

四妙丸提取物乙醇提取部位对肝脏脂质蓄积的作用

马晶杰, 陈伊梦, 姜琪欣, 杨杰, 闻晓东*

(中国药科大学中药学院, 天然药物活性组分与药效国家重点实验室, 南京 211198)

摘要 研究四妙丸提取物的60%乙醇洗脱部位(ESMW)对肝脏脂质蓄积的改善作用及其机制。采用甘油三酯(TG)试剂盒、BODIPY荧光染色、QPCR、Western blot、油红O染色、AMPK α 敲减等方法检测四妙丸提取物ESMW对游离脂肪酸诱导的肝细胞脂质蓄积的改善作用;并在高脂饲喂小鼠中,通过检测ESMW对高脂饮食小鼠的口服糖耐量、血脂、肝脏脂质水平、肝组织脂代谢相关mRNA及蛋白表达等生化指标,验证ESMW对肝脏脂质蓄积的改善作用及其机制。结果表明,ESMW通过调节AMPK信号通路抑制游离脂肪酸诱导的肝原代细胞脂质堆积;显著改善了高脂饮食小鼠肝脏的脂质堆积,且该药效的发挥与AMPK信号通路有关。

关键词 四妙丸;乙醇提取物;糖脂代谢;AMPK;脂质蓄积;脂质合成

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2021)06-0725-10

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20210611

引用本文 马晶杰, 陈伊梦, 姜琪欣, 等. 四妙丸提取物乙醇提取部位对肝脏脂质蓄积的作用[J]. 中国药科大学学报, 2021, 52(6): 725 - 734.

Cite this article as: MA Jingjie, CHEN Yimeng, JIANG Qixin, et al. Effects of ethanol extract of *Si Miao Wan* on hepatic lipid accumulation [J]. *J China Pharm Univ*, 2021, 52(6): 725 - 734.

Effects of ethanol extract of *Si Miao Wan* on hepatic lipid accumulation

MA Jingjie, CHEN Yimeng, JIANG Qixin, YANG Jie, WEN Xiaodong*

State Key Laboratory of Natural Medicines, School of Traditional Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract This study aimed to investigate the ameliorative effects of 60% ethanol elution fraction (ESMW) from *Si Miao Wan* on the hepatic lipid accumulation and its mechanism. TG kit, BODIPY fluorescence staining, QPCR, WB, oil red O staining, and AMPK α knockdown were used to detect the ability of ESMW to improve lipid accumulation in hepatocytes stimulated with free fatty acid. Furthermore, the effects of ESMW on the oral glucose tolerance, serum biochemical indexes, TG content in liver tissue, the expressions of mRNA and protein related to lipid metabolism in liver tissue were studied in mice fed with high fat diet to verify the mechanism of ESMW fraction on hepatic lipid accumulation. The results showed that ESMW inhibited lipid accumulation induced by free fatty acids by regulating AMPK signaling pathway, and that ESMW significantly improved the lipid metabolism of mice fed with high fat diet, with relation to AMPK signaling pathway.

Key words *Si Miao Wan*; ethanol extract; glucolipid metabolism; AMPK; lipid accumulation; lipid biosynthesis

This study was supported by the National Key R&D Program of China (No. 2018YFC1704500, No. 2018YFC1704503)

近年来,随着人们生活水平的提高,肥胖^[1]、糖尿病^[2]、非酒精性脂肪肝^[3]等代谢综合征的发病率逐年上升,已对人类健康构成重大威胁。脂质代谢紊乱与诸症的发生发展密切相关,是各症发生

的重要病理因素^[4]。肝脏是脂质合成的主要场所,肝脏脂质蓄积可诱导脂肪肝、肝纤维化和肝硬化等后续性肝损伤^[4],也是促进胰岛素抵抗的因素之一^[5]。中医虽无脂代谢紊乱的概念,但对“消瘿”、

收稿日期 2021-05-17 *通信作者 Tel:025-86185102 E-mail:xiaodongwen@cpu.edu.cn

基金项目 国家重点研发计划资助项目(No. 2018YFC1704500, No. 2018YFC1704503)

“膏脂”等均有记载,且有“肥人多痰”、“肥人多湿”之说。现代中医学认为,其病因为饮食不节,恣食肥甘,痰浊内生;或肝失疏泄,湿浊内停;或脾虚痰盛证;或脏气衰减,阳虚痰滞,终致痰积血瘀,滞留体内为病。可见,肝脾肾失调,痰湿郁结是代谢综合征的核心病机^[6]。因此,健脾助运,清热燥湿是干预脂代谢紊乱的重要治则^[7]。

四妙丸由黄柏、苍术、牛膝、薏苡仁组成,具有健脾助运,清热燥湿的功效,临床用于关节炎^[8]和痛风^[9]等疾病治疗。因此,拓展四妙丸干预代谢综合征的应用具有较好的基础和发展前景。

腺苷酸激活蛋白激酶(AMPK)作为细胞内重要的能量感受器参与脂质代谢的调节,有研究表明小檗碱既可以通过调节 AMP/ATP 比值激活 AMPK^[10],也可以通过激活 LKB1 激活 AMPK^[11]。四妙丸提取物的 60% 乙醇洗脱部位(ESMW)小檗碱的含量达 20.47%,因此 ESMW 可能调节 AMPK 改善脂代谢。

本课题组前期研究发现,四妙丸提取物的 ESMW 是四妙丸调节脂代谢的活性部位,本研究以游离脂肪酸诱导肝细胞脂质堆积细胞模型,探索 ESMW 改善肝脏脂质蓄积的能力及作用机制,并在高脂饲喂的小鼠中验证 ESMW 对肝脏脂代谢的调节作用。

1 材料

1.1 药品与试剂

ESMW(本课题组制备,提取率 0.92%);脱脂牛血清白蛋白(北京索莱宝科技有限公司);棕榈酸钠、油酸钠、油红 O、BODIPY 荧光染料、Hoechst 荧光染料(美国 Sigma 公司);AMPK 激动剂 A-769662(美国 MCE 公司);二甲双胍[阿拉丁试剂(上海)有限公司];高脂饲料 D12492、对照饲料 D12450B(美国 Research Diets 公司);Trizol 总 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、定量 PCR 检测试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司);RAPI 裂解液;BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);TG、TC、HDL-C、LDL-C、NEFA 测试试剂盒(南京建成生物工程研究所);INS、IL-6、TNF- α ELISA 试剂盒(上海酶联生物科技有限公司);AMPK、p-AMPK、LKB1、p-LKB1、elF4EBP1、p-4EBP1、FASN 抗体(英国 Abcam 公司);ACC、p-ACC 抗体(美国 CST 公

