过高产生非特异性结合, 选择 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为 ASI 体外孵育时的浓度。

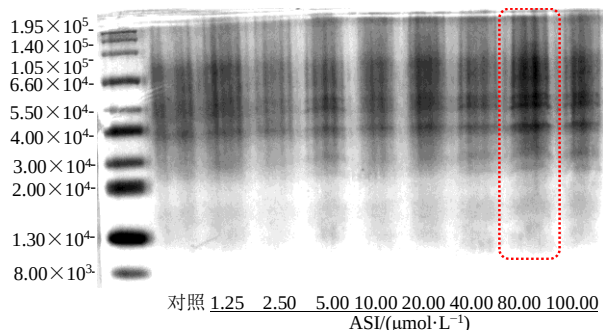


图 6 体外孵育体系中 ASI 浓度的考察

Fig. 6 Investigation of ASI concentration in *in vitro* incubation system

3.2.2 链霉菌蛋白酶用量的考察 结果见图 7, 与不加链霉菌蛋白酶组比, 随着链霉菌蛋白酶用量的减少, 对 HK-2 细胞总蛋白的消化作用呈降低趋势, 当链霉菌蛋白酶浓度为 0.03% 时, 链霉菌蛋白酶对蛋白的消化作用较为适中, 故确定 DARTS 实验中的链霉菌蛋白酶浓度为 0.03% 。

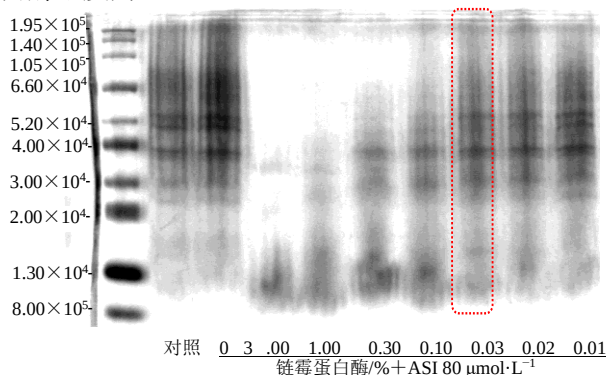


图 7 链霉菌蛋白酶浓度的考察

Fig. 7 Investigation of pronase concentration

3.2.3 定量蛋白组分析研究 将对照组与 ASI 组在 $2.0 \times 10^4 \sim 6.6 \times 10^4$ 处的差异蛋白条带切下 (图 8)。对两组蛋白条带样本中的蛋白进行提取、还原烷基化、酶切、除盐后, 采用液相色谱-质谱仪 (Easy-nLC 1200/QExactive) 进行检测 (图 9)。质谱采集的 raw

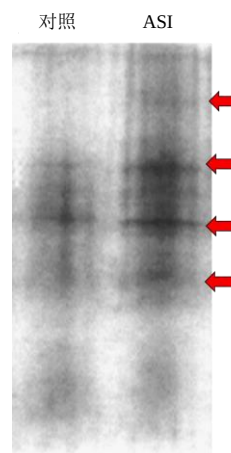


图 8 DARTS 实验检测对照组与 ASI 组的差异蛋白

Fig. 8 Differential proteins between control group and ASI group detected by DARTS assay

