

· 基础研究 ·

绞股蓝皂苷抑制 Bcl2L12 凋亡通路改善 ApoE^{-/-} 动脉粥样硬化小鼠肝脏脂质沉积赵卓¹ 高浩¹ 杨莹¹ 王莹² 王群² 裴宇鹏³ 宋囡⁴ 韩晓伟⁵

摘要 **目的** 探讨绞股蓝皂苷 (GPs) 通过 Bcl2L12 介导的凋亡通路防治动脉粥样硬化 (AS) 的作用机制。**方法** 将 ApoE^{-/-} 小鼠随机分为模型组和 GPs 组 (高脂喂养 12 周), C57BL/6J 小鼠为正常组, 每组各 8 只。GPs 组灌胃 GPs 2.973 g/kg 4 周。全自动生化分析仪检测血清血脂水平; HE 染色及油红 O 染色观察肝脏病理改变及肝脏脂质沉积情况; q-RT PCR、Western Blot 法及免疫组化染色检测 Bcl2L12-Caspase-7/3 通路相关基因及蛋白表达情况。**结果** 与正常组比较, 小鼠血清中 TG、TC、LDL-C 水平升高, HDL-C 水平降低 ($P < 0.01$); 肝脏组织出现病理改变及脂质沉积现象; 凋亡蛋白酶活化因子 (Apaf-1)、细胞色素 C (CytC)、胱天蛋白酶 (Caspase)-9、Caspase-7、Caspase-3 mRNA 水平升高, Bcl2 样蛋白 12 (Bcl2L12) mRNA 水平降低 ($P < 0.01$); Apaf-1、Cyt C、Cleaved-Caspase-9、Cleaved-Caspase-7、Cleaved-Caspase-3 蛋白水平升高, Bcl2L12 蛋白水平降低 ($P < 0.01$); Caspase-3 在肝脏组织表达升高, Bcl2L12 在肝脏组织表达降低。与模型组比较, GPs 组小鼠血清中血脂、肝脏病理改变及脂质沉积现象缓解, Bcl2L12 基因及蛋白水平升高, CytC、Caspase-9、Caspase-7、Caspase-3 基因及蛋白水平降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。**结论** GPs 可通过抑制 Bcl2L12 凋亡通路改善 ApoE^{-/-} AS 小鼠肝脏脂质沉积。

关键词 绞股蓝皂苷; 动脉粥样硬化; 细胞凋亡; Bcl2 样蛋白 12; 中药

Gyenosides Improve Liver Lipid Deposition in ApoE^{-/-} AS Mice by Inhibiting the Bcl2L12 Apoptosis Pathway ZHAO Zhuo¹, GAO Hao¹, YANG Ying¹, WANG Ying², WANG Qun², PEI Yu-peng³, SONG Nan⁴, and HAN Xiao-wei⁵ 1 Graduate School, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang (110847); 2 Engineering Technology Center of Traditional Chinese Medicine Innovation, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang (110847); 3 Liaoning Academy of Chinese Medical Sciences, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang (110847); 4 College of Medical Laboratory, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang (110847); 5 Department of Immunology and Pathogenic Biology, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang (110847)

ABSTRACT Objective To explore the mechanism of gyenosides (GPs) preventing and treating atherosclerosis (AS) through Bcl2L12-mediated apoptosis pathway. **Methods** ApoE^{-/-} mice were selected as randomly divided into model group and GPs group (high-fat feeding for 12 weeks), and C57BL/6J mice were the normal group, with 8 mice in each group. In GPs group, GPs (2.973 g · kg⁻¹) was given intragastrically for 4 weeks. Serum lipid levels were observed by automatic biochemical analyzer. Pathological changes and lipid deposition of liver tissue were observed by HE staining and oil red O staining. The expression of genes and proteins related to Bcl2L12-Caspase-7/3 pathway were detected by q-RT PCR, Western Blot and immunohistochemical staining. **Results** Compared with the normal group, the serum levels of TG, TC and

基金项目: 辽宁省自然科学基金资助项目 (No.2019-ZD-0966); 辽宁省“百千万人才工程”资助项目 (No.2021921104)

作者单位: 1. 辽宁中医药大学研究生学院 (沈阳 110847); 2. 辽宁中医药大学中药创新工程技术中心 (沈阳 110847); 3. 辽宁中医药大学辽宁省中医药科学院 (沈阳 110847); 4. 辽宁中医药大学医学检验学院 (沈阳 110847); 5. 辽宁中医药大学免疫学与病原生物学教研室 (沈阳 110847)

通讯作者: 宋 囡, Tel: 024-31203844, E-mail: cpcool@126.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20230317.007

