

· 基础研究 ·

化痰祛痰方调节 AMPK/SIRT1/PGC-1 α 信号通路抑制炎症小体活化改善 AS 小鼠肝脏脂质沉积的机制研究

陈怡然^{1, 2} 贾连群^{1, 2} 宋 因^{1, 2} 曹慧敏^{1, 2} 陈 丝^{1, 2}
于 宁^{1, 3} 吴 瑶^{1, 3} 王 杰^{1, 3} 李思佳^{1, 2}

摘要 **目的** 探讨化痰祛痰方调节腺苷酸活化蛋白激酶/沉默信息调节因子 1/过氧化酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α (AMPK/SIRT1/PGC-1 α) 信号通路调控炎症小体活化对动脉粥样硬化 ApoE^{-/-} 小鼠肝脏脂质沉积的影响及作用机制。**方法** 将 24 只 ApoE^{-/-} 小鼠按随机数字表法分为模型组、辛伐他汀组、化痰祛痰方组, 8 只 C57BL/6J 小鼠作为正常组对照。造模结束次日各组开始灌胃, 正常组和模型组采用等容积生理盐水, 辛伐他汀组采用辛伐他汀混悬液 2.275 mg/(kg·d), 化痰祛痰方组采用化痰祛痰方, 生药量为 20 g/(kg·d), 每日 1 次, 连续给药 8 周。采用全自动生化分析仪检测血清血脂水平; HE 染色和油红 O 染色观察肝脏组织病理和脂质沉积情况; Western Blot 法检测肝脏腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK)、磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶 (p-AMPK)、沉默信息调节因子 1 (SIRT1)、过氧化酶体增殖物受体 γ 共激活因子 1 α (PGC-1 α)、线粒体转录因子 A (Tfam)、含 pyrin 结构域 NOD 样受体家族 3 (NLRP3) 蛋白表达; 实时荧光定量 PCR 法检测肝脏线粒体 DNA (mtDNA) 水平; ELISA 法检测血清 IL-1 β 、IL-18 水平。**结果** 与正常组比较, 模型组甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (TC)、低密度脂蛋白总胆固醇 (LDL-C) 水平显著升高 ($P<0.01$); 肝脏细胞肿胀, 排列紊乱, 出现大量脂肪空泡, 脂质沉积明显; p-AMPK、SIRT1、PGC-1 α 、Tfam 蛋白表达降低, NLRP3 蛋白表达升高 ($P<0.05$); mtDNA 相对表达量减少 ($P<0.01$); IL-1 β 、IL-18 水平升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 辛伐他汀组和化痰祛痰方组 TG、TC、LDL-C 水平降低 ($P<0.01$); 肝细胞结构有所恢复, 少见脂肪空泡, 脂质沉积现象改善明显; 两组 p-AMPK、SIRT1、PGC-1 α 、Tfam 蛋白表达升高, NLRP3 蛋白表达减少 ($P<0.05, P<0.01$); mtDNA 相对表达量增加 ($P<0.01$); 两组血清 IL-1 β 、IL-18 水平降低 ($P<0.01$)。4 组血清高密度脂蛋白总胆固醇 (HDL-C) 水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。**结论** 化痰祛痰方可通过 AMPK/SIRT1/PGC-1 α 信号通路调节线粒体功能, 抑制炎症小体激活和炎症反应, 改善肝脏脂质沉积。

关键词 动脉粥样硬化; 脂质沉积; 化痰祛痰方; 腺苷酸活化蛋白激酶/沉默信息调节因子 1/过氧化酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α 信号通路; 炎症小体

Study on the Mechanism of Huayu Qutan Recipe Regulating AMPK/SIRT1/PGC-1 α Signaling Pathway, Inhibiting the Activation of Inflammasome, and Improving Hepatic Lipid Accumulation in Atherosclerotic Mice

CHEN Yi-ran^{1, 2}, JIA Lian-qun^{1, 2}, SONG Nan^{1, 2}, CAO Hui-min^{1, 2}, CHEN Si^{1, 2}, YU Ning^{1, 3}, WU Yao^{1, 3}, WANG Jie^{1, 3}, and LI Si-jia^{1, 2} 1 Key Laboratory of Ministry of Education for TCM Viscera-State Theory and Applications, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang (110847); 2 Center of Traditional Chinese Medicine Innovation Engineering Technology, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang (110847); 3 Graduate School, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang (110847)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No.82074145, No.81974548); 辽宁省“兴辽英才计划”项目 (No.XLYC1902100)

作者单位: 1. 辽宁中医药大学中医脉象理论及应用教育部重点实验室 (沈阳 110847); 2. 辽宁中医药大学医药创新工程技术中心 (沈阳 110847); 3. 辽宁中医药大学研究生学院 (沈阳 110847)

通讯作者: 贾连群, Tel: 024-31207020, E-mail: jilq-8@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20220607.148

