

大黄素甲醚改善小鼠非酒精性脂肪性肝病的研究

张进宇¹, 张少波¹, 徐红¹, 欧阳豪^{1,2*}, 季莉莉^{1*}

(1. 上海中医药大学中药研究所, 中药标准化教育部重点实验室, 中药新资源与质量标准综合评价国家中医药管理局重点研究室, 上海市复方中药重点实验室, 上海 201203; 2. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院肝病科, 上海 201203)

摘要: 大黄素甲醚 (physcion, PHY) 是一种来源于大黄等中药的蒽醌类化合物。本实验旨在探究 PHY 对非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 的改善作用及其机制。采用蛋氨酸-和胆碱-缺乏饲料 (methionine- and choline-deficient diet, MCD) 喂养 6 周诱导小鼠 NAFLD 疾病模型 (本实验获得上海中医药大学实验动物伦理委员会批准, 批准号: PZSHUTCM190705019)。结果显示, PHY (5 和 20 mg·kg⁻¹) 能改善 MCD 诱导 NAFLD 小鼠的肝损伤, 减轻肝脏脂肪累积, 降低升高的 NAFLD 活动性评分 (NAFLD activity score, NAS)。Western blot 及酶活力实验结果提示, PHY 能提升肝脏及 L-02 细胞中肉毒碱棕榈酰基转移酶 1A (carnitine palmitoyltransferase 1A, CPT1A) 蛋白表达及酶活力, 但 real-time PCR 结果显示 PHY 不影响 *Cpt1a* mRNA 表达。免疫荧光结果提示, PHY (10 和 25 μmol·L⁻¹) 能缓解游离脂肪酸 (non-esterified fatty acids, NEFA) 诱导的人正常肝 L-02 细胞中的线粒体损伤。Seahorse 实验结果提示, PHY 给药后能提升 L-02 细胞内线粒体基础呼吸能力、最大呼吸能力、ATP 合成和储备呼吸能力, 但不影响线粒体质子漏。以上研究表明, PHY 可能通过改善线粒体功能, 促进脂肪酸 β 氧化, 减少肝脏中脂肪的堆积, 发挥改善 NAFLD 的药效。

关键词: 大黄素甲醚; 非酒精性脂肪性肝病; 肉毒碱棕榈酰基转移酶 1A; β 氧化; 线粒体损伤
中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)04-0939-09

The improvement provided by physcion on non-alcoholic fatty liver disease in mice

ZHANG Jin-yu¹, ZHANG Shao-bo¹, XU Hong¹, OUYANG Hao^{1,2*}, JI Li-li^{1*}

(1. The MOE Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines, the SATCM Key Laboratory for New Resources and Quality Evaluation of Chinese Medicines, Shanghai Key Laboratory of Compound Chinese Medicines, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;
2. Department of Hepatology, Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

Abstract: Physcion (PHY) is an anthraquinone compound derived from traditional Chinese medicine such as *Rhei Radix et Rhizoma*. The aim of this study is to investigate the improvement of PHY on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its underlying mechanism. NAFLD was induced in mice by feeding with the methionine- and choline-deficient diet (MCD) for 6 weeks. This experiment was approved by the Experimental Animal Ethics Committee of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (approval number: PZSHUTCM190705019). The results displayed that PHY (5 and 20 mg·kg⁻¹) reversed liver damage, reduced hepatic lipid accumulation and decreased the elevated NAFLD activity score (NAS) in MCD-fed NAFLD mice.

收稿日期: 2023-10-11; 修回日期: 2023-11-14.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82273994, 82173958).

*通讯作者 Tel: 86-21-51322517, E-mail: jilili@shutcm.edu.cn; oyhao94@shutcm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1158

Results from Western blot and enzyme activity demonstrated that PHY could enhance the protein expression and enzyme activity of carnitine palmitoyltransferase 1A (CPT1A) in the liver and L-02 cells, but it did not affect *Cpt1a* mRNA expression. Immunofluorescence results indicated that PHY (10 and 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) could reduce the mitochondrial injury induced by non-esterified fatty acids (NEFA) in L-02 cells. Results from seahorse assay showed that PHY could enhance mitochondrial basic respiration, maximal respiration, ATP synthesis and reserve respiration in L-02 cells treated with NEFA, but had no effect on mitochondrial proton leakage. In summary, PHY reversed mitochondrial damage and enhanced fatty acid β -oxidation, thereby reducing hepatic steatosis and improving NAFLD.

Key words: phycion; non-alcoholic fatty liver disease; carnitine palmitoyltransferase 1A; β -oxidation; mitochondrial damage

非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是全球范围内最常见的慢性肝脏疾病之一^[1]。NAFLD 被定义为在没有饮酒史或其他致病因素条件下, 肝细胞中脂肪过度累积 (> 5%) 为主要特征的临床病理表现^[2,3], 该病在早期阶段具有隐蔽性, 若不加以治疗, 会进一步发展为晚期严重阶段的非酒精性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH), 且 NASH 会进一步恶化发展为终末期肝病甚至肝癌^[4,5]。近年来 NAFLD 的发病率急剧升高, 预计到 2030 年中国将成为全世界 NAFLD 发病率最高的国家, 患病人数高达 3.145 8 亿^[6,7]。NAFLD 发病率的激增给全球尤其是我国的经济和卫生资源带来了巨大压力。现阶段防治 NAFLD 的手段主要包括减肥、运动、控制饮食等手段, 无 FDA 批准的药物上市^[8,9]。而这些治疗手段患者依从性差, 因此寻找安全有效的药物对治疗 NAFLD 有重大意义。

肝脏脂肪累积是 NAFLD 患者最主要的病理变化, 正常生理状态下肝脏能自我调节脂肪酸代谢, 维持肝脏正常功能, 而当机体摄入过量脂肪后甘油三酯 (triglyceride, TG) 在肝脏中沉积引发肝脏脂肪变性^[10], 进而导致肝脏能量代谢紊乱^[11]。线粒体对维持肝脏正常生理功能具有重要意义^[12]。线粒体 β 氧化是肝细胞分解代谢脂肪酸的最主要途径^[13]。肝脏中蓄积的过量脂肪酸导致肝脏线粒体功能受损产生大量活性氧 (reactive oxygen species, ROS), 导致电子渗漏增强, 同时引发细胞中其他生物大分子氧化修饰, 加剧肝损伤^[14,15]。位于线粒体外膜上的肉碱棕榈酰转移酶 1A (carnitine palmitoyltransferase 1A, CPT1A) 主要负责转运长链脂肪酸进入线粒体, 是线粒体脂肪酸 β 氧化的关键限速酶^[16]。增强 CPT1A 酶活力能提高线粒体 β 氧化功能, 减少肝脏脂肪累积^[17]。可见, 维持线粒体正常功能、减少肝脏脂肪累积是治疗 NAFLD 的重要手段。