LDL-C were increased, and the levels of HDL-C were reduced in model group ($P < 0.01$), pathological changes and lipid deposition were in the liver, the levels of apoptotic protease activating factor (Apaf-1), cytochrome C (CytC), Caspase-9, Caspase-7 and Caspase-3 mRNA were significantly increased, while the mRNA level of Bcl2-like protein 12 (Bcl2L12) were decreased ($P < 0.01$), the protein levels of Apaf-1, Cyt C, Cleaved-Caspase-9, Cleaved-Caspase-7 and Cleaved-Caspase-3 were increased, while the level of Bcl2L12 protein were decreased ($P < 0.01$). The expression of Caspase-3 in liver tissues was elevated and the expression of Bcl2L12 in liver tissues was reduced. Compared with the model group, the serum lipids, pathological liver changes and liver lipid deposition were relieved in GPs group, and the mRNA and the protein expression of Bcl2L12 increased while CytC, Caspase-9, Caspase-7, and Caspase-3 decreased ($P < 0.01$, $P < 0.05$). **Conclusion** GPs can inhibit lipid deposition in the liver of ApoE^{-/-} AS mice, and its mechanism may be related to Bcl2L12-mediated apoptosis.

KEYWORDS gypenosides; atherosclerosis; apoptosis; Bcl2-like protein 12; Chinese herbal medicine

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是心血管病的主要病理学基础, 是动脉管壁内膜的一种慢性炎症性疾病, 血脂异常、血管壁产生粥样斑块为其主要特征^[1,2]。据《中国心血管健康与疾病报告 2021》统计, 推算我国心血管病现患人数 3.3 亿, 患病率与病死率持续上升, 且病死率居城乡居民总死亡原因首位^[3]。近期发现, 肝脏的脂质沉积及对代谢性相关疾病的影响均与 AS 发病密切相关, 肝脏作为脂代谢的重要器官, 其脂质沉积水平直接或间接反映动脉内膜脂质沉积情况, 可作为预测 AS 水平的指标^[4], 缓解肝脏脂质沉积及血脂异常情况能有效预防 AS 发生发展。制定有效预防策略, 开发和测试新的治疗方法以防治 AS, 提高人类生活质量仍是目前医学界亟待解决的重点课题。中医药作为我国传统医学有着“多成分、多靶点”的作用特点, 在心血管疾病的防治方面具有独特效果, 显示出巨大的优势与开发应用前景^[5,6]。AS 归属于中医学“胸痹”“真心痛”“痰饮”等范畴, 多为脾运化功能失调致水湿内停, 聚湿成痰, 痰阻气滞, 气滞血瘀, 痰瘀互结, 阻塞脉络^[7]。可见, 中医学之“痰”与该病有着重要联系, 体现了肝脏脂质沉积过程, 也是对中医病机的部分诠释。绞股蓝 (*Gynostemma pentaphyllum*), 又名七叶胆、五叶参等, 是葫芦科绞股蓝属的多年生草质藤本植物。据《本草纲目》记载, 绞股蓝有清热解毒、益气健脾、生津止渴和化浊降脂等之效,《中药大辞典》中称其为“五叶参”“超人参”^[8,9], 现已被开发为中成药可治疗如高脂血症、高血糖、非酒精性脂肪肝等各类疾病, 在中医学中得到广泛应用^[10,11], 其富含含有皂苷、多糖、黄酮等多种活性成分, 目前绞股蓝主要活性成分绞股蓝皂苷 (gypenosides, GPs) 已应用于非酒精性脂肪肝、糖尿病等疾病的治疗, 一系列药理试验亦发现, GPs 还具有抗癌、心脏保护、肝脏保护、抗糖尿病和抗炎等药物活性, 是治疗血脂代谢异常、AS 等疾病的潜在药物^[12,13]。

近年来研究发现, GPs 可以通过影响 Bcl2 诱发细胞凋亡经典途径及相关信号通路干预 ApoE^{-/-} 小鼠 AS 形成^[14]。然而目前发现 Bcl2 样蛋白 12 (Bcl2 like protein 12, Bcl2L12) 虽与典型的 Bcl-2 蛋白均属于 Bcl-2 家族蛋白, 但与原型 Bcl-2 家族成员不同, 由于其对细胞死亡信号的独特影响, Bcl2L12 表型具有高级别影响凋亡倾向^[15,16]。基于此, 本文重点以 Bcl2L12 介导的细胞凋亡为切入点, 深入探讨 GPs 通过影响肝脏脂质沉积进而防治 AS 的分子机制。为绞股蓝防治心血管疾病方向的基础研究及后续应用提供新思路。

材料与方法

1 动物 选择 16 只健康 ApoE^{-/-} 小鼠, 8 只 C57BL/6J 小鼠, 雄性, SPF 级, 体质量 (20 ± 2) g, 6 周龄, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 许可证号: SCXK (京) 2016 - 0006。饲养于辽宁中医药大学实验动物中心, 环境温度为 (22 ± 1) °C, 湿度 (50 ± 5) %, 自然光照, 自由摄食饮水, 本实验方案经辽宁中医药大学实验动物伦理委员会审核批准 (No.21000042019090)。