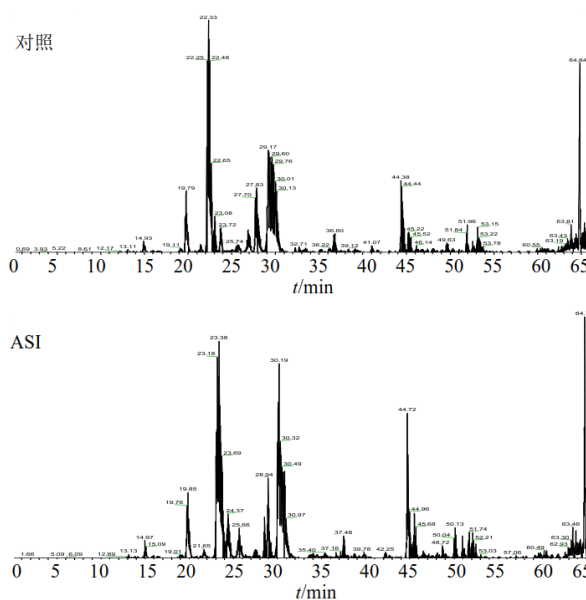


图 9 液相色谱-质谱仪 (Easy-nLC 1200/QExactive) 蛋白鉴定的基峰色谱图

Fig. 9 Base peak chromatograms of protein identification by liquid chromatography-mass spectrometer (Easy-nLC 1200/QExactive)

文件, 经过软件数据库检索, 得到鉴定结果, 并使用峰面积对两组中的蛋白进行相对定量分析。筛选差异倍数 $\lg_2\text{FC} > 2$ 及 ASI 给药孵育后发生上调的蛋白作为潜在结合蛋白, 结果见表 1。通过 GeneCard、DisGeNET 和 OMIM 数据库共获得 1 480 个与 DKD 相关的靶标, 1428 个细胞凋亡相关靶点。经韦恩图将潜在结合蛋白与“糖尿病肾病”与“细胞凋亡”相关蛋白取交集后, 得到 AIFM1、2,4-双烯酰辅酶 A 还原酶 1 (DECRI) 2 个与“糖尿病肾病”“细胞凋亡”相关的交集基因 (图 10)。

表 1 ASI 在 HK-2 细胞上的 32 个潜在结合蛋白

Table 1 Totally 32 potential binding targets of ASI on HK-2 cells

蛋白ID	基因名	蛋白信息
Q9NUJ1	CA2	Carbonic anhydrase 2
O95831	IKBIP	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase-interacting protein
P30038	DECR1	2, 4-dienoyl-CoA reductase [(3E)-enoyl-CoA-producing]
P04083	YARS1	Tyrosine-tRNA ligase, cytoplasmic
P08758	TPP1	Tripeptidyl-peptidase 1
Q9HDC9	NRAS	GTPase NRas
P59998	ARPC4	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4
P50895	NUDC	Nuclear migration protein nud C
Q07021	SCP2	Sterol carrier protein 2
P16152	PSME2	Proteasome activator complex subunit 2
Q8N726	SERPINH1	Serpin H1
P20674	PSMA3	Proteasome subunit alpha type-3
P07858	UBQLN2	Ubiquilin-2
P07108	ARF4	ADP-ribosylation factor 4
Q92499	DUT	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase, mitochondrial
P33316	RPN2	Dolichyl-diphosphoo ligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit 2
O43854	PITPNA	Phosphatidylinositol transfer protein alpha isoform
P63241	TARS1	Threonine-tRNA ligase 1, cytoplasmic
Q96A26	ARPC3	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3
P04062	MAT2A	S-adenosylmethionine synthase isoform type-2
P62873	H2BC21	Histone H2B type 2-E
Q16778	ACSF2	Medium-chain acyl-CoA ligase ACSF2, mitochondrial
Q53H82	AIFM1	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial
P31153	DAD1	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit DAD1
P50579	ETHE1	Persulfide dioxygenase ETHE1, mitochondrial
Q9Y266	GRHPR	Glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase
Q9UKK9	SSR4	Translocon-associated protein subunit delta
P55809	CYB5R3	NADH-cytochrome b5 reductase 3
O95336	CANX	Calnexin
O15173	ECH1	Delta (3, 5)-Delta(2, 4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial
Q9Y237	UBQLN1	Ubiquilin-1
Q00169	RPN1	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit 1

