

基于 AMPK/ACC 信号通路研究雷公菌活性成分对羟基苯甲醛对大鼠非酒精性脂肪肝的保护作用

刘梦^{1,2}, 刘舒庭¹, 卢曦¹, 徐笑天¹, 王宇晖^{1*}, 段小群^{1,2*} (1.桂林医学院药学院, 广西 桂林 541199; 2.澳门科技大学药学院, 中国澳门 999078)

摘要: 目的 探究雷公菌活性成分对羟基苯甲醛(*p*-hydroxybenzaldehyde, HD)对高脂饮食诱导的非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)大鼠模型的保护作用及其对 AMPK/ACC 信号通路的影响。方法 将 48 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、水飞蓟素(120 mg·kg⁻¹)组 and HD 高、中、低剂量组(200, 100, 50 mg·kg⁻¹)组。除正常组大鼠每天饲喂标准饲料外, 其余各组大鼠连续喂养高脂饲料 8 周以建立模型。记录大鼠体质量、肝脏系数, 检测肝功能(ALT、AST)、血脂(TC、TG、HDL-C、LDL-C)、肝脏抗氧化因子(GSH-Px、SOD、MDA)、肝脏炎症因子(TNF- α 、IL-6、IL-1 β)等指标的变化。采用 HE 染色观察肝组织的病理变化, Western blotting 检测 AMPK/ACC 信号通路相关蛋白表达。**结果** 与模型组相比, HD 各剂量组和水飞蓟素组大鼠体质量、肝脏系数显著降低。生化指标检测结果显示, 中、高剂量组 HD 可显著降低模型大鼠血清 TC、TG、AST、ALT、LDL-C 和 MDA 水平, 升高 HDL-C 含量; ELISA 结果表明, 中、高剂量 HD 能明显升高 NAFLD 大鼠肝组织 GSH-Px 和 SOD 活性, 降低 MDA 含量, 显著降低肝脏炎症细胞因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的水平。HE 结果显示, HD 可明显减轻肝组织脂肪变性和炎症细胞浸润。Western blotting 结果表明, HD 激活 AMPK/ACC 信号通路, 显著增加模型大鼠肝组织 p-AMPK 和 p-ACC 蛋白表达。**结论** HD 可能通过促进 AMPK/ACC 信号通路来改善肝脏氧化应激、炎症反应, 减少脂质合成, 从而改善 NAFLD。

关键词: 对羟基苯甲醛; 非酒精性脂肪肝; AMPK/ACC; 氧化应激; 炎症反应

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2022)19-2429-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.19.001

引用本文: 刘梦, 刘舒庭, 卢曦, 等. 基于 AMPK/ACC 信号通路研究雷公菌活性成分对羟基苯甲醛对大鼠非酒精性脂肪肝的保护作用[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(19): 2429-2436.

Protective Effect of *p*-Hydroxybenzaldehyde, an Active Ingredient of *Nostoc Commune* on Non-alcoholic Fatty Liver in Rats Based on AMPK/ACC Signaling Pathway

LIU Meng^{1,2}, LIU Shuting¹, LU Xi¹, XU Xiaotian¹, WANG Yuhui^{1*}, DUAN Xiaoqun^{1,2*} (1.School of Pharmacy, Guilin Medical University, Guilin 541199, China; 2.School of Pharmacy, Macau University of Science and Technology, Macao 999078, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate whether *p*-hydroxybenzaldehyde(HD), the active ingredient of *Nostoc commune*, has hepatoprotective efficacy in a high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease(NAFLD) rat model and its effect on AMPK/ACC signaling pathway. **METHODS** Forty-eight SD rats were randomly divided into normal group, model group, silymarin(120 mg·kg⁻¹) group and HD high, medium and low dose groups(200, 100 and 50 mg·kg⁻¹). Except for the rats in the normal group, which were fed standard chow daily, the rats in all groups were continuously fed high-fat chow for 8 weeks to establish the model. The rats' body weight, liver coefficients, changes in liver function(ALT, AST), blood lipids(TC, TG, HDL-C, LDL-C), liver antioxidant factors(GSH-Px, SOD, MDA), liver inflammatory factors(TNF- α , IL-6, IL-1 β) and other indexes were recorded. HE staining was used to observe the pathological changes of liver tissues, and Western blotting was used to detect the protein expression related to AMPK/ACC signaling pathway. **RESULTS** Compared with the model group, the body mass and liver coefficients of rats in each dose group of HD and silymarin group were significantly reduced. The results of biochemical indexes showed that HD in the middle and high dose groups significantly reduced serum TC, TG, AST, ALT, LDL-C and MDA levels and increased HDL-C levels in the model rats. ELISA results showed that HD in the middle and high dose groups significantly increased GSH-Px and SOD activities and decreased MDA levels in the liver tissues of NAFLD mice, and significantly reduced the levels of liver inflammatory cytokines TNF- α , IL-6 and IL-1 β . HE results showed that HD could

基金项目: 国家自然科学基金项目(82160615)

作者简介: 刘梦, 女, 博士生 E-mail: 517074937@qq.com *通信作者: 王宇晖, 男, 博士, 副教授 E-mail: 371770318@qq.com
段小群, 男, 博士, 教授 E-mail: robertduan@163.com

significantly reduce hepatic steatosis and inflammatory cell infiltration. Western blotting showed that HD activated AMPK/ACC signaling pathway and significantly increased p-AMPK and p-ACC protein expression in the liver of NAFLD rats. **CONCLUSION** HD may ameliorate NAFLD by promoting AMPK/ACC signaling pathway to improve hepatic oxidative stress, inflammatory response, and reduce lipid synthesis.