ABSTRACT Objective To observe the effect and mechanism of Huayu Qutan Recipe (HYQTR) on hepatic lipid accumulation in atherosclerotic ApoE^{-/-} mice by regulating and controlling adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase/ silent information regulator1/ peroxisome proliferators-activated receptor γ coactivator-1 α (AMPK/SIRT1/PGC-1 α) signal pathway and inhibiting the activation of inflammasome. **Methods** Totally 24 ApoE^{-/-} mice were divided into Model group, Simvastatin group, and HYQTR group. Eight C57BL/6J mice were served as Normal group. After modeling, mice in Normal group and Model group were administered with normal saline by gastrogavage, Simvastatin group was treated with simvastatin suspension at the daily dose of 2.275 mg/k and HYQTR group was treated with HYQTR at the daily dose of 20 g crude drugs/kg, once per day. All administration lasted for 8 successive weeks. Serum lipid levels were detected by automatic biochemical analyzer. Liver histopathology and lipid deposition were observed by HE staining and oil red O staining. The protein expressions of adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase (AMPK), phospho-adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase (p-AMPK), silent information regulator1 (SIRT1), peroxisome proliferators-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α), mitochondrial transcription factor A (Tfam), and NOD-like receptors family pyrin domain containing 3 (NLRP3) were detected by Western Blot. Liver mitochondrial DNA (mtDNA) level was detected by Real-time fluorescent quantitative PCR. IL-1 β and IL-18 levels were detected by ELISA. **Results** Compared with Normal group, the levels of total triglyceride (TG), total cholesterol (TC), and low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) significantly increased in Model group ($P < 0.01$). The liver tissue cells were swollen and arranged disorderly, with the appearance of a large number of fat empty cells and obvious lipid deposition. The expressions of p-AMPK, SIRT1, PGC-1 α , and Tfam protein decreased, and the expression of NLRP3 protein increased ($P < 0.05$). The relative expression of mtDNA decreased ($P < 0.01$), and the levels of IL-1 β and IL-18 increased ($P < 0.01$). Compared with Model group, the levels of TG, TC, and LDL-C decreased in Simvastatin group and HYQTR group ($P < 0.01$). The structure of liver cells was restored, with fat vacuoles rarely seen and significantly improved lipid deposition. The expressions of p-AMPK, SIRT1, PGC-1 α , and Tfam protein increased, NLRP3 protein expression decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), mtDNA relative expression increased in Simvastatin group and HYQTR group ($P < 0.01$). Serum IL-1 β and IL-18 levels decreased in the two groups ($P < 0.01$). There was no significant difference in serum high density lipoprotein total cholesterol (HDL-C) level among the four groups ($P > 0.05$). **Conclusion** HYQTR regulated mitochondrial function, inhibited inflammasome activation and inflammatory reactions, and alleviating liver lipid accumulation through AMPK/SIRT1/PGC-1 α signaling pathway.

KEYWORDS atherosclerosis; lipid accumulation; Huayu Qutan Recipe; AMPK/SIRT1/PGC-1 α signaling pathway; inflammasome

目前我国心血管病死亡占国民总死亡病因的首位, 动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 主要累及大型和中型肌弹力型动脉, 是多种心血管疾病的共同病理基础^[1]。脂质代谢异常是 AS 的重要危险因素, 主要表现为血清中甘油三酯 (total triglyceride, TG)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白总胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 水平偏高和 (或) 高密度脂蛋白总胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 水平偏低。肝脏作为人体脂肪酸代谢的关键场所, 是脂质沉积的主要部位, 脂质代谢异常引发肝脏氧化应激和脂质过氧化物的发生, 同时驱动其炎症反应^[2, 3]。相关机制可能是肝脏脂质沉积通过腺苷酸活化蛋白激

酶 (adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, AMPK) / 沉默信息调节因子 1 (silent information regulator1, SIRT1) / 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α (peroxisome proliferators-activated receptor γ coactivator-1 α , PGC-1 α) 通路造成线粒体损伤, 导致线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 消失, 损伤线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 释放入胞质, 激活炎症小体, 促进肝脏炎症反应^[4-6]。AS 是一种公认的慢性炎症性疾病, 血管壁的炎症反应参与斑块形成贯穿 AS 的各个阶段, 抑制肝脏的炎症反应具有增强斑块稳定性和抵抗 AS 的作用^[7-9]。

化痰祛瘀方是课题组防治 AS 的专利方 (专利号:

ZL200710010845.9), 前期研究分别发现该方可抑制肝细胞焦亡和炎症反应, 改善脂质沉积现象^[9, 10], 但是二者之间的内在关联尚未明确。因此本研究选用 AS 经典模型动物 ApoE^{-/-} 小鼠作为研究对象, 以线粒体功能影响炎症小体的关键途径作为切入点, 探究化痰祛痰方能否通过调节线粒体功能抑制炎症反应改善肝脏脂质沉积, 为丰富 AS 的发病机制和防治靶点提供实验依据。