司);SREBP-1 抗体、Reagent、Medium(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司); β -actin、羊抗小鼠、羊抗兔抗体(美国 Bioworld Technology 公司);AMPK α 、Control siRNA(上海吉满生物科技有限公司);实验中所用引物均合成于上海生工生物工程有限公司,种属均为小鼠,其序列见表 1。

Table 1 Primer sequences used for RT-qPCR

Gene	Sequences(5'→3')
<i>Srebp-1</i>	F:CGACTACATCCGCTTCTTGCAG
	R:CCTCCATAGACACATCTGTGCC
<i>Acc</i>	F:GGACAGACTGATCGCAGAGAAAG
	R:TGGAGAGCCCCACACACA
<i>Fasn</i>	F:CACAGTGCTCAAAGGACATGCC
	R:CACCAGGTGTAGTGCCTTCCTC
<i>Ppara</i>	F:TCTGTGGGCTCACTGTCTT
	R:AGGGCTCATCCTGTCTTTG
<i>Cpt-1a</i>	F:TAGGACAGGCAGAAAATTGT
	R:CATTAGGAGCCGATTCAAAA
<i>Pgc-1α</i>	F:ACAACCGCACTCGCAACA
	R:GGAGGAGTCGTGGGAGGAG
<i>Fabp-2</i>	F:GCTGACATCGTAGGACTGGT
	R:TTCCACCTCATGACCTGGC
<i>β-actin</i>	F:CATTGCTGACAGGATGCAGAAGG
	R:TGCTGGAAGGTGGACAGTGAGG

1.2 仪器

血糖仪、血糖试纸(三诺生物传感股份有限公司);酶标仪、自动纯水机、Real-Time qPCR(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);低温高速离心机、梯度 PCR 仪(德国 Eppendorf 公司);Olympus IX53 倒置显微镜(日本 Olympus 公司);Nano Zoomer2.0 RS 切片扫描仪(日本 Hamamatsu 公司);Tanon 5200 化学发光成像仪(上海天能科技有限公司);Nano-100 微量分光光度计(杭州奥盛仪器有限公司)。

1.3 细胞株与动物

人肝癌 HepG2 细胞株(中科院上海细胞库);小鼠肝原代细胞由 C57BL/6J 雄鼠肝脏灌流提取。SPF 级 C57BL/6J 雄鼠,体重 18~22 g,购于浙江维通利华公司,动物许可证号 SCXK(浙)2019-0001。所有动物实验均符合动物伦理委员会标准。

2 方法

2.1 药品的制备

苍术和薏苡仁药材饮片按照质量比 1:2 混合,

10倍量乙醇加热回流提取2 h,趁热过滤,药渣与牛膝和黄柏药材饮片(1:2)用30倍水加热回流提取2 h后,pH调至8,12 000 r/min离心10 min得上清液,用0.22 μm 微滤系统,将制得的上清液过300 kD超滤膜,超滤至截留体积为原溶液的60%;将透过液过10 kD超滤膜,超滤至截留体积为原溶液的50%。将10 kD透过部分过AB-8型大孔树脂,经过吸附和乙醇梯度洗脱,收集60%乙醇洗脱液,浓缩得ESMW(主要复方中的小分子类化合物,包括:黄柏中9个生物碱类成分phellodendrine, magnoflorine, tembetarine, lotusine, menisperine, columbamine, jatrorrhizine, berberrubine and berberine,苍术中的atractylenolide III和atractylone,薏苡仁和黄柏中的caffeoyl-CH₂-O-quinic acid,牛膝中的dibutyl phthalate)。

2.2 药品的配制

精密称取棕榈酸钠粉末0.027 84 g、0.030 44 g油酸钠粉末,加入灭菌双蒸水0.5 mL于75 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴上加热至溶液澄清,制得200 mmol/L的母液。将母液趁热转移至10%BSA溶液4.5 mL中得20 mmol/L PA、OA,吹匀,分装,-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

精密吸取20 mg/mL ESMW母液50 μL ,加入到灭菌PBS缓冲液2 mL中,吹匀,即得500 $\mu\text{g/mL}$ 细胞用ESMW母液,分装并保存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱,按照逐级稀释的配制方法,将500 $\mu\text{g/mL}$ 细胞用ESMW母液稀释为低中高3个浓度:ESMW-L(0.5 $\mu\text{g/mL}$),ESMW-M(1 $\mu\text{g/mL}$),ESMW-H(2 $\mu\text{g/mL}$)。

油红O母液:称取油红O粉末0.2 g加入异丙醇40 mL,避光超声使其溶解,置4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱避光保存备用。

精密称取ESMW,用3%泊洛沙姆溶液分别配制成7.124 mg/mL混悬液;二甲双胍用3%泊洛沙姆溶液分别配制成20 mg/mL溶液;4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,用前混匀。

2.3 脂质蓄积细胞模型的建立与给药

2.3.1 小鼠肝原代脂质蓄积细胞模型的建立与给药 两步灌注法提取小鼠肝原代细胞,DMEM高糖培养基孵育24 h后,细胞密度为70%~80%时,加入棕榈酸(palmitate, PA, 150 $\mu\text{mol/L}$)+油酸(oleinic acid, OA, 150 $\mu\text{mol/L}$)(1:1)或PA+OA+不同剂量的ESMW或A-769662(2 $\mu\text{mol/L}$)继续共孵

育24 h,收集细胞用于后续实验。

2.3.2 AMPK α 敲减HepG2细胞脂质蓄积模型的建立与给药 当HepG2细胞密度达40%~50%时,将细胞培养基换成无血清无双抗的DMEM高糖培养基0.8 mL,细胞培养箱孵育40 min,配制转染液。A液:AMPK α siRNA3 μL 加培养基97 μL 混匀,避光放置备用。(对照组加Control siRNA);B液:转染试剂3 μL 加培养基97 μL 混匀,避光放置备用。将A加入B中,吹匀,避光静置20 min;将混合液0.2 mL均匀加入一个孔中,轻轻摇匀。12 h后,向转染培养基中加入含血清含双抗的DMEM高糖培养基1 mL,继续培养12 h,再进行验证或者给药。给药:加入棕榈酸(palmitate, PA, 150 $\mu\text{mol/L}$)+油酸(oleinic acid, OA, 150 $\mu\text{mol/L}$)(1:1),或PA+OA+ESMW(1 $\mu\text{g/mL}$)共孵育24 h。收集细胞进行Western blot实验或油红O染色实验。

