

大萼金丝桃素 B 抑制 mTORC1 信号通路改善非酒精性脂肪肝炎的作用和机制研究

张艳秋[#], 何蒙蒙[#], 李学炎, 徐文军, 张浩*

(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, 江苏省天然活性物质发现与研究重点实验室, 江苏南京 211198)

摘要: 非酒精性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH) 全球发病率持续攀升, 其发病机制复杂, 临床上尚无有效治疗手段。前期研究成果显示, RNA 解旋酶 DDX 蛋白 5 (DEAD box protein 5, DDX5) 可显著缓解小鼠 NASH 进程, 本研究对课题组天然产物库进行筛选, 发现中药黄花香 (*Hypericum beanii* N. Robson) 活性成分大萼金丝桃素 B (hypercalin B, HB) 可剂量依赖性上调 DDX5 蛋白表达量。本实验通过构建棕榈酸 (palmitic acid, PA) 刺激的 NASH 体外模型以及胆碱-蛋氨酸缺乏饮食 (methionine- and choline-deficient diet, MCD) 诱导的 NASH 动物模型, 采用不同浓度的 HB 处理, 考察 HB 缓解 NASH 进程的效果及作用机制。本文中所有动物实验都获得中国药科大学伦理学委员会批准 (批准号: 2021-02-003)。体外模型结果显示, HB 可显著减少游离脂肪酸 (free fatty acid, FFA) 诱导的细胞内脂质沉积。动物实验结果显示, HB 可显著减少 NASH 小鼠肝脏中脂质沉积; 降低血清谷草转氨酶 (aspartate transaminase, AST) 和谷丙转氨酶 (alanine transaminase, ALT) 水平, 改善肝损伤; 减少肝脏促炎因子白介素 6 (interleukin 6, IL-6)、白介素 1 β (interleukin 1 β , IL-1 β) 和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF α) 等 mRNA 表达量, 抑制肝脏炎症激活。进一步研究表明, HB 可减少雷帕霉素靶蛋白 (mechanistic target of rapamycin, mTOR) 磷酸化水平, 降低脂肪酸合成关键蛋白固醇调节元件结合蛋白 1 (sterol regulatory element-binding protein 1, SREBP1) 和脂肪酸合成酶 (fatty acid synthase, FASN) 表达量, 从而改善脂代谢, 缓解 NASH 进程, 且 HB 该作用依赖于 DDX5。综上, HB 通过上调 DDX5 蛋白抑制雷帕霉素靶蛋白复合物 1 (mechanistic target of rapamycin complex 1, mTORC1) 信号通路激活, 改善脂代谢紊乱、抑制炎症, 在体内外表现出良好的抗 NASH 活性。

关键词: 非酒精性脂肪肝炎; 大萼金丝桃素 B; 雷帕霉素靶蛋白复合物 1; 脂代谢; 炎症

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)08-2391-11

Hypercalin B alleviates nonalcoholic steatohepatitis progression via suppressing mTORC1 signaling pathway

ZHANG Yan-qiu[#], HE Meng-meng[#], LI Xue-yan, XU Wen-jun, ZHANG Hao*

(Jiangsu Key Laboratory of Bioactive Natural Product Research, State Key Laboratory of Natural Medicines, School of Traditional Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

Abstract: The global incidence rate of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) continues to rise. The pathogenesis of NASH is complex, and there is no effective clinical treatment. Previous study has shown that DEAD box protein 5 (DDX5) can significantly alleviate the NASH process in mice. This study screened the natural product library of the research group and found that the active compound hypercalin B (HB) in *Hypericum beanii*

收稿日期: 2023-04-28; 修回日期: 2023-06-30.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81872889, 82074068); 江苏省自然科学基金资助项目 (BK20221052).

[#]并列第一作者.

*通讯作者 Tel: 86-25-83271402, E-mail: zhanghao@cpu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0543

N. Robson, a traditional Chinese medicine, can upregulate the expression of DDX5 protein in a dose-dependent manner. In this study, an *in vitro* model of NASH stimulated by palmitic acid (PA) and an animal model of NASH induced by the methionine- and choline-deficient diet (MCD) were constructed. Different concentrations of HB were used to investigate the effect and mechanism of HB in alleviating NASH progression. All animal experiments in this paper were approved by the Ethics Committee of China Pharmaceutical University (NO: 2021-02-003). *In vitro* model results showed that HB significantly reduced the intracellular lipid deposition induced by free fatty acid (FFA). Animal experiments showed that HB improved liver injury by significantly reducing lipid accumulation in the liver of NASH mice, and reducing serum aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT) levels. Moreover, HB could inhibit liver inflammation by reducing the mRNA levels of liver pro-inflammatory cytokines including interleukin 6 (IL-6), interleukin 1 β (IL-1 β), and tumor necrosis factor α (TNF α). Further research showed that HB could reduce the phosphorylation level of the mechanistic target of rapamycin (mTOR) and reduce the expression of sterol regulatory element binding protein 1 (SREBP1) and fatty acid synthase (FASN), thereby improving lipid metabolism and alleviating NASH progression, and the effects of HB against NASH were dependent on DDX5. In conclusion, HB can improve lipid metabolism and inhibit inflammatory activation by suppressing mTORC1 pathway *via* upregulating DDX5 protein, and showed promising anti-NASH activity *in vitro* and *in vivo*.

Key words: nonalcoholic steatohepatitis; hypercalin B; mechanistic target of rapamycin complex 1; lipid metabolism; inflammation

非酒精性脂肪肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是指无大量饮酒和其他肝损伤因素所引起的、以肝脏中甘油三酯 (triglyceride, TG) 积累增多为特征的疾病, 包括非酒精性单纯性脂肪肝、非酒精性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH)、肝纤维化、肝硬化和肝癌。其中, NASH 以肝细胞大泡性脂肪变、小叶炎症和气球样变为特征, 并伴有不同程度纤维化, 可发展为肝硬化甚至肝癌^[1]。我国超过 2 亿人患有 NAFLD, 其中 20%~60% 是 NASH^[2], 且 NASH 已逐渐成为导致肝癌发生的最主要原因之一^[3]。早期, 人们提出“二次打击”理论解释 NASH 的发病机制, 但这种理论过于简单, 无法概括 NASH 的复杂性。由于多种平行因素与 NASH 的发生发展有关, 现如今, “多重打击”假说被越来越多的人接受, 即由遗传易感性、肥胖、脂代谢、先天性免疫、炎症、自噬、内质网应激等多种因素导致 NASH 产生^[4]。目前, 饮食控制和锻炼减重等方法是 NASH/NAFLD 治疗的基石, 但很多患者不易坚持; 此外有分析表明, 全球 NAFLD 人口中大约 40% 为非肥胖人群, 减重疗法并不完全适用^[5]。目前, 临床上尚无有效控制 NASH 及其进展的药物, 医疗需求远未得到满足。

雷帕霉素靶蛋白复合物 1 (mechanistic target of rapamycin complex 1, mTORC1) 信号通路在细胞中感应内外营养素、激素和能量变化, 调节细胞增殖、蛋白合成和自噬等生命活动上具有重要作用^[6]。脂代谢紊乱是 NASH 的一个重要表现形式和诱发因素, 而 mTORC1 是调控脂代谢的关键通路。mTORC1 通过