材料与方法

1 动物 雄性 ApoE^{-/-} 小鼠 24 只, 雄性 C57BL/6J 小鼠 8 只, 2 月龄, 体重为 (20 ± 2) g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号: SCXK(京) 2016-0006。饲养于长春维石检测技术服务有限公司 SPF 级动物中心, 饲养环境适宜。本实验通过长春维石检测技术服务有限公司伦理委员会审查 [No.SYXK(吉) 2019-0007], 实验过程中的所有处置均符合动物伦理委员会要求。

2 药物 化痰祛痰方药物组成与剂量: 党参 30 g 绞股蓝 30 g 黄芪 30 g 川芎 20 g 石菖蒲 20 g 茯苓 15 g 郁金 15 g 半夏 15 g 丹参 15 g, 中药饮片购于辽宁中医药大学附属医院, 按照中药煎煮流程制备中药水煎液, 浓缩至每毫升含生药量 1 g。辛伐他汀 (20 mg/片, 购于中国杭州默沙东制药有限公司, 批号: L036325)。

3 试剂与仪器 TC 试剂盒 (货号: CH0103152)、TG 试剂盒 (货号: CH0105151)、HDL-C 试剂盒 (货号: CH0105161)、LDL-C 试剂盒 (货号: CH0105162), 均购于四川迈新生物技术有限公司; 小鼠 IL-1 β ELISA 试剂盒 (货号: ML063132-J)、小鼠 IL-18 ELISA 试剂盒 (货号: ML063131-J), 均购于上海酶联生物科技有限公司; 苏木素伊红 (HE) 染色液试剂盒 (碧云天生物, 货号: C0105S); 油红 O 染色试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 货号: G1262); 兔单克隆抗体 AMPK α (货号: 5831)、兔单克隆抗体 Phospho-AMPK α (货号: 2535)、兔单克隆抗体 NLRP3 (货号: 15101) 均购于美国 Cell Signaling Technology 公司; 兔多克隆抗体 SIRT1 (北京博奥森生物技术有限公司, 货号: bs-0921R); 羊抗鼠 IgG (H+L) /HRP (货号: 31430)、羊抗兔 IgG (H+L) /HRP (货号: A16096) 均购于赛默飞世尔科技公司; 兔多克隆抗体 PPARGC1A (Cusabio, 货号: CSB-PA042134); 兔多克隆抗体 TFAM (博士德生物工程有限公司, 货号:

PB0413); 鼠单克隆抗体 β -actin (安诺伦生物科技有限公司, 货号: ABM40121); 血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒 (货号: DP304)、Super Real Premix (SYBR Green, 货号: FP205) 均购于天根生物科技有限公司。

Hitachi 全自动生化分析仪 (型号: 7180); Molecular Devices 全波长酶标仪 (型号: M2); Leica 组织包埋机 (型号: 1150)、石蜡切片机 (型号: RM2235)、烘片机 (型号: HI1220)、摊片机 (型号: HI1210)、荧光显微镜 (型号: BX51TRF); Thermo 冷冻切片机 (型号: NX50)、高速冷冻离心机 (型号: ST16R); Bio-Rad 电泳套装 (型号: 165-8033); Tanon 化学发光成像系统 (型号: 5200); Applied Biosystems 实时荧光定量 PCR 仪 (型号: 7500)。

4 动物分组及干预方法 适应性喂养 1 周后, 应用随机数字表法将 ApoE^{-/-} 小鼠分为模型组、辛伐他汀组、化痰祛痰方组, 每组 8 只; C57BL/6J 小鼠作为正常组对照。采用高脂饲料 12 周喂养 ApoE^{-/-} 小鼠制备 AS 模型^[8]。高脂饲料配方: 4 % 总胆固醇、0.3 % 胆酸盐、10 % 猪油、10 % 蛋黄粉和 61 % 基础饲料。C57BL/6J 小鼠基础饲料喂养。基础饲料配方: 18 % 粗蛋白、4 % 粗脂肪、1.25 % 胆碱、5 % 粗纤维、维生素、矿物质、氨基酸。喂养 12 周后, 根据标准体重动物剂量换算表换算^[11], 确定给药剂量, 其中辛伐他汀组和化痰祛痰方组小鼠的给药量分别为 2.275 mg/(kg · d) 及 20 g/(kg · d), 化痰祛痰方组给药剂量相当于临床成人用药剂量的 6 倍, 正常组和模型组等体积生理盐水灌胃保证组间一致性。

连续给药 8 周, 给药期间饲养方式同前。末次灌胃结束后, 禁食不禁水, 次日按 0.3 mL/100 g 剂量腹腔注射 4 % 水合氯醛麻醉, 采用摘眼球采血, 血浆室温静置 30 min 后, 4 °C, 3 000 r/min 离心 25 min, 取上清液用于血脂水平检测。然后断颈处死小鼠, 开放腹腔分离肝脏, 分别保存于 4 % 多聚甲醛中室温固定及 -80 °C 保存用于后续指标检测。