2.4 动物分组造模与给药

将40只小鼠适应性饲养1周后,按体重随机分为:对照组(Control)、模型组(Model)、ESMW给药组(ESMW, 71.24 mg/kg,相当于7 743.16 mg/kg四妙丸生药量)、阳性药组(二甲双胍,200 mg/kg),每组10只。对照组小鼠给予对照饲料饲养,其余小鼠均给予高脂饲料饲养。实验开始时,每天灌胃给药,给药体积为0.01 mL/g小鼠,对照组、模型组给予等体积3%泊洛沙姆溶液。

2.5 实验指标及测定

2.5.1 BODIPY荧光染色 原代细胞接于共聚焦小皿中,舒展24 h至密度为60%~80%时,造模并给药;给药24 h后,吸去上清液,用PBS溶液润洗后,每孔加入BODIPY荧光染料溶液(BODIPY母液稀释1 000倍)100 μL 孵育15 min。弃去BODIPY,每孔加入Hoechst荧光染料溶液(Hoechst母液稀释100倍)100 μL 孵育10 min。弃去Hoechst,用灭菌PBS洗3次后,每孔加入PBS 100 μL ,避光在激光共聚焦显微镜63 \times 油镜下观察并拍照。

2.5.2 油红O染色 细胞给药24 h后,弃上清液,加入37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的PBS溶液1 mL润洗,吸尽弃去PBS溶液,每孔加4%多聚甲醛溶液1 mL,室温固定30 min。吸尽弃去多聚甲醛溶液,每孔加入60%异丙醇溶液(9 mL异丙醇:6 mL PBS)1 mL,室温孵育1 min。吸尽弃去异丙醇溶液,每孔加入油红O工作液(15 mL油红O母液:10 mL PBS)1 mL,

室温避光染色30 min。吸尽弃去油红O工作液,用PBS溶液洗4次,每次5 min。每孔加PBS溶液1 mL,在倒置显微镜下拍照。

2.5.3 生理状况及体重 记录每周记录两次动物体重,并每天观察记录动物的摄食量、活动及精神状态。

2.5.4 口服葡萄糖耐量 实验第9周,动物禁食不禁水16 h,酒精棉片擦拭尾尖,消毒剪刀剪尾尖,取1滴尾尖血于试纸上测量并记录血糖值,为0 min血糖值。灌胃0.2 g/mL葡萄糖溶液(2 g/kg, 0.1 mL/10 g 动物),分别测定并记录30、60、90、120 min时间点处血糖值,计算曲线下面积。

2.5.5 样品采集和保存 实验第12周,动物禁食不禁水12 h,取血离心得血清,脱颈处死动物,解剖分离肝脏,称重并拍照。肝脏分3份:(1)用胶水包裹做冰冻切片,用于肝脏油红O染色切片的制作;(2)4%多聚甲醛固定,用于肝脏HE染色切片的制作;(3)剩余肝脏样品与血清放置于-80℃冰箱冻存。

2.5.6 血清生化指标 按TG、TC、NEFA、TNF- α ELISA测试试剂盒说明书的方法,对血清样品进行检测。

2.5.7 Western blot法检测细胞和肝脏的蛋白表达 精密称取肝组织30 mg,加入RAPI裂解液500 μ L,匀浆10 min后冰上裂解30 min(细胞样品加入RAPI裂解液30~50 μ L后,吹匀冰上裂解30 min)。4℃,12 000 r/min离心20 min,避开最上层脂质,取上清液。BCA定量后,调至统一浓度,加入5 \times 上样缓冲盐,100℃金属浴加热变性5 min,将样品插入冰盒降温后,-20℃保存备用。每孔加入蛋白样品45 μ g,经SDS-PAGE电泳、半干转膜法转膜后,将PVDF膜用5%脱脂奶粉封闭2 h,对应一抗在4℃冰箱中孵育过夜,TBST洗30 min,对应二抗室温孵育1 h,TBST洗30 min,ECL显影。每个指标重复3次,Image J计算灰度。

2.5.8 实时荧光定量PCR实验检测细胞和肝脏的mRNA表达 精密称取肝组织25 mg,加入Trizol 1 mL,匀浆10 min后冰上静置5 min(细胞样品加入Trizol 1 mL吹匀,冰上静置5 min)。提取总RNA后,Nano-100定量,按照HiScript II Q RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)说明书的方法进行cDNA的合成;按照ChamQ SYBR qPCR Master

Mix试剂盒说明书的方法定量,每个指标重复3次。

2.6 统计学分析

使用GraphPad Prism Version 6软件进行统计学分析。所得数据以均值 \pm 标准误($\bar{x} \pm s$)表示。采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)检验多组数据间的显著性差异,采用 t 检验分析两组数据间的显著性差异。以 $P < 0.05$ 认为具有统计学意义。

3 结果

3.1 ESMW对游离脂肪酸诱导的肝原代细胞脂质堆积的影响

TG试剂盒检测结果显示(图1-A),游离脂肪酸刺激后,TG含量显著增加,且中剂量的ESMW可以显著降低细胞内的TG含量;与该结果一致,BODIPY荧光染色(图1-B)显示ESMW有效降低了游离脂肪酸诱导的肝原代细胞中脂质堆积。

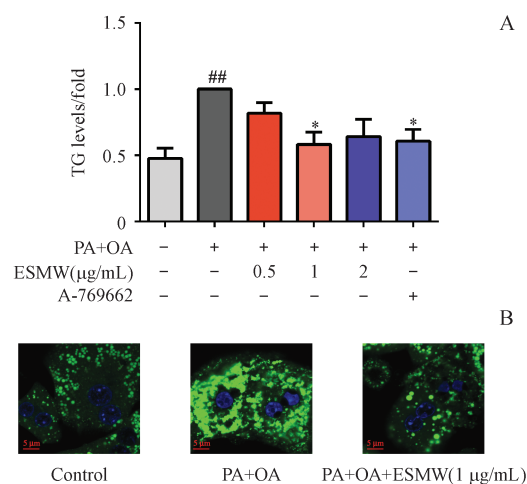


Figure 1 Effects of 60% ethanol extract of *Si Miao Wan* (ESMW) on lipid accumulation in primary mouse hepatocytes induced by free fatty acids ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

A: TG levels determined by TG kits ($\bar{x} \pm s, n = 3$); B: BODIPY fluorescence staining

$P < 0.01$ vs untreated group; * $P < 0.05$ group vs treated with PA + OA only

3.2 ESMW对Srebp-1、Acc、Fasn mRNA及蛋白表达的影响

QPCR的结果显示(图2-A~2-C),棕榈酸和油酸刺激下,肝细胞中Srebp-1、Acc、Fasn mRNA水平显著上调,而给予ESMW后,游离脂肪酸诱导的Srebp-1、Acc、Fasn mRNA水平升高得到了抑制。与QPCR结果一致,Western blot结果显示(图2-D~2-G),棕榈酸和油酸作用下,肝细胞中SREBP-1、

