

【 实验研究 】

岩黄连总碱对代谢相关脂肪性肝病小鼠的治疗作用及分子机制研究

陈萍¹, 鞠霖杰¹, 成俊², 刁和芳², 赵开军², 邱志霞¹, 黄芳^{1, 2, 3*}

1. 中国药科大学 中药药理与中医药学系, 江苏 南京 211198

2. 南京中山制药有限公司, 江苏 南京 210046

3. 江苏弘典中药产业研究院, 江苏 南京 210042

摘要: 目的 研究岩黄连总碱对高糖高脂饮食诱导的代谢相关脂肪性肝病(MAFLD)小鼠的治疗作用。方法 随机取C57BL/6小鼠7只设置为对照组,喂以正常饲料;造模小鼠给予高脂饮食和高糖饮水(含20%果糖水),连续喂养10周;将造模小鼠按体质量随机分为模型组、盐酸二甲双胍(阳性药,200 mg/kg)组和岩黄连总碱低、高剂量(25、100 mg/kg)组,继续饲以高脂高糖饮食,连续ig给药5周。记录小鼠体质量,取肝脏并拍照,测定小鼠肝脏质量,计算肝脏指数;应用血糖仪测定小鼠空腹血糖(FBG)及口服糖耐量(OGTT);试剂盒法测定血清总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)及游离脂肪酸(NEFA)的水平;取肝组织进行HE染色、油红O染色和Masson染色;Western blotting检测肝组织中AMP依赖的蛋白激酶(AMPK)、p-AMPK、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)、p-PI3K、蛋白激酶B(Akt)、p-Akt蛋白表达情况。**结果** 与对照组比较,模型组小鼠体质量、肝脏指数显著升高;给药后小鼠体质量及肝脏指数显著下降($P<0.05, 0.01$)。与模型组比较,岩黄连总碱显著降低小鼠的FBG及OGTT水平($P<0.01$);显著降低血清TC、TG、LDL-C及NEFA水平($P<0.01$);显著改善小鼠肝组织脂肪变及纤维化;显著上调MAFLD小鼠肝组织p-AMPK、p-PI3K、p-Akt蛋白水平($P<0.01$)。**结论** 岩黄连总碱对MAFLD发挥显著治疗作用,其作用机制可能与通过激活AMPK/PI3K/Akt信号通路,减轻肝脏脂质沉积有关。

关键词: 岩黄连总碱; 代谢相关脂肪性肝病; 高脂高糖饮食; AMPK/PI3K/Akt信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2021)03-0468-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.03.002

Study on effect and molecular mechanism of *Corydalis saxicola* total alkaloids on nonalcoholic fatty liver mice

CHEN Ping¹, JU Linjie¹, CHENG Jun², DIAO Hefang², ZHAO Kaijun², QIU Zhixia¹, HUANG Fang^{1, 2, 3}

1. Department of Chinese Pharmacology and Traditional Chinese Medicine, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

2. Nanjing Zhongshan Pharmaceutical Limited Company, Nanjing 210046, China

3. Jiangsu Hongdian Institute of Traditional Chinese Medicine Industry, Nanjing 210042, China

Abstract: Objective To study the effect and mechanism of *Corydalis saxicola* total alkaloids (CSTA) on the high-fat and high-sugar (HFHC) diet induced metabolic associated fatty liver disease (MAFLD) mice. **Methods** Seven C57BL/6 mice were randomly selected as control group and fed with normal diet. Mice were fed high fat diet and high sugar drinking water (containing 20% fructose water) for 10 weeks. The model mice were randomly divided into model group, metformin hydrochloride (positive drug, 200 mg/kg) group and CSTA low and high-dose (25, 100 mg/kg) groups according to body weight. Record the body weight and liver coefficient, the fasting blood glucose (FBG) and oral glucose tolerance test (OGTT) of the mice. The total cholesterol (TC), triglycerides (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and non-esterified fatty acids (NEFA) were investigated to explore whether CSTA could alleviate dyslipidemia in MAFLD mice. HE staining, oil red O

收稿日期: 2020-08-19

基金项目: “重大新药创制”科技重大专项(2017ZX09301026)

第一作者: 陈萍(1996—),女,硕士研究生,研究方向为复方中药药理。Tel: 19850853873 E-mail: 2550198420@qq.com

*通信作者: 黄芳(1971—),女,药理学博士,教授,博士生导师。Tel: 18151620528 E-mail: chengtianle007@163.com

staining and Masson staining of liver sections were carried out according to the manufacture's protocol. The expression of AMPK, p-AMPK, PI3K, p-PI3K, AKT, p-AKT in mouse livers were detected by Western blotting. **Results** The body weight and liver index of MAFLD mice were significantly increased, which were ameliorated by CSTA ($P < 0.05$ and 0.01). Meanwhile, abnormal FBG and impaired OGTT in MAFLD mice were also normalized by CSTA ($P < 0.01$). CSTA dramatically decreased the serum levels of TC, TG, LDL-C and NEFA in MAFLD mice ($P < 0.01$). HFHC diet could exacerbate lipid accumulation in hepatic cells and hepatic fibrosis in mice, while these entities were relieved by CSTA. Western blotting furtherly indicated that the level of p-AMPK, p-PI3K, and p-Akt protein in the liver tissue of MAFLD mice could be upregulated by CSTA ($P < 0.01$). **Conclusion** These data clarified CSTA ameliorated hepatic steatosis and dyslipidemia of MAFLD mice via a novel mechanism involved AMPK/PI3K/Akt pathway.