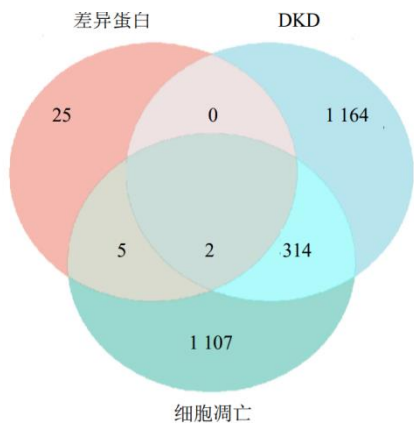


图 10 潜在结合蛋白与 DKD 靶标取交集的韦恩图

Fig. 10 Venn diagram of intersection between potential binding proteins and diabetic nephropathy targets

3.3 作用靶标的验证

3.3.1 分子对接 结果显示, ASI 与 AIFM1、DECR1 的结合能分别为 -38.91 、 $-30.12 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, 与 AIFM1 的结合活性更强。使用 PyMoL 软件对 ASI 与 AIFM1 的结合进行结构匹配分析, 结果见图 11。靶蛋白以卡通 (cartoon)、浅蓝色 (cyan) 表示, 关键残基 (形成氢键的残基) 以棍状 (stick)、紫色 (purple) 表示, 配体以棍状 (stick)、浅红色 (light red) 表示, 黄色虚线表示氢键。表明 ASI 与 AIFM1 蛋白周围的多种氨基酸残基通过氢键等分子间作用力形成较为稳定的构象, 成分与靶标蛋白具有较强的结合活性。

3.3.2 DARTS 结合 Western blotting 验证作用靶标结果见图 12, 不同浓度的 ASI 与目的蛋白 AIFM1

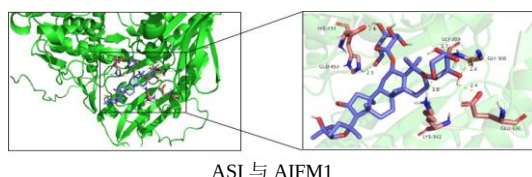


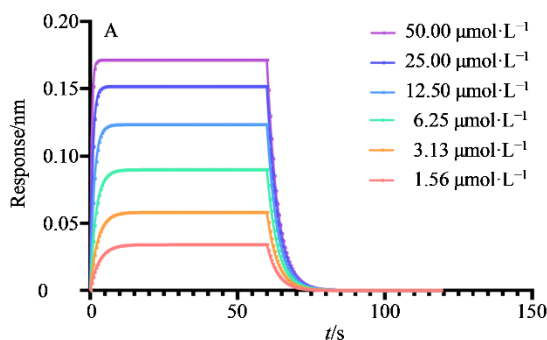
图 11 分子对接示意图

Fig. 11 Schematic diagram of molecular docking

结合后,能不同程度地提高目的蛋白 AIFM1 的酶解稳定性,降低了链霉蛋白酶对此蛋白的消解作用。

AIFM1 可能是 ASI 在 HK-2 细胞上的主要作用靶标。

3.3.3 生物膜干涉实验 Octet® R4 分子互作分析仪能实时检测 ASI 与 AIFM1 蛋白之间的相互作用。实验结果如图 13 所示,ASI 与 AIFM1 的 K_D 为



A-ASI 与 AIFM1 的结合解离图; B-稳态结合曲线响应图; K_D -亲和力常数。

A-Binding dissociation plot of ASI and AIFM1; B-Steady-state binding curve response plot; K_D -affinity constant.