ACC、FASN 蛋白水平显著上调,ESMW 中、高剂量显著抑制了 ACC 及 FASN 蛋白表达,中剂量 ESMW

抑制了 SREBP-1 的成熟。以上结果表明,ESMW 可以抑制游离脂肪酸诱导的脂质合成。

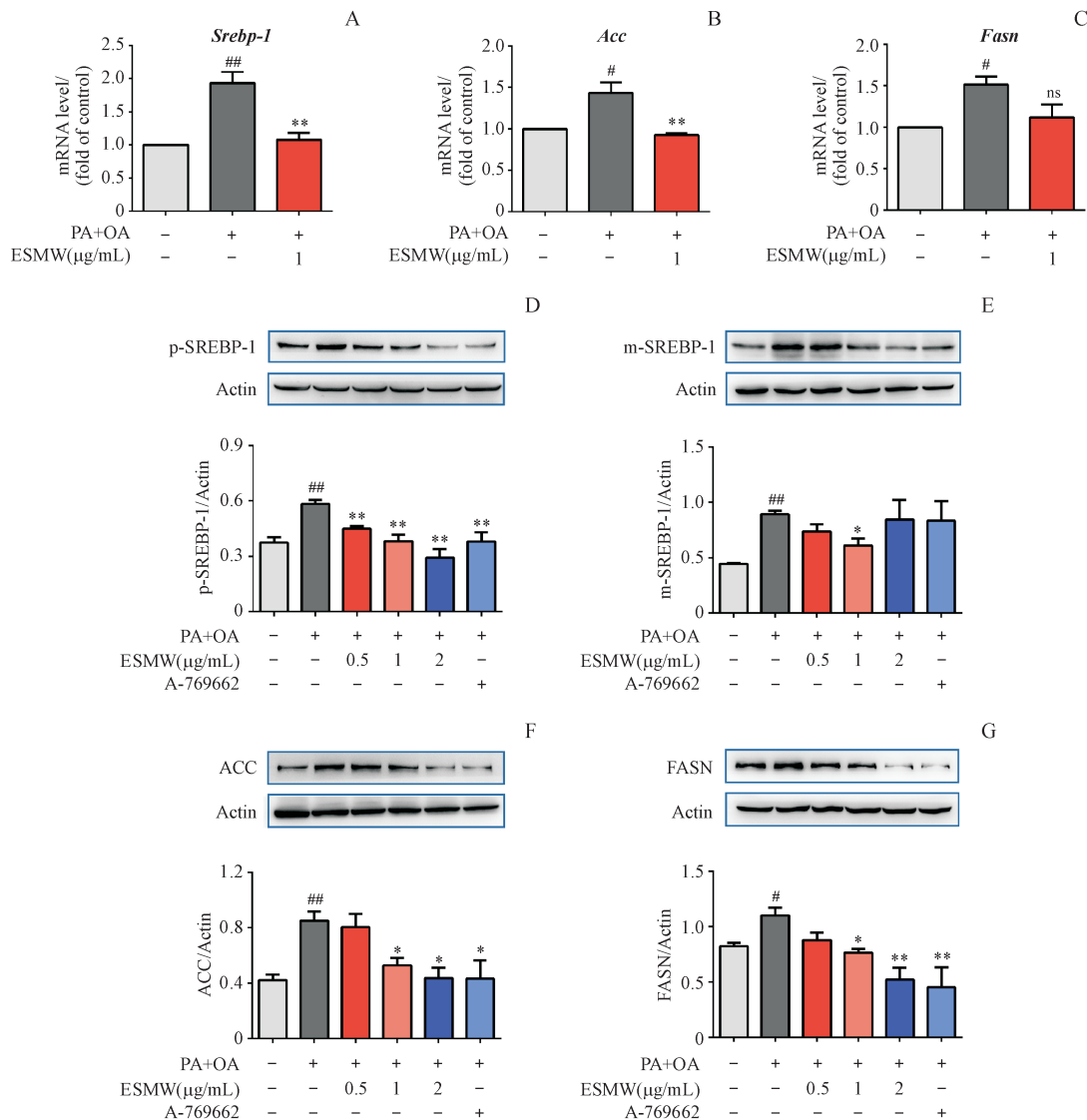


Figure 2 Effects of ESMW on *Srebp-1*, *Acc* and *Fasn* mRNA and protein expression ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

A-C: Effects of ESMW on the mRNA expression of *Srebp-1*, *Acc* and *Fasn* in cells; D-G: Effects of ESMW on the proteins expression of SREBP-1, ACC and FASN in cells

$P < 0.01$, # $P < 0.05$ vs untreated group; ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs group treated with PA + OA only; ns means no significant difference

3.3 ESMW 对 AMPK 的激活作用及对 LKB1-AMPK-mTOR 信号的影响

图 3-A 结果表明,在正常生理状态的原代肝细胞中,ESMW 对 AMPK 具有显著的激活作用,且呈剂量依赖。

实验结果表明,游离脂肪酸作用下,LKB1 的磷酸化水平受到抑制(图 3-C),AMPK 的激活降低(图 3-B),而 ESMW 给药后,促进了 LKB1 的磷酸化(图 3-C),并显著增加了 AMPK 的磷酸化(图 3-B)。

AMPK 的激活将抑制 mTOR 信号。4EBP1 作为 mTOR 的底物,游离脂肪酸显著增加了 4EBP1 的磷酸化(图 3-D),表明 mTOR 信号激活。ESMW ($1 \mu\text{g/mL}$)作用后,4EBP1 的磷酸化显著降低(图 3-D),表明 ESMW 抑制了 mTOR 信号。