2 药物 GPs, 西安天丰生物科技有限公司 (批号: NF-201910), 提取来源为绞股蓝, 纯度 98%, 规格 UV98%。

3 主要试剂及仪器 cDNA 反转录试剂盒 (批号: W0008), 北京天根生化科技有限公司; q-RT PCR 试剂盒 (批号: 962103H27W36), 武汉爱博泰克生物科技有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号: 20210425), 杭州弗德生物科技有限公司; 甘油三酯 (triglycerides, TG, 批号: BH016Z)、胆固醇 (total cholesterol, TC, 批号: BH017Z)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C, 批号: BH018Z)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density

lipoprotein cholesterol, HDL-C, 批号: BH019Z) 检测试剂盒均购自上海透景诊断科技有限公司; 凋亡蛋白酶活化因子 (apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1, 批号: 8969T)、分裂的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 7 (Cleaved-Caspase-7, 批号: 8438T)、Cleaved-Caspase-3 (批号: 9961T)、Caspase-3 一抗 (批号: 9662S), 均购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 细胞色素 C (Cytochrome, CytC, 批号: 00099055), 武汉三鹰生物技术有限公司; Cleaved-caspase-9 一抗 (批号: 12k6940), 美国 Affinity Bioscience (艾菲) 公司; Bcl2L12 一抗 (批号: AB11305623), 北京博奥森生物技术有限公司; β -actin 一抗 (批号: PL212550), 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 兔二抗 (批号: SE134), 北京索莱宝科技有限公司。全自动生化分析仪 (型号: 7180 型, 日本日立公司); PCR 扩增仪 (型号: QuantStudio 3, 美国 Applied Biosystems 公司); 电泳仪 (型号: PowerPac1645050, 美国 Bio-rad 公司); 转膜仪 (型号: Trans-Blot Turbo1704150, 美国 Bio-rad 公司); 显影仪 (型号: Tanon-5200, 上海天能科技有限公司)。

4 动物分组及造模方法 参考课题组前期给药方法^[17], 所有小鼠适应性喂养 7 d 后, 将 16 只健康 ApoE^{-/-} 小鼠按随机数字表分为 2 组: 模型组、GPs 组, 各 8 只。每日给予 ApoE^{-/-} 小鼠高脂饲料 (含 0.15% 胆固醇、21% 脂肪) 喂养 12 周, 正常组小鼠正常饲料喂养。

5 药物干预方法 造模 12 周后, 以临床成人每日绞股蓝最高用量 30 g、GPs 纯度 98% 为依据, 通过《人与动物间体表面积折算的等效剂量比值表》^[18] 计算小鼠对应的等效剂量, 灌胃 GPs 组小鼠 GPs 2.973 g/kg 连续 4 周 (相当于 60 kg 成人临床用量 1 倍), 其余两组给予等体积生理盐水灌胃 4 周。小鼠禁食 12 h 后称重, 眼球取血, 静置 30 min 后, 4 °C、3 000 r/min 离心 15 min, 取上清液分装, -20 °C 保存待用, 颈部脱臼法予以安乐死, 取部分小鼠肝脏组织 4% 多聚甲醛固定, 其余小鼠肝脏组织切成小块, 于 -80 °C 保存。

6 检测指标及方法

6.1 肝脏组织转录组学筛选 依据随机化原则从正常组、模型组中各选取 3 只小鼠, 取小鼠肝脏组织置于 -80 °C 超低温冰箱中待检测。由北京源宜基因科技股份有限公司进行 RNA 提取、文库构建、混合上机、数据分割和比对, 筛选出组间与线粒体功能相关的差异基因。

6.2 血液生化指标检测 严格按照生化试剂盒说明书, 应用全自动生化分析仪检测小鼠血清中 TC、TG、LDL-C、HDL-C 含量。

6.3 肝脏组织染色 HE 染色: 选取小鼠肝脏, 于多聚甲醛中固定 24 h, 石蜡包埋后切片 (5 μ m), 烤片, 脱蜡, 苏木精染色, 水洗, 1% 盐酸乙醇脱水, 水洗, 伊红染色, 梯度乙醇脱水, 中性树胶封片。每张切片于 200 倍光镜下观察病理变化, 拍照。油红 O 染色: 取各组肝脏组织切成 1 cm \times 1 cm 小块进行包埋, 将包埋后肝脏固定于冰冻切片机上, 行厚 10 μ m 的横断面切片, 4% 多聚甲醛固定 5 min, 60% 异丙醇浸 40 s, 浸入油红 O 工作液 15 min, 60% 异丙醇冲洗后蒸馏水冲洗 2 次, 苏木素染色 5 min, 蒸馏水冲洗 2 次, 1% 盐酸-乙醇分色 1 s, 封片后在光镜下观察分别以多聚甲醛固定及冷冻。