调控脂肪酸合成关键蛋白固醇调节元件结合蛋白 1 (sterol regulatory element-binding protein 1, SREBP1) 促进从头脂肪生成 (*de novo* lipogenesis, DNL), 从而导致脂代谢紊乱、产生脂毒性^[7]。脂毒性一方面可导致肝脏脂肪变, 另一面可激活炎症因子如肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF α) 和白介素 1 β (interleukin 1 β , IL-1 β) 等, 加剧肝脏炎症反应, 促进 NASH 进程^[8]。

中药及天然产物在 NASH 治疗中具有疗效显著、毒副作用小等明显优势。本课题组前期发现, RNA 解旋酶 DDX 蛋白 5 (DEAD box protein 5, DDX5) 可通过抑制 mTORC1 信号通路激活缓解 NASH 发生发展^[9], 基于此, 本课题组对实验室天然活性产物库进行了筛选, 发现大萹金丝桃素 B (hypercalin B, HB) 能够剂量依赖性地提高 DDX5 表达量。HB 由栽秧花根中分离得到, 有报道其具有一定的抗肿瘤作用^[10]。栽秧花 (*Hypericum bearii* N. Robson) 为藤黄科金丝桃属植物, 又名黄花香, 作为传统中药, 黄花香主要用于治疗肝炎、湿热黄疸、淋病、泄泻、痢疾、黄水疮等^[11,12]。为研究 HB 对 NASH 进程的影响, 本研究通过构建棕榈酸 (palmitic acid, PA) 刺激的细胞模型以及胆碱和蛋氨酸缺乏饮食 (methionine- and choline-deficient diet, MCD) 诱导的 NASH 小鼠模型, 在体内外考察 HB 的抗 NASH 作用及机制, 发现 HB 可显著抑制 mTORC1 信号通路激活并缓解小鼠 NASH 进程。本研究可为金丝桃属类化合物作为一种有前景的抗 NASH 先导化合物提供理论和实验依据。

材料与方 法

实验动物 雄性 C57BL/6J 小鼠 (6~8 周龄), 购买于北京维通利华实验动物技术有限公司南京分公司 [SPF 级, 合格证号: SCXK (苏) 2016-0003], 饲养于中国药科大学药学动物实验中心。所有动物实验都获得中国药科大学伦理学委员会批准 (批准号: 2021-02-003)。实验动物在 12 h 明暗交替的 SPF 级动物房中饲养, 自由进食饮水, 预适应环境 7 天。

药物与实验试剂 HB 来源于本实验室, 从栽秧花根中分离得到: 栽秧花干燥根切片后 95% 乙醇浸提 3 次, 回收溶剂至干后加水混悬, 加石油醚萃取 3 次。石油醚部位浓缩, 浸膏经硅胶柱色谱, 用石油醚/乙酸乙酯梯度洗脱, 收集纯乙酸乙酯段回收溶剂得浸膏。再经过中压制备柱色谱, 在 73% 甲醇/水洗脱条件时得到 HB 纯品。MCD (南通特洛菲饲料科技有限公司, 货号 TP3005); 血清谷草转氨酶 (aspartate transaminase, AST)、谷丙转氨酶 (alanine transaminase, ALT) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 货号分别为 C010-2-1、C009-2-1); ChamQ SYBR qPCR Master Mix、HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (南京诺唯赞生物科技股份有限公司, 货号分别为 Q321-02、R222-01); Total RNA 提取试剂盒 (上海奕杉生物科技有限公司, 货号 ES-RN001); DDX5 抗体 (货号 9877)、脂肪酸合成酶 (fatty acid synthase, FASN) 抗体 (货号 3180)、雷帕霉素靶蛋白 (mechanistic target of rapamycin, mTOR) 抗体 (货号 2983)、p-mTOR (Ser2448) 抗体 (货号 5536)、S6K 抗体 (货号 2708)、p-S6K (Thr389) 抗体 (货号 9208)、cell lysis buffer (货号 9803) (Cell Signaling Technology 公司); 固醇调节元件结合蛋白 1 (sterol regulatory element-binding protein 1, SREBP1) 抗体 (Santa Cruz Biotechnology 公司, 货号 sc-13551); Actin 抗体 (上海翊圣生物科技有限公司, 货号 30101ES60); PVDF 膜 (Bio-Rad 公司, 货号 1620177); EasySee Western blot kit (北京全式金生物技术股份有限公司, 货号 DW101-01)。

PA 诱导的细胞模型构建 配制 20% 无脂肪酸 BSA (d-BSA) 溶液, 溶剂为 PBS; 配制 20 mmol·L⁻¹ PA 溶液, 溶剂为 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液, 在 70~75 °C 水浴锅中溶解配制, 充分皂化; 取等体积的 d-BSA 溶液迅速加入保温的 PA 溶液中, 可置于 50~55 °C 水浴锅中助溶, 得到澄清的 10 mmol·L⁻¹ PA + 10% d-BSA 溶液; 将上述得到的溶液于超净台中过滤除菌, 即为棕榈酸脂性培养基 (PA 储存液), 分装后于 4 °C 保存; 对照组配制: 20% d-BSA 溶液混合等体积的 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液, 过滤除菌后分装保存; 取 PA 储存液及相应的对

照溶液, 用细胞培养基稀释成相应终浓度, 培养 16 h 后收细胞或进行其他实验操作。

FFA 诱导的细胞模型构建 配制 20% d-BSA 溶液, 溶剂为 PBS; 配制 20 mmol·L⁻¹ FFA [PA: OA (oleic acid, 油酸) = 1:2] 溶液, 溶剂为 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液, 在 70~75 °C 水浴锅中溶解配制, 充分皂化; 其余步骤同“PA 诱导的细胞模型构建”。

油红 O 染色 将细胞接种至合适的孔板, FFA 处理后多聚甲醛固定 20 min, 60% 异丙醇漂洗 1 min, 油红 O 染色液浸染 20 min, 60% 异丙醇漂洗 20 s 至间质清晰, 水洗 3 次后加入蒸馏水覆盖细胞, 采用倒置显微镜采集图像。

MCD 模型构建 采用 40 只 6~8 周龄的 C57BL/6J 雄鼠, 随机分为 5 组, 分别为对照饲料组 MCS (methionine and choline-sufficient diet)、模型组 MCD、MCD + HB 10 mg·kg⁻¹、MCD + HB 20 mg·kg⁻¹、MCD + HB 40 mg·kg⁻¹, 每组 8 只, 第 1 周过渡喂养, 第 3 周开始灌胃给予 HB, 4 周后, 取小鼠全血及肝脏进行后续分析 (表 1)。

Table 1 Feeding plan of methionine- and choline-deficient diet (MCD)-induced nonalcoholic steatohepatitis (NASH) model. MCS: Methionine- and choline-sufficient diet

	Day 1 and day 2	Day 3 and day 4	Day 5 and day 6	After day 7
MCS:MCD	3:1	2:1	1:1	All MCD

血清生化指标检测 全血室温静置 2 h, 4 °C、4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 后上清即为血清, 血清 ALT 和 AST 根据说明书按照标准操作程序测定。

肝脏病理切片 取小鼠肝脏固定于 4% 多聚甲醛 24 h 以上, 石蜡包埋后切片, 按照说明书进行 HE、油红 O、Masson 和 Sirius Red 染色, 显微镜观察并采集图像分析。