3.4 ESMW 通过 AMPK 抑制 HepG2 细胞中的脂质蓄积

AMPK α 敲减后,HepG2 细胞中 AMPK 蛋白表达显著降低,表明敲降成功(图 4-A, $P < 0.01$)。随

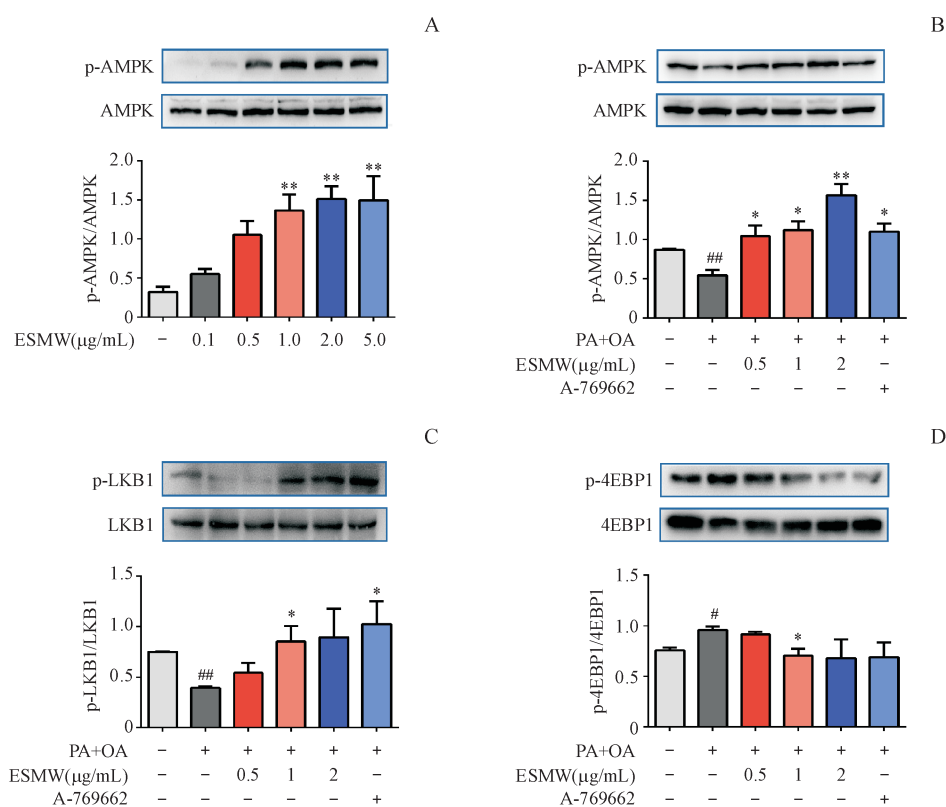


Figure 3 Effects of ESMW on LKB1-AMPK-mTOR signaling pathway ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

A: Primary mouse hepatocytes were co-incubated with ESMW and the effects of ESMW on AMPK activation were detected by Western blot; B-D: Primary mouse hepatocytes were co-incubated with palmitate (PA, 150 μmol/L) + Oleic acid (OA, 150 μmol/L) (1 : 1) or PA + OA + ESMW. The effects of ESMW on the phosphorylation of AMPK, LKB1 and 4EBP1 were detected by Western blot

$P < 0.01$, # $P < 0.05$ vs untreated group; ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs group treated with PA + OA only

后,用游离脂肪酸对上述敲降细胞进行诱导,考察ESMW能否抑制饱和脂肪酸诱导的脂质蓄积。实验结果表明,AMPK被敲降后,ESMW对SREBP1的抑制作用及对TG的抑制作用均被显著减弱(图4-B ~ 4-D, $P < 0.05$),证明ESMW是通过调控AMPK抑制肝细胞中的脂质蓄积。

3.5 ESMW对高脂喂养小鼠体重、口服葡萄糖耐量的影响

图5-A结果显示,与对照组相比,模型组体重增长速度较快,给予ESMW和二甲双胍灌胃后,小鼠体重增加明显受到抑制。如图5-B和5-C所示,模型组血糖曲线下面积与对照组相比明显升高。ESMW组的血糖曲线下面积显著降低,说明ESMW有效改善了高脂诱导的口服糖耐量异常。

3.6 ESMW对高脂饲喂小鼠血清中生化指标的影响

血浆生化指标结果如表2所示,与空白组相

比,模型组小鼠血清中TG、TC、NEFA水平显著增加($P < 0.01$),表明高脂饲料诱导了小鼠体内脂质代谢异常。ESMW显著抑制了高脂诱导的血脂相关参数的改变($P < 0.01$),改善了脂质代谢。高脂诱导造成小鼠体内高血糖和高血脂,糖毒性和脂毒性共同加剧炎症、氧化应激等发展,最终导致糖尿病、脂肪肝、动脉粥样硬化等糖脂代谢紊乱性疾病的发生发展。本课题组用ELISA试剂盒检测小鼠血清中炎症因子TNF-α水平,考察ESMW对炎症的改善作用。与普通饮食组小鼠相比,高脂饮食明显上调TNF-α水平,表明高脂诱导了小鼠体内炎症反应的发生。与模型组相比,ESMW组TNF-α水平下降了21.2%,表明ESMW能有效改善高脂诱导的小鼠体内炎症反应。

3.7 ESMW对高脂饲喂小鼠肝脏中脂质蓄积的影响

肝脏是脂质代谢的重要器官,前面的实验表

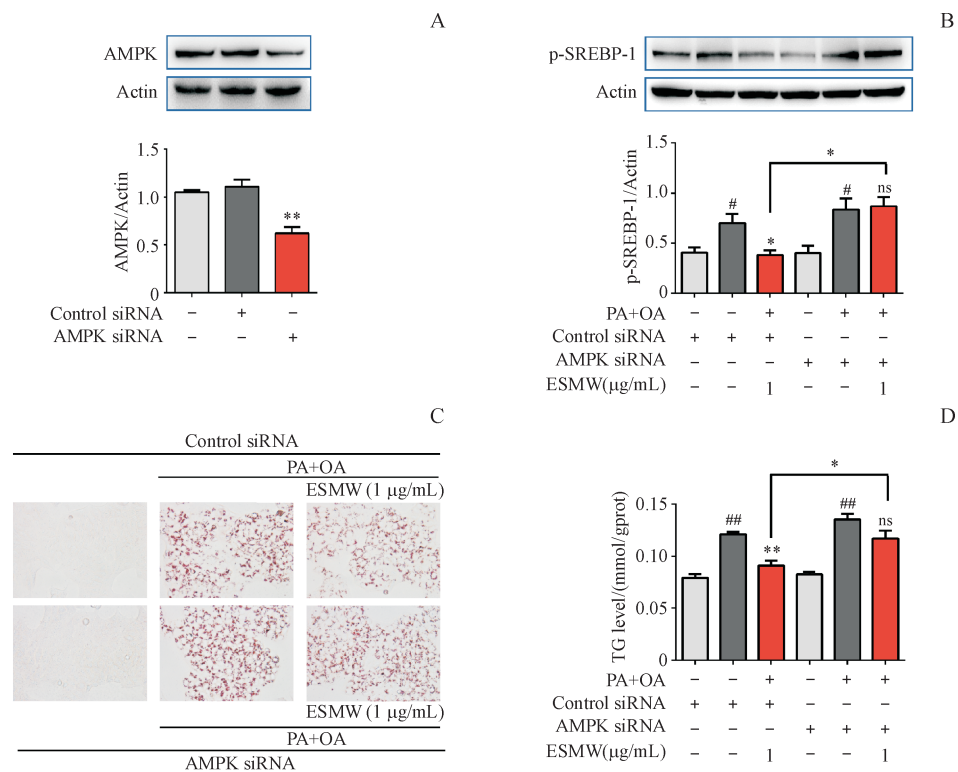


Figure 4 ESMW inhibited lipid accumulation in HepG2 cells by AMPK activation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
A: AMPK expression; B: p-SREBP1 expression; C-D: Levels of TG in cells were detected by oil red O and TG kits
$P < 0.01$, # $P < 0.05$ vs control siRNA group; ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs group treated with PA + OA only

