

马里昔对酒精性脂肪肝的保护作用及机制[△]

牛广豪^{1*}, 徐俊驰², 顾利青¹, 许英¹, 顾宇人¹, 宋华峰^{2#}[1. 苏州市第五人民医院(苏州大学附属传染病医院)临床试验机构办公室, 江苏 苏州 215000; 2. 苏州市第五人民医院(苏州大学附属传染病医院)检验中心, 江苏 苏州 215000]

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2024)09-1044-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.09.04



摘要 **目的** 探究马里昔对酒精性脂肪肝(AFL)的保护作用及可能机制。**方法** 以高度白酒灌胃建立小鼠AFL模型,将小鼠按体重随机分为正常对照组($n=9$, 0.5%羧甲基纤维素钠溶液)、模型组($n=10$, 0.5%羧甲基纤维素钠溶液)和马里昔75、150 mg/kg组($n=9$);每天灌胃给药1次,连续30 d。末次给药后,测定小鼠肝组织中甘油三酯(TG)、丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)水平,观察其肝组织病理形态学变化,测定其肝组织中过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPAR α)、肉碱棕榈酰转移酶1(CPT-1)和磷脂酰甘油酰基转移酶(DGAT)蛋白表达水平。以乙醇诱导结合硫酸亚铁和油酸建立大鼠BRL肝细胞损伤模型,以3、6、12 $\mu\text{mol/L}$ 马里昔干预24 h,观察肝细胞的脂滴分布,测定细胞中TG、MDA、SOD水平及PPAR α 、CPT-1、DGAT蛋白表达;经MK886(PPAR α 抑制剂, 10 $\mu\text{mol/L}$)预处理后,将造模肝细胞给予12 $\mu\text{mol/L}$ 马里昔干预24 h,测定细胞中上述蛋白表达。**结果** 动物实验中,与模型组比较,马里昔75、150 mg/kg组小鼠肝脏脂肪变性程度显著减轻,TG、MDA水平和DGAT蛋白表达水平显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),SOD水平及PPAR α 、CPT-1蛋白水平表达水平显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。细胞实验中,3、6、12 $\mu\text{mol/L}$ 马里昔作用后可显著减少乙醇诱导肝细胞中脂质堆积,降低细胞中TG、MDA水平和DGAT蛋白表达水平($P<0.05$ 或 $P<0.01$),升高细胞中SOD水平及PPAR α 、CPT-1蛋白表达水平($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且在MK886预处理后马里昔对PPAR α 、CPT-1和DGAT蛋白表达的影响消失。**结论** 马里昔对AFL具有保护作用,其作用机制可能与抑制氧化应激损伤、改善PPAR α 介导的脂质代谢信号通路有关。

关键词 马里昔;酒精性脂肪肝;氧化应激;脂质代谢;过氧化物酶体增殖物激活受体 α

Protective effect of marein against alcoholic fatty liver and its mechanism

NIU Guanghao¹, XU Junchi², GU Liqing¹, XU Ying¹, GU Yuren¹, SONG Huafeng²[1. Clinical Trial Institution Office, the Fifth People's Hospital of Suzhou (the Affiliated Infectious Diseases Hospital of Soochow University), Jiangsu Suzhou 215000, China; 2. Inspection Center, the Fifth People's Hospital of Suzhou (the Affiliated Infectious Diseases Hospital of Soochow University), Jiangsu Suzhou 215000, China]

ABSTRACT **OBJECTIVE** To explore the protective effect of marein against alcoholic fatty liver (AFL) and its potential mechanisms. **METHODS** AFL mice model was established with strong wine by gavage. The mice were randomly divided into normal control group ($n=9$, 0.5% sodium carboxymethyl cellulose solution), model group ($n=10$, 0.5% sodium carboxymethyl cellulose solution) and marein 75 and 150 mg/kg groups ($n=9$). Mice were given relevant medicine intragastrically, once a day, for consecutive 30 days. After the last medication, the levels of triglyceride (TG), malondialdehyde (MDA), and superoxide dismutase (SOD) in liver tissue were determined, and hepatic histopathological changes of liver tissue were observed; the protein expression levels of peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α), carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1), and diacylglycerol acyltransferase (DGAT) were determined in liver tissue. BRL hepatocytes injury model was induced by ethanol combined with ferrous sulfate and oleic acid; after treatment with 3, 6 and 12 $\mu\text{mol/L}$ of marein for 24 h, the distribution of lipid droplets, the levels of TG, MDA and SOD and protein expressions of PPAR α , CPT-1 and DGAT in hepatocytes were examined.