Key words: *Corydalis saxicola* total alkaloids; non-alcoholic fatty liver; high fat and high sugar diet; AMPK/PI3K/Akt signaling pathway

代谢相关脂肪性肝病 (metabolic associated fatty liver disease, MAFLD), 曾用名非酒精性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)^[1-2], 是指除由酒精和其他对肝脏有明确损害致病因素引起的, 以脂肪在肝细胞内过度沉积为主要病变特征临床病理综合征^[3]。其主要包括肝脏的脂质代谢异常引起的肝脂肪变, 以及体内物质代谢紊乱, 如血脂及血糖水平异常升高。MAFLD是一种慢性进展性疾病, 患者早期无明显不适症状, 多于体检或者其他相关疾病检查时发现, 可出现乏力、胸胁隐痛等临床表现, 随着病情进一步恶化, 可进展为非酒精性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH) 及肝硬化 (nonalcoholic cirrhosis, NAC), 甚至肝癌^[4-5]。近年来, MAFLD的发病率逐年升高, 迄今为止已经取代病毒性肝炎成为全球最常见的慢性肝病^[6], 占全球患病率的 25.2%^[7], 已成为严重的全球性公共健康问题。

脂肪肝为现代医学病名, 中医学无明确的该病记载名。中医学根据 MAFLD 患者腹胀、乏力、胁痛、纳差的临床表现, 将其命名为“痞满”“胁痛”“虚劳”等。《素问·五邪》云:“邪在肝, 则两胁中痛”, 《难经·五十六难》曰:“肝之积, 名曰肥气, 在左胁下, 如覆杯, 有头足”。由此可见 MAFLD 当属中医学“肥气”“积聚”等范畴^[6]。岩黄连 *Corydalis saxicola* Bunting, 又名石生黄堇, 为紫堇科紫堇属多年生草本植物, 为云贵地区常用药, 本品性凉、味苦, 具有清热、消肿、利湿、止痛止血之功效, 民间用于治疗火眼、痔疮出血及红痢、急性腹痛、肝炎、肝硬化、痢疾等症, 现代医学研究表明, 其具有抗病毒、抗炎、抗肿瘤、保肝利胆等作用^[8-11]。蒙田秀等^[12]研究表明, 岩黄连提取物能显著改善四氯化碳 (CCl₄) 诱导的小鼠肝损伤模型。同时, Wang 等^[13]进一步研究提示, 岩黄连有效活性成分脱氢卡维丁对 CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维化具有显著的改善作用, 其作用可能与

减少氧化应激、促进胶原溶解和调节纤维化相关基因有关。岩黄连总碱为岩黄连的有效部位, 成分包括脱氢卡维丁 (dehydrocavidine)、小檗碱 (berberine) 和巴马汀 (palmatine) 等, 且脱氢卡维丁含量最高^[14-15]。因此, 本实验主要在已有研究的基础上, 以高脂高糖饮食诱导的 MAFLD 小鼠模型考察岩黄连总碱对 MAFLD 的药效, 并初步探讨其作用机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠 35 只, 4~5 周龄, 体质量 18~20 g, 购自山东斯科贝斯生物科技股份有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK(鲁)2016 0001。清洁级环境, 温度湿度适宜, 由中国药科大学药理学动物实验中心饲养, 适应性喂养 1 周后, 进行 MAFLD 造模过程。

1.2 药品及主要试剂

岩黄连总碱, 购自南京中山制药有限公司, 产品批号 160801, 经 HPLC 检测, 脱氢卡维丁、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱质量分数分别为 13.79%、8.38%、1.52%; 盐酸二甲双胍, 购自中美上海施贵宝制药有限公司, 产品批号 ABE4994。

实验鼠生长繁殖饲料、60% 脂肪供能高脂饲料 (含 60% 乳脂、40% 基础饲料, 货号 TP240000)、果糖, 均购自南通特洛菲饲料科技有限公司; 总胆固醇 (total cholesterol, TC) 试剂盒 (货号 A111-1-1)、三酰甘油 (triglycerides, TG) 试剂盒 (货号 A110-1-1)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 试剂盒 (货号 A113-1-1)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 试剂盒 (货号 A112-1-1)、游离脂肪酸 (non esterified fatty acids, NEFA) 试剂盒 (货号 A042-2-1), 均购自南京建成生物科技有限公司; AMPK 抗体 (货号 2532)、p-AMPK 抗体 (phospho-AMPK Thr172, 货号 2535)、Akt 抗体 (货号 4691)、p-Akt 抗

体(phospho-AKT Ser473, 货号 4060)、PI3K p85 抗体(货号 4292)、p-PI3K p85 抗体(phospho- PI3K p85 Tyr458, 货号 4060),均购自美国 Cell Signaling Technology 公司;山羊抗兔二抗(货号 ZJ2020-R)、山羊抗小鼠二抗(货号 ZJ2020-M)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(货号 P0010S),均购自上海碧云天生物技术有限公司;ECL 化学发光超敏显色试剂盒(货号 36208ES76),购自上海翊圣生物科技有限公司。

1.3 主要仪器

高速冷冻离心机(5415R型, Eppendorf, 德国); PB303-N 电子天平(Mettler Toledo, 德国); MULTSKAN Sky 全波长酶标仪(Thermo Scientific, 美国);可调式移液器(上海赛默飞世尔仪器有限公司);血糖仪及血糖试纸(江苏鱼跃医疗设备有限公司);电泳仪(Bio-Rad, 美国),转膜仪(Bio-Rad, 美国),显影仪(上海天能科技有限公司);密理博Direct-Q3 实验室纯水/超纯水一体化系统(密理博, 美国)。

2 方法

2.1 分组、造模及给药

小鼠适应性喂养1周后,随机取7只设置为对照组,余下的进行造模。对照组动物喂以正常饲料,造模组小鼠给予高脂饮食和高糖饮水(含20%果糖水)^[16-18]。连续喂养10周,将造模小鼠按体质量随机分为模型组,岩黄连总碱低、高剂量(25、100 mg/kg)^[19]组和盐酸二甲双胍组(200 mg/kg)^[20-21],每组7只小鼠,继续饲以高脂高糖饮食。对照组与模型组小鼠给予等量0.5%CMC-Na混悬液,岩黄连总碱与盐酸二甲双胍组给予相应的药物,连续给药5周。