5 指标检测及方法

5.1 血清 TC、TG、HDL-C、LDL-C 水平 按照试剂盒使用说明于全自动生化分析仪中检测血脂水平。

5.2 肝脏组织病理学观察 将固定好的肝脏组织从多聚甲醛中取出, 乙醇梯度脱水二甲苯透明, 石蜡包埋, 切成厚度为 5 μ m 切片后置于载玻片, 脱蜡后分别用苏木精和伊红染液染色, 中性树胶封片, 显微镜下观察组织形态。

将冰冻的肝脏组织放置于冰冻切片机内包埋, 切

成厚度为 4 μ m 切片后置于载玻片, 0.5 % 油红 O 染液孵育 10 min, 异丙醇清洗, 苏木精染液复染 2 min, PBS 清洗后甘油明胶封片, 显微镜下观察组织脂质沉积情况。

5.3 肝脏组织 AMPK、p-AMPK、SIRT1、PGC-1 α 、线粒体转录因子 A (mitochondrial transcription factor A, Tfam)、含 pyrin 结构域 NOD 样受体家族 3 (NOD-like receptors family pyrin domain containing 3, NLRP3) 蛋白表达 采用 Western Blot 法检测。取各组肝脏组织 0.1g, 加入 1 mL 蛋白裂解液, 冰上充分研磨, 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清即为组织蛋白。使用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度, 100 $^{\circ}$ C, 5 min 蛋白变性, 并按照每孔 60 μ g 计算上样量。根据目的蛋白分子量分别配置 6 % 和 10 % 浓度的分离胶, 上样, 80 V, 15 min 浓缩胶电泳, 后转 120 V 分离胶电泳。结束后按照蛋白分子量分别选择湿转和半干转进行转膜, 参数为 110 V, 70 min。5 % 脱脂奶粉配置封闭液封闭 1 h, 一抗过夜、根据一抗选择羊抗鼠、羊抗兔二抗孵育 1 h。凝胶成像系统中曝光, 根据条带灰度值计算蛋白表达量。

5.4 肝脏组织 mtDNA 水平 采用实时荧光定量 PCR 法检测。取各组肝脏组织 30 mg, 使用离心柱型 DNA 提取试剂盒提取组织 DNA。因 ND1 的基因片段为 mtDNA 的高保守序列^[12], 因此选择 ND1 水平作为 mtDNA 拷贝数的表达量, 以 GAPDH 基因作为内参基因。ND1 的引物序列为正向: CACCCCCTTATCAACCTCAA, 反向: ATTTGTTTCTGCGAGGGTTG; 引物长度: 20 bp; GAPDH 的引物序列为正向: GTGTTTCCTCGTCCCGTAGA, 反向: CCTTGACTGTGCCGTTGAAT。引物长度: 20 bp; 向 1.5 mL EP 管内加入 2 μ L 的 DNA 模板和 23 μ L PCR 反应体系, 混匀, 入 PCR 反应仪。反应条件: 95 $^{\circ}$ C, 2 min。95 $^{\circ}$ C, 30 s, 60 $^{\circ}$ C, 30 s, 72 $^{\circ}$ C, 1 min。循环 40 次。采用“标准曲线法”计算 ND1 基因相对表达量, 用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 形式表示^[13]。

5.5 血清 IL-1 β 、IL-18 水平 采用 ELISA 法检测。按照试剂盒说明书进行标准品制备, 分别设空白孔、标准品孔、待测样品孔依次上样, 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h。弃液, 加洗涤液洗涤, 加显色液混匀, 37 $^{\circ}$ C 避光 15 min, 加终止液终止反应。酶标仪波长 450 nm 上机测定, 读取 OD 值。绘制标准曲线, 计算样品浓度。

6 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析处理。所有的计量资料均满足正态分布, 数据

采用 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, 所有数值均为多组间比较, 根据是否具有方差齐性, 若方差齐采用单因素方差分析, 并选择 LSD 法进行两两比较; 若方差不齐, 采用 Welch 检验并选择 Dunnett's T3 法进行两两比较。P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

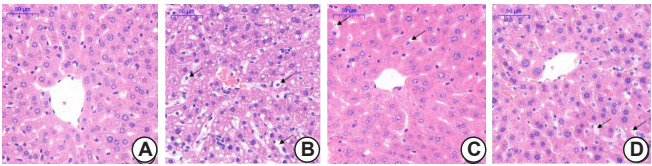
1 各组小鼠血清 TC、TG、HDL-C、LDL-C 水平比较 (表 1) 模型组 TG、TC、LDL-C 水平较正常组显著升高 (P<0.01)。辛伐他汀组和化痰祛痰方组 TG、TC、LDL-C 水平较模型组显著降低 (P<0.01)。