实时荧光定量 PCR (real time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 首先采用 RNA 提取试剂盒提取小鼠肝脏中总 RNA, Nanodrop 测定 RNA 浓度, 取 1 μg RNA 逆转录成 cDNA, 于 -20 °C 保存作后续实验用。将适量的 cDNA 用 RNase free dH₂O 稀释 5 倍, 按说明书配置好 PCR 反应液, 反应条件和引物序列如表 2、3 所示。

蛋白免疫印迹 (Western blot, WB) 在液氮速冻

Table 2 RT-qPCR reaction condition

Step	Temperature/°C	Time/s	Cycle
Initial denaturation	95	30	1
Denaturation	95	5	40
Annealing	60	10	
Extension	72	15	

Table 3 Primer sequences used in the experiments. *Il-6*: Interleukin 6; *Il-1β*: Interleukin 1β; *Tnfa*: Tumor necrosis factor α; *Il-10*: Interleukin 10

Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>Il-6</i>	AGTTGCCTTCTGGGACTGA	TCCACGATTTCCAGAGAAC
<i>Il-1β</i>	ATGAGAGCATCCAGCTCAA	TGAAGGAAAAGAAGGTGCTC
<i>Tnfa</i>	CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA	TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC
<i>Il-10</i>	TGAATTCCCTGGGTGAGAAG	CTCTTCACTGCTCCACTGC
<i>Actin</i>	GGCTGTATTCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT

后的小鼠肝脏或冰上收集的细胞中加入含有蛋白酶抑制剂的裂解液, 超声破碎, 4 °C、12 000 r·min⁻¹离心 10 min, 取上清液进行蛋白定量, 加入 2×上样缓冲液, 沸水煮 10 min 后进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转印至 PVDF 膜, 5% BSA 室温封闭 1 h, 一抗 4 °C 孵育过夜, 二抗室温孵育 2 h, 采用 ECL 显影液于 Bio-Rad ChemiDocXRS+成像系统中进行分析。

统计学方法 采用 GraphPad Prism 8 软件作统计分析, 数据用平均值 ± 标准误 (mean ± SEM) 表示, 两组数据采用 *t* 检验统计, 多组数据采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 统计, 分析结果*表示 $P < 0.05$, 有显著性差异; **表示 $P < 0.01$, 有特别显著性差异; ***表示 $P < 0.001$, 有极显著性差异。

结果

1 HB 显著减少细胞内脂质沉积

在 PA 刺激的 HepG2 细胞模型中给予不同剂量的 HB (图 1A), 发现 12.5 μmol·L⁻¹ 以下时不存在细胞毒 (图 1B), 进一步采用 WB 检测 DDX5 蛋白表达量, 发现 HB 可剂量依赖性地上调 DDX5 蛋白表达量 (图 1C)。进一步, 在 FFA 处理的 L02 细胞中给予 HB, 采用油红 O 染色显示细胞中脂滴大小和数量, 实验结果显示, 随着 FFA 浓度的提高, 细胞中脂质沉积明显加重, 而给予 HB 后, 则能明显减少细胞脂滴大小和数量 (图 1D)。在 HepG2 细胞中, 得到同样结果 (图 1E)。以上结果表明, HB 可显著减少 NASH 细胞模型中脂质沉积。

2 HB 改善 NASH 小鼠肝损伤和脂质沉积

首先考察 HB 的体内毒性, HE 染色结果显示, 高剂量下 HB 对小鼠各脏器无明显毒性 (图 2A)。进一步, 采用 MCD 构建 NASH 小鼠模型, 灌胃给予不同剂量的 HB, 小鼠肝脏 HE 染色结果显示, 模型组小鼠肝损伤严重, 给予 HB 后, 随着 HB 剂量的增加, 小鼠肝损伤程度逐渐减轻; 油红 O 染色结果显示, HB 能够明显减少小鼠肝脏中脂质沉积, 且具有剂量依赖性 (图 2B)。血清 AST 和 ALT 结果同样表明, HB 能够明显缓解 NASH 小鼠肝损伤 (图 2C、D)。以上结果表明, HB 能够明显缓解 MCD 诱导的 NASH 小鼠模型肝损伤及

脂质沉积。

3 HB 改善 NASH 小鼠肝纤维化及炎症反应

NASH 发病机制复杂, 其核心除脂质沉积外, 纤维化和炎症激活同样是驱动 NASH 进程的重要因素。通过对小鼠肝组织切片进行 Masson 和 Sirius red 染色发现, 对照组中几乎没有胶原纤维沉积, 模型组中胶原沉积较多, 给予 HB 后胶原染色面积明显减少, 且高剂量组的改善效果更为明显 (图 3A), 提示 HB 能够减轻 NASH 小鼠肝脏纤维化程度。通过检测小鼠肝脏中炎症相关基因发现, 模型组小鼠肝脏中促炎因子 *Il-6*、*Il-1β* 和 *Tnfa* 的 mRNA 表达量明显升高, 而抗炎因子 *Il-10* mRNA 表达量明显下降, 给予 HB 后则能够明显减少促炎因子 *Il-6*、*Il-1β* 和 *Tnfa* 表达量, 显著提高抗炎因子 *Il-10* 表达量, 并具有剂量依赖性, 提示 HB 能够缓解 NASH 小鼠肝脏炎症激活。以上结果表明, HB 通过减轻肝脏纤维化程度及抑制肝脏炎症激活, 从而缓解小鼠 NASH 进程。

4 HB 通过减少小鼠肝脏中脂肪酸合成减轻脂质沉积

脂代谢紊乱是 NASH 的一个重要表现形式和诱发因素, 其中脂肪酸合成关键基因 SREBP1 和 FASN 通过促进 DNL 干扰脂代谢从而促进肝脏脂肪变^[13]。本研究通过检测小鼠肝脏相关蛋白表达量, 发现随着 HB 剂量的提高, 虽然不影响 SREBP1 前体 (pSREBP1) 表达量, 但能明显减少成熟型 SREBP1 (mSREBP1) 的表达量, 同时显著降低 FASN 表达量 (图 4A、B), 表明 HB 可通过抑制脂肪酸合成从而改善 NASH 小鼠肝脏脂代谢, 减轻小鼠肝脏脂质沉积。另一方面, 在 PA 刺激的 HepG2 细胞中, HB 同样可以减少 mSREBP1 与 FASN 蛋白表达量, 且具有剂量依赖性 (图 4C、D)。

5 HB 通过抑制 mTORC1 信号通路激活改善 NASH 进程

前期通过筛选, 发现在 PA 刺激的细胞模型中, HB 能够剂量依赖性地上调 DDX5 蛋白表达量, 在 MCD 诱导的 NASH 小鼠模型中给予 HB 处理后, 随着剂量的增加, 小鼠肝脏中 DDX5 表达量随之升高 (图 5A、B)。进一步研究发现, HB 处理后不影响 mTOR 总蛋白表达量, 但可剂量依赖性抑制小鼠肝脏中 p-mTOR 表达水