大黄素甲醚 (phycion, PHY) 是一种来源于大黄等中药的蒽醌类化合物, 已有文献^[18]报道 PHY 具有抗

炎、抗肿瘤等多种生物活性。但是, 目前尚无研究评价 PHY 改善 NAFLD 的药效。本实验将在蛋氨酸胆碱缺乏饲料喂养 (methionine- and choline-deficient diet, MCD) 诱导 NAFLD 小鼠的动物模型上, 探讨 PHY 对 NAFLD 的改善作用, 并初步探索其作用机制。

材料与方法

药物和仪器 PHY (货号: PRF9030521) 购自上海源叶生物科技有限公司; 吡格列酮 (pioglitazone, PGZ; 货号: 41-529F) 购自江苏万邦生化医药集团有限责任公司; 蛋氨酸胆碱补充饲料 (methionine- and choline-supplement diet, MCS; 货号: TP3005GS)、MCD (货号: TP3005G) 购自南通特洛菲饲料科技有限公司; Trizol (货号: AL11815A) 购自宝日医生物技术有限公司; Evo M-MLV RT Mix Kit with gDNA Clean for qPCR Ver.2 (货号: AG11728) 购自艾克瑞生物科技有限公司; Hieff® qPCR SYBR® Green Master Mix (Low Rox Plus) (货号: 11202ES08) 购自翌圣生物科技有限公司; 丙氨酸转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT; 货号: C009-1-1)、天冬氨酸转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST; 货号: C010-1-1)、TG (货号: A110-1-1)、游离脂肪酸 (non-esterified fatty acids, NEFA; 货号: A042-2-1) 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所; BCA 试剂盒 (货号: SB-WB013) 购自上海圣尔生物科技有限公司; 肝脂解酶活力检测试剂盒 (货号: BC2385) 购自索莱宝科技有限公司; CPT1A 酶活力试剂盒 (货号: GMS50118.2.2) 购自上海杰美基因医药科技有限公司; 无脂肪酸 BSA (货号: 9048-46-8) 购自大连美仑生物技术有限公司; β -actin 抗体 (货号: EM2001-07) 购自杭州华安生物技术有限公司; CPT1A 抗体 (货号: 97361) 购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS; 货号: 12484028) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; RPMI-1640 培养基 (货号: 11875093) 购自美国 Life Technology 公司; 油酸

(oleic acid, OA; 货号: M36008)、棕榈酸 (palmitic acid, PA; 货号: SLBN0402V) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司。

BioTek Synergy H4 酶标仪 (美国 Biotek 公司); QuantStudio 6 flex 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Life Technology 公司); Seahorse XFe 96 细胞能量代谢分析仪 (美国 Agilent Technologies 公司)。

药物配制 体内实验药物配制: 精确称取 PHY、PGZ 粉末于 0.5% CMC-Na 溶液配制为混悬液; 体外实验药物配制: 精确称取 OA 原液、PA 粉末, 加入 DMSO 配制为 100 mmol·L⁻¹ 浓度的母液备用; 精确称取 PHY 粉末, 加入 DMSO 配制为 10 mmol·L⁻¹ 浓度的母液并梯度稀释备用。

动物实验 C57BL/6 小鼠 (20 ± 2 g) 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 实验动物许可证号 SCXK (沪) 2022-0004。饲养条件: 温度 (22 ± 1) °C, 湿度 65% ± 5%, 12 h 光暗循环。小鼠能自由获取食物和水。本动物实验获得上海中医药大学实验动物伦理委员会批准 (伦理号: PZSHUTCM190705019)。

MCD 饲料诱导 NAFLD 模型: 35 只小鼠被随机分为 5 组: ① MCS 组 ($n = 7$); ② MCD 组 ($n = 7$); ③ MCD + PGZ (10 mg·kg⁻¹) 组 ($n = 7$); ④ MCD + PHY (5 mg·kg⁻¹) 组 ($n = 7$); ⑤ MCD + PHY (20 mg·kg⁻¹) 组 ($n = 7$)。小鼠适应性喂养 1 周后, 进行过渡期饲养: 除了 MCS 组之外的其他组小鼠第 1~2 天 MCD 饲料与 MCS 饲料以 1:2 混合喂养, 第 3~4 天 MCD 饲料与 MCS 饲料等比例混合喂养, 第 5~6 天 MCD 饲料与 MCS 饲料以 2:1 混合喂养, 从第 7 天开始至实验结束, 用 MCD 饲料喂养。随后, MCS 组给予 MCS 对照饲料, 其余所有小鼠均用 MCD 喂养 6 周。MCD 饲料正式喂养 2 周后, 给药 4 周, 共 6 周。第 3 周开始灌胃给予 PHY (5 和 20 mg·kg⁻¹), 阳性药组灌胃给予 PGZ (10 mg·kg⁻¹), 每日 1 次, 直至实验结束, 共 4 周。实验结束后处死小鼠, 取肝脏及血液用于后续实验。

细胞培养 人正常肝细胞 L-02 购自中国科学院细胞库, 培养基为含 10% FBS、1% 双抗的 1640 培养基, 培养条件为: 37 °C, 5% CO₂, 饱和湿度恒温培养箱, 取对数生长期的细胞用于实验。

ALT、AST 检测 取一定量小鼠血清, 按照相关试剂盒说明书进行测定。

肝脏 TG 和 NEFA 检测 称取一定量的肝脏样本, 按照说明书检测小鼠肝脏中 TG 和 NEFA 含量。

肝脏病理学分析 将小鼠肝脏固定在 4% 多聚甲醛溶液中, 进行石蜡包埋和切片, 用苏木素-伊红染色 (hematoxylin-eosin staining, H&E) 后, 在显微镜下观察肝组织中病理变化。使用天狼星红染色 (Sirius red

staining) 观察肝脏胶原沉积状况。使用油红 O 染色 (oil red O staining, ORO) 观察肝脏脂肪累积程度。参照文献^[19]对小鼠肝脏 H&E 切片中脂肪变性、小叶炎症和肝细胞气球样变的病变程度进行非酒精性脂肪性肝病活动性评分 (NAFLD activity score, NAS) 评分。