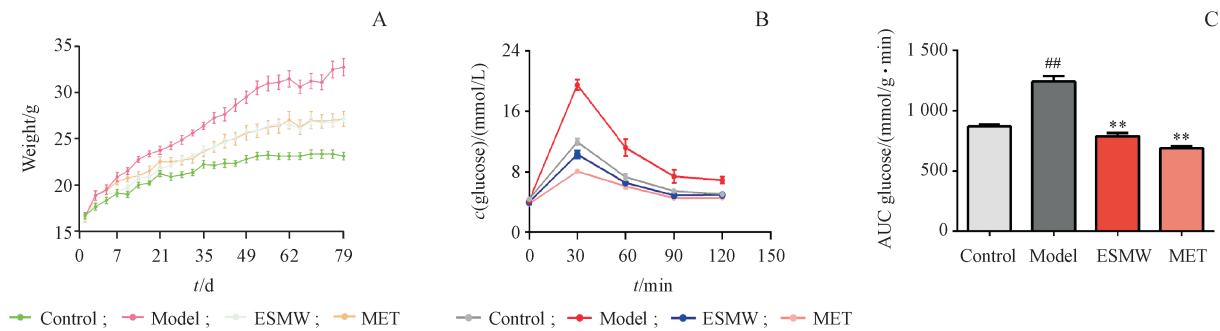


Figure 5 Effects of ESMW on body weight (A) and oral glucose tolerance (B, C) in mice fed with high fat diet ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Control: Normal mice; Model: High fat diet-fed mice; ESMW: High fat diet-fed mice treated with ESMW; MET: High fat diet-fed mice treated with metformin
$P < 0.01$ vs control group; ** $P < 0.01$ vs model group

Table 2 Effects of ESMW on blood biochemical characteristics ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Group	TG/(mmol/L)	TC/(mmol/L)	NEFA/(mmol/L)	TNF- α /(pg/mL)
Control	0.719 \pm 0.044	2.499 \pm 0.113	0.751 \pm 0.027	219.2 \pm 13.86
Model	1.209 \pm 0.068 ^{##}	3.865 \pm 0.033 ^{##}	1.167 \pm 0.034 ^{##}	462.3 \pm 26.91 ^{##}
ESMW	0.755 \pm 0.051 ^{**}	3.299 \pm 0.113 ^{**}	0.696 \pm 0.036 ^{**}	364.4 \pm 22.83 [*]
MET	0.669 \pm 0.032 ^{**}	3.374 \pm 0.060 ^{**}	0.057 \pm 0.066 ^{**}	255.3 \pm 27.55 ^{**}

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$, ^{*} $P < 0.05$ vs model group

明 ESMW 能抑制游离脂肪酸诱导的肝脏脂质蓄积。在高脂饲喂动物中,模型组小鼠的肝脏重量显著增加(图 6-A),肝组织油红 O 染色及 TG 试剂盒结果(图 6-B, 6-E)显示,模型组小鼠肝组织内脂质蓄积严重,ESMW 给药后,动物肝组织的脂质含

量明显下降。肝组织 HE 染色结果(图 6-C)显示,高脂喂养后脂滴空泡增加增大,给药后空泡变少变小,这一结果进一步说明,ESMW 可以改善动物肝脏的脂代谢,减少肝脏脂质蓄积。

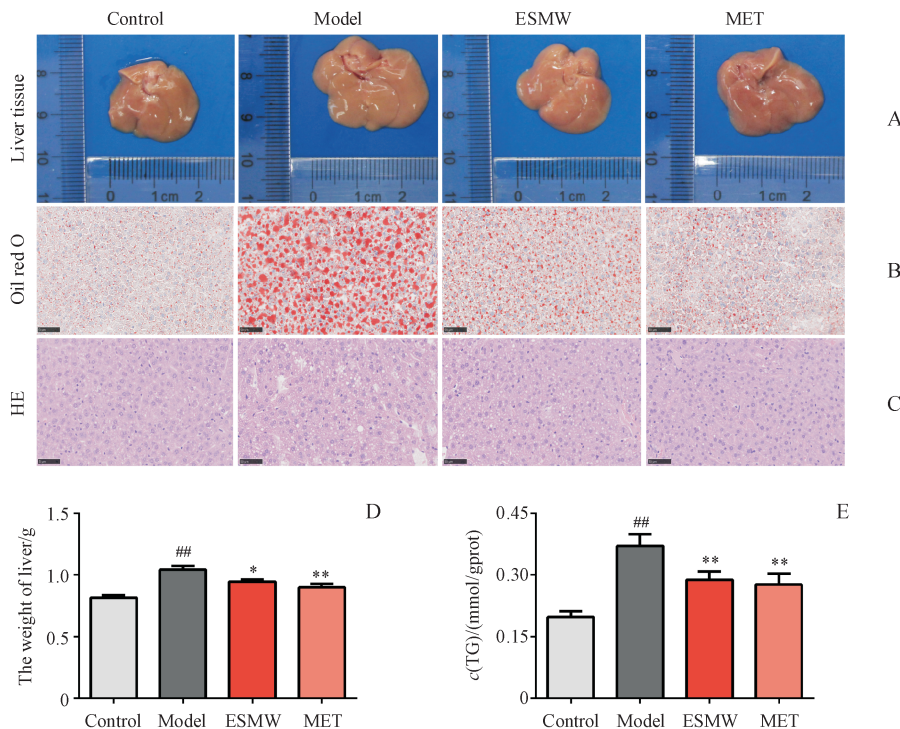


Figure 6 Effects of ESMW on lipid accumulation in liver of mice fed high fat diet ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

A: Liver tissues; B: Liver tissues after oil red O staining (400 \times); C: Liver tissues after HE staining (400 \times); D: Weight of liver; E: TG of liver tissues