△基金项目 国家自然科学基金青年项目(No.81900577);苏州市姑苏卫生人才科研项目(No.GSWS2022089);苏州市科技计划-医工结合协同创新研究项目(No.SLJ2022022)

* 第一作者 主管药师,硕士。研究方向:临床药理学。E-mail: ngh2367@suda.edu.cn

通信作者 副主任技师,硕士。研究方向:传染性疾病病原学诊断及临床药物耐药。E-mail: 506650847@qq.com

After pretreatment with MK886 (PPAR α inhibitor, 10 $\mu\text{mol/L}$), modeled hepatocytes were treated with 12 $\mu\text{mol/L}$ of marein for 24 h, and the protein expressions of PPAR α , CPT-1 and DGAT were determined. **RESULTS** As the results showed *in vivo*, compared with the model group, after treatment with 75 and 150 mg/kg of marein, the degree of steatosis was significantly reduced, and the levels of TG and MDA and

protein expression of DGAT were significantly decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$); the levels of SOD, protein expressions of PPAR α and CPT-1 were significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$). As the results showed *in vitro*, after treatment with 3, 6 and 12 $\mu\text{mol/L}$ of marein, the lipid accumulation of hepatocytes was significantly inhibited, and the levels of TG and MDA, protein expression of DGAT were significantly decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$), while the levels of SOD, protein expressions of PPAR α and CPT-1 were significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$). After MK886 pretreatment, the effects of marein on the above protein expressions were abolished. **CONCLUSIONS** Marein might exert a protective effect against AFL. The mechanisms might be related to inhibiting oxidative stress-mediated injury and improving PPAR α -mediated lipid metabolism signaling pathway.

KEYWORDS marein; alcoholic fatty liver; oxidative stress; lipid metabolism; PPAR α

长期大量饮酒会引起酒精性脂肪肝(alcoholic fatty liver, AFL)^[1]。AFL的发病机制非常复杂,由多种因素共同参与。其中,氧化应激和脂代谢异常在AFL的发生发展过程中具有重要作用^[2]。过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator-activated receptor α , PPAR α)是抑制肝脏脂质生成的关键蛋白,上调PPAR α 表达可以改善肝脏的脂代谢异常,减轻脂肪堆积^[3]。研究表明,AFL的发生可能与PPAR α 调控的脂代谢通路抑制密切相关^[4]。

马里昔的化学名为奥卡宁-4'-*O*-葡萄糖苷,是一种查尔酮类化合物,在两色金鸡菊头状花序的水和乙醇提取部位中含量最高^[5]。近年来国内外研究发现,马里昔具有较多有益的药理活性,如改善糖脂代谢^[6]、抗炎和抗氧化应激^[7]等。同时有研究表明,马里昔可减缓糖尿病所造成的肝脏损伤^[8]。本课题组前期研究已经证实,在缺氧诱导的心肌肥大细胞中,马里昔可以通过上调PPAR α 的表达进而改善其脂代谢异常^[9]。鉴于马里昔对肝损伤的减缓作用以及其抗氧化应激和改善PPAR α 介导的脂代谢异常的药理活性,本研究拟通过建立体内和体外AFL模型,探讨马里昔对AFL的影响,并从氧化应激和PPAR α 介导的脂代谢2个角度探究其抗AFL的可能作用机制,为进一步研究马里昔的药理作用提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有: Infinite M1000 Pro型全波长多功能酶标仪(瑞士Tecan公司), FJ-200型高速分散均质机(美国LI-COR公司), Power PAC 2000型电泳仪、ChemiDoc XRS型自动凝胶成像系统、电泳槽(美国Bio-Rad公司), Fresco 21型高速微量台式冷冻离心机(美国Thermo Fisher Scientific公司), CX31型倒置显微镜(日本Olympus公司)。

1.2 主要药品与试剂

本研究所用的主要药品与试剂有: 马里昔标准品(上海源叶生物科技有限公司, 批号B29210, 纯度 $\geq 98\%$), MK886(PPAR α 抑制剂)标准品(上海Med Chem Express公司, 批号HY-14166, 纯度 $\geq 99.7\%$), 高度白酒(北京红星股份有限公司, 酒精度: 52%vol), 油红O染色试剂盒(德国Sigma公司, 批号MAK194), 考马斯亮蓝蛋白、甘油三酯(triglyceride, TG)、丙二醛(malondialde-

hyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所, 批号分别为20230403、20230412、20230415、20230514), 兔源PPAR α 抗体、兔源肉碱棕榈酰转移酶1(carnitine palmitoyltransferase-1, CPT-1)抗体、兔源二脂酰甘油酰基转移酶(diacylglycerol acyltransferase, DGAT)抗体和兔源 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(英国Abcam公司, 批号分别为ab314112、ab220789、ab100982、ab8226), 辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(武汉Proteintech公司, 批号SA02502), ECL化学发光液(上海天能生命科学有限公司, 批号180-5001)。

1.3 动物

实验动物为SPF级健康雄性昆明小鼠, 共37只, 体重20~22 g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 实验动物生产许可证号为SCXK(沪)2022-0004。小鼠购入后, 饲养于苏州大学SPF级动物房内, 饲养环境温度(22 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度为55%、12 h光照/12 h黑暗循环。实验动物所有操作均严格按照苏州大学动物伦理委员会标准执行(伦理批件号: SUDA20230622A01)。