6.4 实时荧光定量 PCR 检测肝脏组织 Apaf-1、CytC、Caspase-9、Caspase-3、Caspase-7、Bcl2L12 mRNA 表达 Trizol 处理各组肝脏组织提取总 RNA, 按照逆转录试剂盒, 逆转录成 cDNA, 用 SYBRGreenMaterMix 试剂检测待测基因的 mRNA 水平, 设定 PCR 反应条件, 以 2 μ L cDNA 为模板, 按照 95 °C 10 min, 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40 个循环, 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s 反应条件进行扩增。用 $\Delta\Delta$ Ct 法对结果进行相对定量分析。按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行定量分析, 实验所需引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因名称	引物序列	产物长度 (bp)
Apaf-1	上游: 5'-TCCCTGGGCTGCTTCTTTC-3'	95
	下游: 5'-CCGGATGTGTAACCAAGCCT-3'	
CytC	上游: 5'-GAACAAGTGTGGTTGCACCG-3'	86
	下游: 5'-GACTCGAAGACAGACGTCCC-3'	
Caspase-9	上游: 5'-ACCTTCCCAGTTGCCAATG-3'	112
	下游: 5'-CCCCGAGCCTCATGAAGTTTT-3'	
Caspase-7	上游: 5'-GTTTTCCCAAAGCTGCCCTC-3'	98
	下游: 5'-GCACAGTCTGATCATCGGT-3'	
Caspase-3	上游: 5'-GAGCTTGAACGGTACGCTA-3'	118
	下游: 5'-GAGTCCACTGACTTGCTCCC-3'	
Bcl2L12	上游: 5'-CTGGCCAGCCTCTTCC-3'	72
	下游: 5'-TCAGTTGCTCCTGCACCAAT-3'	
β -actin	上游: 5'-ACTGTCGAGTCGCGTCCA-3'	89
	下游: 5'-GTCATCCATGGCGAACTGGT-3'	

6.5 Western Blot 法检测肝脏组织 Apaf-1、CytC、Cleaved-Caspase-9、Cleaved-Caspase-7、Cleaved-Caspase-3、Bcl2L12 蛋白表达 根据 BCA 蛋白定量试剂盒测定结肠组织蛋白浓度, 将蛋白变

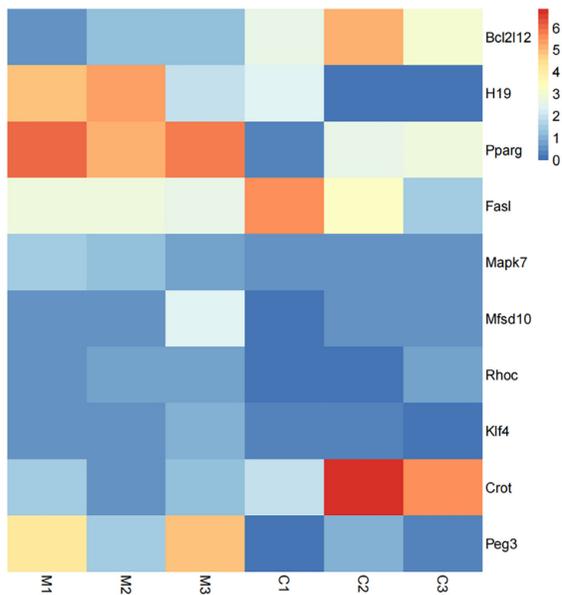
性后，泳道上样，经 SDS-PAGE 电泳后，电转移至 PVDF 膜，加入一抗，4 °C 封闭过夜，TBST 洗涤 3 次，每次 5 min，加入 HRP 标记的二抗。按化学发光试剂盒说明书混合发光液 A 和 B，与膜作用 5 min 后进行 X 光片曝光。X 光片显影和定影后利用凝胶自动分析成像软件扫描分析结果，以 β-actin 为内参照，对蛋白条带进行分析。

6.6 免疫组化检测肝脏组织 Caspase-3、Bcl2L12 蛋白表达 制作小鼠肝脏石蜡切片，切片经二甲苯脱蜡，梯度乙醇水化，用蒸馏水或 PBS 配制新鲜的 3% H₂O₂，室温封闭 5~10 min，用蒸馏水洗 3 次，微波炉加热“3-5-3 法”抗原修复，滴加正常山羊血清封闭液，室温 20 min，直接加一抗，4 °C 过夜，PBS 洗 3 次，2 min，加二抗，37 °C 孵育 20 min，PBS 洗 3 次，2 min，滴加试剂 SABC 20~30 °C 20 min，PBS 洗 4 次，5 min，DAB 显色，常规脱水透明，封片，显微镜下观察拍照。

7 统计学方法 应用 SPSS 23.0 软件进行数据统计分析，采用单因素方差分析，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，多组间两两比较采用 LSD-t 检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 小鼠肝脏转录组线粒体相关差异表达基因 (图 1) 共筛选 1 166 个线粒体相关差异表达基因。与正常组比较，模型组 Bcl2L2 基因下调。