KEYWORDS: *p*-hydroxybenzaldehyde; non-alcoholic fatty liver disease; AMPK/ACC; oxidative stress; inflammatory response

非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是指除过量饮酒以外的其他因素所致肝细胞弥漫性脂肪变性与脂质累积的一类疾病,其可由单纯脂肪肝变性演变而成,进一步进展为肝纤维化、肝硬化及肝癌^[1-2],随着人们膳食水平的提升,NAFLD的发病率逐年上升^[3]。传统治疗方法主要采取干预其生活方式,如饮食热量限制和运动等,然而由于社会、生理、心理和遗传等各种原因,此疗法通常难以维持^[4]。药物治疗多使用胰岛素增敏剂、保肝抗炎调脂药物,如他汀类等^[5]。虽有一定的治疗效果,但长期服用会导致肝功能受损、脂质代谢障碍、骨质流失和出血性中风等不良反应而限制了应用^[6]。在过去的几十年里,中药和天然产物作为治疗肝病和血脂异常的替代治疗剂受到越来越多的关注^[7-8]。大量临床前研究证据表明,许多中药及其分离出的化合物展现出了优异的保肝疗效^[9],开发源自天然的NAFLD的治疗药物并阐明其作用机制是目前亟须解决的问题。

雷公菌俗称地皮菜、地木耳、地衣等,为藻类蓝藻纲念珠藻科(*Nostocaceae*)念珠藻属植物念珠藻的藻体。其性凉,味甘,具有清热明目、收敛益气之功效^[10]。雷公菌是一种“药食同源”的优质天然资源,千百年来,人们采集、烹食,或将其入药。大量文献证明雷公菌和雷公菌的提取物具有抗炎、抗氧化、降低血清胆固醇等作用^[10-11]。此外,笔者所在课题组在前期研究中发现,雷公菌的主要活性成分对羟基苯甲醛(*p*-hydroxybenzaldehyde, HD)能通过抑制肠道炎症反应改善溃疡性结肠炎^[12],但关于其是否具有抗NAFLD作用尚不明确。腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)即丝氨酸/苏氨酸激酶AMP依赖的蛋白激酶,是一种细胞能量传感器和“代谢总开关”^[13]。乙酰辅酶A羧化酶(acetyl-coenzyme A carboxylase, ACC)是一种依赖生物素的变构羧化酶,是AMPK的下游分子,AMPK/ACC通路抑制可加重脂肪变性和脂质代谢紊乱,在NAFLD发生、发展过程中扮演重要角色^[14]。目前,雷公菌活性成分HD对AMPK/ACC信号通路在NAFLD中的机制国内外尚无研究和报道。本研究拟以高

脂饮食诱导的大鼠NAFLD模型探讨其作用,并通过检测AMPK/ACC信号通路相关因子表达的变化分析其作用机制。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

H2050R 台式高速大容量冷冻离心机(湖南湘仪离心机厂, $r=9.2$ cm); THZ-C-1 全温振荡器(太仓市实验设备厂); Tanon 5200 全自动化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司); Epoch 酶标仪(美国 Bio-tek 公司)。

1.2 药物与试剂

高脂饲料配方(货号: D12492; 含蛋白 26%、碳水化合物 26%、脂肪 35%, 江苏协同药业生物工程公司); HD(实验室自制, 纯度>93%, 得率 0.02%, 制备方法见课题组已发表文章^[12]); 水飞蓟素(德国马博士大药厂, 批号: H20181067); 谷丙转氨酶(ALT)(批号: 20190706)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)(批号: 20190706)、甘油三酯(TG)(批号: A111-1-1)、总胆固醇(TC)(批号: A110-1-1)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)(批号: 20190615)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)(批号: 20190621)、丙二醛(MDA)、总超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)(批号: A003-1-2, A001-1-2, A005-1-2)均购自南京建成生物工程研究所; 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素 1 β (IL-1 β)、白介素 6(IL-6) ELISA 试剂盒(批号: A003-1-2, A001-3-2, A005-1-2)均购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; AMPK、磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶(p-AMPK)一抗(货号: BS6271, BS4010)均购自美国 CST 公司; ACC、磷酸化乙酰辅酶 A 羧化酶(p-ACC)辣根过氧化物酶一抗(货号: BS6271, BS4010)均购自 abcam 公司; 标记山羊抗兔二抗(赛默飞公司, 货号: A32731)。

1.3 动物

SPF 级 SD 大鼠 48 只, δ , 体质量 120~140 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 生产许可证号: SCXK(湘)2016-0002。桂林医学院实验动

物伦理委员会审批通过,编号:GLMC201703011。所有大鼠在动物室环境(环境温度 20~25 °C, 黑暗 12 h/光照 12 h)中适应 1 周,并可自由食用标准饲料和水。

2 方法

2.1 动物分组与处理

将 48 只 SD 大鼠($n=8$)随机分为正常组、模型组、水飞蓟素($120 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 阳性对照)组和 HD 低、中、高($50, 100, 200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)剂量组, 剂量设置参考相关文献并经过预实验最终确定^[15-17]。除正常组大鼠每天饲喂普通饲料外, 其余各组大鼠连续喂养高脂饲料 8 周。在制备模型的同时, 水飞蓟素组、HD 各剂量组大鼠按照 $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃给药, 正常组和模型组灌胃相应体积溶剂, 每日 1 次, 连续 8 周。末次给药后, 禁食不禁水 12 h, 乙醚麻醉, 腹主动脉取血, 并收集肝脏。部分肝脏置 4%多聚甲醛固定, 用于病理学检测; 部分冻存于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 用于组织蛋白检测。