1.4 细胞

大鼠BRL肝细胞购自中国科学院细胞库。将细胞接种于含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的RPMI 1640培养基中, 并在饱和湿度、5%CO₂、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养。

2 方法

2.1 动物实验

2.1.1 小鼠AFL模型建立及分组、给药

在进行正式实验前, 小鼠进行环境适应性饲养2 d。然后按体重将小鼠随机分为正常对照组($n=9$)、模型组($n=10$)和马里昔75、150 mg/kg组($n=9$, 给药剂量根据相关文献报道^[10-11]及本课题组前期预实验结果确定; 以0.5%羧甲基纤维素钠溶液为溶剂进行药液配制, 马里昔母液质量浓度分别为3.75、7.5 mg/mL)。马里昔75、150 mg/kg组小鼠灌胃相应剂量的马里昔药液(0.02 mL/g), 正常对照组和模型组小鼠灌胃等体积0.5%羧甲基纤维素钠溶液, 每天1次, 持续30 d。每天完成给药30 min后, 模型组和各给药组小鼠均采用高度白酒灌胃30 d的方法建立AFL小鼠模型^[12]: 初始灌胃剂量为0.01 mL/g, 并在7 d内将剂量逐渐加大到0.015 mL/g; 正常对照组小

鼠灌胃相应剂量双蒸水。实验第30天取1只模型组小鼠,采用苏木素-伊红(HE)染色后观察其肝组织病理改变,以肝细胞出现脂滴沉积、脂肪空泡变性为造模成功判定标准。

2.1.2 取材及肝组织中TG、MDA和SOD水平测定

末次给药后,小鼠禁食不禁水12 h,称重。经眼球取血后,脱颈处死小鼠。取出小鼠肝脏,用冷生理盐水冲洗,滤纸吸干后,取大约0.3 g肝组织,加2.7 mL生理盐水制成10%肝组织匀浆,以4 000 r/min离心10 min;取上清,按照试剂盒说明书操作,测定肝组织中TG、MDA和SOD水平。另取部分肝组织置于10%甲醛溶液中固定,剩余肝组织置于-80℃冰箱中保存备用。

2.1.3 肝组织病理形态学观察

采用HE染色法进行观察。取“2.1.2”项下经10%甲醛溶液固定的肝组织(每只小鼠取的部位相同),常规操作制备石蜡切片(厚度4 μm)后行HE染色,在显微镜下观察肝组织脂肪浸润情况。

2.1.4 肝组织中PPARα、CPT-1和DGAT蛋白表达检测

采用Western blot法进行检测。取“2.1.2”项下冻存的肝组织(每组取3只小鼠样本),采用RIPA裂解液超声提取组织中总蛋白,测定总蛋白浓度后,调整样品体积,使各组上样量保持一致。将蛋白高温变性后,配制10%分离胶,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(电压80 V、电泳时间20 min,电压120 V、电泳时间40 min),之后按90 V、90 min的转膜条件转移至NC膜,用5%脱脂奶粉封闭90 min;加入PPARα、CPT-1、DGAT和β-actin一抗(PPARα的稀释度为1:500,CPT-1的稀释度为1:300,DGAT和β-actin的稀释度为1:1 000),4℃孵育过夜。洗膜后,加入对应二抗,室温孵育1 h。ECL化学发光显影,采用ChemiDoc XRS凝胶成像系统进行信号扫描,利用Image J软件进行图像分析获取蛋白条带灰度值,以目的蛋白与内参蛋白(β-actin)条带灰度值的比值表示目的蛋白的表达水平。

2.2 细胞实验

2.2.1 马里苕对大鼠BRL肝细胞活力的影响

为筛选马里苕后续实验干预的浓度和时间,采用MTT法测定马里苕对正常BRL肝细胞活力的影响。取对数生长期的细胞,接种于96孔板中(铺板密度为1×10⁵个/mL),置于CO₂培养箱内培养24 h后,将细胞分为正常对照组、1‰二甲基亚砷(DMSO)组和马里苕3、6、12 μmol/L组(浓度参考文献[9]设置,以1‰DMSO为溶剂进行药液配制),每组设置3个复孔。各组细胞分别经空白培养基、含1‰DMSO的培养基、含药培养基处理24 h后,每个细胞培养孔加入20 μL MTT溶液作用4 h,吸取上清液,加入100 μL DMSO作用15 min后,利用全波长酶标仪测定490 nm波长下吸光度值,计算细胞相对活力:细胞相对活力=(实验孔吸光度值-空白孔吸光度值)/(对照孔吸光度值-空白孔吸光度值)×100%。实验重复3次。