2.2 体质量及小鼠肝脏指数的测定

给药期间每周对小鼠的体质量进行测定并记录。末次给药并取血完成后,小鼠脱颈椎处死,取肝脏,并拍照记录肝脏外观及形态,测定小鼠肝脏质量,计算小鼠肝脏指数。

肝脏指数=肝脏质量(mg)/体质量(g)

2.3 空腹血糖水平(FBG)及口服葡萄糖耐量试验(OGTT)测定

末次给药后,小鼠禁食12 h,自由饮水,次日早晨测定FBG;各组小鼠ig葡萄糖溶液(2 g/kg),测定ig后15、30、60、120 min小鼠的血糖水平,并计算曲线下面积(AUC)^[22-24]。

2.4 血清生化指标测定

血糖测定结束后小鼠摘眼球取血,收集于1.5 mL离心管中,室温静置2 h,3 000 r/min离心15 min,取上

清置于-80 °C保存备用,按试剂盒说明书分别测定血清中TC、TG、LDL-C、HDL-C及NEFA的浓度。

2.5 肝组织HE染色及油红O染色

HE染色:取小鼠肝脏置于4%多聚甲醛中固定,梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋切片(切片厚度4 μm)后行HE染色,中性树胶封片^[25-26]。

油红O染色:小鼠肝脏固定后置于25%~30%的蔗糖溶液脱水48 h,OCT包埋剂包埋并于冰冻切片切取15 μm的冰冻切片;蒸馏水浸洗,60%异丙醇浸洗后进行油红O染色,水溶性封片剂封固,并置于4 °C条件下保存^[27-29]。

2.6 肝组织Masson染色

肝脏固定后常规包埋脱蜡;用蒸馏水湿润玻片60 s;核染液染色50 s,弃染液,冲洗液冲洗30 s;浆染液染色20 s,弃染液,冲洗液冲洗30 s;黄色分色液分色8 min,弃染液;直接用蓝色复染液染色4 min,弃染液,用无水乙醇冲洗干净;吹干后,封片^[30]。

2.7 Western blotting检测

称取适量肝组织,剪碎并按质量(g)与体积(mL)比1:9的比例加入RIPA裂解液,匀浆仪匀浆裂解,2 500 r/min离心10 min取上清,BCA法测定蛋白浓度并适当稀释。将蛋白与5×loading buffer以4:1的比例混匀,100 °C煮沸变性,进行10% SDS-PAGE垂直电泳,垂直电泳结束后冰浴环境水平电泳转至PVDF膜上,5% BSA室温封闭膜2 h,一抗孵育过夜(4 °C),次日TBST漂洗,二抗孵育,ECL显影,Image J软件分析目的蛋白条带灰度值^[31]。

2.8 统计学处理

采用SPSS 19.0统计软件对所得数据进行统计分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间比较分析采用LSD法(方差齐)和Games-Howell法(方差不齐)。

3 结果

3.1 岩黄连总碱对MAFLD模型小鼠的体质量、肝脏形态及肝脏指数的影响

如图1A所示,造模结束后,模型组小鼠的体质量与对照组比较显著升高($P<0.01$);自给药第14天起,岩黄连总碱低、高剂量组小鼠的体质量与模型组比较显著下降($P<0.05、0.01$),并维持至实验结束。小鼠肝脏指数及肝脏形态如图1B和C所示,与对照组比较,模型组小鼠肝脏指数显著升高($P<0.01$);与模型组比较,岩黄连总碱低、高剂量小鼠肝脏指数显著下降($P<0.05、0.01$),且呈剂量相关性,

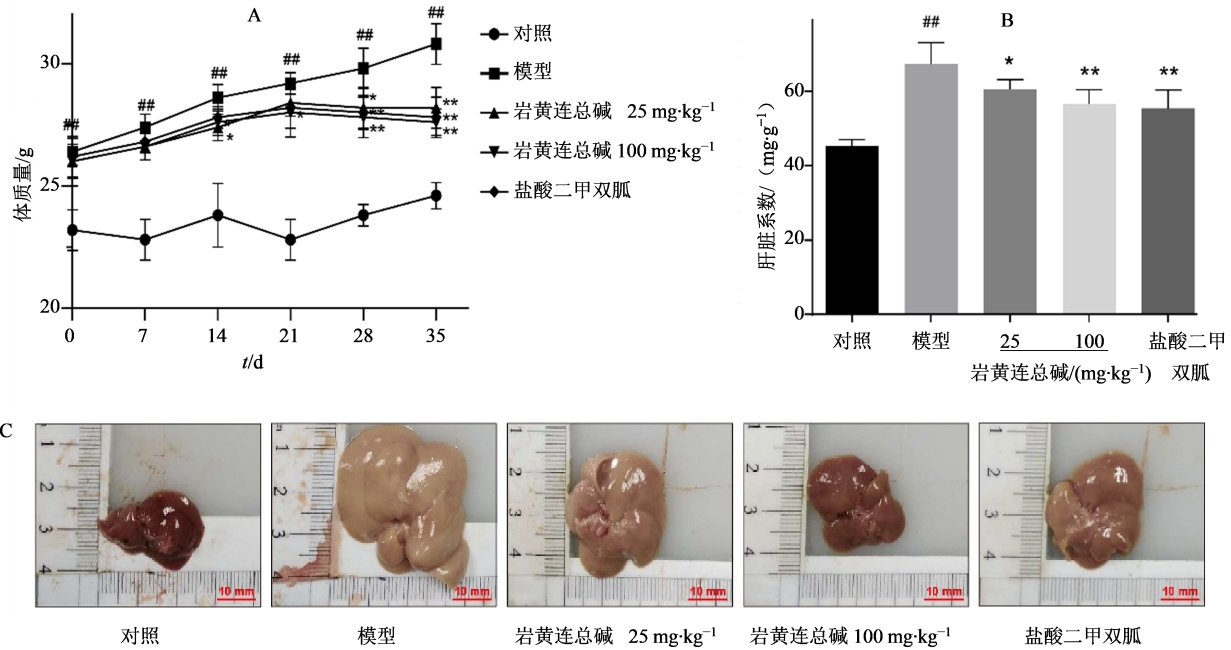


图1 岩黄连总碱对MAFLD小鼠体质量(A)、肝脏(B、C)的影响($\bar{x}\pm s, n=7$)