注：C1、C2、C3 为正常组；M1、M2、M3 为模型组

图 1 线粒体相关差异表达基因热图

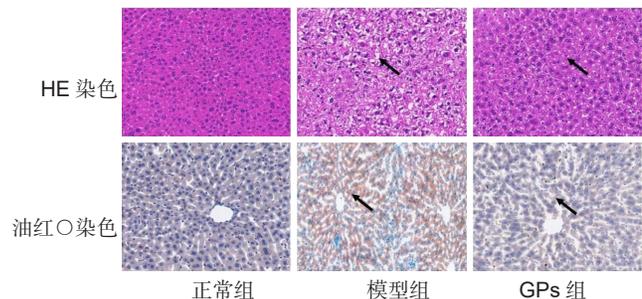
2 各组小鼠血脂水平比较 (表 2) 与正常组比较，模型组 ApoE^{-/-} 小鼠血清 TG、TC、LDL-C 水平升高 ($P < 0.01$)，HDL-C 水平下降 ($P < 0.01$)；与模型组比较，GPs 组血清 TG、TC、LDL-C 水平降低 ($P < 0.01$)，HDL-C 水平升高 ($P < 0.01$)。

表 2 各组小鼠血清 TG、TC、LDL-C、HDL-C 水平比较 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	TG	TC	LDL-C	HDL-C
正常	8	0.52 ± 0.01	14.79 ± 0.51	3.25 ± 0.10	3.10 ± 0.14
模型	8	1.36 ± 0.05*	35.49 ± 1.19*	12.07 ± 0.20*	1.72 ± 0.06*
GPs	8	0.59 ± 0.02 [△]	18.00 ± 0.41 [△]	4.10 ± 0.15 [△]	2.80 ± 0.04 [△]

注：与正常组比较，* $P < 0.01$ ；与模型组比较，[△] $P < 0.01$

3 各组小鼠肝脏组织染色比较 (图 2) HE 染色：正常组肝脏细胞排列整齐，结构规则，颜色均匀，无脂肪空泡；与正常组比较，模型组的肝脏细胞体积明显增大，排列疏松，结构不规则，肝窦变小，可见脂肪空泡；与模型组比较，GPs 组肝脏细胞膨大程度减弱，排列较紧密，结构恢复规则，脂肪空泡较少，肝窦变化也有所恢复。油红 O 染色：正常组肝脏组织未见明显脂质积累；与正常组比较，模型组脂质积累明显，汇管区周围肝脏细胞内可见脂肪呈橙红色，并有大量散在的大小不等的脂肪空泡存在；与模型组比较，GPs 组肝脏细胞脂质积累情况明显减轻，肝脏细胞内见少量脂肪滴呈橙红色。



注：箭头所指为明显病变处

图 2 各组小鼠肝脏组织病理学改变及脂质沉积情况比较 (× 200)

4 各组小鼠肝脏组织 Apaf-1、CytC、Caspase-9、Caspase-7、Caspase-3、Bcl2L12 mRNA 水平比较 (图 3) 与正常组比较，模型组 ApoE^{-/-} 小鼠肝脏组织 Apaf-1、CytC、Caspase-9、Caspase-7、Caspase-3 mRNA 升高 ($P < 0.01$)，Bcl2L12 mRNA 降低 ($P < 0.01$)；与模型组比较，GPs 组 ApoE^{-/-} 小鼠肝脏组织 CytC、Caspase-9、Caspase-7、Caspase-3 mRNA 降低 ($P < 0.01$)，Apaf-1 mRNA 明显降低 ($P < 0.05$)，BCL2L12 mRNA 升高 ($P < 0.01$)。

5 各组小鼠肝脏组织 Apaf-1、CytC、Cleaved-Caspase-9、Cleaved-Caspase-7、Cleaved-Caspase-3、Bcl2L12 蛋白水平比较 (图 4、5) 与正常组比较, 模型组 ApoE^{-/-} 小鼠肝脏组织 Apaf-1、CytC、Cleaved-Caspase-9、Cleaved-Caspase-7、Cleaved-Caspase-3 蛋白水平升高 ($P<0.01$), Bcl2L12 蛋白水平降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, GPs 组 ApoE^{-/-} 小鼠肝脏组织 CytC、Cleaved-Caspase-9、Cleaved-Caspase-7、Cleaved-Caspase-3 蛋白水平降低 ($P<0.01$), Bcl2L12 蛋白水平升高 ($P<0.01$)。

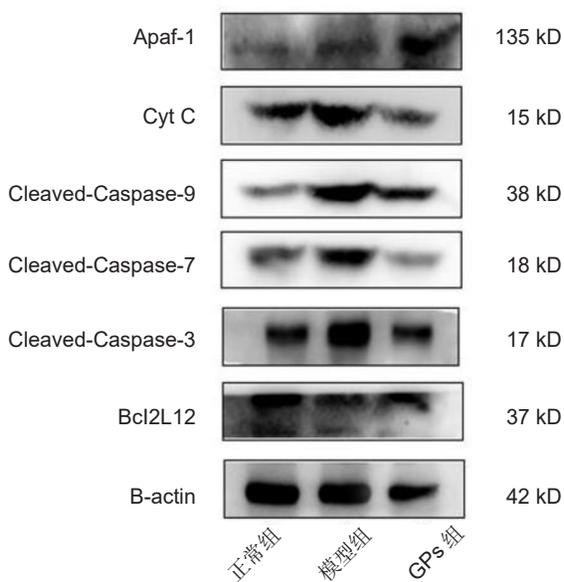
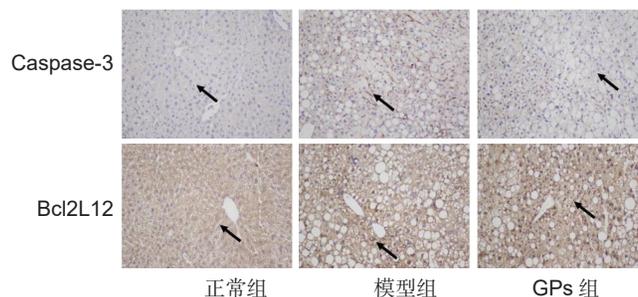