2.2 大鼠体质量、肝脏系数的测定

每周称大鼠体质量并记录。实验终末期, 剖离大鼠肝脏, 生理盐水洗净, 用滤纸吸干水分, 精密称定肝质量并计算肝脏系数, 肝脏系数=肝脏质量/大鼠体质量 $\times 100\%$ 。

2.3 生化指标检测

将收集的各组大鼠血液静置 2 h 后, 离心机 ($4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $4\ 500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10 min)离心以获得血清, 依据试剂盒说明书测定各组血清中 AST、ALT、TC、TG、HDL-C 和 LDL-C 浓度。

2.4 氧化因子和炎症因子检测

将冻存的肝脏组织取出, 称取 60 mg 肝脏组织并剪碎置于玻璃匀浆器内, 用移液器加入 1 mL 生理盐水于冰上充分研磨, 制成 10%肝组织匀浆, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $4\ 500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 留取上清液, 依据试剂盒说明书检测各组大鼠肝组织匀浆中氧化因子 GSH-Px、SOD、MDA 的水平, 根据 ELISA 试剂盒检测炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的水平。

2.5 肝组织病理学指标检测

收集大鼠肝组织, 经固定、脱水、包埋、切片等制作肝组织石蜡切片, 进行 HE 染色; 另取肝组织石蜡切片, 进行油红 O 染色: 切片脱蜡、水洗后, 进行油红 O 染色, 50%乙醇分化, 苏木素复染核, 返蓝, 脱水, 甘油明胶封片。于显微镜下观察病理改变并拍照。

2.6 Western blotting 检测肝脏 AMPK 信号通路相关蛋白的表达

用 Western blotting 检测大鼠肝脏组织中 AMPK、p-AMPK、ACC、p-ACC 蛋白的表达。取 60 mg 肝组织加入适量含 1% PMSF 蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液进行匀浆, 用 BCA 试剂盒测定蛋白含量, 将等量的蛋白样品进行电泳分离, 于 80 V 恒定电压下转膜 30 min, 然后在 120 V 恒压下转膜 40 min, 将蛋白转移到 PVDF 膜上。用 5%牛血清白蛋白室温孵育 2 h, 一抗在 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱摇床孵育过夜。次日, TBST 洗膜 4 次, 二抗室温孵育 1.5 h。TBST 洗膜 4 次后 ECL 显影, Image J 软件分析计算蛋白相对表达量。

2.7 统计学处理

采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行数据分析, 数据以至少 3 个独立实验的 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 t 检验进行两样本间比较, 多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 HD 对大鼠一般状况、体质量、肝脏大体情况以及肝脏系数的影响

实验期间, 正常组大鼠状态良好, 毛色亮泽, 正常饮食, 大便呈颗粒状、色黄、质硬, 垫料干燥。模型组大鼠肥胖萎靡, 活动减缓, 毛色枯黄, 大便呈颗粒状、色黑、质硬, 垫料潮湿。与模型组相比, 给予水飞蓟素及 HD 的大鼠一般状态均有明显改善, 毛发光泽尚可, 反应较为灵敏, 大便呈颗粒状、色微黄、质硬, 垫料潮湿状况也有所改善。实验终末期, 模型组大鼠的体质量和肝脏系数均高于正常组($P < 0.01$); 经水飞蓟素及 HD 各剂量组干预 8 周之后, 大鼠肝脏系数和终末体质量均显著低于模型组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。正常组大鼠肝脏形态正常, 呈红褐色, 表面亮滑, 边缘锐利、质地韧; 模型组大鼠肝脏体积增大, 呈黄褐色, 表面粗糙, 边缘变钝, 质地软, 切面油腻; HD 组大鼠肝脏呈浅黄色, 表面较模型组细腻, 稍有包膜紧张, 边缘稍钝, 质地稍软。以上结果表明 HD 可显著改善 NAFLD 大鼠活动状态、体质量增加及肝脏系数, 结果见表 1。

3.2 HD 对大鼠血清 TC、TG、AST、ALT、HDL-C 和 LDL-C 水平的影响

与正常组相比, 模型组大鼠血清 TC、TG、AST、ALT 和 LDL-C 水平均显著升高, 而 HDL-C

表 1 HD 对非酒精性脂肪肝大鼠体重及肝脏系数的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Tab. 1 Effect of HD on body weight and liver coefficient in rats with NAFLD($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	初始体重/g	终末体重/g	肝脏系数/%
正常组	127.62±6.63	440.62±22.27	2.25±0.04
模型组	126.38±6.84	550.88±35.61 ¹⁾	2.98±0.28 ¹⁾
水飞蓟素组	129.47±7.88	442.25±42.87 ³⁾	2.38±0.24 ³⁾
HD 高剂量组	128.86±5.77	433.00±28.46 ³⁾	2.43±0.22 ³⁾
HD 中剂量组	126.25±6.47	468.38±51.58 ³⁾	2.57±0.31 ³⁾
HD 低剂量组	127.50±5.56	473.87±64.03 ²⁾	2.60±0.36 ³⁾

注: 与正常组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。
Note: Compared with normal group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

含量明显下降($P<0.01$), 表明模型组大鼠出现了严重的血脂异常、肝脂肪堆积和肝功能障碍。与模型组相比, 中、高剂量 HD 给药组和水飞蓟素组大

鼠血清 AST、ALT、TC、TG、LDL-C 水平均明显降低, HDL-C 含量显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 且高剂量 HD 组和水飞蓟素组对上述指标的改善作用相当, 但低剂量的 HD 效果不显著。结果见图 1。