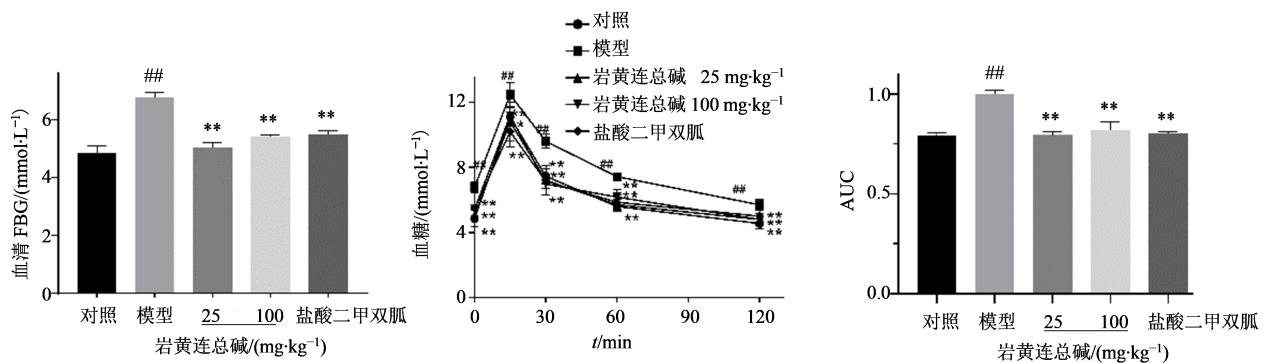
Fig. 1 Effect of CSBTA on body weight (A) and liver (B and C) of MAFLD mice ($\bar{x}\pm s, n=7$)

盐酸二甲双胍也能显著降低MAFLD小鼠肝脏指数($P<0.01$)。同时与对照组比较,模型组小鼠的肝脏出现明显的肥大,且触之质脆,油腻;与模型组比较,岩黄连总碱低、高剂量组均显著改善肝脏肥大症状,表现为肝脏体积变小,颜色深红,且不易破碎。结果表明,高脂高糖饮食会使小鼠的体质量出现显著升高,肝脏出现明显肥大症状,岩黄连总碱能够明显降低MAFLD小鼠的体质量且改善其肝脏脂肪变。

3.2 岩黄连总碱对MAFLD模型小鼠的FBG及OGTT的影响

如图2所示,模型组小鼠的FBG与对照组比较

显著升高($P<0.01$),岩黄连总碱低、高剂量组及盐酸二甲双胍组小鼠的FBG与模型组比较显著下降($P<0.01$)。OGTT结果显示,ig葡萄糖后15 min,模型组小鼠血糖值与对照组比较显著升高($P<0.01$),岩黄连总碱低、高剂量组及盐酸二甲双胍组小鼠的血糖值与模型组比较显著下降($P<0.01$)。ig葡萄糖后30、60、120 min各组的血糖水平均表现为下降趋势,然而模型组小鼠各时间点的血糖仍显著高于对照组小鼠($P<0.01$),岩黄连总碱低、高剂量组及盐酸二甲双胍组小鼠的血糖与模型组比较显著下降($P<0.01$)。模型组小鼠的AUC与对照组比较



与对照组比较:## $P<0.01$;与模型组比较:** $P<0.01$

$P<0.01$ vs control group; ** $P<0.01$ vs model group

图2 岩黄连总碱对MAFLD小鼠血糖的影响($\bar{x}\pm s, n=7$)

Fig. 2 Effect of CSBTA on blood glucose in MAFLD mice ($\bar{x}\pm s, n=7$)

显著升高($P < 0.01$),岩黄连总碱低、高剂量组及盐酸二甲双胍组小鼠的AUC与模型组比较显著下降($P < 0.01$)。结果表明,高脂高糖饮食会使小鼠的FBG升高,岩黄连总碱可以显著降低MAFLD小鼠的血糖水平,同时长期高脂高糖饮食会导致小鼠糖耐量受损,机体对血糖调节能力下降,岩黄连总碱能显著缓解上述症状。

3.3 岩黄连总碱对MAFLD模型小鼠血清中TC、TG、LDL-C、HDL-C、NEFA的影响

如图3所示,模型组小鼠血清中的TC、TG、LDL-C、NEFA浓度与对照组比较显著升高($P < 0.01$),岩黄连总碱低、高剂量组及盐酸二甲双胍组小鼠血清中的TC、TG、LDL-C、NEFA浓度与模型组比较均显著降低($P < 0.01$)。模型组小鼠血清中的HDL-C浓度与对照组比较显著降低($P < 0.01$),岩黄连总碱低、高剂量组及盐酸二甲双胍组小鼠血清中的HDL-C浓度与模型组比较虽然出现上升的趋势,但并无明显差异。结果表明,岩黄连总碱能够显著调节MAFLD小鼠的血脂水平,改善小鼠的脂质代谢紊乱。