图 4 各组小鼠肝脏组织 Apaf-1、CytC、Cleaved-Caspase-9、Cleaved-Caspase-7、Cleaved-Caspase-3、Bcl2L12 蛋白电泳图

6 各组小鼠肝脏组织 Caspase-3、Bcl2L12 表达比较 (图 6) 免疫组化染色显示, 与正常组比较, 模型组 ApoE^{-/-} 小鼠肝脏组织 Caspase-3 表达升高, 见强阳性染色, 着色较重, 其表达呈棕黄色或棕褐色颗粒, Bcl2L12 表达降低, 阳性表达减弱, 着色较浅; 与模型组比较, GPs 组 ApoE^{-/-} 小鼠肝脏组织 Caspase-3 表达降低, 而 Bcl2L12 表达升高。

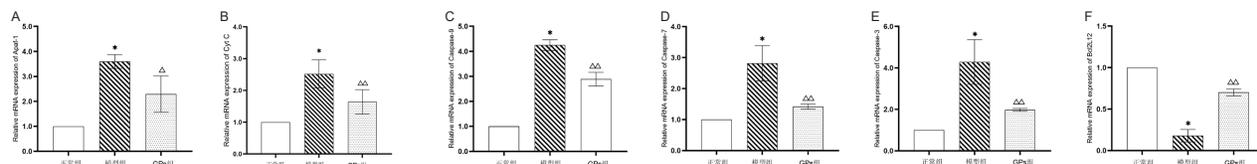


注: 箭头所指为明显病变处

图 6 各组小鼠肝脏组织 Caspase-3、Bcl2L12 表达比较 (IHC, ×200)

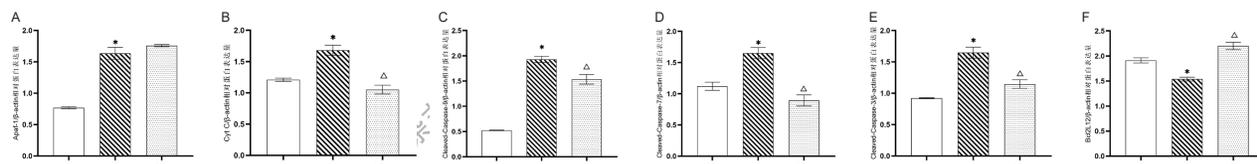
讨论

既往临床及基础研究中多有关于非酒精性脂肪肝参与 AS 发病的报道^[19-21]。然而随着“代谢相关脂肪性肝病”机制研究的深入将肝脏脂质沉积对 AS 的影响做了更科学的解释。高脂饮食诱导 AS 形成过程中会导致内脏脂肪沉积、血脂紊乱^[22, 23]。血脂异常导致肝内脂质沉积是造成 AS 的主要危险因素之一, 同时肝脏脂质沉积又会加重血脂异常, 二者相互影响, 是 AS 形成发展的病理基础, 研究发现, 改善血脂异常及肝脏脂质沉积是目前防治 AS 的重要手段^[4]。临床研究表明, 与他汀类药物比较, GPs 降脂疗效无



注: A 为 Apaf-1; B 为 CytC; C 为 Caspase-9; D 为 Caspase-7; E 为 Caspase-3; F 为 Bcl2L12; 与正常组比较, * $P<0.01$; 与模型组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$; $n=3$

图 3 各组小鼠肝脏组织 Apaf-1、CytC、Caspase-9、Caspase-7、Caspase-3、Bcl2L12 mRNA 表达比较



注: A 为 Apaf-1; B 为 CytC; C 为 Cleaved-Caspase-9; D 为 Cleaved-Caspase-7; E 为 Cleaved-Caspase-3; F 为 Bcl2L12; 与正常组比较, * $P<0.01$; 与模型组比较, $\Delta P<0.01$; $n=3$

图 5 各组小鼠肝脏组织 Apaf-1、CytC、Cleaved-caspase-9、Cleaved-Caspase-7、Cleaved-Caspase-3、Bcl2L12 蛋白表达比较