2.2.2 马里苕对乙醇诱导的肝细胞损伤的影响

取对数生长期的细胞,接种于6孔板中(铺板密度为1×10⁴个/mL)。实验分为正常对照组、模型组、模型+1‰DMSO组和马里苕3、6、12 μmol/L组,每组设3个复孔。参考文献[13]方法并进行改良后建立酒精性肝细胞损伤模型:用0.5%乙醇、0.01%硫酸亚铁和0.1 μmol/L油酸刺激大鼠BRL肝细胞24 h致脂质堆积(采用油红O染色法观察肝细胞内脂滴的分布,观察到脂滴提示造模成功)。马里苕各浓度组在造模同时给予不同浓度的马里苕作用24 h。收集细胞,按照试剂盒说明书操作,测定肝细胞中TG、MDA和SOD水平,并参照“2.1.4”项下方法测定细胞中PPARα、CPT-1和DGAT的蛋白表达。实验重复3次。

2.2.3 MK886干预后马里苕对乙醇损伤肝细胞中PPARα、CPT-1和DGAT蛋白表达的影响

为进一步验证马里苕是否通过调控PPARα发挥作用,采用MK886处理细胞。取对数生长期的细胞,接种于6孔板中(铺板密度为1×10⁴个/mL)。实验分为正常对照组、模型组、模型+MK886组、模型+MK886+马里苕12 μmol/L组,每组设3个复孔。MK886的给药浓度参考文献[14]设定为10 μmol/L,马里苕给药浓度根据“2.2.2”项下结果设定。正常对照组不处理,模型组按“2.2.2”项下方法建立酒精性肝细胞损伤模型,模型+MK886组造模的同时加入MK886,模型+MK886+马里苕12 μmol/L组造模的同时加入MK886和马里苕。培养24 h后收集各组细胞,按照“2.1.4”项下方法测定细胞中PPARα、CPT-1和DGAT的蛋白表达。实验重复3次。

2.3 统计学方法

采用GraphPad Prism软件作图和进行数据统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析和LSD-*t*法进行组间比较。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 动物实验结果

3.1.1 马里苕对小鼠肝组织中TG、MDA和SOD水平的影响

与正常对照组比较,模型组小鼠肝组织中TG、MDA水平显著升高($P<0.01$),SOD水平显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,马里苕75、150 mg/kg组小鼠肝组织中TG、MDA水平显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),SOD水平显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见表1。

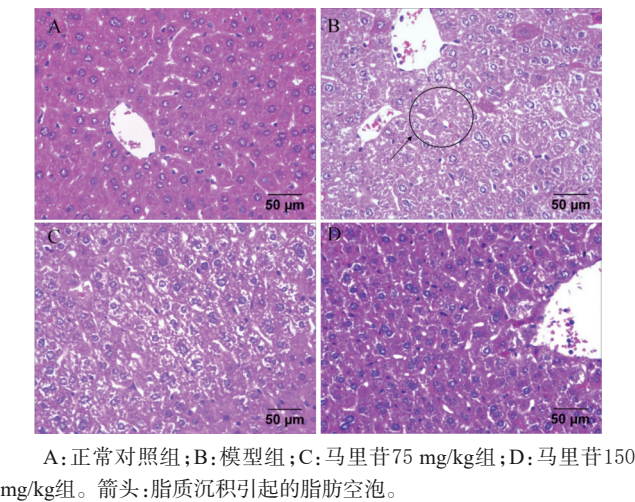
表1 各组小鼠肝组织中TG、MDA和SOD水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	TG/(mg/g)	MDA/(nmol/mg prot)	SOD/(U/mg prot)
正常对照组	7.33±2.72	1.72±0.57	220.73±45.13
模型组	20.31±3.17 ^a	2.58±0.28 ^a	163.49±8.91 ^a
马里苕75 mg/kg组	14.95±3.26 ^b	1.99±0.40 ^b	178.47±17.12 ^b
马里苕150 mg/kg组	10.73±1.71 ^c	1.75±0.39 ^c	193.30±26.88 ^c

a:与正常对照组比较, $P<0.01$;b:与模型组比较, $P<0.05$;c:与模型组比较, $P<0.01$ 。

3.1.2 马里苕对小鼠肝组织病理形态学的影响

正常对照组小鼠肝组织中肝细胞排列有序、整齐，肝小叶结构正常，肝细胞未见脂肪变性、炎症细胞浸润现象。模型组小鼠肝组织中肝细胞排列紊乱，肝小叶结构被破坏，分布有弥散性的脂质空泡。马里苕不同剂量组小鼠肝组织中脂肪变性的程度较模型组明显减轻，肝细胞的排列渐趋正常，肝小叶的结构有所恢复，尤以马里苕150 mg/kg组的改善更为明显。结果见图1。