表 1 各组小鼠血清 TG、TC、HDL-C、LDL-C

水平比较 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)					
组别	n	TG	TC	HDL-C	LDL-C
正常	8	0.35 $\pm$ 0.03	13.79 $\pm$ 0.78	2.80 $\pm$ 0.25	3.48 $\pm$ 0.35
模型	8	0.90 $\pm$ 0.65*	36.45 $\pm$ 1.00*	2.54 $\pm$ 0.77	13.48 $\pm$ 1.18*
辛伐他汀	8	0.42 $\pm$ 0.29 $^{\Delta}$	16.50 $\pm$ 0.97 $^{\Delta}$	2.31 $\pm$ 0.21	5.51 $\pm$ 0.31 $^{\Delta}$
化痰祛痰方	8	0.45 $\pm$ 0.40 $^{\Delta}$	20.26 $\pm$ 0.81 $^{\Delta}$	2.47 $\pm$ 0.31	6.80 $\pm$ 0.56 $^{\Delta}$

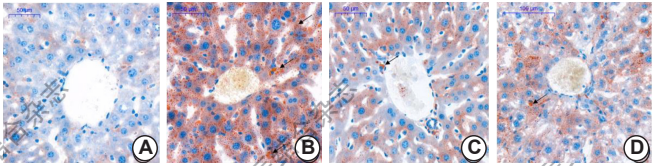
注: 与正常组比较, *P<0.01; 与模型组比较, $^{\Delta}$ P<0.01

2 各组小鼠肝细胞 HE 染色和油红 O 染色结果观察 (图 1、2) 正常组肝细胞结构正常, 排列均匀, 肝索分布致密; 模型组可见细胞肿胀, 排列紊乱, 肝索分布杂乱, 胞内出现大量的脂肪空泡; 辛伐他汀组细胞结构有所恢复, 但仍存在肿胀现象, 肝索较模型组致密, 几乎未见脂肪空泡; 化痰祛痰方组肝细胞结构恢复优于辛伐他汀组, 细胞结构正常, 肿胀消失, 但仍存在少量肝索分布杂乱和胞内脂肪空泡现象, 见图 1。橘红色为脂滴, 正常组肝细胞内几乎未见脂滴, 不存在脂质沉积; 模型组胞浆内和胞浆外弥散大量脂滴, 脂质沉积明显; 辛伐他汀组和化痰祛痰方细胞内



注: A 为正常组; B 为模型组; C 为辛伐他汀组; D 为化痰祛痰方组; 箭头所指为脂肪空泡

图 1 各组小鼠肝脏组织病理形态学观察 (HE, $\times 200$)

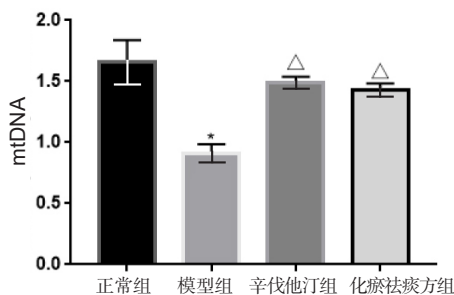


注: A 为正常组; B 为模型组; C 为辛伐他汀组; D 为化痰祛痰方组; 箭头所指为脂滴

图 2 各组小鼠肝脏组织脂质沉积情况观察 (油红 O, $\times 200$)

脂滴显著减少,可见药物干预后脂质沉积现象改善明显,两组间未见显著差异,见图 2。

3 各组小鼠肝脏 mtDNA 水平比较(图 3) 与正常组比较,模型组 mtDNA 相对表达量减少 ($P<0.01$);与模型组比较,辛伐他汀组和化痰祛痰方组 mtDNA 相对表达量增加 ($P<0.01$)。



注:与正常组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,Δ $P<0.01$;n 为 8

图 3 各组小鼠肝脏 mtDNA 相对表达量比较

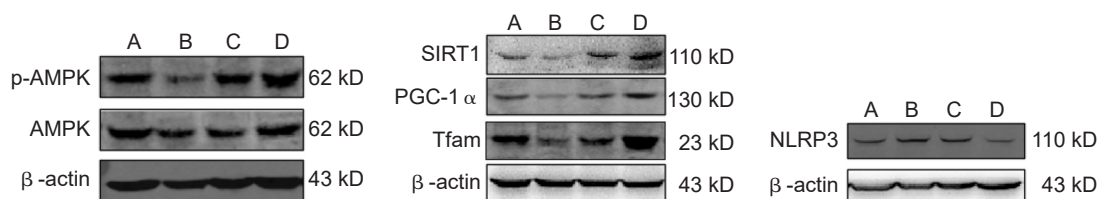
4 各组小鼠血清 IL-1 β 、IL-18 水平比较(表 2) 与正常组比较,模型组血清中 IL-1 β 、IL-18 水平显著升高 ($P<0.01$);与模型组比较,辛伐他汀组和化痰祛痰方组血清 IL-1 β 、IL-18 水平显著降低 ($P<0.01$)。