荧光实时定量聚合酶链式反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, real-time PCR) 检测 按照 Trizol 试剂盒说明书提取小鼠肝脏组织 RNA, 以 Evo M-MLV RT Mix Kit with gDNA Clean for qPCR Ver.2 试剂盒进行逆转录合成 cDNA, 接着将 cDNA 与 Hieff® qPCR SYBR® Green Master Mix 混匀后置于 QuantStudio 6 flex 实时荧光定量 PCR 仪中进行 real-time PCR 扩增。扩增完成后, 根据溶解曲线判断扩增反应的准确性。相关基因引物序列见表 1。目标基因的相对表达量以 Actin 标准化, 并通过 2^{-ΔΔCt} 方法分析并计算。

Table 1 The primer sequences of mouse gene. *Cpt1a*: Carnitine palmitoyltransferase 1A; *Acaadvl*: Acyl-coenzyme A (Acyl-CoA) dehydrogenase very long chain; *Acaavl*: Acyl-CoA dehydrogenase, long-chain; *Acadm*: Acyl-CoA dehydrogenase medium chain; *Acaads*: Acyl-CoA dehydrogenase short chain; *Nrf1*: Nuclear respiratory factor 1; *Tfam*: Transcription factor A, mitochondrial; *Ppargc1a*: Peroxisome proliferative activated receptor gamma coactivator 1 alpha; *Lipa*: Lipase A; *Lipc*: Lipase C; *Ndl*: NADH dehydrogenase subunit 1; 18S: 18S ribosomal RNA; *Actb*: Actin; Forward: Forward primers; Reverse: Reverse primers

Gene	Primer	Sequence
<i>Cpt1a</i>	Forward	5'-TATGGTCAAGGCTCTTCTCGGGTCG-3'
	Reverse	5'-AGTGCTGTGCATGCGTTGGAAGTCTC-3'
<i>Acaadvl</i>	Forward	5'-GATTCTGTCTCCGTCCTC-3'
	Reverse	5'-GGCTCTGCAAGGCTGTAT-3'
<i>Acaavl</i>	Forward	5'-TTCAGATGCCAGTATTTT-3'
	Reverse	5'-GCCTGTGAGTTCATGTTTG-3'
<i>Acadm</i>	Forward	5'-TAACATACTCGTCACCCTTC-3'
	Reverse	5'-ATGCCTGTGATTCTTGCT-3'
<i>Acaads</i>	Forward	5'-AGGGTTTGCATGGCTATTT-3'
	Reverse	5'-TATCAGTGCCTTCCTGGTTC-3'
<i>Nrf1</i>	Forward	5'-AGCACGGAGTGACCCAAAC-3'
	Reverse	5'-TGTACGTGGCTACATGGACCT-3'
<i>Tfam</i>	Forward	5'-ATTCCGAAGTGTTTTTCCAGCA-3'
	Reverse	5'-TCTGAAAGTTTTGCATCTGGGT-3'
<i>Ppargc1a</i>	Forward	5'-TATGGAGTGACATAGAGTGTGCT-3'
	Reverse	5'-CCACTTCAATCCACCCAGAAAAG-3'
<i>Lipa</i>	Forward	5'-TGTTTCGTTTTCCACATGGGA-3'
	Reverse	5'-CGCATGATTATCTCGGTACA-3'
<i>Lipc</i>	Forward	5'-ATGGGAAATCCCTCCAAATCT-3'
	Reverse	5'-GTGCTGAGGTCTGAGACGA-3'
<i>Ndl</i>	Forward	5'-CTAGCAGAAACAAACCGGGC-3'
	Reverse	5'-CCGGCTGCGTATTCTACGTT-3'
18S	Forward	5'-CGCGTTCTATTTTGTGGT-3'
	Reverse	5'-AGTCGGCATCGTTTATGGTC-3'
<i>Actb</i>	Forward	5'-TTCGTTGCCGGTCCACACCC-3'
	Reverse	5'-GCTTTGCACATGCCGGAGCC-3'

Western blot 实验 称取 10 mg 肝脏样本或细胞样本, 加入 10 倍量的含蛋白酶抑制剂的裂解液冰上匀浆, 提取总蛋白。将制备好的蛋白样本用 SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 在电流作用下转移至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上, 用 5% BSA 室温封闭 2 h 后加入相应的抗体, 4 °C 环境中过夜; 以含 0.1% Tween 20 的 TBST 缓冲液洗脱未结合的抗体, 用与辣根过氧化物酶缀合的二抗在室温条件下孵育 2 h; 洗脱未结合的二抗, 以化学发光 HRP 底物对 PVDF 膜进行显色反应, 置于凝胶成像仪中曝光。

肝脏或 L-02 细胞 CPT1A 酶活力检测 取约 20 mg 肝组织或细胞沉淀, 按试剂盒说明书所述方法制样并检测其中 CPT1A 蛋白质的酶活力。

免疫荧光检测 L-02 细胞线粒体损伤 取对数生长期的 L-02 细胞, 以每孔 3×10^4 个细胞铺于 24 孔板中。待细胞贴壁且生长状态良好时, 将正常组培养基换为无血清含 1% 无脂肪酸 BSA 的 RPMI-1640 培养基, 将模型组及给药组的培养基换为含 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NEFA、1% 无脂肪酸 BSA 的无血清 RPMI-1640 培养基, 并在给药组中分别加入 10 和 $25 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PHY。给药 24 h 后加入 Mito-Tracker Red 染料, 同时加入 Hoechst33342, 避光孵育 30 min 后荧光显微镜下观察, 并使用 Image J 统计阳性区域面积。