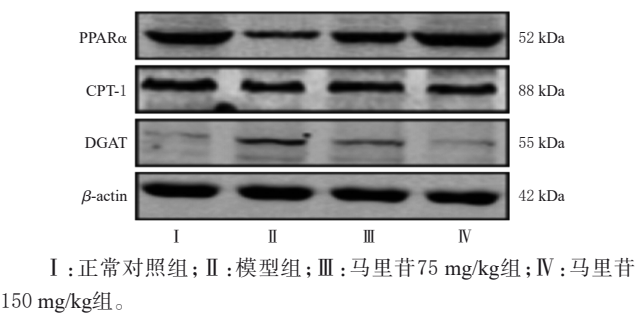


A: 正常对照组; B: 模型组; C: 马里苕75 mg/kg组; D: 马里苕150 mg/kg组。箭头: 脂质沉积引起的脂肪空泡。

图1 各组小鼠肝组织HE染色病理形态学观察图

3.1.3 马里苕对小鼠肝组织中PPARα、CPT-1和DGAT蛋白表达的影响

与正常对照组比较，模型组小鼠肝组织中PPARα、CPT-1的蛋白表达水平显著降低($P<0.01$), DGAT蛋白表达水平显著升高($P<0.01$)。与模型组比较，马里苕75、150 mg/kg组小鼠肝组织中PPARα、CPT-1蛋白表达水平显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), DGAT蛋白表达水平显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见图2和表2。



I: 正常对照组; II: 模型组; III: 马里苕75 mg/kg组; IV: 马里苕150 mg/kg组。

图2 各组小鼠肝组织中PPARα、CPT-1、DGAT蛋白表达的电泳图

3.2 细胞实验结果

3.2.1 马里苕对正常大鼠BRL肝细胞活力的影响

与正常对照组[相对细胞活力为(100.00±0.00)%， $n=3$]比较，1% DMSO组和马里苕3、6、12 μmol/L组作用24 h后，细胞活力[分别为(99.21±6.42)%、(99.02±5.39)%、(96.24±5.98)%、(96.83±9.43)%， $n=3$]均无显著变化($P>0.05$)，因此该浓度可以用于后续实验。

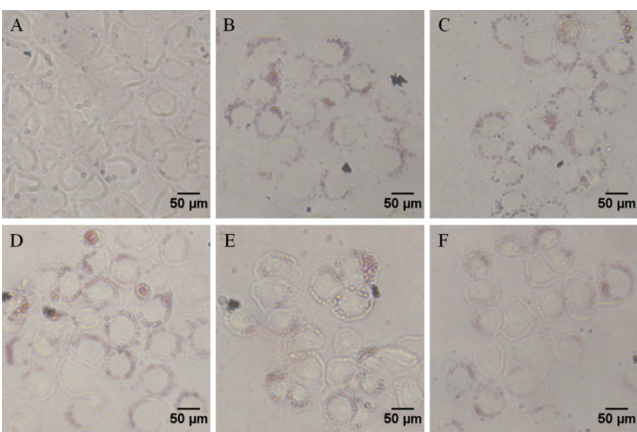
表2 各组小鼠肝组织中PPARα、CPT-1、DGAT蛋白表达水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	PPARα/β-actin	CPT-1/β-actin	DGAT/β-actin
正常对照组	1.15±0.20	0.96±0.11	0.15±0.02
模型组	0.39±0.04 ^a	0.55±0.09 ^a	0.22±0.23 ^a
马里苕75 mg/kg组	0.64±0.05 ^b	0.82±0.06 ^c	0.19±0.01 ^b
马里苕150 mg/kg组	0.98±0.12 ^c	0.83±0.12 ^c	0.15±0.01 ^c

a: 与正常对照组比较， $P<0.01$; b: 与模型组比较， $P<0.05$; c: 与模型组比较， $P<0.01$ 。

3.2.2 马里苕对肝细胞脂质生成的影响

与正常对照组比较，模型组细胞中有较多被染成红色的脂滴，其分布在靠近细胞膜的区域，使整个细胞呈现出“印戒”状；与模型组比较，3、6、12 μmol/L马里苕作用后可显著减少细胞中红色脂滴分布，细胞轮廓变得清晰，且以马里苕12 μmol/L组细胞红色脂滴减少最明显。结果见图3。



A: 正常对照组; B: 模型组; C: 模型+1% DMSO组; D: 马里苕3 μmol/L组; E: 马里苕6 μmol/L组; F: 马里苕12 μmol/L组。

图3 各组细胞的油红O染色观察结果

3.2.3 马里苕对肝细胞中TG、MDA和SOD水平的影响

与正常对照组比较，模型组细胞中TG、MDA水平显著升高($P<0.01$)，SOD水平显著降低($P<0.01$)。与模型组比较，模型+1% DMSO组细胞中上述指标差异均无统计学意义($P>0.05$)；马里苕3、6、12 μmol/L组细胞中TG、MDA水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，SOD水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见表3。