表 2 各组小鼠血清 IL-1 β 、IL-18 水平比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-1 β	IL-18
正常	8	234.90 $\pm$ 13.52	151.78 $\pm$ 11.17
模型	8	347.81 $\pm$ 5.82*	332.30 $\pm$ 20.45*
辛伐他汀	8	234.19 $\pm$ 6.53 Δ	172.94 $\pm$ 11.07 Δ
化痰祛痰方	8	272.74 $\pm$ 20.30 Δ	249.22 $\pm$ 43.30 Δ

注:与正常组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,Δ $P<0.01$

5 各组小鼠肝脏 AMPK、p-AMPK、SIRT1、PGC-1 α 、Tfam、NLRP3 蛋白表达比较(图 4,表 3)



注: A 为正常组; B 为模型组; C 为辛伐他汀组; D 为化痰祛痰方组

图 4 各组小鼠肝脏 AMPK、p-AMPK、SIRT1、PGC-1 α 、Tfam、NLRP3 蛋白表达电泳图

表 3 各组小鼠肝脏 p-AMPK/AMPK、SIRT1、PGC-1 α 、Tfam、NLRP3 蛋白相对灰度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	p-AMPK/AMPK	SIRT1	PGC-1 α	Tfam	NLRP3
正常	3	1.037 $\pm$ 0.067	0.848 $\pm$ 0.143	1.229 $\pm$ 0.131	1.229 $\pm$ 0.131	1.580 $\pm$ 0.105
模型	3	0.780 $\pm$ 0.113*	0.647 $\pm$ 0.068*	0.789 $\pm$ 0.102**	0.591 $\pm$ 0.124*	1.997 $\pm$ 0.151*
辛伐他汀	3	1.273 $\pm$ 0.101 Δ	1.063 $\pm$ 0.140 Δ	1.120 $\pm$ 0.110 Δ	0.891 $\pm$ 0.132 Δ	1.577 $\pm$ 0.127 Δ
化痰祛痰方	3	1.197 $\pm$ 0.078 Δ	1.693 $\pm$ 0.182 $\Delta\Delta$	1.280 $\pm$ 0.095 $\Delta\Delta$	1.686 $\pm$ 0.243 $\Delta\Delta$	1.460 $\pm$ 0.111 Δ

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$

p-AMPK 蛋白模型组表达低于正常组 ($P<0.05$);辛伐他汀组和化痰祛痰方组表达高于模型组 ($P<0.01$)。与正常组比较,模型组 SIRT1、PGC-1 α 、Tfam 蛋白表达减少 ($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,辛伐他汀组和化痰祛痰方组 SIRT1、PGC-1 α 、Tfam 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。与正常组比较,模型组 NLRP3 蛋白表达显著升高 ($P<0.05$);与模型组比较,辛伐他汀组和化痰祛痰方组表达显著减少 ($P<0.05$)。

讨 论

根据发病特点可将 AS 同“胸痹”病机相关联,课题组认为该病以膏脂运化失常为病理基础,其主要病理因素是痰浊和瘀血壅滞。《黄帝内经》对于“膏脂”的定义具有明确的记载,认为膏脂属于人体正常津液的组成部分,现代医学中“血脂”的描述与之接近。膏脂来源于水谷精微,由脾所运化,并依赖脾之散精功能布散周身,脾主运化与脾气散精功能正常是膏脂正常运化的前提^[14]。若脾气虚弱,失于健运,水谷精微聚生痰浊,痰浊日久化瘀,痰瘀互结,痹阻脉道,则导致 AS。AS 以脾失健运,痰瘀互结为关键病机,化痰祛痰方中党参、绞股蓝、黄芪益气健脾,川芎、石菖蒲、茯苓、半夏行气化痰,郁金、丹参活血化瘀,合用共奏益气健脾、祛痰化瘀之功。现代药理学研究发现该方中多味中药的有效成分对于预防和治疗 AS 具有积极作用,主要通过影响脂质沉积抑制动脉内膜斑块形成而实现。如茯苓多糖可有效抑制血管平滑肌中泡沫细胞的形成^[15],黄芪甲苷和丹参酮 II A 能够分别通过 AMPK 和 LXR α /SREBP1 通路抑制脂肪生成^[16, 17],而绞股蓝皂苷可通过干扰线粒体

凋亡抑制肝脏脂质沉积^[18]。课题组前期研究证实该方同样具有改善脂质代谢异常防治 AS 的作用,可能是通过调节细胞铁死亡、自噬等途径实现^[19, 20]。

线粒体是细胞中脂肪酸氧化的主要场所,游离脂肪酸在包括脂酰辅酶 A 合成酶等一系列酶的作用下,分解为乙酰辅酶 A,最终经三羧酸循环和酮体生成途径代谢^[21]。当高脂饮食导致机体及肝脏总胆固醇大量堆积时,线粒体脂肪酸氧化率大幅度增高,产生过量的活性氧 (reactive oxygen species, ROS),损伤线粒体正常功能,加重细胞总胆固醇堆积,最终引发氧化损伤^[5, 22]。研究发现棕榈酸可通过抑制 AMPK 活性,影响细胞自噬途径,使机体清除损伤线粒体的功能出现障碍,导致损伤线粒体堆积并产生大量线粒体活性氧 (mitochondrial reactive oxygen species, mtROS),进一步促进 NLRP3 炎症小体活化和 IL-1 β 释放^[23]。此外,棕榈酸能够改变肝脏巨噬细胞的 MMP,破坏 mtDNA,使损伤的 mtDNA 向细胞质释放,激活 NLRP3 炎症小体,促进肝脏炎性反应^[6]。