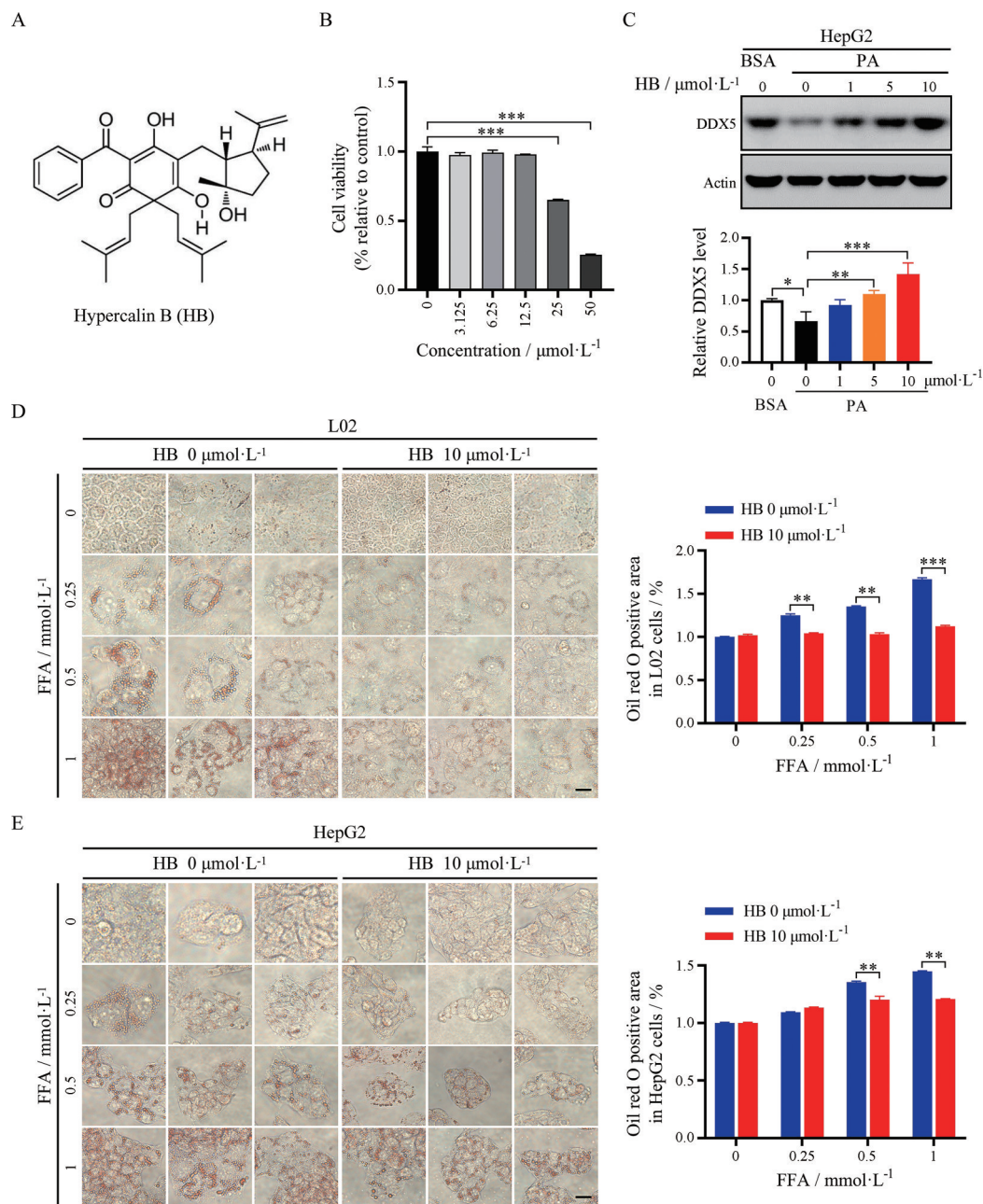


Figure 1 Hypercalin B (HB) significantly reduces lipid deposition in cells. A: Structure of HB; B: Cell viability of HepG2 cells after being treated with indicated concentration of HB for 48 h; C: Western blots and quantification of DEAD box protein 5 (DDX5) protein level in BSA- or palmitic acid (PA)-stimulated HepG2 cells treated with indicated concentrations of HB for 48 h; D, E: L02 (D) and HepG2 (E) cells were treated with DMSO or HB ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 48 h under different concentrations of free fatty acid (FFA) stimulation. Oil red O staining analyzed the degree of lipid accumulation. Scale bars, $50 \mu\text{m}$. $n = 3$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

平(图5A、B),表明HB可抑制小鼠肝脏中mTORC1信号通路激活;在PA刺激的HepG2细胞模型中,HB不影响mTOR和S6K总蛋白表达量,但可剂量依赖性降低p-mTOR和p-S6K表达量(图5C、D),表明HB可抑制PA诱导的NASH细胞模型中mTORC1信号通路激活。以上结果提示,HB通过抑制mTORC1信号通路激活从而缓解NASH发生发展。

进一步,在HepG2细胞中下敲DDX5后再给予

HB,检测mTORC1信号通路和脂肪酸合成相关蛋白表达量,发现下敲DDX5后HB对mTORC1信号通路及FASN、SREBP1的调控作用被逆转,说明HB改善NASH进程依赖于DDX5(图5E、F)。