细胞能量代谢分析 取对数生长期的 L-02 细胞, 以每孔 5×10^3 个细胞铺于 Seahorse XF 96 孔微孔板中。待细胞贴壁且生长状态良好时, 将细胞培养基更换为含 1% 无脂肪酸 BSA 的 1640 培养基并分组给药, 给药方式同上。给药 24 h 后, 清洗细胞并将细胞培养基更换为 Seahorse XF 测定培养基 (含 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ L-谷氨酰胺、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 丙酮酸钠、 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖), 在 37 °C 无 CO_2 培养箱中孵育 1 h。将 Seahorse XF 96 孔微孔板放入 Seahorse XFe 96 细胞能量代谢仪中连续检测细胞对氧气的消耗速率 (oxygen consumption rate, OCR), 随时间依次注射寡霉素 (oligomycin; 终浓度为 $2 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、碳酰氰-4-三氟甲氧基苯腙 [carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone, FCCP; 终浓度为 $0.5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$] 和鱼藤酮或抗霉素 A (antimycin A, AA; 终浓度为 $1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。根据试剂盒说明计算 L-02 细胞线粒体基础呼吸能力、最大呼吸能力、质子漏、ATP 合成和储备呼吸能力, 并将线粒体呼吸能力标准化至总细胞数并表示为每 5×10^3 个细胞 $\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

肝脏脂解酶活力测定 称取一定量的肝脏样本, 并按照说明书进行相关操作。

数据处理 实验数据以平均值 \pm 标准误 ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) 表示, 采用 SPSS 21.0 软件进行统计, 组间用

one-way ANOVA 统计方法进行方差分析, $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

结果

1 PHY 改善 MCD 诱导 NAFLD 小鼠的肝脏损伤

如图 1A 所示, MCS 组小鼠肝脏中肝细胞规则排布, 无明显脂肪空泡。与 MCS 组相比, MCD 饮食导致小鼠肝脏出现大量脂肪空泡, 并伴随着不同程度的炎性浸润; 而与 MCD 组相比, 阳性药 PGZ ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和 PHY 给药组 (5 和 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 都能不同程度地减少肝脏中脂肪空泡。天狼星红染色结果显示, 与 MCS 组相比, MCD 组肝脏内胶原沉积不明显, 而给予 PHY (5 和 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 后也无明显改善作用。肝脏病理学切片 NAS 评分结果如图 1B 所示, PHY 治疗 4 周后能降低 NAS 评分, 改善肝脏病理学变化 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。图 1C、D 结果提示, PHY (5 和 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 能降低血清中 AST 和 ALT 酶活力, 提示 PHY 具有改善肝损伤的作用。以上结果说明, PHY (5 和 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 能减轻肝脏脂肪累积, 减轻肝损伤, 进而改善 NAFLD。

2 PHY 减轻 MCD 诱导 NAFLD 小鼠肝脏中的脂肪累积

如图 2A 所示, NAFLD 小鼠肝脏油红 O 染色切片结果显示, 与 MCS 组相比, MCD 组小鼠肝脏中脂肪累积增加, 而阳性药和 PHY 治疗组均具有降低肝脏脂肪含量的作用, 此结果与 H&E 染色结果一致。TG 结果如图 2B 所示, 与 MCS 组相比, MCD 组小鼠肝脏中的 TG 含量显著升高 ($P < 0.01$), 阳性药有效地降低了肝脏 TG 含量 ($P < 0.001$), PHY 给药后也能显著降低肝脏 TG 含量 ($P < 0.01$, $P < 0.001$)。图 2C 结果显示, PGZ 对于 MCD 造模后肝脏 NEFA 含量的上调无显著影响, 而 PHY (5 和 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 均能降低肝脏 NEFA 含量 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。以上结果提示, PHY 具有改善 NAFLD 小鼠肝脏中脂肪累积的作用。

3 PHY 提升 MCD 诱导 NAFLD 小鼠肝脏中 CPT1A 蛋白表达及酶活力

CPT1A 在介导活化长链脂肪酸进入线粒体进行 β 氧化中具有重要作用^[20]。有文献^[21]报道肝脏 *Cpt1a* 基因治疗能够降低小鼠肝脏脂肪变性程度。因此, 对 NAFLD 小鼠肝脏 *Cpt1a* mRNA 表达进行分析, 如图 3A 所示, PHY 给药并不影响 MCD 小鼠肝脏中 *Cpt1a* 基因表达水平的下调。Western blot 结果显示 (图 3B), 与 MCS 组相比, MCD 组 CPT1A 蛋白水平显著下调 ($P < 0.01$), 而 PHY (5 和 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 给药均能提高 CPT1A 蛋白表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

为了确定 PHY 是否通过介导增强 CPT1A 酶活力,

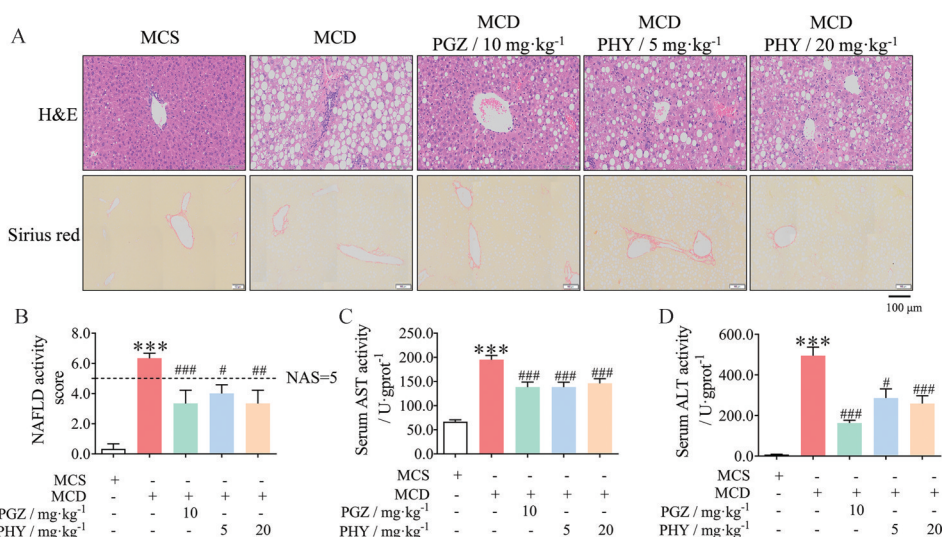


Figure 1 The effect of PHY on liver injury in MCD-induced NAFLD mice. A: H&E staining and Sirius red staining of liver tissue (200 \times); B: NAFLD activity score; C: Serum AST activity; D: Serum ALT activity. $n = 6-7$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$. *** $P < 0.001$ vs MCS group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$, #### $P < 0.001$ vs MCD group. MCS: Methionine- and choline-supplement diet; MCD: Methionine- and choline-deficient diet; PGZ: Pioglitazone; PHY: Phycion; NAFLD: Non-alcoholic fatty liver disease; ALT: Alanine aminotransferase; AST: Aspartate aminotransferase; H&E: Hematoxylin-eosin staining