AMPK 在细胞能量稳态调节中发挥关键调节作用,是细胞的能量感受器,同时还参与脂肪酸氧化分解和能量代谢^[24, 25]。AMPK 对于线粒体参与脂肪酸等合成三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 的生物分解过程具有正向调控作用,通过促进下游 SIRT1 的乙酰化可提高 PGC-1 α 的转录活性,直接调节线粒体的数量和生物活性^[4]。SIRT1 和 PGC-1 α 分别是能量代谢的上下游关键调控因子,因此 AMPK/SIRT1/PGC-1 α 信号通路是调控线粒体能量代谢的重要途径。本研究结果发现模型组中 p-AMPK、SIRT1 和 PGC-1 α 蛋白表达减少,化痰祛痰方组中三者表达升高,结合血脂水平和肝脏组织病理形态学及脂质沉积情况观察,发现 AS 小鼠肝脏中存在脂质分解和线粒体能量代谢障碍,化痰祛痰方可通过该通路进行调节。Tfam 具有保护 mtDNA 和启动 mtDNA 转录的双重功能,是调控线粒体生物发生的核心因子,敲低 Tfam 会直接抑制 mtDNA 拷贝数,从而影响机体早期发育^[26, 27]。本研究中 Tfam 蛋白和 mtDNA 相对表达量的结果进一步说明了肝脏总胆固醇堆积可通过抑制 mtDNA 转录影响线粒体的数量和生理功能。细胞焦亡,又称细胞炎性坏死,其主要特征是细胞膜破裂导致胞质内容物的释放从而激活炎性反应^[28]。在其经典激活途径中, NLRP3 作为模式识别受体,能够依次招募凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein, ASC)、

半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶 -1 前体 (pro-cysteiny aspartate-specific protease-1, pro-caspase-1), 并切割效应底物白细胞介素 -1 β 前体 (pro-interleukin-1 β , pro-IL-1 β)、白细胞介素 -18 前体 (pro-interleukin-18, pro-IL-18), 使活化的炎症因子从细胞膜孔隙处释放^[29]。本研究分别对肝脏组织 NLRP3 炎症小体和血清中炎症因子 IL-1 β 、IL-18 进行了检测,结果发现模型组炎症小体激活后造成炎症因子的释放引发炎症反应,化痰祛痰方能够通过上述途径抑制炎症反应。

综上所述,笔者认为 AS 小鼠存在肝脏脂质沉积,可破坏线粒体功能和减少完整 mtDNA 拷贝数,激活炎症小体,促进机体炎性反应。化痰祛痰方可通过 AMPK/SIRT1/PGC-1 α 信号通路调节线粒体功能,影响其能量代谢和生物发生,减少 mtDNA 损伤,抑制炎症小体激活和炎性反应,改善肝脏脂质沉积。

利益冲突: 无。

参 考 文 献

- [1] 胡盛寿, 高润霖, 刘力生, 等.《中国心血管病报告 2018》概要[J]. 中国循环杂志, 2019, 34 (3): 209-220.
- [2] 葛均波, 徐永健, 王辰主编. 内科学[M]. 第 9 版. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 213-215.
- [3] Dong BN, Zhou Y, Wang W, et al. Vitamin D receptor activation in liver macrophages ameliorates hepatic inflammation, steatosis, and insulin resistance in mice[J]. Hepatology, 2020, 71 (5): 1559-1574.
- [4] Liao ZZ, Zhang JY, Wang JY, et al. The anti-nephritic activity of a polysaccharide from okra *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench via modulation of AMPK-Sirt1-PGC-1 α signaling axis mediated anti-oxidative in type 2 diabetes model mice[J]. Int J Biol Macromol, 2019, 140: 568-576.
- [5] 刘明, 邱彬, 王婷婷, 等. FKBP51 参与高脂诱导的线粒体损伤[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28 (4): 1-6.
- [6] Pan J, Ou Z, Cai C, et al. Fatty acid activates NLRP3 inflammasomes in mouse Kupffer cells through mitochondrial DNA release[J]. Cell Immunol, 2018, 332: 111-120.
- [7] 刘俊田. 动脉粥样硬化发病的炎症机制的研究进展[J]. 西安交通大学学报 (医学版), 2015, 36 (2): 141-152.
- [8] Courtney LM, Gregory HN, Christina J, et al. Long-