讨论

NAFLD已成为最常见的慢性肝病,其中NASH是NAFLD进展期,可发展为肝纤维化、肝硬化甚至肝癌,

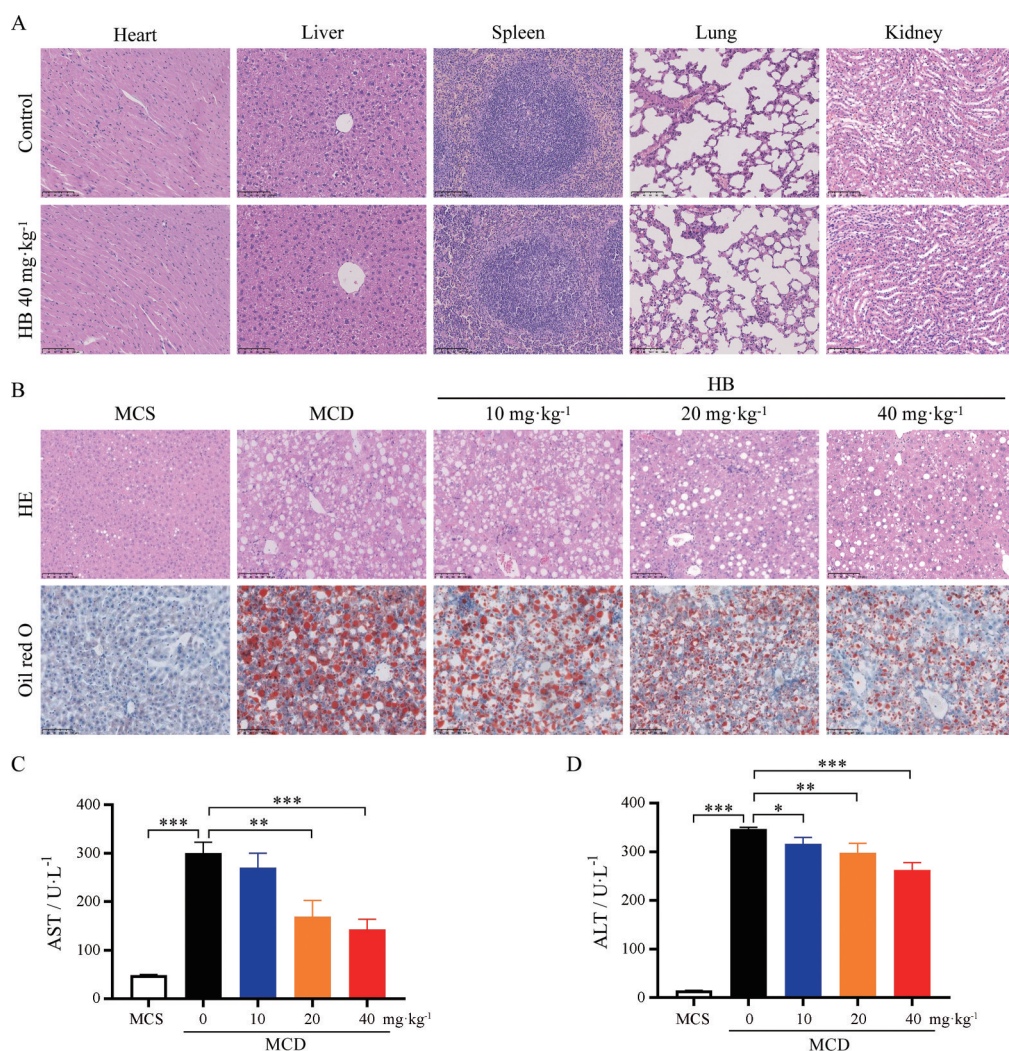


Figure 2 HB improved liver injury and lipid accumulation in MCD-induced NASH mouse model. A: HE staining of heart, liver, spleen, lung, and kidney in mice treated with HB (40 mg·kg⁻¹) under normal diet. Scale bars, 100 μm; B: Representative images of HE and oil red O staining in MCD mice treated with vehicle or different doses of HB (10, 20, 40 mg·kg⁻¹). Scale bars, 100 μm; C, D: Plasma aspartate transaminase (AST, C) and alanine transaminase (ALT, D) levels in MCD mice treated with vehicle or different doses of HB (10, 20, 40 mg·kg⁻¹). *n* = 8, $\bar{x} \pm \text{SEM}$. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001

目前尚无FDA正式批准治疗NASH的药物。NASH的发病机制较为复杂,经历了“双重打击”到“多重打击”学说的转变,其核心是脂质沉积、炎症和纤维化^[14]。

MCD模型是用于诱导小鼠NASH模型最常用的饮食模型之一,已使用40余年,其含有40%果糖和10%脂肪,但缺乏蛋氨酸和胆碱,导致脂肪酸摄入增加、极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)分泌减少,进而导致肝内脂质蓄积,可在最短的时间内产生最严重的NASH表型。小鼠喂食MCD饮食体重减轻,随着白色脂肪组织的减少,肝脏也会缩小^[15-17]。2~4周时,肝脏即发生大泡性脂肪变,此后巨噬细胞活化浸润肝脏、核转录因子κB(nuclear factor kappa B, NFκB)激活,伴随着促炎因子IL-6、转化生长因子β(transforming growth factor β, TGFβ)和TNFα的

增加,小鼠肝脏炎症反应增加,并可诱导肝脏纤维化^[18-20]。本研究发现,HB可缓解MCD诱导的小鼠肝脏脂质蓄积和炎症激活。

在NASH发展前期,细胞中TG大量累积从而导致脂代谢紊乱,除了FFA形成的TG,DNL也是TG的一个重要来源,DNL在NASH发生发展过程中具有重要作用,占人类受试者肝脏TG的26%^[21]。在DNL过程中,葡萄糖首先转化为乙酰辅酶A,乙酰辅酶A通过乙酰辅酶A羧化酶形成丙二酰辅酶A,脂肪酸合成限速酶FASN则催化乙酰辅酶A和丙二酰辅酶A合成PA,PA经硬脂酰辅酶A去饱和酶(stearoyl-CoA desaturase, SCD)形成单不饱和脂肪酸,继而通过甘油-3-磷酸酰基转移酶(glycerol-3-phosphate acyltransferase, GPAT)催化TG合成的初始步骤,最终经二酰基

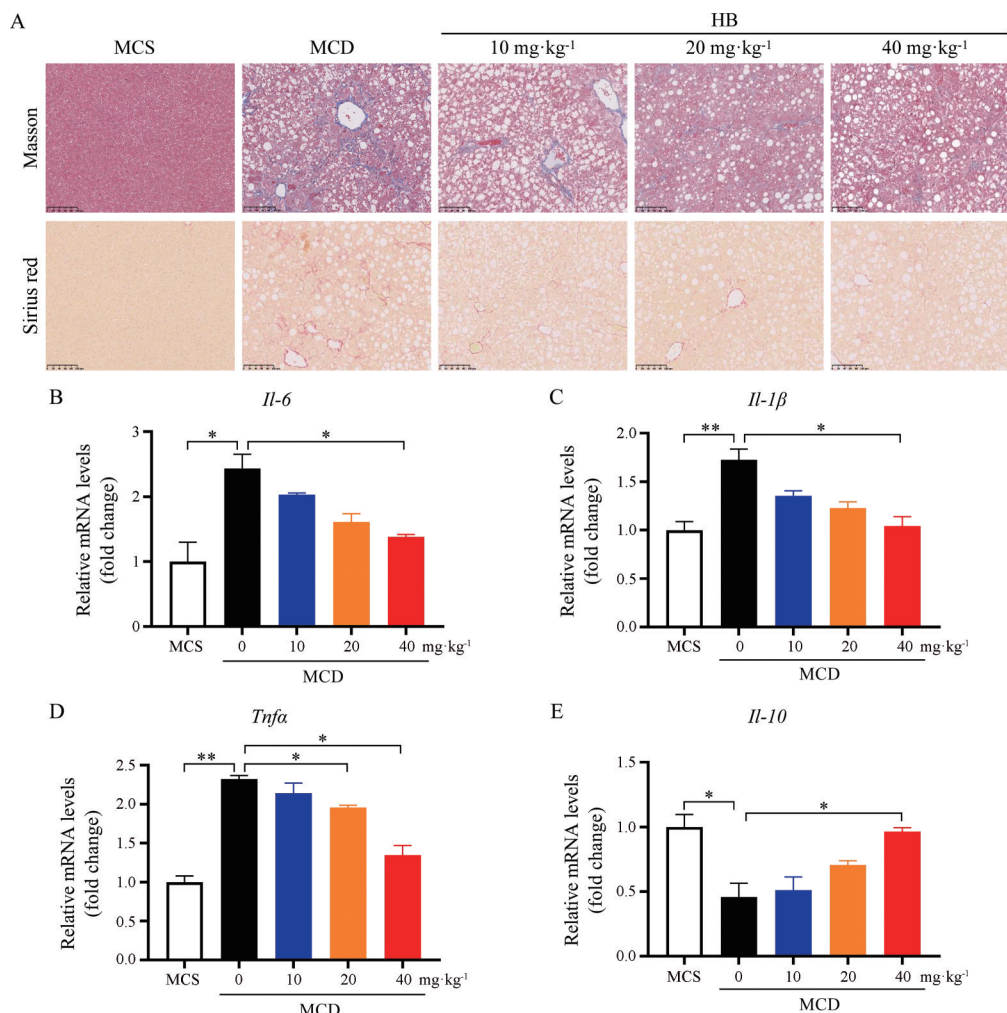


Figure 3 HB improves liver fibrosis and inflammatory response in NASH mice. A: Representative images of Masson and Sirius red staining in MCD mice treated with vehicle or different doses of HB (10, 20, 40 mg·kg⁻¹). Scale bars, 100 μm; B–E: Relative mRNA levels of *Il-6* (B), *Il-1β* (C), *Tnfa* (D), and *Il-10* (E) in the livers of MCD mice from the indicated groups. $n = 8$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