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$, ^{*} $P < 0.05$ vs model group

3.8 ESMW 对高脂饲喂小鼠肝脏脂代谢相关基因 mRNA 表达的影响

脂质代谢包括脂质摄取、脂质合成、脂质转运、脂质的 β 氧化等多个环节。前面实验中本课题组发现 ESMW 能抑制游离脂肪酸诱导的脂质合成相关基因的表达,因此,在高脂饲喂小鼠体内,重点考察了 ESMW 对脂质合成相关基因(*Srebp-1*、*Acc*、*Fasn* mRNA)及脂质 β 氧化相关基因(*Ppara* α 、*Pgc-1* α 、*Cpt-1* α 、*Fabp-2* mRNA)的影响。QPCR 结果显示,模型组小鼠中脂质合成相关基因(*Srebp-1*、*Acc*、*Fasn* mRNA)的水平显著上调(图 7-A ~ 7-C),而脂质 β 氧化相关基因(*Ppara* α 、*Pgc-1* α 、*Cpt-1* α 、*Fabp-2* mRNA)水平显著降低(图 7-D ~ 7-G),表明高脂诱导了小鼠体内脂质代谢紊乱,小鼠体内脂质合成及脂质氧化异常。ESMW 显著抑制了

高脂诱导的脂质合成相关基因的上升,且促进了脂质氧化相关基因的表达,提示 ESMW 能改善高脂诱导的小鼠脂质代谢紊乱。

3.9 ESMW 对高脂饲喂小鼠肝脏中脂合成相关蛋白及 LKB1-AMPK-mTOR 信号的影响

Western blot 结果(图 8-A)显示,高脂诱导了小鼠肝脏中 SREBP-1 前体的大量表达,且成熟型的 SREBP-1 水平也显著增强。ESMW 不仅显著抑制了 SREBP-1 前体的表达,也抑制了它的成熟。高脂诱导了小鼠肝脏中 ACC 的大量表达,并使其磷酸化降低(图 8-B),表明高脂诱导了 ACC 活性的增加,肝脏中脂质合成增加。ESMW 降低了 ACC 的表达并促进了其磷酸化,表明 ESMW 能抑制 ACC 活化,进而改善脂质蓄积。

与体外实验结果一致,高脂抑制了小鼠肝脏

中 LKB1 的磷酸化(图 8-C),也使 AMPK 的磷酸化受到抑制(图 8-D),同时激活了 mTOR 信号(图 8-E)。ESMW 显著增强了 LKB1 和 AMPK 的磷酸化,

并抑制了 mTOR 信号,表明 ESMW 具有调节 LKB1-AMPK-mTOR 信号的作用。

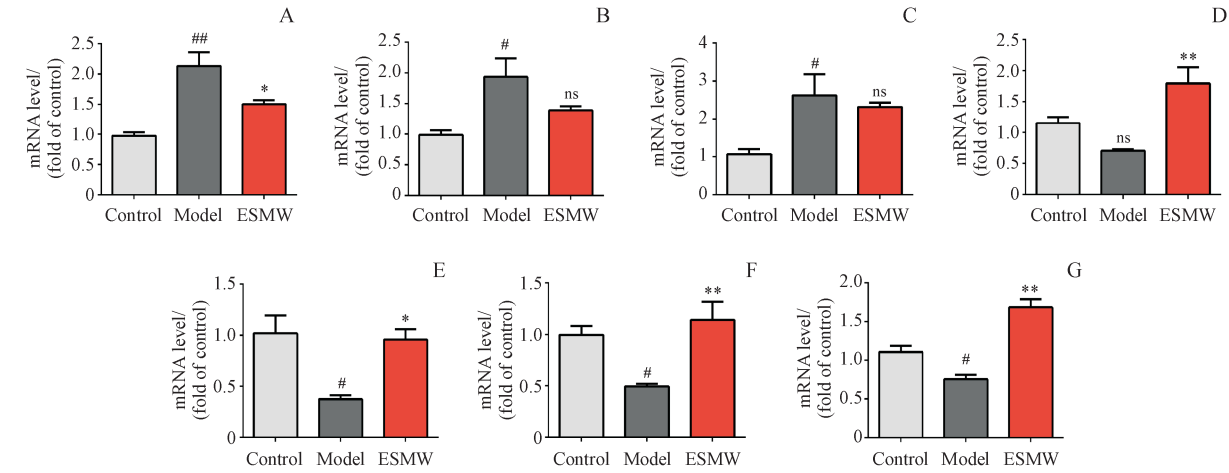


Figure 7 Effects of ESMW fraction on mRNA expression of lipid metabolism-related genes in liver of mice fed high fat diet ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
A:*Srebp-1*;B:*Acc*;C:*Fasn*;D:*Ppar α*;E:*Pgc-1α*;F:*Cpt-1α*;G:*Fabp-2*
##*P* < 0. 01, #*P* < 0. 05 vs control group; **P* < 0. 01, **P* < 0. 05 vs model group; ns means no significant difference