- term supplementation of black elderberries promotes hyperlipidemia, but reduces liver inflammation and improves HDL function and atherosclerotic plaque stability in apolipoprotein E-knockout mice[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2018, 62 (23): e1800404.
- [9] 冷雪, 吴瑶, 王莹, 等. 动脉粥样硬化小鼠肝脏脂质代谢相关的 PPAR- γ /LXR- α /ABCG1 通路及炎症因子的变化和化痰祛痰方在其中的作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2020, 36 (4): 637-643.
- [10] 陈宁, 贾连群, 宋因, 等. 化痰祛痰方对动脉粥样硬化家兔肝脏脂质沉积的影响[J]. *中医杂志*, 2019, 60 (20): 50-55.
- [11] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004 (9): 1069-1072.
- [12] 刘军舰, 李忠廉, 尚海涛. 茵陈蒿汤调节胆汁酸代谢并干预阻塞性黄疸大鼠肝细胞线粒体 DNA 损伤的研究[J]. *天津医药*, 2020, 48 (9): 839-842.
- [13] Reynolds CM, Suliman HB, Hollingsworth JW, et al. Nitric oxide synthase-2 induction optimizes cardiac mitochondrial biogenesis after endotoxemia[J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 46 (5): 564-572.
- [14] 贾连群, 宋因, 张妮, 等. 基于“脾主运化”理论探讨肠道微生物稳态与膏脂转输的关系[J]. *中医杂志*, 2017, 58 (18): 1554-1557.
- [15] Zhao JM, Niu XY, Yu JJ, et al. Poria cocos polysaccharides attenuated ox-LDL-induced inflammation and oxidative stress via ERK activated Nrf2/HO-1 signaling pathway and inhibited foam cell formation in VSMCs[J]. *Internat Immunopharmacol*, 2020, 80 : 106173.
- [16] Zhou B, Zhou DL, Wei XH, et al. Astragaloside IV attenuates free fatty acid-induced ER stress and lipid accumulation in hepatocytes via AMPK activation[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2017, 38 (7): 998-1008.
- [17] Gao WY, Chen PY, Hao-Jen Hsu, et al. Tanshinone II A down-regulates lipogenic gene expression and attenuates lipid accumulation through the modulation of LXR α /SREBP1 pathway in HepG2 cells[J]. *Biomedicines*, 2021, 9 (3): 326.
- [18] 宋因, 曹慧敏, 陈丝, 等. 绞股蓝皂苷调控长链非编码 RNA TUG1/miR-26a 干扰线粒体凋亡对 ApoE^{-/-}AS 小鼠肝脏脂质沉积的影响及机制研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2021, 33 (7): 1178-1185.
- [19] 吴瑶, 宋因, 贾连群, 等. 化痰祛痰方对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠肝脏脂质过氧化及 p53、GPX4、xCT 表达的影响[J]. *中医杂志*, 2020, 61 (18): 1633-1638.
- [20] 满艺璐, 杨灿, 王雪婷, 等. 化痰祛痰方通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路调控自噬改善动脉粥样硬化家兔肝脏脂质损伤[J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37 (8): 1913-1916, 2058.
- [21] 刘丽, 张学红, 陆彪, 等. 线粒体脂肪酸 β -氧化障碍的研究新进展[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2014, 22 (5): 4-7.
- [22] Fischer F, Hamann A, Osiewacz HD. Mitochondrial quality control: an integrated network of pathways[J]. *Trends Biochem Sci*, 2012, 37 (7): 284-292.
- [23] Wen H, Gris D, Lei Y, et al. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling[J]. *Nat Immunol*, 2011, 12 (5): 408-415.
- [24] Hardie DG. AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function[J]. *Genes Dev*, 2011, 25 (18): 1895-1908.
- [25] Deleze Y, Cotte AK, Hannou SA, et al. CDKN2A/p16INK4a suppresses hepatic fatty acid oxidation through the AMPK α 2-SIRT1-PPAR α signaling pathway[J]. *J Biol Chem*, 2020, 295 (50): 17310-17322.
- [26] Watanabe A, Arai M, Koitabashi N, et al. Mitochondrial transcription factors TFAM and TFB2M regulate Serca2 gene transcription[J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 90 (1): 57-67.
- [27] Otten Auke BC, Kamps R, Lindsey P, et al. Tfam knockdown results in reduction of mtDNA copy number, OXPHOS deficiency and abnormalities in zebrafish embryos[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 381.
- [28] Zhang Y, Chen X, Gueydan C, et al. Plasma membrane changes during programmed cell deaths[J]. *Cell Res*, 2018, 28 (1): 9-21.
- [29] McKee CM, Coll RC. NLRP3 inflammasome priming: A riddle wrapped in a mystery inside an enigma[J]. *J Leukoc Biol*, 2020, 108 (3): 937-952.

(收稿: 2021-01-29 在线: 2022-06-28)

责任编辑: 段碧芳

英文责编: 张晶晶