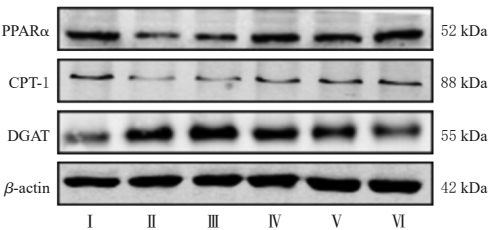
表3 各组细胞中TG、MDA和SOD水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	TG/(mg/g prot)	MDA/(nmol/mg prot)	SOD/(U/mg prot)
正常对照组	1.23±0.12	1.34±0.13	56.98±6.89
模型组	2.86±0.40 ^a	3.50±0.62 ^a	23.37±6.41 ^a
模型+1% DMSO组	2.34±0.52	3.32±0.65	29.20±2.05
马里苕3 μmol/L组	1.74±0.22 ^b	2.24±0.38 ^b	37.43±6.57 ^b
马里苕6 μmol/L组	1.58±0.17 ^c	1.82±0.21 ^c	43.30±6.55 ^c
马里苕12 μmol/L组	1.55±0.15 ^c	1.52±0.11 ^c	47.01±4.01 ^c

a: 与正常对照组比较， $P<0.01$; b: 与模型组比较， $P<0.05$; c: 与模型组比较， $P<0.01$ 。

3.2.4 马里苷对肝细胞PPARα、CPT-1和DGAT蛋白表达的影响

与正常对照组比较,模型组细胞中PPARα、CPT-1蛋白表达水平显著降低($P<0.01$),DGAT蛋白表达水平显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,模型+1%*DMSO*组细胞中上述指标水平差异均无统计学意义($P>0.05$);马里苷3、6、12 μmol/L组细胞中PPARα、CPT-1蛋白表达水平显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),DGAT蛋白表达水平显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见图4和表4。



I : 正常对照组; II : 模型组; III : 模型+1% *DMSO*组; IV : 马里苷3 μmol/L组; V : 马里苷6 μmol/L组; VI : 马里苷12 μmol/L组。

图4 各组细胞中PPARα、CPT-1、DGAT蛋白表达的电泳图

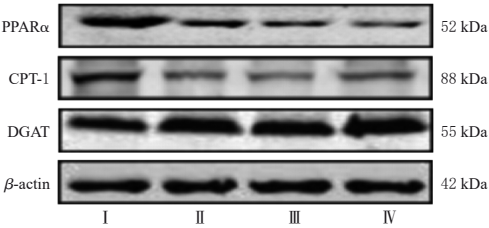
表4 各组细胞中PPARα、CPT-1、DGAT蛋白表达水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	PPARα/β-actin	CPT-1/β-actin	DGAT/β-actin
正常对照组	0.78 ± 0.05	0.23 ± 0.05	0.20 ± 0.02
模型组	0.25 ± 0.05 ^a	0.12 ± 0.02 ^a	1.02 ± 0.09 ^a
模型+1% <i>DMSO</i> 组	0.33 ± 0.06	0.11 ± 0.02	1.13 ± 0.10
马里苷3 μmol/L组	0.59 ± 0.04 ^b	0.16 ± 0.01 ^b	0.78 ± 0.09 ^b
马里苷6 μmol/L组	0.60 ± 0.09 ^b	0.18 ± 0.02 ^b	0.64 ± 0.08 ^b
马里苷12 μmol/L组	0.75 ± 0.04 ^c	0.20 ± 0.01 ^c	0.27 ± 0.05 ^c

a: 与正常对照组比较, $P<0.01$; b: 与模型组比较, $P<0.05$; c: 与模型组比较, $P<0.01$ 。

3.2.5 MK886干预后马里苷对乙醇损伤肝细胞中PPARα、CPT-1和DGAT蛋白表达的影响

与正常对照组比较,模型组和模型+MK886组细胞中PPARα、CPT-1蛋白表达水平显著降低($P<0.01$),DGAT蛋白表达水平显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,模型+MK886+马里苷12 μmol/L组细胞中上述指标水平差异均无统计学意义($P>0.05$),表明在用MK886预处理后,马里苷对乙醇诱导肝细胞中PPARα、CPT-1和DGAT蛋白表达的影响消失。结果见图5、表5。