甘油酰基转移酶 (diacylglycerol acyltransferase, DGAT) 催化合成 TG^[22,23]。在 DNL 调节过程中, 核转录因子 SREBP1 具有重要作用, SREBP1 通过促进脂肪酸合成关键基因 FASN 等从而促进 DNL, 加剧脂代谢紊乱、形成脂肪变, 最终促进 NASH 进展^[24,25]。

mTORC1 作为调节细胞代谢的关键信号通路, 主要通过增加合成代谢和抑制分解代谢过程来调控细胞生长等生命活动^[26]。mTORC1 慢性激活可导致肥胖、肝脂肪变、胰岛素抵抗和纤维化等^[27]。mTORC1 抑制剂被认为是潜在的 NASH 和 HCC 治疗方法。然而, 肝细胞特异性缺失 mTORC1 活性可导致肝损伤和炎症, 并显著提高肝癌发生率, 因此, 直接靶向 mTORC1 可能并不是 NASH 或相关肝癌治疗的有效策略^[26]。在 NASH 发生发展过程中, 脂代谢紊乱具有重要作用, 而 mTORC1 是影响脂代谢过程的重要信号通路。mTORC1 信号通路过度激活导致下游 S6K 磷酸化水

平升高, 而 S6K 可调节 SREBP1c 活性从而促进 DNL, 干扰脂代谢促进肝脏脂肪变^[28]。除了异常增加的 DNL, 脂肪酸氧化不足也是另一个促进 NASH 进展的重要因素, 肝脏自噬水平对于维持脂肪酸氧化平衡具有重要作用^[29-32]。肝脏中脂肪酸主要以脂滴的形式贮存, 脂滴主要通过自噬以脂噬的形式降解, 因此, 提高脂噬水平能够促进脂肪酸氧化, 降低脂毒性, 而自噬缺陷则会导致脂滴异常蓄积, 脂毒性增加, 继而加重 NASH 发展^[33-36]。作为自噬的直接上游调控中心, mTOR 通过直接磷酸化 ULK1 抑制自噬小体形成从而降低自噬水平, 抑制脂噬发生, 最终促进 NASH 发展^[37,38]。另一方面, 炎症激活也是加重 NASH 进程的重要因素, 其中对 NLRP3 炎症小体的研究最为广泛^[39-41], 脂质过度积累可持续激活 NLRP3, 导致肝细胞损伤、细胞内容物 (如 ATP 等) 释放, ATP 又继续激活肝细胞和 Kupffer 细胞中 NLRP3 炎症小体, 形成恶性循

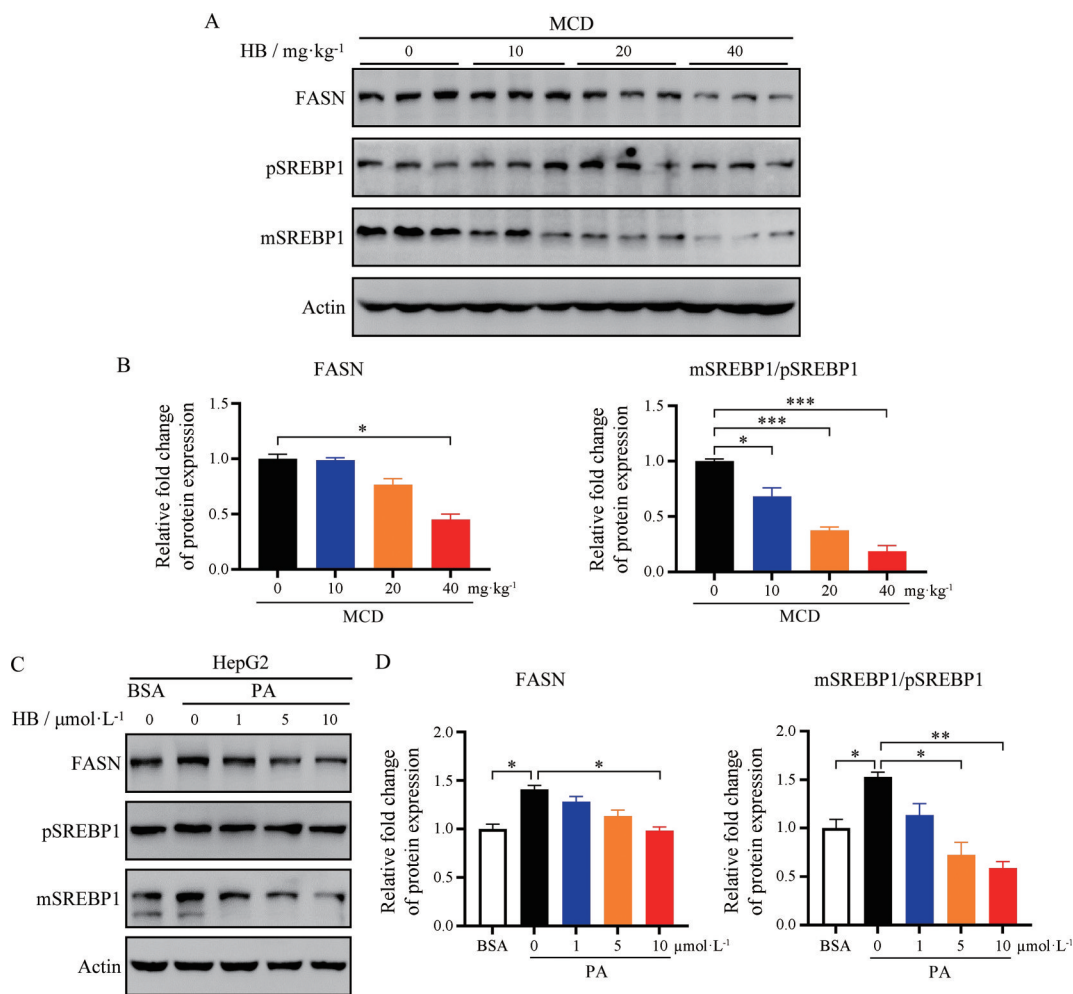


Figure 4 HB alleviates lipid accumulation by reducing fatty acid synthesis in NASH models. A, B: Western blots (A) and quantification (B) of fatty acid synthase (FASN) and sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1) protein levels in the livers of MCD mice treated with vehicle or different doses of HB (10, 20, 40 mg·kg⁻¹); C, D: Western blots (C) and quantification (D) of FASN and SREBP1 protein levels in BSA or PA-stimulated HepG2 cells treated with vehicle or different concentrations of HB (1, 5, 10 μmol·L⁻¹). *n* = 8 (A, B), *n* = 3 (C, D), $\bar{x} \pm \text{SEM}$. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001