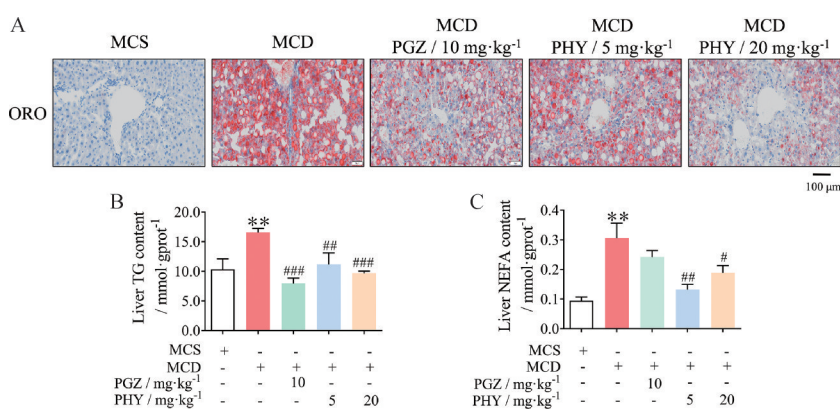


Figure 2 The effect of PHY on lipid accumulation in MCD-induced NAFLD mice. A: Oil red O staining (ORO, 200 \times); B: Liver TG content; C: Liver NEFA content. $n = 6-7$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$. ** $P < 0.01$ vs MCS group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs MCD group. TG: Triglyceride; NEFA: Non-esterified fatty acids

促进脂肪酸 β 氧化进而增加脂肪酸代谢。本研究接着检测了NAFLD肝脏中CPT1A酶活力,结果如图3C所示,与MCD组相比,PHY (5和20 mg \cdot kg⁻¹) 给药均能提升CPT1A酶活力 ($P < 0.01$)。同时,本研究还检测了NAFLD小鼠肝脏中 β 氧化相关基因的表达,如图3D所示,与MCD组相比,PHY (5和20 mg \cdot kg⁻¹) 均能不同程度地提高酰基辅酶A脱氢酶超长链 [acyl-coenzyme A (acyl-CoA) dehydrogenase very long chain, *Acadvl*]、酰基辅酶A脱氢酶长链 (acyl-CoA dehydrogenase long chain, *Acadl*)、酰基辅酶A脱氢酶中链 (acyl-CoA dehydrogenase medium chain, *Acadm*)、酰基辅酶A脱氢酶短链 (acyl-CoA dehydrogenase short chain, *Acads*) 的

基因表达水平 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。以上结果说明,PHY能够增加NAFLD小鼠肝脏CPT1A蛋白表达,提升CPT1A酶活力,促进NAFLD小鼠肝脏中脂肪酸的 β 氧化。

4 PHY提升NEFA刺激的肝细胞内CPT1A蛋白及酶活力

在体外采用0.5 mmol \cdot L⁻¹ NEFA刺激L-02细胞24 h作为细胞模型。如图4A所示,在NEFA刺激后,L-02细胞中CPT1A的蛋白表达升高 ($P < 0.05$),而孵育PHY (25 μ mol \cdot L⁻¹) 能进一步提升CPT1A表达水平 ($P < 0.05$)。细胞CPT1A酶活力结果 (图4B) 提示,PHY (10和25 μ mol \cdot L⁻¹) 均能显著提高CPT1A酶活力

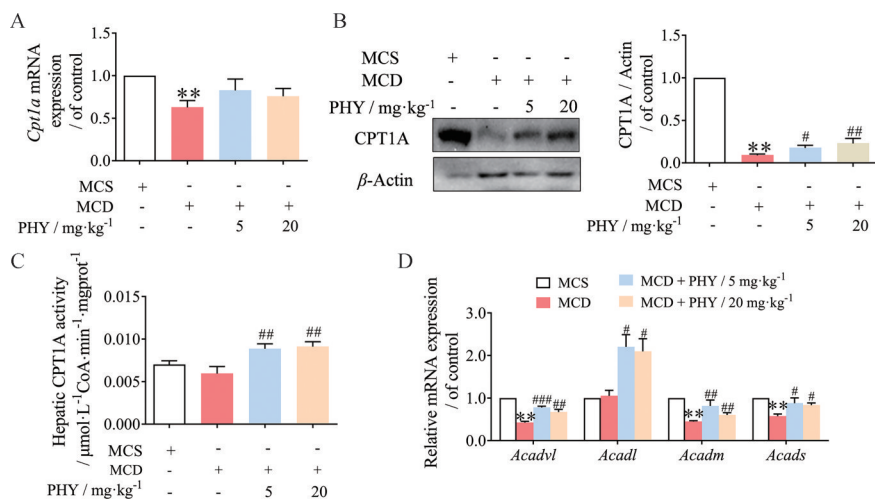


Figure 3 The effect of PHY on hepatic protein expression, enzyme activity of CPT1A and mRNA expression of β -oxidation-associated genes in MCD-induced NAFLD mice. A: Hepatic *Cpt1a* mRNA expression; B: Hepatic CPT1A protein expression; C: Hepatic CPT1A enzyme activity; D: Hepatic *Acads*, *Acadm*, *Acadl*, and *Acadvl* mRNA expression. $n = 3-5$, $\bar{x} \pm SEM$. ** $P < 0.01$ vs MCS group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$, #### $P < 0.001$ vs MCD group