显著差异,且不良反应少,可成为临床首选降脂药物,值得推广^[24-26],课题组前期亦证实,GP_s可降低血脂防治AS,其降脂效力虽不优于辛伐他汀但亦无明显差异^[27]。与临床研究结论一致。在前期基础之上本文重点关注GP_s的作用机制,故未设立阳性对照,结果表明,GP_s可缓解高脂饮食所致的血脂紊乱和肝脏病理改变。经肝脏转录组学筛选AS小鼠差异基因发现,Bcl2L12显著下调,因此,本文以Bcl2L12介导的细胞凋亡为切入点,探讨GP_s防治AS的作用机制。

线粒体凋亡通路是一种Caspase依赖性的程序性细胞死亡,当细胞受到刺激,线粒体膜通透转换孔开放,释放Cyt C,与Apaf-1协同激活Caspase-9,Caspase-9切割下游Caspase-3和7,导致染色质浓缩、DNA断裂、细胞收缩和凋亡小体形成^[28]。最近,在原发性恶性胶质瘤(glioblastoma,GBM)中发现一种含BH-2结构域且富含脯氨酸结构域,发挥抗凋亡和促坏死作用的癌蛋白-Bcl2L12^[29],可通过直接作用抑制Caspase-7激活;上调Caspase-3特异性抑制剂小热休克蛋白 α B-晶体蛋白,间接抑制Caspase-3激活,抑制线粒体后凋亡信号。此过程由于线粒体功能障碍引起ATP耗竭及能量危机,细胞死亡途径从凋亡转向坏死^[30]。有研究表明,在AS中细胞凋亡亦充当重要角色^[31]。陈松等^[32]利用网络药理学联合芯片分析发现,GP_s可通过抑制Bax/Bcl-2介导的细胞凋亡,缓解AS。课题组前期研究也发现^[33],GP_s可下调ApoE^{-/-}AS小鼠肝脏组织CytC、Caspase-9,干扰线粒体凋亡,防治AS,但Bcl2L12介导的细胞凋亡是否参与了AS进展,该途径是否为GP_s防治AS的有效作用机制暂未见报道。因此,本研究进一步将关注点聚焦于新发现的Bcl-2家族成员Bcl2L12介导凋亡对ApoE^{-/-}AS小鼠肝脏脂质沉积的作用。结果表明,ApoE^{-/-}AS小鼠Apaf-1、CytC、Caspase-9、Caspase-7、Caspase-3 mRNA及蛋白水平升高,Bcl2L12 mRNA及蛋白水平降低,证实Bcl2L12-Caspase-7/3细胞凋亡通路参与了AS进展;经GP_s给药后可下调CytC、Caspase-9、Caspase-7、Caspase-3 mRNA及蛋白水平,上调BCL2L12 mRNA及蛋白水平,其中,Apaf-1 mRNA降低,而蛋白水平无统计学意义,其原因可能是Bcl2L12通过在线粒体后效应靶向Caspase-7和3激活抑制凋亡,对Apaf-1无直接作用,与上述报道一致。综上,GP_s可缓解肝脏脂质沉积,防治AS,其作用机制可能与Bcl2L12-Caspase-7/3通路介导的细

胞凋亡有关。本研究首次证明Bcl2L12介导的细胞凋亡是缓解肝脏脂质沉积进而防治AS的有效作用机制,GP_s可通过干预该通路防治AS,为防治AS提供了新思路,并为GP_s的推广应用提供理论依据。基于前期研究已有阳性对照对比GP_s疗效,本研究仅从体内实验初步探讨GP_s防治AS的作用机制,未设立阳性对照组重复验证GP_s疗效,存在一定局限性,且其具体靶向调控机制,缺乏后续细胞实验的深入验证,这也将成为本课题组未来研究的重点。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] 贾连群,杨关林,陈文娜,等.化痰祛痰方通过调节ApoE^{-/-}小鼠胆固醇代谢相关基因表达抗动脉粥样硬化[J].中国动脉粥样硬化杂志,2014,22(1):1-6.
- [2] 中国医师协会中西医结合分会心血管专业委员会,中华中医药学会心血管病分会.动脉粥样硬化中西医结合防治专家共识(2021年)[J].中国中西医结合杂志,2022,42(3):287-293.
- [3] 中国心血管健康与疾病报告编写组.中国心血管健康与疾病报告2021概要[J].中国循环杂志,2022,37(6):553-578.
- [4] 陈丝,贾连群,宋囡,等.化痰祛痰方调控线粒体自噬相关蛋白减少动脉粥样硬化家兔肝脏脂质沉积的研究[J].北京中医药大学学报,2018,41(4):310-315.
- [5] 吕佳,江云,张鑫,等.非酒精性脂肪性肝病中医研究进展[J].上海中医药杂志,2017,51(S1):238.
- [6] 高晓乐,段冷昕,仇可可,等.鬼针草水煎液对高脂高糖诱导的小鼠非酒精性脂肪肝的作用及机制研究[J].中国中药杂志,2020,45(16):3915.
- [7] 刘继东,张哲,贾连群,等.从现代生物学角度探讨动脉粥样硬化“痰浊-痰结-痰瘀”病机演变规律[J].中华中医药学刊,2021,39(2):109-112.
- [8] 李淑娣,李素领,刘江凯,等.基于网络药理学及分子对接技术探讨绞股蓝治疗代谢相关脂肪性肝病的作用机制[J].中国中药杂志,2021,46(19):5080-5087.
- [9] 苏瑶,王兰,常相娜,等.基于网络药理学及分子对接技术探讨绞股蓝防治肥胖的作用机制[J].食品工业科技,2022,43(4):12-23.
- [10] Su C, Li N, Ren R, et al. Progress in the medicinal value, bioactive compounds, and pharmacological activities of *Gynostemma pentaphyllum*[J].