环,加重 NASH 进程^[42,43]。NLRP3 炎症小体是一种细胞内多蛋白复合物,由 NLRP3、ACS 和 caspase-1 组成,它的激活使 caspase-1 将促炎因子 IL-1 β 和 IL-18 剪切为成熟形式释放出胞外,继而引发一系列炎症反应。在 NASH 患者和动物模型的肝脏中, NLRP3 和促炎因子 IL-1 β 的表达量显著升高^[44]。有研究报道, mTORC1 依赖的糖酵解能够促进 NLRP3 炎症小体激活^[45], 并且 NLRP3 和 mTOR 可直接相互作用调控炎症反应^[46], 这些都表明 mTORC1 与炎症发生之间存在密切联系。

在本课题组前期研究成果中,发现 DDX5 蛋白通过抑制脂肪酸合成关键基因 SREBP1、FASN 和 SCD,抑制 TG 合成关键基因 GPAT、DGAT, 以及提高肝脏自噬水平从而改善肝脏脂代谢,进一步研究发现 DDX5 通过招募 TSC1/2 复合物至 mTOR, 从而抑制肝脏 mTORC1 信号通路激活,改善脂代谢紊乱、增加自噬

活性、抑制 NLRP3 炎症小体激活,进而缓解 NASH 发生发展^[9]。本研究前期通过筛选,发现 HB 可剂量依赖性上调 NASH 小鼠和细胞模型中 DDX5 表达量,并可抑制 mTORC1 信号通路激活;在细胞中下敲 DDX5 后再给予 HB,发现 HB 失去了对 mTORC1 信号通路和脂肪酸合成相关蛋白的调控作用,提示 HB 通过上调 DDX5 从而抑制 mTORC1 信号通路激活,进而改善 NASH 进程。

综上所述,HB 通过上调 DDX5 蛋白表达量抑制 mTORC1 信号通路激活,从而抑制脂肪酸合成途径关键蛋白表达,改善脂代谢,并可减轻炎症反应,在体内外水平表现出良好的抗 NASH 作用。本研究为中药黄花香在临床中治疗 NASH 提供了理论和实验依据。

作者贡献: 张艳秋和何蒙蒙负责细胞和动物实验、数据分析及文章撰写;李学炎负责 HB 的提取分离和制备;徐文

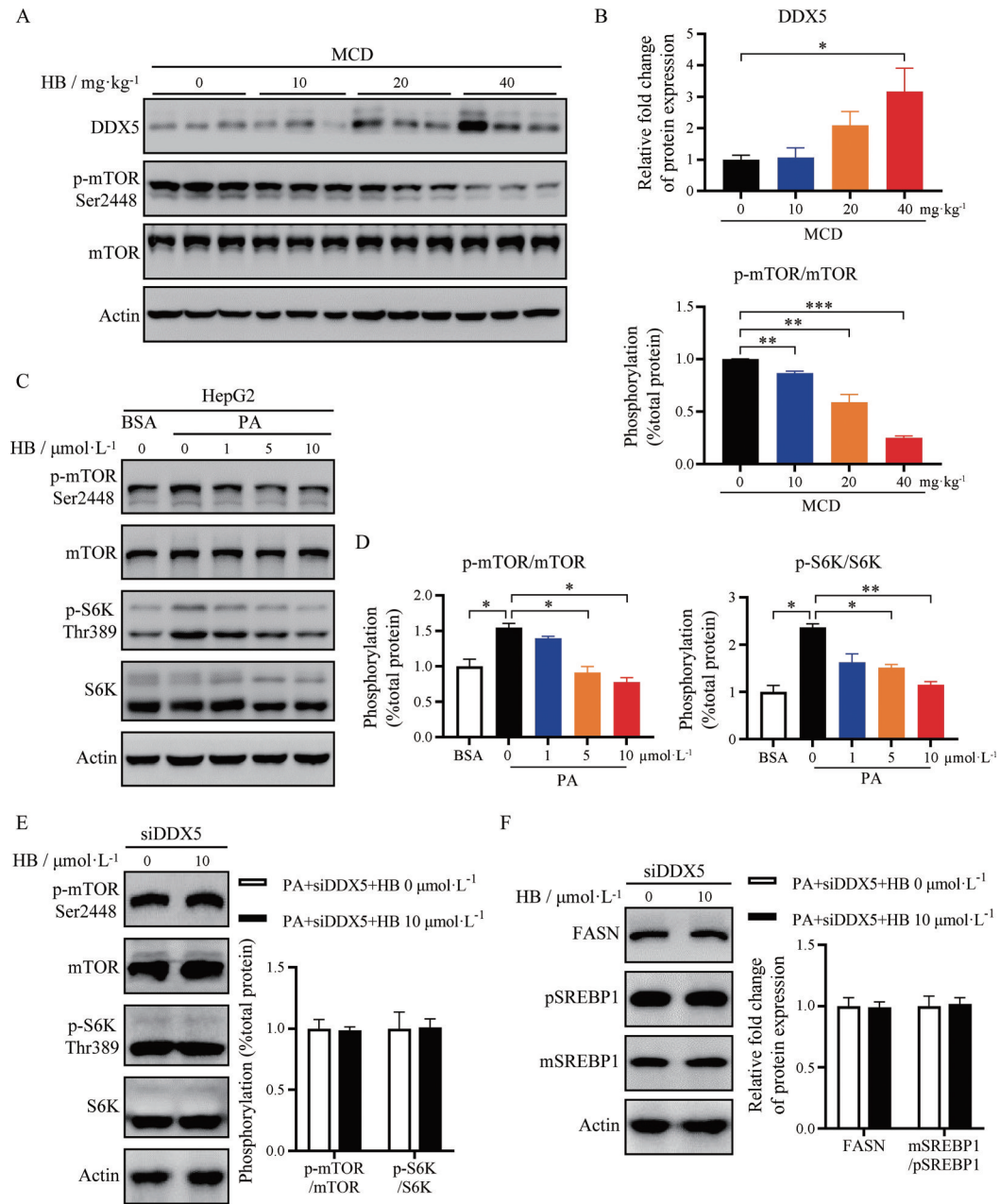


Figure 5 HB alleviates NASH progression *via* inhibiting mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling. A, B: Western blots (A) and quantification (B) of DDX5, mechanistic target of rapamycin (mTOR) and p-mTOR protein levels in the livers of MCD mice treated with vehicle or different doses of HB (10, 20, 40 mg·kg⁻¹); C, D: Western blots (C) and quantification (D) of p-mTOR, mTOR, p-S6K, and S6K protein levels in BSA- or PA-stimulated HepG2 cells treated with vehicle or different concentrations of HB (1, 5, 10 μmol·L⁻¹); E, F: Western blots and quantification of p-mTOR, mTOR, p-S6K, S6K (E), FASN, and SREBP1 (F) protein levels in HepG2 cells transfected with DDX5 siRNA and treated with DMSO or HB (10 μmol·L⁻¹) for 48 h under PA stimulation. *n* = 8 (A, B), *n* = 3 (C, D), $\bar{x} \pm \text{SEM}$. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001

军参与课题设计和指导; 张浩负责课题设计、指导和论文审阅。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Michelotti GA, Machado MV, Diehl AM. NAFLD, NASH and liver cancer [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013, 10: 656-665.

- [2] Zhou J, Zhou F, Wang W, et al. Epidemiological features of NAFLD from 1999 to 2018 in China [J]. *Hepatology*, 2020, 71: 1851-1864.