($P < 0.05$)。以上结果提示, PHY 在体外也能提高 CPT1A 蛋白表达水平及其酶活力。

5 PHY 改善 NAFLD 病变中肝细胞线粒体功能障碍

CPT1A 位于线粒体, 是脂肪酸 β 氧化的关键限速酶。根据上述结果可知, PHY 具有提升 CPT1A 酶活力, 促进线粒体 β 氧化, 减少 NAFLD 小鼠肝脏中的脂质累积的潜力。那么 PHY 是否还能改善线粒体功能? 接着采用免疫荧光手段对 L-02 细胞进行染色, Mito-Tracker 结果如图 5A 所示, NEFA 刺激后 L-02 细胞内线粒体膜电位显著下降 ($P < 0.001$), 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PHY 能显著提高 L-02 细胞中降低的线粒体膜电位 ($P < 0.05$)。在体外使用 Seahorse XFe96 细胞能量代谢分析仪检测 NEFA 刺激及给药后 L-02 细胞的线粒体功能。结果如图 5B 所示, NEFA 刺激后 L-02 细胞中线粒体基础呼吸能力、最大呼吸能力、储备呼吸能力和 ATP 合成能力均显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$), 而给予 PHY (10 和 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 能显著逆转 NEFA 诱导的线粒体基础呼吸能力、最大呼吸能力和 ATP 合成能力的降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 同时仅有 PHY (25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 能显著逆转 NEFA 诱导的储备呼吸能力

降低 ($P < 0.05$)。但不同浓度的 PHY (10 和 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 对 NEFA 引发的线粒体质子漏水平均无改善作用。线粒体 mtDNA 水平检测及线粒体生物发生相关基因表达分析的结果显示 (图 5C、D), PHY 并不影响肝细胞线粒体生成, 即对肝细胞中线粒体总量没有影响。此结果提示, PHY 具有提高线粒体膜电位, 改善线粒体功能障碍的作用。

6 PHY 促进 MCD 诱导 NAFLD 小鼠肝脏中脂解酶活力

除促进脂肪酸 β 氧化外, 调节脂肪酶活性同样对脂肪分解代谢具有重要作用。如图 6A 所示, PHY 对脂肪酶 A (lipase A, *Lipa*) 基因表达无明显影响, 而 PHY (5 和 20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 能逆转 MCD 饲料诱导的脂肪酶 C (lipase C, *Lipc*) 基因表达的降低 ($P < 0.05$)。如图 6B 所示, 与 MCD 组相比, PHY (5 和 20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 均能显著提高 NAFLD 小鼠肝脏中脂肪酶的活性 ($P < 0.01$)。上述结果提示, PHY 可能通过增加肝脏脂解酶的表达, 增加其含量并提高脂解酶活性, 进而促进甘油三酯的分解。

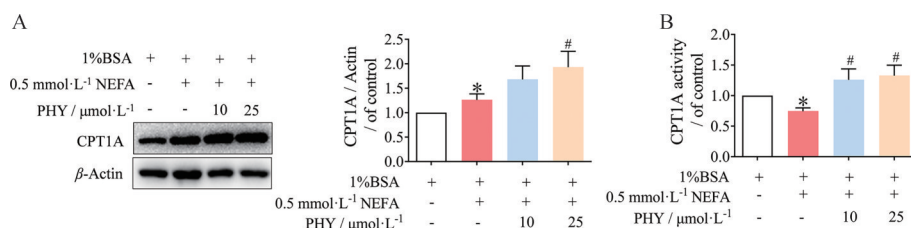


Figure 4 The effect of PHY on CPT1A protein expression and enzyme activity *in vitro*. A: CPT1A protein expression in L-02 cells; B: Enzyme activity of CPT1A in L-02 cells. $n = 3-4$, $\bar{x} \pm SEM$. * $P < 0.05$ vs BSA group; # $P < 0.05$ vs NEFA group. BSA: Bovine serum albumin

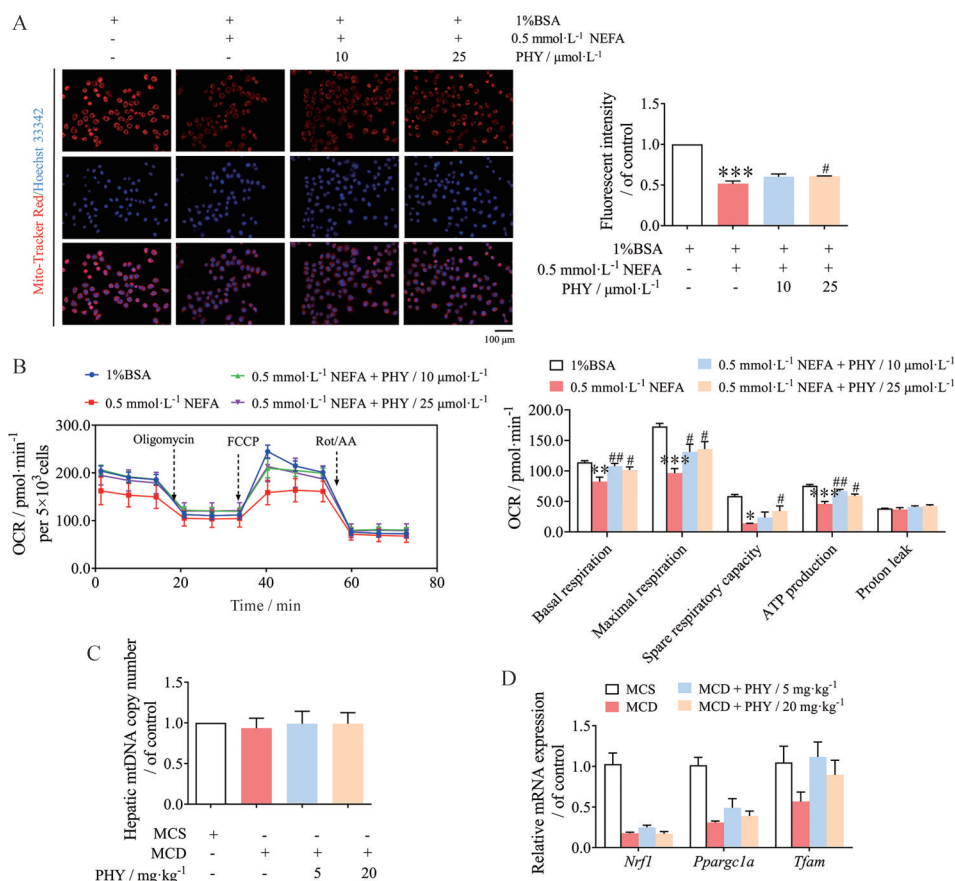


Figure 5 The effect of PHY on mitochondrial function and mitochondrial quantity. A: Mito-tracker red staining (200 \times); B: Detection of mitochondrial energy metabolism in L-02 cells; C: Hepatic mtDNA copy numbers; D: Hepatic *Nrf1*, *Ppargc1a*, and *Tfam* mRNA expression. $n = 3-5$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs BSA group or MCS group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$ vs NEFA group or MCD group. OCR: Oxygen consumption rate; FCCP: Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone; AA: Antimycin A