图 13 生物膜干涉实验检测 ASI 与 AIFM1 的结合情况

Fig. 13 Binding of ASI to AIFM1 detected by bio-layer interferometry

4 讨论

研究表明,高糖环境可诱导 RTECs 凋亡,导致肾脏小管间质纤维化改变,加重 DKD 的发展进程^[16-17]。ASI 作为中药黄芪的主要活性成分,能通过抗氧化、自噬调控、减轻炎症反应等多种作用机制,发挥肾脏保护、降低蛋白尿及治疗 DKD 的作用^[18-20]。本实验结果也显示,ASI 可能通过抑制炎症反应及抗凋亡途径,发挥对 HK-2 细胞的保护作用,进而发挥抗 DKD 的治疗作用。并采用 DARTS 技术结合定量蛋白组分析及 GeneCard、DisGeNET 和 OMIM 数据库中“糖尿病肾病”相关基因信息,得出 32 个潜在结合蛋白中有 AIFM1、DEC1 与“糖尿病肾病”“细胞凋亡”有关。

AIFM1 是一种定位于线粒体的氧化还原酶,在细胞凋亡和氧化还原平衡调节方面发挥着重要的作用。生理状态下,AIFM1 定位于线粒体的内膜面

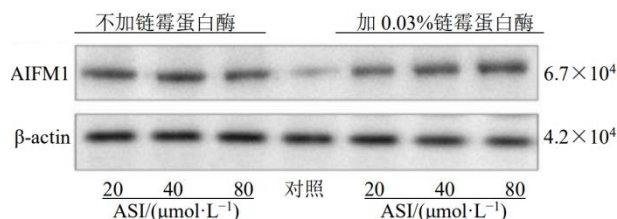
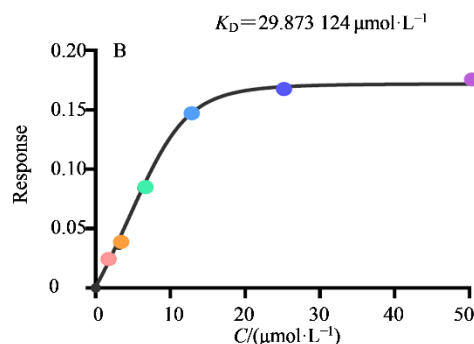


图 12 DARTS-Western blotting 实验考察 ASI 对 AIFM1 蛋白酶解稳定性的影响

Fig. 12 Effect of ASI on proteolytic stability of AIFM1 investigated by DARTS-Western blotting assay

$29.873\ 124\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在 $1.56\sim 50.00\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, ASI 与 AIFM1 结合的响应值随 ASI 浓度的升高而升高,符合特异性结合的趋势,两者有结合。



隙。当细胞受到氧化应激、DNA 损伤、缺血缺氧及高糖等刺激时,AIFM1 会从线粒体释放到细胞质中。随后易位至细胞核,与染色质结合,促使 DNA 碎片化,进而诱导细胞凋亡,这种凋亡方式不依赖于半胱天冬酶(Caspase)的激活,也是细胞凋亡的重要途径之一^[21-23]。细胞凋亡后也会放大氧化应激与 TNF- α 、VEGF、KIM-1 等损伤因子分泌,放大局部炎症级联反应,驱动肾小管上皮损伤与肾间质病变,促进 DKD 发展^[24-25]。DEC1 为线粒体不饱和脂肪酸代谢关键还原酶,高糖环境下肾小管脂质蓄积会抑制 DEC1 活性,诱发线粒体脂质过氧化、活性氧爆发,间接促进肾小管上皮凋亡^[26-27]。分子对接结果显示,ASI 与 AIFM1 的结合较 DEC1 更稳定,故本实验进一步采用 DARTS-Western blotting 实验及生物膜干涉实验技术,对凋亡核心靶点 AIFM1 进行验证。结果,发现 ASI 与 AIFM1 具有

较强结合能,且能提高 AIFM1 的酶解稳定性,降低链霉蛋白酶对 AIFM1 的消解作用。初步验证了 ASI 与 AIFM1 的结合,为深入解析 ASI 抗 DKD 的分子机制提供了新视角。