I : 正常对照组; II : 模型组; III : 模型+MK886组; IV : 模型+MK886+马里苷12 μmol/L组。

图5 MK886干预后肝细胞中PPARα、CPT-1和DGAT蛋白表达的电泳图

表5 MK886干预后肝细胞中PPARα、CPT-1和DGAT蛋白表达水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	PPARα/β-actin	CPT-1/β-actin	DGAT/β-actin
正常对照组	1.03 ± 0.11	0.72 ± 0.19	1.15 ± 0.08
模型组	0.38 ± 0.05 ^a	0.30 ± 0.11 ^a	1.95 ± 0.06 ^a
模型+MK886组	0.23 ± 0.05 ^a	0.20 ± 0.02 ^a	2.07 ± 0.08 ^a
模型+MK886+马里苷12 μmol/L组	0.23 ± 0.05	0.21 ± 0.03	1.93 ± 0.09

a: 与正常对照组比较, $P<0.01$ 。

4 讨论

乙醇可能会影响肝脏脂质代谢,并导致肝脏脂质蓄积和脂肪变性^[15-16]。在本研究中,动物实验采取小鼠连续灌胃高度白酒30 d,细胞实验采取0.5%乙醇、0.01%硫酸亚铁和0.1 μmol/L油酸诱导大鼠BRL肝细胞损伤来进行药效研究。结果显示,在动物和细胞模型中均检测到肝细胞中TG水平显著增加,而在给予马里苷后,细胞中TG水平均显著下降,表明马里苷可拮抗乙醇引起的肝脏脂肪堆积。

研究表明,乙醇蓄积可导致活性氧自由基的大量产生,进而诱发机体的氧化应激和脂质过氧化反应,最终导致肝细胞损伤。而乙醇蓄积不但会引起活性氧自由基的大量产生,还会降低机体的抗氧化能力^[17]。在本研究中,笔者检测了小鼠肝组织中MDA、SOD水平。结果发现,在马里苷作用后,小鼠肝组织中MDA水平显著降低,SOD水平显著升高;同时,在乙醇诱导的肝细胞中也检测到马里苷的上述作用。由此可知,马里苷可通过提高机体的抗氧化酶水平,增加对活性氧自由基的清除能力,从而减轻氧化应激引起的肝损伤。

PPARα是调节脂质代谢的一种重要的转录因子,主要在肝脏表达^[18]。在乙醇蓄积的情况下,肝组织中PPARα表达被抑制,从而导致脂质代谢异常,使肝脏受损^[3]。PPARα可通过调控其靶基因CPT-1和DGAT表达,在肝脏脂质代谢中发挥重要作用^[19-20]。CPT-1是调控脂肪酸β氧化的关键酶,DGAT则是调控TG合成的关键酶,这2种酶的异常表达会导致脂质合成增加。在本研究中,动物实验和细胞实验结果均表明,乙醇诱导肝细胞损伤后会抑制PPARα蛋白表达,且CPT-1蛋白表达也随之下调,但DGAT蛋白表达却上调,这表明PPARα参与了乙醇引起的肝脂质代谢紊乱;而马里苷可上调乙醇诱导肝细胞中PPARα、CPT-1蛋白的表达,下调DGAT蛋白的表达。为了进一步验证马里苷对PPARα的靶向调控作用,本研究在采用MK886对肝细胞进行预处理后,观察到马里苷对细胞中PPARα、CPT-1和DGAT的调控作用被阻断,证实了马里苷改善乙醇诱导肝脏脂肪变性的作用可能是通过调控PPARα信号通路实现的。

综上所述,马里苷对AFL具有保护作用,其作用机制可能为增加肝脏的SOD水平以抑制乙醇引起的氧化应激,也可能是通过增强PPARα的表达进而调控其介导的脂质代谢相关靶蛋白CPT-1和DGAT的表达,但其更多的作用机制仍待进一步研究。