3.3 HD 对氧化因子和炎症因子的影响

SOD、GSH-Px 和 MDA 的水平与氧化应激有关, 其中 SOD 和 GSH-Px 是内源性抗氧化酶, MDA 是脂质过氧化的关键指标^[18]。与正常组相比, 模型组大鼠肝组织匀浆中 GSH-Px 和 SOD 水平显著下降, MDA 显著升高($P<0.01$), 表明 NAFLD 大鼠肝脏发生氧化应激, 抗氧化能力下降。与模型组比较, 水飞蓟素组及高、中剂量 HD 能显著升高 GSH-Px 和 SOD 水平, 降低 MDA 含量($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 而低剂量 HD 效果不显著, 表明中、高剂量的 HD 可提高大鼠肝脏的抗氧化能力。结果见图 2。

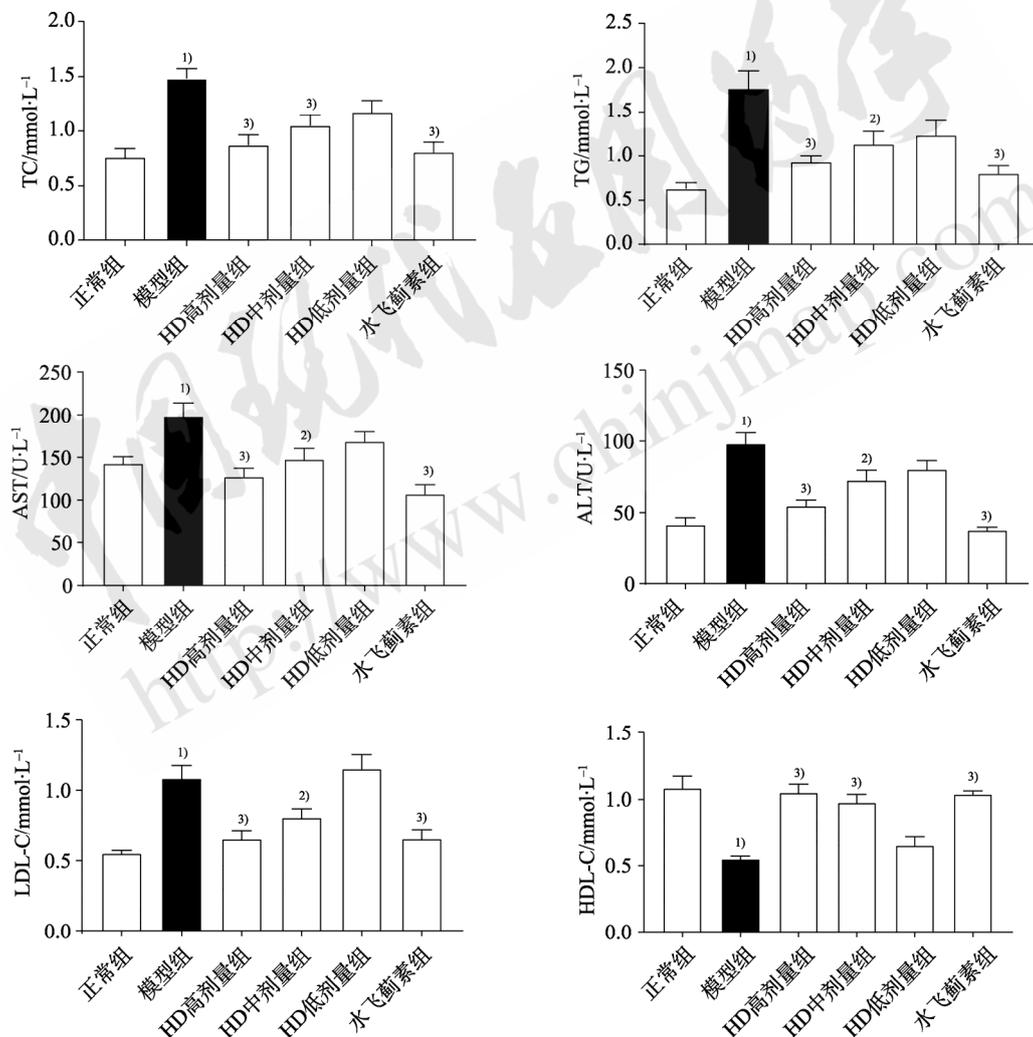


图 1 HD 对 NAFLD 大鼠血清 TC、TG、AST、ALT、HDL-C、LDL-C 水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

与正常组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 1 Effects of HD on the levels of TC, TG, AST, ALT, HDL-C and LDL-C in rats with NAFLD($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Compared with normal group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

研究发现, NAFLD 状态下, 肝脏发生氧化应激, 激活炎症反应, 进而导致炎症因子的产生^[19]。相比于正常组, 模型组大鼠促炎因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平均显著升高($P<0.01$), 这证实了模型组大鼠肝脏确实出现了严重的炎症反应。而经过 HD 和水飞蓟素给药治疗后, HD 各剂量组和水飞蓟素组大鼠肝脏中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平均显著下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 且高剂量 HD 和水飞蓟素组作用相当, 表明 HD 能显著抑制炎症因子的释放而发挥抗炎作用。结果见图 2。

3.4 HD 对肝组织病理变化的影响

HE 和油红 O 染色后, 正常组大鼠肝组织结构清晰完整, 肝细胞排列整齐, 基本无肝脂肪变性

和炎症等病理变化。而模型组出现大小不一的肝细胞空泡, 微、大水泡脂肪变性, 并伴有炎症细胞浸润; 油红 O 染色显示, 模型组脂质堆积, 脂肪变性严重。以上均表明已经成功建立了 NAFLD 动物模型。相比于模型组, 水飞蓟素和各剂量 HD 干预后的大鼠肝脏脂肪空泡、炎症程度和脂质堆积减轻, 这进一步证实了 HD 对 NAFLD 引起的肝损伤起保护作用。结果见图 3。