3.4 岩黄连总碱对MAFLD模型小鼠的肝组织病理变化的影响

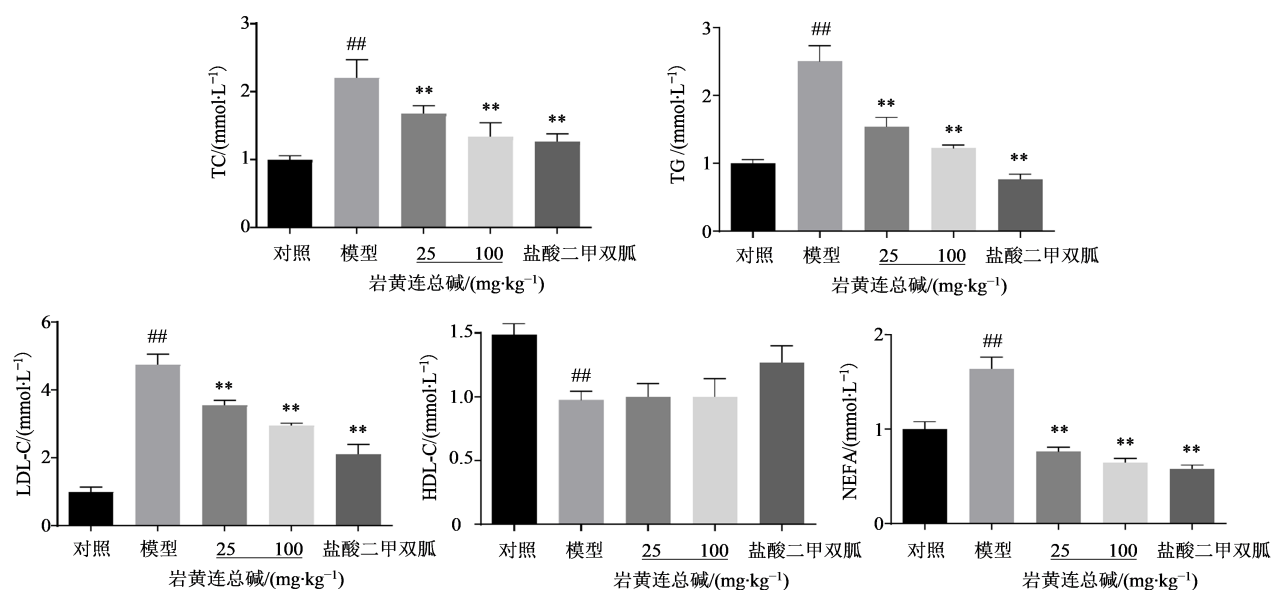
如图4所示,对照组小鼠肝脏HE染色显示肝脏结构完整,中央静脉轮廓清晰(图中绿色*号),且肝索沿着中央静脉呈放射状排列,肝小叶及小叶间未见明显炎症细胞浸润;与对照组比较,模型组小鼠

肝小叶结构被破坏,伴肝细胞膨胀,中央静脉周围肝细胞脂质堆积严重,胞质挤满空泡(图中黑色箭头所示),肝小叶炎细胞浸润明显且肝细胞呈现不均一的核固缩,核碎裂以及核溶解的现象^[32-33]。与模型组比较,岩黄连总碱和盐酸二甲双胍显著改善肝细胞脂质堆积以及肝细胞凋亡现象。

油红O染色进一步提示,模型组小鼠肝细胞有严重的脂肪堆积(图中蓝色箭头所示)。与模型组比较,岩黄连总碱低、高剂量组及盐酸二甲双胍组小鼠肝细胞脂质堆积的情况有明显改善。以上结果初步说明岩黄连总碱能显著改善MAFLD小鼠肝脂肪变症状。

3.5 岩黄连总碱对MAFLD模型小鼠的肝纤维化的影响

研究表明,慢性或反复性肝损伤最终都会导致肝纤维化的生成,以细胞质外基质(ECM)蛋白主要是胶原蛋白的过度积累为特征^[34-36]。肝纤维化是MAFLD严重程度的重要预测指标^[37]。因此,本研究对小鼠肝脏进行Masson染色来进一步考察岩黄连总碱对于MAFLD引起的肝纤维化改善作用。如图5所示,对照组肝组织血管壁周围可见少量胶原纤维,呈深蓝色,属正常范围。模型组肝组织内大量胶原纤维沉积,呈蓝色团块状,自汇管区周围向外延伸,纤维条索较粗且染色着色较深,表明胶原纤维较多,肝组织纤维化明显^[38-39]。与模型组比较,岩黄连总碱和盐酸二甲双胍对肝组织纤维化有明