参考文献

- [1] 张译文,李昱锦,胡冰芳,等.3种小鼠酒精性肝病短期模型的评价[J].药学报,2018,53(2):236-243.
ZHANG Y W, LI Y J, HU B F, et al. Evaluation on three short-term animal models of alcoholic liver disease[J]. Acta Pharm Sin, 2018, 53(2): 236-243.
- [2] 李玥,杨松.酒精性肝病研究进展[J/OL].中国肝脏病杂志(电子版),2022,14(3):1-4[2024-03-01].<https://zggbzz.boyuancb.com/Magazine/Show.aspx?ID=139366>. DOI:10.3969/j.issn.1674-7380.2022.03.001.
LI Y, YANG S. Progress on alcoholic liver disease[J/OL]. Chin J Liver Dis Electron Version, 2022, 14(3): 1-4[2024-03-01].<https://zggbzz.boyuancb.com/Magazine/Show.aspx?ID=139366>. DOI:10.3969/j.issn.1674-7380.2022.03.001.
- [3] 单朋涛,葛文静,付俊敏,等.核受体PPAR、FXR、LXR在非酒精性脂肪肝中的调节作用和靶点[J].生命的化学,2023,9(8):1237-1245.
SHAN P T, GE W J, FU J M, et al. The regulation and target of nuclear receptors PPAR, FXR and LXR in nonalcoholic fatty liver disease[J]. Chem Life, 2023, 9(8): 1237-1245.
- [4] 杜延超,肖默,杨瑞,等.急性和慢性酒精性脂肪肝小鼠肝组织中过氧化物酶体增殖物活化受体 α 和甾醇调节元件结合蛋白1c及其调控关键靶分子的蛋白表达情况[J].环境与健康杂志,2017,34(7):638-642.
DU Y C, XIAO M, YANG R, et al. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor α and sterol regulatory element binding protein 1c and their key target molecules in liver tissues of acute and chronic alcoholic fatty liver mice[J]. J Environ Health, 2017, 34(7): 638-642.
- [5] 石玉梦,杨佳璐,刘静,等.两色金鸡菊中马里苷的肠道菌群代谢转化[J].现代食品科技,2023,39(11):68-77.
SHI Y M, YANG J L, LIU J, et al. Metabolic transformation of marein in *Coreopsis tinctoria* Nutt. by intestinal flora[J]. Mod Food Sci Technol, 2023, 39(11): 68-77.
- [6] GUO Y L, RAN Z, ZHANG Y W, et al. Marein ameliorates diabetic nephropathy by inhibiting renal sodium glucose transporter 2 and activating the AMPK signaling pathway in db/db mice and high glucose-treated HK-2 cells[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 131: 110684.
- [7] YAO M Y, ZHANG J, LI Z H, et al. Marein protects human nucleus pulposus cells against high glucose-induced injury and extracellular matrix degradation at least partly by inhibition of ROS/NF- κ B pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 80: 106126.
- [8] 张芳,祖力皮亚·阿布拉,克迪热亚·卡迪尔,等.马里苷对糖尿病小鼠肝脏和胰腺组织形态及自噬的影响[J].西部中医药,2024,37(2):4-8.
ZHANG F, Zulipiya·Abula, Kedireya·Kadier, et al. Influence of marein on histomorphology of liver and pancreas and autophagy in diabetic mice[J]. West J Tradit Chin Med, 2024, 37(2): 4-8.
- [9] NIU G H, ZHOU M, WANG F, et al. Marein ameliorates Ang II/hypoxia-induced abnormal glucolipid metabolism by modulating the HIF-1 α /PPAR α / γ pathway in H9c2 cells[J]. Drug Dev Res, 2021, 82(4): 523-532.
- [10] ZHANG P P, ZHUO B Y, DUAN Z W, et al. Marein reduces lipid levels via modulating the PI3K/AKT/mTOR pathway to induce lipophagy[J]. J Ethnopharmacol, 2023, 312: 116523.
- [11] 陈瑶.基于血清药物化学技术的两色金鸡菊活性成分分析及药代动力学研究[D].乌鲁木齐:新疆医科大学,2017.
CHEN Y. Study on serum pharmacochemistry and pharmacokinetics of *Coreopsis tinctoria*[D]. Urumqi: Xinjiang Medical University, 2017.
- [12] WANG F, ZHOU R J, ZHAO X, et al. Apigenin inhibits ethanol-induced oxidative stress and LPS-induced inflammatory cytokine production in cultured rat hepatocytes[J]. J Appl Biomed, 2018, 16(1): 75-80.
- [13] 袁叶飞,胡祥宇,欧贤红.赶黄草对体外诱导的酒精性脂肪肝细胞的影响[J].泸州医学院学报,2013,36(1):35-38.
YUAN Y F, HU X Y, OU X H. Effect of *Penthorum chinense* Pursh on cells of alcoholic fatty liver induced by ethanol *in vitro*[J]. J Southwest Med Univ, 2013, 36(1): 35-38.
- [14] CHEN L, YU S, HONG S B, et al. Therapeutic role of Artemether in the prevention of hepatic steatosis through miR-34a-5p/PPAR α pathway[J]. Drug Dev Res, 2023, 84(2): 156-171.
- [15] TESCHKE R. Alcoholic liver disease: alcohol metabolism, cascade of molecular mechanisms, cellular targets, and clinical aspects[J]. Biomedicines, 2018, 6(4): 106.
- [16] CHEN X, ZHANG Z, CUI B, et al. Combination of chronic alcohol consumption and high-salt intake elicits gut microbial alterations and liver steatosis in mice[J]. J Agric Food Chem, 2020, 68(6): 1750-1759.
- [17] KIM H G, HUANG M H, XIN Y, et al. The epigenetic regulator SIRT6 protects the liver from alcohol-induced tissue injury by reducing oxidative stress in mice[J]. J Hepatol, 2019, 71(5): 960-969.
- [18] WANG Y P, NAKAJIMA T, GONZALEZ F J, et al. PPARs as metabolic regulators in the liver: lessons from liver-specific PPAR-null mice[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(6): 2061.
- [19] QIU Y Y, ZHANG J, ZENG F Y, et al. Roles of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. Pharmacol Res, 2023, 192: 106786.
- [20] BOUGARNE N, MYLKA V, RATMAN D, et al. Mechanisms underlying the functional cooperation between PPAR α and GR α to attenuate inflammatory responses[J]. Front Immunol, 2019, 10: 1769.
(收稿日期:2023-09-26 修回日期:2024-03-18)
(编辑:林 静)