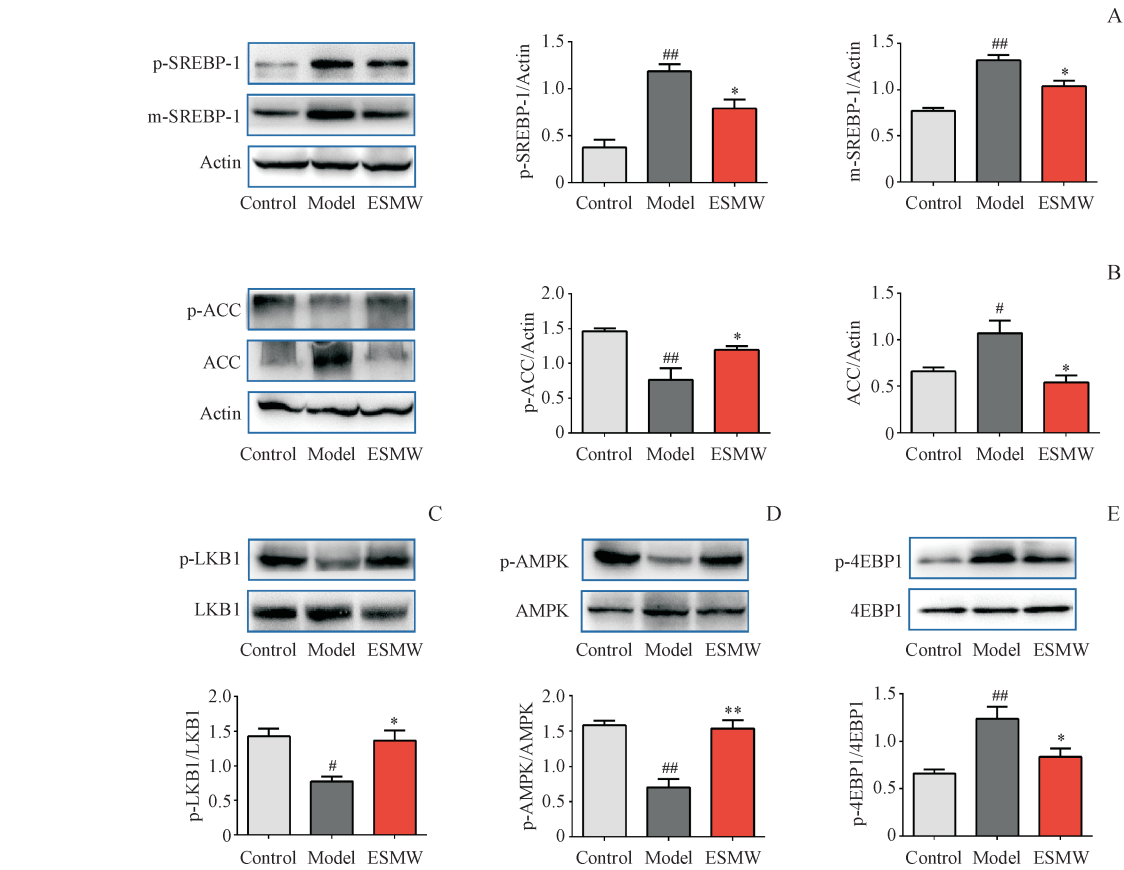


Figure 8 Effects of ESMW fraction on proteins expression of lipid metabolism-related genes and LKB1-AMPK-mTOR signaling pathway in liver of mice fed high fat diet ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
A:SREBP-1;B:ACC;C: LKB1;D:AMPK;E:4EBP1
#*P* < 0. 05, ##*P* < 0. 01 vs control group; **P* < 0. 05, ***P* < 0. 01 vs model group

4 讨论

本研究首先以游离脂肪酸诱导小鼠肝原代脂质蓄积细胞模型, TG试剂盒及BODIPY荧光染色结果表明ESMW可有效降低细胞内的脂质堆积。QPCR及Western blot结果表明, ESMW通过调节SREBP-1、ACC、FASN抑制游离脂肪酸诱导的脂质合成。在正常生理状态的肝原代细胞中, ESMW剂量依赖性激活AMPK; 且在脂质蓄积细胞模型中检测到ESMW磷酸化LKB1和AMPK, 抑制mTOR信号。

为了确认AMPK信号通路在ESMW调节脂代谢方面的作用, 以AMPK α siRNA敲减HepG2细胞的AMPK α , TG试剂盒、油红O染色实验结果表明AMPK α 敲减后, ESMW改善脂质蓄积的作用减弱; Western blot实验结果说明AMPK α 敲减后, ESMW对p-SREBP-1蛋白的抑制作用减弱, 进一步验证了ESMW至少部分是通过AMPK信号发挥脂代谢调节作用。

在高脂饮食诱导的糖脂代谢紊乱模型中, 口服葡萄糖耐量和丙酮酸耐量实验结果显示, ESMW可以显著改善高脂饮食动物的葡萄糖耐量和糖异生功能。血清生化指标结果显示, 糖脂代谢紊乱模型动物血清TG、TC、NEFA含量显著增加, 而ESMW给药后可显著改善这些生化指标的异常变化。另外, 血清中的炎症因子TNF- α 在ESMW给药后显著降低, 提示该部位还具有抗炎作用。

肝组织油红O染色、HE染色及TG试剂盒结果证实了ESMW能显著降低肝脏的脂质蓄积。同时, 在ESMW给药后, 小鼠肝脏中与脂质合成相关的SREBP-1、Acc、Fasn mRNA的表达水平降低; 且与脂肪酸氧化相关的Ppar α 、Pgc-1 α 、Cpt-1 α 、Fabp-2 mRNA的表达水平显著增加, 表明ESMW可以显著的降低脂质合成, 增加脂质氧化。Western blot实验结果显示, ESMW显著抑制了脂质合成关键蛋白SREBP-1/ACC的活化。同时与细胞实验结果一致, ESMW可调节LKB1-AMPK-mTOR的活性。

综上, 四妙丸提取物ESMW具有显著改善糖

脂代谢紊乱的作用, 其可通过激活AMPK、抑制脂质合成相关酶的表达, 抑制脂质合成, 进而抑制肝脏中的脂质蓄积。

References

- [1] Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2019, **15**(5): 288-298.
- [2] Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2018, **14**(2): 88-98.
- [3] Sanyal AJ. Past, present and future perspectives in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, **16**(6): 377-386.
- [4] Ota T. Molecular mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)/nonalcoholic steatohepatitis (NASH) [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2021, **1261**: 223-229.
- [5] Cetin EG, Demir N, Sen I. The relationship between insulin resistance and liver damage in non-alcoholic fatty liver patients [J]. *Sisli Etfal Hastan Tip Bul*, 2020, **54**(4): 411-415.
- [6] Wang CR, Xiang N. Discussion on the relation dysfunction of between liver, spleen and kidney and metabolic syndrome [J]. *World Chin Med* (世界中医药), 2013, **8**(12): 1412-1413.
- [7] Endocrinology and metabolism committee of integrated traditional chinese and western medicine physicians branch of chinesemedical doctor association. guidelines for the diagnosis and treatment of diabetes mellitus with hyperlipidemia [J]. *World Chin Med* (世界中医药), 2021, **16**(16): 2377-2385.
- [8] Hu H, Li LT, Liu YW, et al. Effect of modified simiaoan on inflammatory factors and neuropeptide substances of patients with synovitis of knee joint and damp-heat obstruction collateral syndrome [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2020, **26**(6): 97-102.
- [9] Zhao XB, Zhao YK, Li LY. Clinical study on the treatment of acute gouty arthritis by Simiao pills [J]. *J New Chin Med* (新中医), 2021, **53**(4): 58-60.
- [10] Chang WG, Li K, Guan FY, et al. Berberine pretreatment confers cardioprotection against ischemia-reperfusion injury in a rat model of type 2 diabetes [J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2016, **21**(5): 486-494.
- [11] Cai ZY, Wang CL, Lu TT, et al. Berberine alleviates amyloid-beta pathogenesis via activating LKB1/AMPK signaling in the brain of APP/PS1 transgenic mice [J]. *Curr Mol Med*, 2019, **19**(5): 342-348.