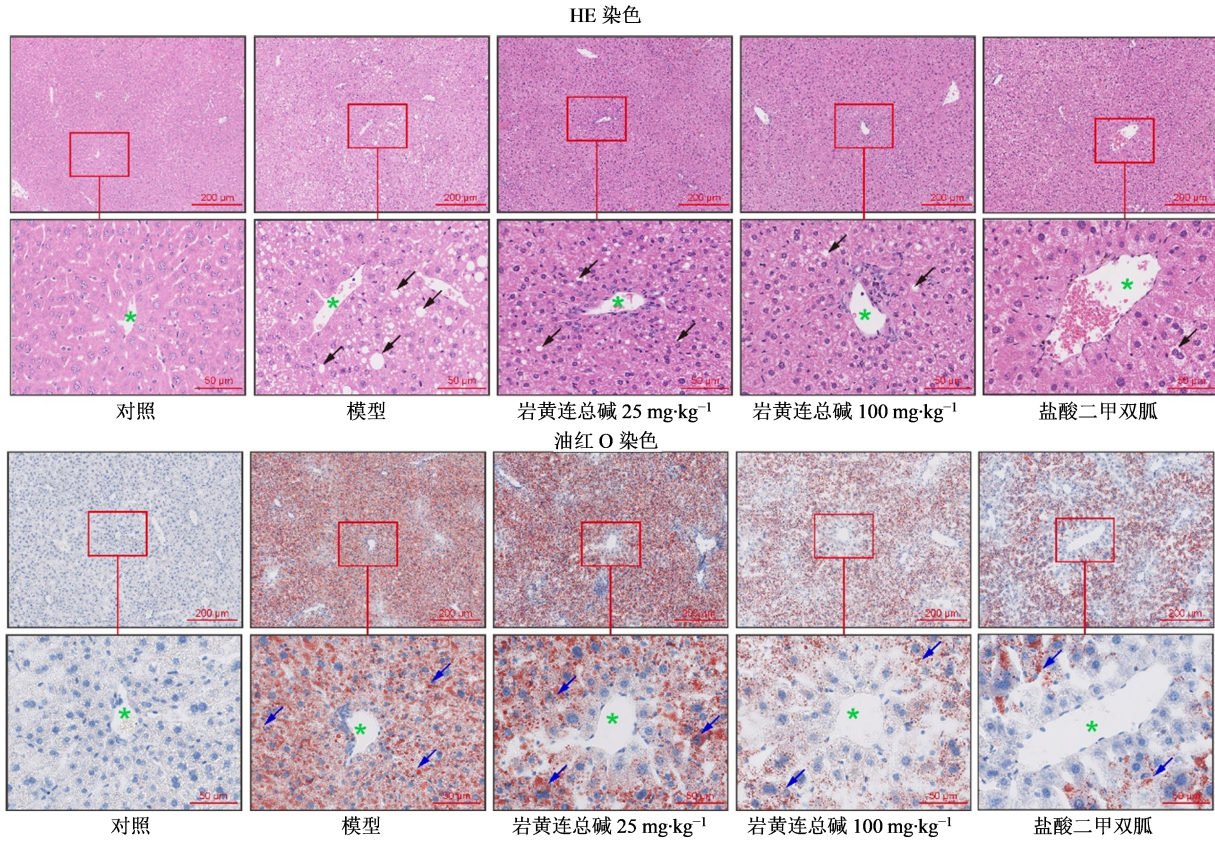


与对照组比较: # $P < 0.01$; 与模型组比较: ** $P < 0.01$

$P < 0.01$ vs control group; ** $P < 0.01$ vs model group

图3 岩黄连总碱对MAFLD小鼠血清中TC、TG、LDL-C、HDL-C及NEFA的影响($\bar{x} \pm s, n=7$)

Fig. 3 Effect of CSBTA on TC, TG, LDL-C, HDL-C and NEFA in serum of MAFLD mice ($\bar{x} \pm s, n=7$)



*号:中央静脉;箭头:脂肪堆积
* : central vein; arrow: fat accumulation

图4 岩黄连总碱对MAFLD小鼠的肝组织病理变化的影响
Fig. 4 Effect of CSBTA on pathological changes of liver tissue in MAFLD mice

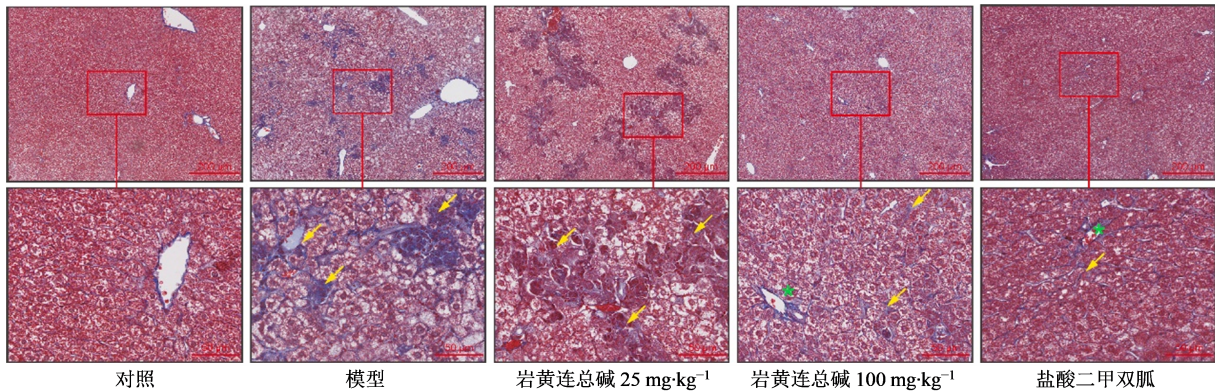


图5 岩黄连总碱对MAFLD小鼠的肝纤维化的影响(Masson染色)
Fig. 5 Effect of CSBTA on liver fibrosis in MAFLD mice (Masson stain)

显改善作用。

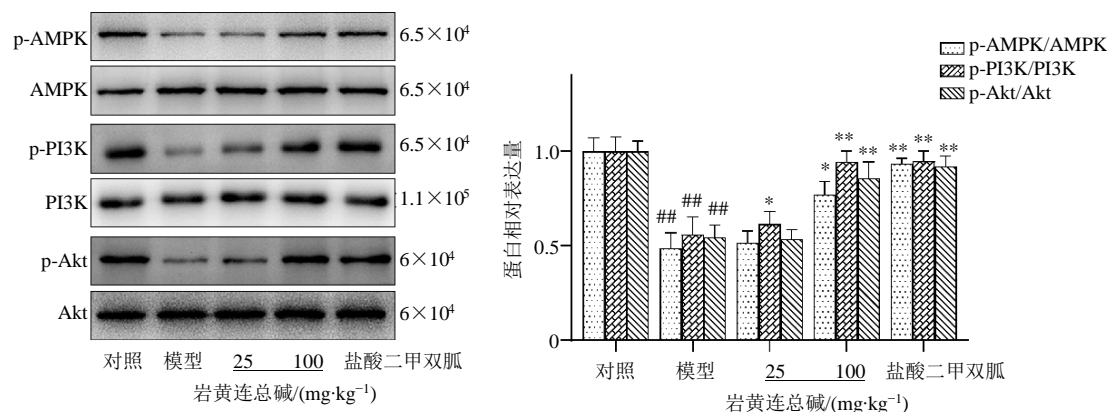
3.6 岩黄连总碱对MAFLD模型小鼠肝组织AMPK/PI3K/Akt信号通路的影响

为了明确岩黄连总碱对MAFLD治疗作用的机制,利用Western blotting技术检测小鼠肝组织中能量代谢调节的关键分子AMPK以及胰岛素信号通路相关的PI3K、Akt蛋白表达情况。如图6所示,与对照组比较,模型组小鼠肝组织p-AMPK、p-PI3K、

p-Akt蛋白表达量显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,岩黄连总碱高剂量组及盐酸二甲双胍组小鼠肝组织p-AMPK、p-PI3K、p-Akt蛋白表达量显著升高($P < 0.05, 0.01$)。