- Molecules, 2021, 26 (20): 6249.
- [11] 任哲, 任江南. 绞股蓝对非酒精性脂肪肝和酒精性脂肪肝血清生化指标的疗效[J]. 转化医学杂志, 2013, 2(3): 143-145, 149.
- [12] Nguyen NH, Ha TKQ, Yang JL, et al. Triterpenoids from the genus *Gynostemma*: Chemistry and pharmacological activities[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 43(268): 113574.
- [13] 黎展桃, 谢杏榕. 绞股蓝皂苷对非酒精性脂肪肝患者肝纤维化及肝功能的影响[J]. 中医药导报, 2015, 21(12): 70-73.
- [14] Song N, Jia L, Cao H, et al. Gypenoside inhibits endothelial cell apoptosis in atherosclerosis by modulating mitochondria through PI3K/Akt/Bad pathway[J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 2819658.
- [15] Chernova O, Cowell JK. Molecular definition of chromosome translocations involving 10q24 and 19q13 in human malignant glioma cells[J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 1998, 105(1): 60-68.
- [16] Magnani I, Chiariello E, Conti AM, et al. A recurrent 19q11-12 breakpoint suggested by cytogenetic and fluorescence in situ hybridization analysis of three glioblastoma cell lines[J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 1999, 110(2): 82-86.
- [17] 宋囡, 杨芳, 曹慧敏, 等. 绞股蓝总甙调控 mTOR/ULK1 通路对 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2018, 26(2): 127-132.
- [18] 徐叔云, 卞如濂, 陈修主编. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1184.
- [19] 何方平. 非酒精性脂肪性肝病与动脉粥样硬化[J]. 实用肝脏病, 2017, 20(3): 263-266.
- [20] Pais R, 罗利婷, 牛俊奇. 脂肪肝、特定部位和多部位动脉粥样硬化与 10 年心血管风险评估的关系[J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(1): 108.
- [21] 刘婷婷. 二氢杨梅素对 LDLr^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化和脂肪肝发展的影响及机制研究[D]. 江苏: 南通大学, 2017.
- [22] Neuschwander-Tetri BA. Non-alcoholic fatty liver disease[J]. *BMC Med*, 2017, 15(1): 45.
- [23] 唐云, 张建影, 李雅, 等. 心痛泰颗粒预防性给药对动脉粥样硬化兔主动脉 TLR4、p38 MAPK 蛋白及 mRNA 表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2020, 40(12): 1484-1488.
- [24] 赵巧萍, 卢巧英, 吕宏云. 绞股蓝总苷治疗肾病综合征高脂血症 30 例[J]. 浙江中医药大学学报, 2009, 33(6): 783, 785.
- [25] 陈宏卫, 王守丽, 陈艳. 洛伐他丁和绞股蓝总甙治疗糖尿病合并高脂血症的疗效比较[J]. 河南医药信息, 1998, 19(11): 51-52.
- [26] 黄雪萍. 绞股蓝总苷与辛伐他汀治疗原发性高脂血症的疗效比较[J]. 中国药业, 2006, 15(6): 46.
- [27] 宋囡, 陈宁, 曹慧敏, 等. 绞股蓝总苷调控生物节律相关蛋白对 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化的影响[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(8): 248-251, 284-285.
- [28] 张弋宁, 靳晓飞, 高维娟. p53/CytC/Apaf-1 介导线粒体凋亡通路对缺血性脑卒中的作用[J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(1): 226-230.
- [29] Stegh AH, Kim H, Bachoo RM, et al. Bcl2L12 inhibits post-mitochondrial apoptosis signaling in glioblastoma[J]. *Genes Dev*, 2007, 21(1): 98-111.
- [30] Stegh AH, Chin L, Louis DN, et al. What drives intense apoptosis resistance and propensity for necrosis in glioblastoma? A role for Bcl2L12 as a multifunctional cell death regulator[J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(18): 2833-2839.
- [31] 王贞, 李海波. 细胞凋亡与动脉粥样硬化关系的最新研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10(4): 352-354.
- [32] 陈松, 刘云青, 张泽, 等. 绞股蓝皂苷对动脉粥样硬化的分子靶点及作用机制[J]. 贵州医科大学学报, 2022, 47(5): 511-518.
- [33] 宋囡, 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.

(收稿: 2022-10-02 在线: 2023-05-04)

责任编辑: 赵芳芳