3.5 HD 对肝脏脂质代谢 AMPK 信号通路蛋白表达的影响

为研究 HD 对 NAFLD 大鼠肝损伤的作用机制, 采用 Western blotting 检测大鼠肝脏 AMPK 信号通路中相关蛋白的表达。与正常组相比, 模型组大鼠

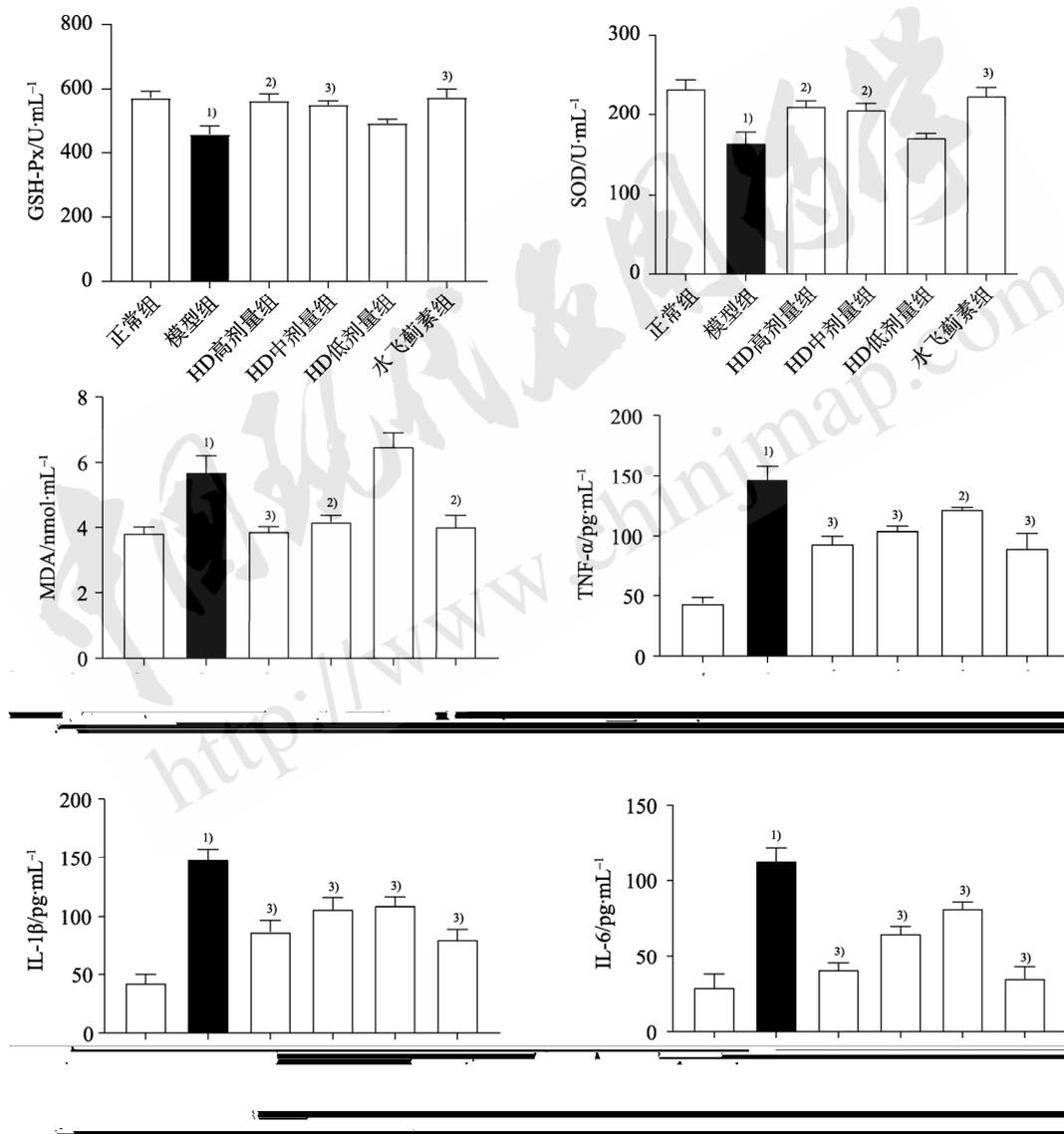


图 2 HD 对 NAFLD 大鼠氧化应激和炎症因子水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)
与正常组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 2 Effects of HD on the levels of oxidative stress and inflammatory cytokine in rats with NAFLD ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)
Compared with normal group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