本研究基于 DARTS 技术联合定量蛋白组分析初步筛选出 AIFM1 可能为 ASI 在 HK-2 细胞上的作用靶标。并采用分子对接、DARTS-Western blotting 实验及 BLI 技术对靶标进行验证。结果显示,ASI 可能通过靶向作用于 HK-2 细胞上的 AIFM1,进而抑制 HK-2 细胞凋亡及炎症反应,发挥抗 DKD 的作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Gong X X, Cao L H, Ni H X, et al. Chinese herbal medicine for the treatment of diabetic nephropathy: From clinical evidence to potential mechanisms [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 330: 118179.
- [2] Sun H, Saeedi P, Karuranga S, et al. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2022, 183: 109119.
- [3] Jaikumkao K, Thongnak L, Htun K T, et al. Dapagliflozin and metformin in combination ameliorates diabetic nephropathy by suppressing oxidative stress, inflammation, and apoptosis and activating autophagy in diabetic rats [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2024, 1870(1): 166912.
- [4] Gonzalez C D, Carro Negueruela M P, Nicora Santamarina C, et al. Autophagy dysregulation in diabetic kidney disease: From pathophysiology to pharmacological interventions [J]. *Cells*, 2021, 10(9): 2497.
- [5] Han Y P, Liu L J, Yan J L, et al. Autophagy and its therapeutic potential in diabetic nephropathy [J]. *Front Endocrinol*, 2023, 14: 1139444.
- [6] Chen X, Yang Y, Liu C X, et al. Astragaloside IV ameliorates high glucose-induced renal tubular epithelial-mesenchymal transition by blocking mTORC1/p70S6K signaling in HK-2 cells [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43(2): 709-716.
- [7] Liu J, Yang K, Zhou L L, et al. A new strategy for Astragaloside IV in the treatment of diabetic kidney disease: Analyzing the regulation of ferroptosis and mitochondrial function of renal tubular epithelial cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 141: 112794.
- [8] Qin Y, Yan Y, Zhou J, et al. Advancements in screening

systems for active ingredients in traditional Chinese medicines using ligand fishing technique [J]. *Trac Trends Anal Chem*, 2024, 180: 117983.

- [9] Zhang X W, Li L, Liao M, et al. Thermal proteome profiling strategy identifies CNPY3 as a cellular target of gambogic acid for inducing prostate cancer pyroptosis [J]. *J Med Chem*, 2024, 67(12): 10005-10011.
- [10] 魏君楠, 戴建业. 中药活性成分直接作用靶点鉴定研究方法及应用 [J]. *中草药*, 2021, 52(17): 5378-5388.
Wei J N, Dai J Y. Research method and application for identifying direct target of bioactive components from traditional Chinese medicine [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2021, 52(17): 5378-5388.
- [11] Chen X C, Niu X, Li L J, et al. Design, synthesis, and target identification of novel phenylalanine derivatives by drug affinity responsive target stability (DARTS) in *Xanthomonas oryzae pv oryzae* [J]. *J Agric Food Chem*, 2024, 72(7): 3436-3444.
- [12] Pai M Y, Lomenick B, Hwang H, et al. Drug affinity responsive target stability (DARTS) for small-molecule target identification [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1263: 287-298.
- [13] 陈缘静, 蒋薇薇, 李丽华, 等. 基于 DARTS 技术的丹参素钠直接结合靶蛋白鉴定 [J]. *药学与临床研究*, 2022, 30(1): 58-61, 65.
Chen Y J, Jiang W W, Li L H, et al. Target identification of sodium danshensu using drug affinity responsive target stability technique [J]. *Pharm Clin Res*, 2022, 30(1): 58-61, 65.
- [14] 陈飞燕, 秦微, 李瑞梅, 等. 基于 DARTS 技术人参皂苷脑内蛋白质作用位点 AK1 的发现和确证 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(5): 1336-1342.
Chen F Y, Qin W, Li R M, et al. Discovery and confirmation of protein action site AK1 of ginsenosides in brain based on DARTS technology [J]. *China J Chin Mater Med*, 2022, 47(5): 1336-1342.
- [15] Ni L H, Zhou Q Y, Gao X Y, et al. EphrinB2 alleviates tubulointerstitial fibrosis in diabetic kidney disease [J]. *J Transl Med*, 2025, 23(1): 821.
- [16] Gao G, Su X, Liu S Y, et al. Cornuside as a promising therapeutic agent for diabetic kidney disease: Targeting regulation of Ca^{2+} disorder-mediated renal tubular epithelial cells apoptosis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2025, 149: 114190.
- [17] Lin Z Y, Chen A, Cui H W, et al. Renal tubular epithelial cell necroptosis promotes tubulointerstitial fibrosis in patients with chronic kidney disease [J]. *FASEB J*, 2022, 36(12): e22625.