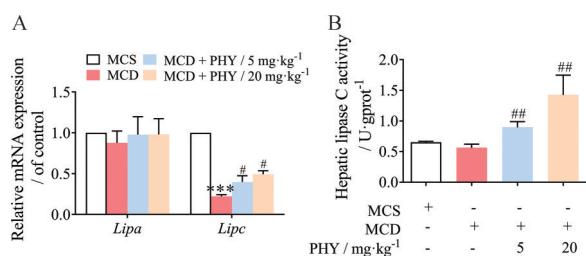


Figure 6 The effect of PHY on hepatic lipase enzyme activity in MCD-induced NAFLD mice. A: Expression of lipase enzyme-related gene in liver; B: Hepatic lipase C activity. $n = 4-6$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$. *** $P < 0.001$ vs MCS group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs MCD group

讨论

随着人们生活水平的提高以及生活方式的改变,全世界范围内NAFLD的患病率逐年升高。据预测,到2023年,全世界范围内约有29.8%的人口患有NAFLD^[6,22]。NAFLD已成为全球最常见的慢性肝病之一,如得不到及时干预,将导致其最终发展为终末期肝病,严重威胁患者生命健康。目前,临床上尚无安全有效的NAFLD治疗药物。因此,针对NAFLD的新药

研发是当前亟需解决的问题之一。

NAFLD最主要的病征是肝脏脂肪蓄积,其一方面加剧了脂质过氧化产物的生成,另一方面引发氧化损伤和炎症的级联反应^[23,24],由此可以发现减少脂肪累积是延缓NAFLD恶化的重要手段之一。通过分析小鼠肝脏病理切片,本研究发现MCD饲养6周能够使小鼠肝脏出现与临床NAFLD患者相似的病理变化,即肝脏中出现大量脂肪空泡,肝细胞排列疏松以边缘不清晰,并伴有一定程度的炎症反应;给予PHY(5和20 mg·kg⁻¹)治疗4周能够显著改善肝脏病理学变化,主要表现为肝脏中脂肪空泡明显减少,同时通过对肝脏中TG及NEFA定量检测,发现PHY给药后能显著降低肝脏脂肪含量。病理切片及生化指标结果均提示PHY具有改善肝脏脂肪堆积的作用。

肝脏脂肪酸代谢主要依赖线粒体脂肪酸 β 氧化^[25],短链脂肪酸主要通过扩散的方式进入线粒体,大部分长链脂肪酸需要借助于CPT家族转运至线粒体中,进而参与 β 氧化,因此被认为是 β 氧化的限速酶^[26]。

已有研究指出抑制 CPT1A 能促进 NAFLD 进程^[27], 而激活 CPT1A 则能有效地改善肝细胞的脂质累积^[28]。Western blot 结果表明 PHY 能提升 CPT1A 蛋白表达水平, 而其对 NAFLD 小鼠肝脏 *Cpt1a* 基因表达水平并无影响, 提示 PHY 并不是通过影响 CPT1A 的转录水平进而影响脂肪酸 β 氧化。CPT1A 以酶促反应的方式参与到线粒体 β 氧化反应中, 酶活力是其发挥作用的关键因素。CPT1A 酶活力的结果显示, PHY 能提高其酶活力。酰基辅酶 A 脱氢酶参与线粒体 β 氧化过程中第一次脱氢反应^[29], 影响 β 氧化的起始环节。Real-time PCR 结果提示, PHY 给药组均能提高 *Acadyl* 等基因表达。综合体内结果可知, PHY 可能是通过提高 CPT1A 蛋白表达及增强其酶活力, 促进线粒体 β 氧化相关基因表达, 改善肝脏脂肪酸代谢。在体外采用 OA:PA=2:1 的 0.5 mmol·L⁻¹ NEFA 刺激 L-02 细胞作为 NAFLD 的体外模型, CPT1A 蛋白及酶活力结果均显示出 PHY 在体外也具有与体内一致的作用。以上结果提示, PHY 具有调节 CPT1A 促进肝脏脂肪酸 β 氧化, 改善 NAFLD 的作用。

临床上, NAFLD 患者肝组织中往往表现出不同程度的线粒体损伤、呼吸链活性下降、ROS 过量生成、线粒体 DNA 缺失等^[30]。线粒体功能缺失与 NAFLD 之间存在密切的关系^[31], 有研究表明肝脏线粒体是治疗 NAFLD 的一个重要潜在靶点^[32]。现阶段针对线粒体的治疗手段主要包括: 增加线粒体数量和提高线粒体功能^[33]。Mito-tracker red 荧光结果显示 NEFA 会导致线粒体膜电位降低, 即脂肪酸能诱导线粒体损伤; 而 PHY (25 μ mol·L⁻¹) 能够逆转这种线粒体损伤。Seahorse 结果提示, PHY (25 μ mol·L⁻¹) 给药后能提升线粒体基础呼吸能力、最大呼吸能力、储备呼吸能力和 ATP 合成能力, 但是其对线粒体质子漏无改善作用, 此结果提示, PHY 能改善线粒体功能, 促进线粒体有氧呼吸, 增加 ATP 的合成, 但 PHY 对线粒体将能量转化为热能无明显影响。通过检测线粒体 mtDNA, 发现 PHY 并不能提高线粒体 mtDNA 水平, 对调控线粒体生物发生相关基因进行检测得到相同的结果, 即 PHY 不能增加线粒体数量。 β 氧化的底物主要是游离脂肪酸, 肝脏中游离脂肪酸主要由脂肪酶将 TG 脂解为游离脂肪酸及甘油^[27], 本研究通过检测 NAFLD 小鼠肝脏脂肪酶相关基因及酶活力发现, PHY 给药后基因表达和脂解酶活力均上调, 提示 PHY 可能通过提高肝脏脂解酶基因表达、提高其酶活力, 促进 TG 分解。以上结果提示, PHY 可逆转 MCD 造模小鼠肝脏中的线粒体损伤, 改善线粒体功能, 促进肝脏中脂肪酸的 β 氧化代谢, 还能够提高脂解酶活力, 促进肝脏中 TG 的分解。