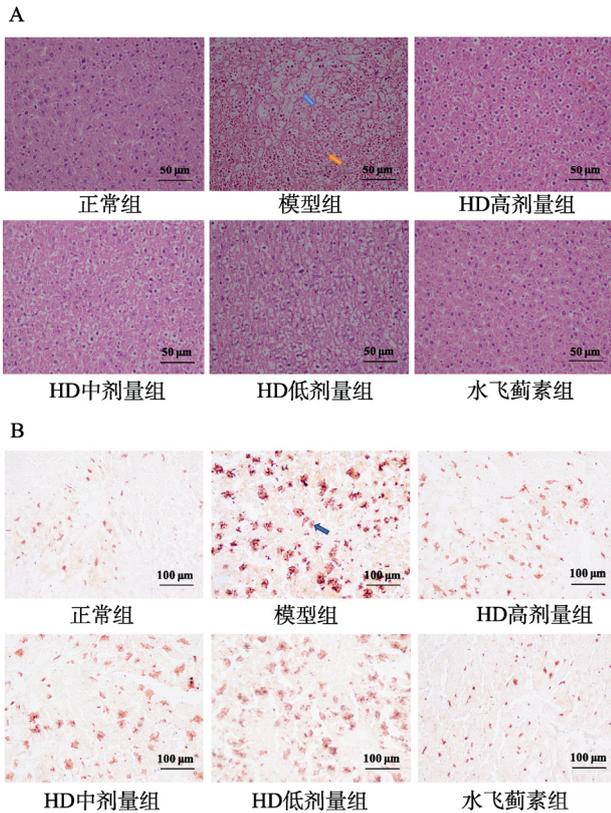


图3 各组大鼠 HE 与油红 O 染色图
A-HE 染色(400×); B-油红 O 染色(200×)。

Fig. 3 HE staining and oil red O staining results in rats of each group
A-HE staining(400×); B-oil red O staining(200×).

肝组织 p-AMPK 和 p-ACC 含量均显著下降($P < 0.01$); 相比于模型组, HD 中、高剂量组及水飞蓟素组大鼠肝组织 p-AMPK 和 p-ACC 表达均升高, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 表明 HD 可通过调节 AMPK/ACC 信号通路改善 NAFLD 大鼠肝损伤。结果见图 4。

4 讨论

NAFLD 是最常见的慢性肝病^[20]。目前全世界有四分之一的成年人患有 NAFLD, 公认的 NAFLD 发病机制为“二次打击”理论, 即肝脏细胞发生脂质积累, 并且诱发氧化应激, 以及将肝脏脂质积累发展为脂肪性肝炎、纤维化甚至肝硬化^[21-22]。NAFLD 动物模型通常由高脂饮食诱导, 其模型稳定性、成本低^[23]。本研究中的高脂饮食诱导 NAFLD 大鼠主要表现为体质量、肝质量增加、血脂紊乱、肝损伤、氧化应激并伴有炎症。

水飞蓟素是一种经批准的治疗肝损伤的药物, 它可以防止氧化应激和脂质积累^[24], 在本研究中被用作阳性对照以验证 HD 能否产生类似的保肝作用。研究表明, 补充 HD 显示出与水飞蓟素

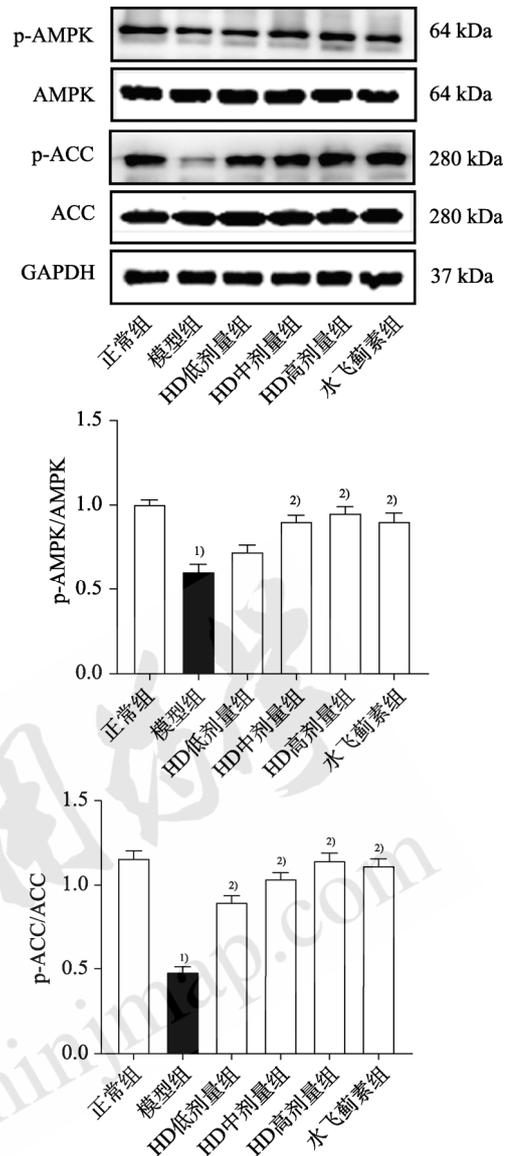


图4 各组大鼠肝脏 AMPK 信号通路中相关蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

与正常组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 4 Expression of related proteins in AMPK signaling pathway in rat liver of each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Compared with normal group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with model group, ²⁾ $P < 0.01$.

相似的预防 NAFLD 的潜力。

研究发现, NAFLD 患者通常会伴随着不同程度的脂代谢紊乱和肝损伤^[25]。本研究采用高脂饮食诱导的 NAFLD 大鼠探究 HD 的抗肝损伤作用, 并进一步阐明其作用机制。实验结果显示, 模型组大鼠精神萎靡, 活动减少, 体质量和肝脏系数显著升高。HD 和水飞蓟素组均能有效改善大鼠活动状态, 减轻体质量并降低肝脏系数。ALT 和 AST 是临床常用的检测肝功能的指标, 用于评估肝功能或肝脏损伤情况, TC、TG、HDL-C 和 LDL-C

则为机体脂质水平标志物^[26]。本研究显示模型组大鼠血清 TC、TG、AST、ALT、LDL-C 水平均显著升高，而血清 HDL-C 水平明显下降，表明 NAFLD 大鼠存在血脂异常、肝脂质堆积以及肝损伤，而中、高剂量 HD 和水飞蓟素干预均能明显降低血脂、肝脂质水平和肝功能指标。表明 HD 可调节脂代谢异常，对 NAFLD 大鼠的肝损伤有一定改善作用。