- [18] Wang Y N, Zhao S L, Su Y Y, et al. Astragaloside IV attenuates high glucose-induced EMT by inhibiting the TGF- β /Smad pathway in renal proximal tubular epithelial cells [J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(6): BSR20190987.
- [19] Yuan Y, Wu Y F, He M H, et al. Astragaloside IV protects against podocyte injury by upregulating mitophagy via Mfn2/Pink1/parkin axis [J]. *Curr Mol Med*, 2025, 25(7): 871-881.
- [20] Mo Y N, Hu D M, Yu W L, et al. Astragaloside IV attenuates indoxyl sulfate-induced injury of renal tubular epithelial cells by inhibiting the aryl hydrocarbon receptor pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 308: 116244.
- [21] Bano D, Prehn J H M. Apoptosis-inducing factor (AIF) in physiology and disease: The tale of a repented natural born killer [J]. *EBioMedicine*, 2018, 30: 29-37.
- [22] Ji W S, Zhang L F, Ma C X, et al. Newly synthesized AIFM1 determines the hypersensitivity of T lymphocytes to STING activation-induced cell apoptosis [J]. *Cell Rep*, 2023, 42(4): 112327.
- [23] Liu D J, Liu M Y, Wang W J, et al. Overexpression of apoptosis-inducing factor mitochondrion-associated 1 (AIFM1) induces apoptosis by promoting the transcription of caspase3 and DRAM in hepatoma cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 498(3): 453-457.
- [24] 朱敬轩, 宋囡, 杨莹, 等. 人参皂苷 Rb₁ 通过 KEAP1/PGAM5/AIFM1 通路促进肝细胞癌 HepG2 细胞发生氧死亡 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2024, 31(5): 445-451.
- [25] Zhu J X, Song N, Yang Y, et al. Ginsenoside Rb₁ promotes oxeiptosis in hepatocellular carcinoma HepG2 cells through KEAP1/PGAM5/AIFM1 pathway [J]. *Chin J Cancer Biother*, 2024, 31(5): 445-451.
- [26] 裘雪莹, 贾连群, 宋囡, 等. 基于 Keap1/PGAM5/AIFM1 介导的氧死亡途径探讨健脾益气化痰祛瘀法对高脂血症大鼠的影响与机制 [J]. *时珍国医国药*, 2022, 33(12): 2848-2851.
- Qiu X Y, Jia L Q, Song N, et al. Based on the oxygen death pathway mediated by Keap1/PGAM5/AIFM1, this paper discusses the effect and mechanism of invigorating spleen, benefiting Qi, removing blood stasis and eliminating phlegm on hyperlipidemia rats [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2022, 33(12): 2848-2851.
- [27] Zhang Q, Feng H L, Chen R X, et al. DECR1 deficiency activates a lipid peroxidation-mitocytosis-mitochondrial dysfunction axis in trophoblasts to promote preeclampsia [J]. *Free Radic Biol Med*, 2026, 250: 1-15.
- [28] Lu Q B, Sun H T, Zhou K, et al. Therapeutic targeting of Decr1 ameliorates cardiomyopathy by suppressing mitochondrial fatty acid oxidation in diabetic mice [J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2025, 16(2): e13761.

[责任编辑 兰新新]