4 讨论

MAFLD作为一种全身代谢性疾病,发病率逐年升高,更有年轻化的趋势^[40]。寻找和开发治疗MAFLD的相关药物变得尤为迫切。目前治疗



与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$
^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

图 6 岩黄连总碱对 MAFLD 小鼠的肝组织 AMPK/PI3K/AKT 信号通路的影响

Fig. 6 Effect of CSBTA on AMPK/PI3K/AKT signaling pathway in liver tissue of MAFLD mice

MAFLD 的化学药发展迅速,但缺少疗效较好的药物^[4,41]。中医药治疗 MAFLD 主要包括改善胰岛素抵抗、调节脂质代谢和运转、改善肠道菌群失调、减轻氧化应激水平与调节免疫等,具有多成分、多靶点、多通路的作用特点^[42]。但是,中药治疗代谢性疾病是如何启动以及通过哪些具体信号转导通路发挥作用等问题有待进一步探究^[43]。

岩黄连在《中华本草》《贵州草药》等医学书籍中有记载,为云贵地区常用药,具有抗病毒、抗炎、抗肿瘤、保肝利胆等作用^[9-11]。研究显示岩黄连及其有效部位能显著缓解 CCl₄ 诱导的大鼠急性肝炎症状^[12-13]。因此本研究主要以高脂高糖诱导的 MAFLD 小鼠模型探究岩黄连总碱对 MAFLD 药效及并初步阐述其相关分子机制。

实验结果表明,岩黄连总碱对高脂高糖饮食诱导的 MAFLD 小鼠具有治疗作用。小鼠体质量、肝脏形态及肝脏指数的变化表明,岩黄连总碱对 MAFLD 小鼠体质量增加以及肝脏的脂肪变具有明显的改善作用;另外,实验结果进一步显示,岩黄连总碱能够显著降低 MAFLD 小鼠 FBG 水平,改善 OGTT 损伤,说明岩黄连总碱能够显著改善 MAFLD 小鼠胰岛 β 细胞功能受损,恢复机体对血糖的调节能力^[44-45];小鼠血清生化指标结果表明,高脂高糖饮食会引起小鼠的脂质代谢紊乱,岩黄连总碱对小鼠脂代谢紊乱有明显改善作用进而减少脂质堆积;小鼠肝组织的 HE 染色及油红 O 染色结果表明,岩黄连总碱对 MAFLD 小鼠的肝脏脂肪变性和堆积有明显的改善作用;小鼠肝组织 Masson 染色结果表明,小鼠的 MAFLD 进一步恶化发展为肝纤维化,而岩黄连总碱呈现出对肝纤维化有明显的改善作用。

在肝脏中,肝胰岛素信号转导途径的完整性对于维持肝细胞正常生理功能起着至关重要的作用^[46]。肝胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 是 MAFLD 重要诱发因素,任何胰岛素信号转导途径成分的蛋白质表达不足都可能导致肝 IR^[47]。AMPK 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,作为细胞能量代谢过程中重要的传感器和调节剂,AMPK 是研究代谢相关疾病的核心,AMPK 磷酸化后会增加细胞的 AMP/ATP 比,从而调节细胞能量代谢过程^[45,48]。PI3K 是一种胞内磷脂酰肌醇激酶,与多种细胞功能有关,包括细胞增殖、分化、凋亡和葡萄糖转运,同时也是胰岛素信号通路中关键信号分子^[46]。作为 PI3K 的关键下游效应子,Akt 主要负责 PI3K 引发的生物信息的传输,包括细胞代谢、细胞周期调控、细胞生长以及通过各种靶蛋白和下游途径的磷酸化而引起的细胞凋亡。AMPK 和 PI3K/Akt 途径并非彼此隔离,而是相互作用复杂。激活 AMPK 后,可以通过 AMPK 与 PI3K/Akt 信号通路之间的相互作用缓解由于胰岛素抵抗引起的 MAFLD^[22]。在高脂高糖诱导的 MAFLD 模型中,p-AMPK/AMPK、p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 蛋白的表达水平比均显著降低,在高脂高糖的饮食下肝细胞代谢产生大量 ATP,而 AMP 含量减少,导致 AMPK 的磷酸化程度降低,从而进一步导致 PI3K/Akt 信号通路受阻^[22,49-51]。岩黄连总碱可以一定程度逆转高能饮食导致的 AMPK/PI3K/Akt 信号的下调。此外,岩黄连总碱可改善肝脂肪变性,增加 p-AMPK 的表达水平并导致 PI3K/Akt 活化。通过影响胰岛素信号蛋白的表达和激活从而减轻肝脂肪变性。