- [3] Huang DQ, Singal AG, Kono Y, et al. Changing global epidemiology of liver cancer from 2010 to 2019: NASH is the

- fastest growing cause of liver cancer [J]. *Cell Metab*, 2022, 34: 969-977.e2.
- [4] Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. *Metabolism*, 2016, 65: 1038-1048.
- [5] Ye Q, Zou B, Yeo YH, et al. Global prevalence, incidence, and outcomes of non-obese or lean non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2020, 5: 739-752.
- [6] Kim J, Guan KL. mTOR as a central hub of nutrient signalling and cell growth [J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21: 63-71.
- [7] Peterson TR, Sengupta SS, Harris TE, et al. mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway [J]. *Cell*, 2011, 146: 408-420.
- [8] Farrell GC, Van Rooyen D, Gan L, et al. NASH is an inflammatory disorder: pathogenic, prognostic and therapeutic implications [J]. *Gut Liver*, 2012, 6: 149-171.
- [9] Zhang Y, Ye S, Lu W, et al. RNA helicase DEAD-box protein 5 alleviates nonalcoholic steatohepatitis progression *via* tethering TSC complex and suppressing mTORC1 signaling [J]. *Hepatology*, 2023, 77: 1670-1687.
- [10] Decosterd LA, Stoeckli-Evans H, Chapuis JCC, et al. New cell growth-inhibitory cyclohexadienone derivatives from *Hypericum calycinum* L. [J]. *Helv Chim Acta*, 1989, 72: 1833-1845.
- [11] Editorial Committee of Flora of China. *Flora of China (中国植物志)* [M]. Beijing: Science and Technology Press, 1996: 8-71.
- [12] Chinese Materia Medica editorial Committee. *Chinese Herbal Medicine (中华本草)* [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999: 586-608.
- [13] Tessari P, Coracina A, Cosma A, et al. Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2009, 19: 291-302.
- [14] Hardy T, Oakley F, Anstee QM, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and disease spectrum [J]. *Annu Rev Pathol*, 2016, 11: 451-496.
- [15] Larter CZ, Yeh MM, Williams J, et al. MCD-induced steatohepatitis is associated with hepatic adiponectin resistance and adipogenic transformation of hepatocytes [J]. *J Hepatol*, 2008, 49: 407-416.
- [16] Hebbard L, George J. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2011, 8: 35-44.
- [17] Rinella ME, Elias MS, Smolak RR, et al. Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet [J]. *J Lipid Res*, 2008, 49: 1068-1076.
- [18] Dela Pena A, Leclercq I, Field J, et al. NF- κ B activation, rather than TNF, mediates hepatic inflammation in a murine dietary model of steatohepatitis [J]. *Gastroenterology*, 2005, 129: 1663-1674.
- [19] Yu J, Ip E, Dela Pena A, et al. COX-2 induction in mice with experimental nutritional steatohepatitis: role as pro-inflammatory mediator [J]. *Hepatology*, 2006, 43: 826-836.
- [20] Ip E, Farrell G, Hall P, et al. Administration of the potent PPAR α agonist, Wy-14,643, reverses nutritional fibrosis and steatohepatitis in mice [J]. *Hepatology*, 2004, 39: 1286-1296.
- [21] Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, et al. Sources of fatty acids stored in liver and secreted *via* lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115: 1343-1351.
- [22] Kawano Y, Cohen DE. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease [J]. *J Gastroenterol*, 2013, 48: 434-441.
- [23] Shimano H, Sato R. SREBP-regulated lipid metabolism: convergent physiology-divergent pathophysiology [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2017, 13: 710-730.
- [24] Xu X, So JS, Park JG, et al. Transcriptional control of hepatic lipid metabolism by SREBP and ChREBP [J]. *Semin Liver Dis*, 2013, 33: 301-311.
- [25] Gong Z, Tas E, Yakar S, et al. Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease in aging [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2017, 455: 115-130.
- [26] Umemura A, Park EJ, Taniguchi K, et al. Liver damage, inflammation, and enhanced tumorigenesis after persistent mTORC1 inhibition [J]. *Cell Metab*, 2014, 20: 133-144.
- [27] Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, et al. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults [J]. *New Engl J Med*, 2003, 348: 1625-1638.
- [28] Porstmann T, Santos CR, Griffiths B, et al. SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth [J]. *Cell Metab*, 2008, 8: 224-236.
- [29] Madrigal-Matute J, Cuervo AM. Regulation of liver metabolism by autophagy [J]. *Gastroenterology*, 2016, 150: 328-339.
- [30] Sahebkar A, Chew GT, Watts GF. New peroxisome proliferator-activated receptor agonists: potential treatments for atherogenic dyslipidemia and non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2014, 15: 493-503.
- [31] Barbier-Torres L, Fortner KA, Iruzubieta P, et al. Silencing hepatic MCJ attenuates non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) by increasing mitochondrial fatty acid oxidation [J]. *Nat Commun*, 2020, 11: 3360.
- [32] Tong L, Wang L, Yao S, et al. PPAR δ attenuates hepatic steatosis through autophagy-mediated fatty acid oxidation [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10: 197.
- [33] Yamaguchi K, Yang L, McCall S, et al. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Hepatology*, 2007, 45: 1366-1374.
- [34] Liu K, Qiu D, Liang X, et al. Lipotoxicity-induced STING1 activation stimulates mTORC1 and restricts hepatic lipophagy [J]. *Autophagy*, 2022, 18: 860-876.
- [35] Fuchs M, Sanyal AJ. Lipotoxicity in NASH [J]. *J Hepatol*, 2012, 56: 291-293.

- [36] Li S, Dou X, Ning H, et al. Sirtuin 3 acts as a negative regulator of autophagy dictating hepatocyte susceptibility to lipotoxicity [J]. *Hepatology*, 2017, 66: 936-952.
- [37] Kim J, Kundu M, Viollet B, et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of ULK1 [J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13: 132-141.
- [38] Moscat J, Diaz-Meco MT. Feedback on fat: p62-mTORC1-autophagy connections [J]. *Cell*, 2011, 147: 724-727.
- [39] Kubes P, Mehal WZ. Sterile inflammation in the liver [J]. *Gastroenterology*, 2012, 143: 1158-1172.
- [40] Mridha AR, Wree A, Robertson AAB, et al. NLRP3 inflammasome blockade reduces liver inflammation and fibrosis in experimental NASH in mice [J]. *J Hepatol*, 2017, 66: 1037-1046.
- [41] Szabo G, Petrasek J. Inflammasome activation and function in liver disease [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2015, 12: 387-400.
- [42] Csak T, Ganz M, Pespisa J, et al. Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells [J]. *Hepatology*, 2011, 54: 133-144.
- [43] Wan X, Xu C, Yu C, et al. Role of NLRP3 inflammasome in the progression of NAFLD to NASH [J]. *Can J Gastroenterol Hepatol*, 2016, 2016: 6489012.
- [44] Thomas H. NAFLD: a critical role for the NLRP3 inflammasome in NASH [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 14: 197.
- [45] Moon JS, Hisata S, Park MA, et al. mTORC1-induced HK1-dependent glycolysis regulates NLRP3 inflammasome activation [J]. *Cell Rep*, 2015, 12: 102-115.
- [46] Cosin-Roger J, Simmen S, Melhem H, et al. Hypoxia ameliorates intestinal inflammation through NLRP3/mTOR downregulation and autophagy activation [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 98.