此外，氧化应激和炎症因子在介导 NAFLD 从脂肪变性到 NAFLD 肝炎、肝纤维化和肝硬化的进展中发挥重要的作用^[27]。脂肪酸氧化是脂肪肝中活性氧的重要来源，活性氧攻击多不饱和脂肪酸并启动细胞内的脂质过氧化，导致醛副产物如 MDA 的形成^[28-29]。这些分子有可能从它们的起源部位扩散到远处的细胞内和细胞外靶点，从而放大氧化应激的影响^[30]。通过检测肝脏 MDA 水平，SOD 和 GSH 活性进一步研究了 HD 对 NAFLD 大鼠氧化状态的影响。结果表明，中、高剂量 HD 干预后可显著增加 NAFLD 大鼠肝脏抗氧化因子 GSH-Px 和 SOD 水平，同时降低 MDA 含量。表明 HD 的抗氧化潜力可能代表了减轻和改善 NAFLD 大鼠肝功能的另一种机制。根据“双重打击”假说，在 NAFLD 期间，脂肪细胞中游离脂肪酸水平升高，肝细胞中脂质积累，导致肝脏炎症损伤^[31]。本研究中，NAFLD 期间，TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等促炎细胞因子含量显著高于正常组大鼠证实了“第二次打击”的假设。以上结果表明 HD 改善 NAFLD 大鼠的肝脏氧化应激水平的同时减轻肝脏炎症，从而达到改善 NAFLD 的效果。HE 和油红 O 染色情况也证实了这一结果。

肝脏是糖脂代谢的主要器官之一，AMPK 信号分子在肝脏脂质代谢中起着关键作用^[32]。AMPK 广泛分布于能量代谢旺盛的组织，如肝脏、脂肪、骨骼肌等，被称为“细胞能量平衡感受器”，已成为预防和治疗 NAFLD 的主要靶点^[33]。ACC 是 AMPK 调控的下游靶点，是脂肪酸合成与代谢的重要调节器。活化的 AMPK，即 p-AMPK，能够刺激分解代谢并抑制合成代谢，从而导致脂肪消耗的增加。在肝脏中，p-AMPK 可以磷酸化 ACC，使 ACC 失去活性，加速细胞脂质分解，抑制脂肪酸与胆固醇合成，减少肝脏脂质蓄积^[34]。另一方面，AMPK 活化会启动下游抗氧化基因 Nrf2 表达，抑制炎症反应^[35]。本研究中 HE 染色

显示 HD 能有效改善 NAFLD 大鼠肝脂肪变性。Western blotting 提示 NAFLD 大鼠肝脏 p-AMPK、p-ACC 表达均显著下降，使 ACC 活性增加，促进肝脏脂质合成和氧化应激发生。HD 治疗可显著上调肝脏中 p-AMPK 和 p-ACC 水平，提示 HD 可通过调节 AMPK/ACC 信号通路，抑制肝脏脂质合成和氧化应激，AMPK 可能是 HD 对 NAFLD 有益作用的关键机制。

2015 年，美国康涅狄格州斯托尔斯康涅狄格大学营养科学系发现，雷公菌提取物可通过降低 C57BL/6J 小鼠肠道胆固醇吸收和增加肝脏脂肪酸氧化来降低 TC 和 TG 水平，发挥降血脂作用^[36]，但并未对其具体活性成分深究。本研究提示雷公菌活性成分 HD 可通过调控 AMPK/ACC 信号通路，减轻 NAFLD 大鼠肝脏脂代谢异常，并减轻肝脏氧化应激和炎症反应引起的肝脏损害，这是对雷公菌降血脂作用的一大拓展，启示补充富含 HD 的雷公菌可能有助于防治脂质代谢异常相关疾病。

REFERENCES

- [1] MASARONE M, FEDERICO A, ABENAVOLI L, et al. Non alcoholic fatty liver: Epidemiology and natural history[J]. Rev Recent Clin Trials, 2014, 9(3): 126-133.
- [2] BYRNE C D, TARGHER G. NAFLD: A multisystem disease[J]. J Hepatol, 2015, 62(1 Suppl): S47-S64.
- [3] ESTES C, ANSTEE Q M, ARIAS-LOSTE M T, et al. Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016-2030[J]. J Hepatol, 2018, 69(4): 896-904.
- [4] FRIEDMAN S L, NEUSCHWANDER-TETRI B A, RINELLA M, et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies[J]. Nat Med, 2018, 24(7): 908-922.
- [5] WILKINS T, TADKOD A, HEPBURN I, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: Diagnosis and management[J]. Am Fam Physician, 2013, 88(1): 35-42.
- [6] SCHUPPAN D, SCHATTEBERG J M. Non-alcoholic steatohepatitis: Pathogenesis and novel therapeutic approaches[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2013, 28(Suppl 1): 68-76.
- [7] ZHONG F W, LI G X, ZENG L. *Gynostemma pentaphyllum* saponins alleviate non-alcoholic fatty liver disease in rats by regulating intestinal flora and short-chain fatty acid metabolism[J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2022, 47(9): 2500-2508.
- [8] CHENG J A, YUAN Y, YU Y, et al. Metabolomics study on the liver protection effect of total flavone extract from *Penthorum chinense* Pursh on alcoholic fatty liver in mice[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2021, 38(24): 3160-3166.