综上所述, 本研究发现大黄素甲醚可以提升肝脏脂解酶活性, 加速 NAFLD 病变肝脏中 TG 的分解代谢; 抑制线粒体损伤, 改善线粒体功能, 提升 CPT1A 酶活力, 加速线粒体中脂肪酸的 β 氧化代谢, 降低肝脏脂质堆积, 改善 NAFLD 病变。本研究为大黄素甲醚作为 NAFLD 防治药物的进一步研发奠定了基础。

作者贡献: 张进宇负责完成各种检测实验、采集数据、分析数据和撰写文章; 张少波负责动物实验和分析数据; 徐红负责指导实验方案; 欧阳豪负责指导实验方案和文章的修改; 季莉莉负责指导实验方案、文章的审阅和修改、提供实验经费。

利益冲突: 本研究与任何组织和个人均不存在利益冲突。

References

- [1] Cotter TG, Rinella M. Nonalcoholic fatty liver disease 2020: the state of the disease [J]. *Gastroenterology*, 2020, 158: 1851-1864.
- [2] Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes [J]. *Hepatology*, 2016, 64: 73-84.
- [3] Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies [J]. *Nat Med*, 2018, 24: 908-922.
- [4] Loomba R, Friedman SL, Shulman GI. Mechanisms and disease consequences of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Cell*, 2021, 184: 2537-2564.
- [5] Rinella ME. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review [J]. *JAMA*, 2015, 313: 2263-2273.
- [6] Zhou JH, Zhou F, Wang WX, et al. Epidemiological features of NAFLD from 1999 to 2018 in China [J]. *Hepatology*, 2020, 71: 1851-1864.
- [7] Liu HH, Cao YX, Sun D, et al. Impact of non-alcoholic fatty liver disease on cardiovascular outcomes in patients with stable coronary artery disease: a matched case-control study [J]. *Clin Transl Gastroenterol*, 2019, 10: e00011.
- [8] Paternostro R, Trauner M. Current treatment of non-alcoholic fatty liver disease [J]. *J Intern Med*, 2022, 292: 190-204.
- [9] Yang YY, Xie L, Zhang NP, et al. Updates on novel pharmacotherapeutics for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43: 1180-1190.
- [10] Chao HW, Chao SW, Lin H, et al. Homeostasis of glucose and lipid in non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 298.
- [11] Khan RS, Bril F, Cusi K, et al. Modulation of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Hepatology*, 2019, 70: 711-724.
- [12] Xu HE, Guo JS. All about NASH: disease biology, targets, and opportunities on the road to NASH drugs [J]. *Acta Pharmacol*

- Sin, 2022, 43: 1101-1102.
- [13] Mashek DG. Hepatic fatty acid trafficking: multiple forks in the road [J]. *Adv Nutr*, 2013, 4: 697-710.
- [14] Cusi K. Role of insulin resistance and lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis [J]. *Clin Liver Dis*, 2009, 13: 545-563.
- [15] Gonzalez A, Huerta-Salgado C, Orozco-Aguilar J, et al. Role of oxidative stress in hepatic and extrahepatic dysfunctions during nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020: 1617805.
- [16] Schlaepfer IR, Joshi M. CPT1A-mediated fat oxidation, mechanisms, and therapeutic potential [J]. *Endocrinology*, 2020, 161: bqz046.
- [17] Dai JY, Liang K, Zhao S, et al. Chemoproteomics reveals baicalin activates hepatic CPT1 to ameliorate diet-induced obesity and hepatic steatosis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115: E5896-E5905.
- [18] Adnan M, Rasul A, Hussain G, et al. Physcion and physcion 8-*O*-beta-*D*-glucopyranoside: natural anthraquinones with potential anticancer activities [J]. *Curr Drug Targets*, 2021, 22: 488-504.
- [19] Sheka AC, Adeyi O, Thompson J, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: a review [J]. *JAMA*, 2020, 323: 1175-1183.
- [20] Liang K. Mitochondrial CPT1A: insights into structure, function, and basis for drug development [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1160440.
- [21] Weber M, Mera P, Casas J, et al. Liver CPT1A gene therapy reduces diet-induced hepatic steatosis in mice and highlights potential lipid biomarkers for human NAFLD [J]. *FASEB J*, 2020, 34: 11816-11837.
- [22] Le MH, Yeo YH, Li XH, et al. 2019 global NAFLD prevalence: a systematic review and meta-analysis [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2022, 20: 2809-2817.e28.
- [23] Shi YW, Fan JG. Current status and challenges in the drug treatment for fibrotic nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43: 1191-1199.
- [24] Begriche K, Massart J, Robin MA, et al. Mitochondrial adaptations and dysfunctions in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Hepatology*, 2013, 58: 1497-1507.
- [25] Alves-Bezerra M, Cohen DE. Triglyceride metabolism in the liver [J]. *Compr Physiol*, 2017, 8: 1-8.
- [26] Houten, SM, Violante S, Ventura FV, et al. The biochemistry and physiology of mitochondrial fatty acid β -oxidation and its genetic disorders [J]. *Annu Rev Physiol*, 2016, 78: 23-44.
- [27] Kim S, Lee I, Piao SY, et al. miR204 potentially promotes non-alcoholic fatty liver disease by inhibition of CPT1A in mouse hepatocytes [J]. *Commun Biol*, 2022, 5: 1002.
- [28] Fang K, Wu F, Chen G, et al. Diosgenin ameliorates palmitic acid-induced lipid accumulation via AMPK/ACC/CPT-1A and SREBP-1c/FAS signaling pathways in L02 cells [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2019, 19: 255.
- [29] Nguyen P, Leray V, Diez M, et al. Liver lipid metabolism [J]. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, 2008, 92: 272-283.
- [30] Ramanathan R, Ali AH, Ibdah JA. Mitochondrial dysfunction plays central role in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 7280.
- [31] Dabravolski SA, Bezsonov EE, Orekhov AN. The role of mitochondria dysfunction and hepatic senescence in NAFLD development and progression [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 142: 112041.
- [32] Fromenty B, Roden M. Mitochondrial alterations in fatty liver diseases [J]. *J Hepatol*, 2023, 78: 415-429.
- [33] Prasun P. Mitochondrial dysfunction in metabolic syndrome [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2020, 1866: 165838.