- [9] YAN T T, YAN N N, WANG P, et al. Herbal drug discovery for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10(1): 3-18.
- [10] LI Z Y, GUO M. Healthy efficacy of *Nostoc commune vaucher*[J]. *Oncotarget*, 2017, 9(18): 14669-14679.
- [11] LI Z Y, GUO M. Biological activities of natural products from *Nostoc commune vaucher*[J]. *J Shanxi Univ Nat Sci Ed(山西大学学报: 自然科学版)*, 2017, 40(3): 645-651.
- [12] XU X T, WEI C Q, YANG Y Y, et al. New discovery of anti-ulcerative colitis active ingredients of *Nostoc commune*: P-Hydroxy benzaldehyde[J]. *J Funct Foods*, 2021(77): 104327.
- [13] SMITH B K, MARCINKO K, DESJARDINS E M, et al. Treatment of nonalcoholic fatty liver disease: Role of AMPK[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2016, 311(4): E730-E740.
- [14] WOODS A, WILLIAMS J R, MUCKETT P J, et al. Liver-specific activation of AMPK prevents steatosis on a high-fructose diet[J]. *Cell Rep*, 2017, 18(13): 3043-3051.
- [15] VAHABZADEH M, AMIRI N, KARIMI G. Effects of silymarin on metabolic syndrome: A review[J]. *J Sci Food Agric*, 2018, 98(13): 4816-4823.
- [16] MUMAL S, WAHEED A, AZEEM A, et al. Hepato-Protective effects of silymarin and coffee in rats[J]. *JIMC*, 2020, 15(4): 241-244.
- [17] ZHANG S, ZHENG L L, DONG D S, et al. Effects of flavonoids from *Rosa laevigata* Michx fruit against high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in rats[J]. *Food Chem*, 2013, 141(3): 2108-2116.
- [18] FENG L, WANG X J, PENG F, et al. Walnut protein hydrolysates play a protective role on neurotoxicity induced by D-galactose and aluminum chloride in mice[J]. *Molecules*, 2018, 23(9): 2308.
- [19] CARVAJAL S, PERRAMÓN M, ORÓ D, et al. Cerium oxide nanoparticles display antilipogenic effect in rats with non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 12848.
- [20] QUESADA-VÁZQUEZ S, ARAGONÈS G, DEL BAS J M, et al. Diet, gut microbiota and non-alcoholic fatty liver disease: Three parts of the same axis[J]. *Cells*, 2020, 9(1): 176.
- [21] PETERS A E, PANDEY A, AYERS C, et al. Association of liver fibrosis risk scores with clinical outcomes in patients with heart failure with preserved ejection fraction: Findings from TOPCAT[J]. *ESC Heart Fail*, 2021, 8(2): 842-848.
- [22] WANG M Y, GAO G, LI E W, et al. Mechanism of Zexie decoction in improvement of nonalcoholic fatty liver disease based on LKB1/AMPK/PGC-1 α pathway[J]. *Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2022, 47(2): 453-460.
- [23] SHEN C, GAO J, ZHAO C Y. Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: Recent advances[J]. *World Chin J Dig(世界华人消化杂志)*, 2009, 17(33): 3414-3419.
- [24] YANG G, ZHAO Y P, ZHANG Y T, et al. Enhanced oral bioavailability of silymarin using liposomes containing a bile salt: Preparation by supercritical fluid technology and evaluation *in vitro* and *in vivo*[J]. *Int J Nanomedicine*, 2015(10): 6633-6644.
- [25] ARMANDI A, SCHATTENBERG J M. Beyond the paradigm of weight loss in non-alcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to novel dietary approaches[J]. *Nutrients*, 2021, 13(6): 1977.
- [26] YUNQING W, WU F X, JIANPING J, et al. Effect of erchen decoction on rat model with type 2 diabetes mellitus and nonalcoholic fatty liver based on the SIRT1/UCP₂ signaling pathway[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2021, 38(1): 28-35.
- [27] GE P F, LI J Q, GAO Y, et al. Protective effect and mechanism of Yinzhihuang combined with metformin on nonalcoholic fatty liver disease in rats [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Clin Med(中药药理与临床)*, 2021, 37(2): 150-155.
- [28] ZHANG Q L, LIU X C, LIU Y G, et al. Protective effect of Yishen Paidu Pill on liver injury by regulating AMPK/ACC signaling pathway in db/db mice[J]. *Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志)*, 2021, 41(4): 360-366.
- [29] CHITTURI S, FARRELL G C. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Semin Liver Dis*, 2001, 21(1): 27-42.
- [30] ESTERBAUER H, SCHAUR R J, ZOLLNER H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes[J]. *Free Radic Biol Med*, 1991, 11(1): 81-128.
- [31] XIE P C, QIU L Y. Development of nanocarriers in drug treatment of non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2021, 38(13): 1610-1617.
- [32] OKISHIO S, YAMAGUCHI K, ISHIBA H, et al. PPAR α agonist and metformin co-treatment ameliorates NASH in mice induced by a choline-deficient, amino acid-defined diet with 45% fat[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 19578.
- [33] ZHENG Z, LI Y, FAN S Y, et al. WW domain-binding protein 2 overexpression prevents diet-induced liver steatosis and insulin resistance through AMPK β 1[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(3): 228.
- [34] GENG T T, LIU Y, XU Y T, et al. H19 lncRNA promotes skeletal muscle insulin sensitivity in part by targeting AMPK[J]. *Diabetes*, 2018, 67(11): 2183-2198.
- [35] DAVAL M, DIOT-DUPUY F, BAZIN R, et al. Anti-lipolytic action of AMP-activated protein kinase in rodent adipocytes[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(26): 25250-25257.
- [36] KU C S, KIM B, PHAM T X, et al. Hypolipidemic effect of a blue-green alga(*Nostoc commune*) is attributed to its nonlipid fraction by decreasing intestinal cholesterol absorption in C57BL/6J mice[J]. *J Med Food*, 2015, 18(11): 1214-1222.

收稿日期: 2022-01-09
(本文责编: 沈倩)