本研究一方面证实岩黄连总碱对 MAFLD 具有

显著治疗作用,并进一步说明其作用机制可能是与AMPK/PI3K/Akt信号通路的活化有关,后期本课题组将对岩黄连总碱对NASH的改善作用作进一步探索。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Eslam M, Sanyal A J, George J, et al. MAFLD: a consensus-driven proposed nomenclature for metabolic associated fatty liver disease [J]. *Gastroenterology*, 2020, 158(7): 1999-2014.
- [2] 薛茵, 范建高. 代谢相关脂肪性肝病新定义的国际专家共识简介 [J]. *实用肝脏病杂志*, 2020, 23(3): 457-460.
Xue R, Fan J G. Brief introduction of an international expert consensus statement: a new definition of metabolic associated fatty liver disease [J]. *J Prac Hepatol* May, 2020, 23(3): 457-460.
- [3] 杨小颖, 胡芳, 韦晓虹, 等. 黄芪甲苷IV对非酒精性脂肪肝小鼠肝脏脂质代谢的作用 [J]. *实用医学杂志*, 2018, 34(24): 4064-4067, 4071.
Yang X Y, Hu F, Wei X H, et al. Effect of astragaloside IV on liver lipid metabolism of nonalcoholic fatty liver disease in mice [J]. *J Pract Med*, 2018, 34(24): 4064-4067, 4071.
- [4] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组, 中国医师协会脂肪性肝病专家委员会. 非酒精性脂肪性肝病防治指南(2018年更新版) [J]. *临床肝胆病杂志*, 2018, 34(5): 947-957.
National Workshop on Fatty Liver and Alcoholic Liver Disease, Chinese Society of Hepatology. Guidelines of prevention and treatment for nonalcoholic fatty liver disease: a 2018 update [J]. *Chin J Clin Hepatol*, 2018, 34(5): 947-957.
- [5] Diehl A M, Day C. Cause, pathogenesis, and treatment of nonalcoholic steatohepatitis [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(21): 2063-2072.
- [6] Lonardo A, Byrne C D, Caldwell S H, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes [J]. *Hepatology*, 2016, 64(4): 1388-1389.
- [7] Younossi Z M, Golabi P, de Avila L, et al. The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Hepatol*, 2019, 71(4): 793-801.
- [8] 余姣娇, 邱志霞, 刘秋燕, 等. 岩黄连的研究进展 [J]. *药学研究*, 2018, 37(6): 342-345, 360.
Yu J J, Qiu Z X, Liu Q Y, et al. Research advance on *Corydalis saxicola* Bunting [J]. *J Pharm Res*, 2018, 37(6): 342-345, 360.
- [9] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准 [M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 1991.
Health Department of Guangxi Zhuang Autonomous Region. *Guangxi Traditional Chinese Medicine Standard* [M]. Nanning: Guangxi Science and Technology Press, 1991.
- [10] 贵州省中医研究所. 贵州民间药物-第一辑 [M]. 贵阳: 贵州人民出版社, 1965.
Guizhou Institute of Traditional Chinese Medicine. *Guizhou Folk Medicine-Part One* [M]. Guiyang: Guizhou People's Publishing House, 1965.
- [11] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1986.
Jiangsu New Medical College. *Dictionary of Traditional Chinese Medicine* [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1986.
- [12] 蒙田秀, 谢丽莎, 黄茂春. 岩黄连提取物对CCl₄致小鼠肝损伤的保护作用 [J]. *上海中医药杂志*, 2013, 47(11): 89-91.
Meng T X, Xie L S, Huang M C. Protective effect of *Corydalis saxicola* Bunting extract on liver injury induced by CCl₄ in mice [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med*, 2013, 47(11): 89-91.
- [13] Wang T, Zhao L J, Li P, et al. Hepatoprotective effects and mechanisms of dehydrocavidine in rats with carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 138(1): 76-84.
- [14] 柯珉珉, 张宪德, 吴练中, 等. 岩黄连有效成分的研究 [J]. *植物学报*, 1982, 24(3): 289-291.
Ke M M, Zhang X D, Wu L Z, et al. Studies on the active principles of *Corydalis saxicola* Bunting [J]. *J Integrat Plant Biol*, 1982, 24(3): 289-291.
- [15] 刘思明, 胡坪, 罗国安, 等. 岩黄连注射液的高效液相色谱质谱联用指纹图谱研究 [J]. *药学学报*, 2005, 40(9): 846-849.
Liu S M, Hu P, Luo A G, et al. HPLC fingerprint for the *Corydalis saxicola* Bunting injection [J]. *Acta Pharm Sin*, 2005, 40(9): 846-849.
- [16] Yang P, Liang Y, Luo Y, et al. Liraglutide ameliorates nonalcoholic fatty liver disease in diabetic mice via the IRS2/PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2019, 12: 1013-1021.
- [17] Zhang C, Deng J, Liu D, et al. Nuciferine ameliorates hepatic steatosis in high-fat diet/streptozocin-induced diabetic mice through a PPAR α /PPAR γ coactivator-1 α pathway [J]. *Br J Pharmacol*, 2018, 175(22): 4218-4228.
- [18] Xu X, Zhu X P, Bai J Y, et al. Berberine alleviates nonalcoholic fatty liver induced by a high-fat diet in mice

- by activating SIRT3 [J]. *FASEB J*, 2019, 33(6): 7289-7300.
- [19] 周劲光. 岩黄连总碱对小鼠急性化学性肝损伤的保护作用研究 [J]. *中国当代医药*, 2010, 17(27): 29-30.
Zhou J G. Study of hepatoprotective effect of the total alkaloids from *Corydalis saxicola* Bunting of the acute chemical hepatic injury model mice [J]. *China Modern Med*, 2010, 17(27): 29-30.
- [20] de Jesús Acosta-Cota S, Aguilar-Medina E M, Ramos-Payán R, et al. Therapeutic effect of treatment with metformin and/or 4-hydroxychalcone in male Wistar rats with nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 863: 172699.
- [21] Song Y M, Lee Y H, Kim J W, et al. Metformin alleviates hepatosteatosis by restoring SIRT1-mediated autophagy induction via an AMP-activated protein kinase-independent pathway [J]. *Autophagy*, 2015, 11(1): 46-59.
- [22] Zheng T, Yang X, Wu D, et al. Salidroside ameliorates insulin resistance through activation of a mitochondria-associated AMPK/PI3K/Akt/GSK3 β pathway [J]. *Br J Pharmacol*, 2015, 172(13): 3284-3301.
- [23] Guo X L, Zhang Z C, Zeng T, et al. cAMP-MicroRNA-203-IFN γ network regulates subcutaneous white fat browning and glucose tolerance [J]. *Mol Metab*, 2019, 28: 36-47.
- [24] Gonçalves N B, Bannitz R F, Silva B R, et al. A -Linolenic acid prevents hepatic steatosis and improves glucose tolerance in mice fed a high-fat diet [J]. *Clinics (Sao Paulo)*, 2018, 73: e150.
- [25] Nagy C, Einwallner E. Study of *in vivo* glucose metabolism in high-fat diet-fed mice using oral glucose tolerance test (OGTT) and insulin tolerance test (ITT) [J]. *JoVE*, 2018(131). DOI:10.3791/56672.
- [26] 涂琦, 刘勇, 袁晟. 苏木素伊红染色一步法的研究及应用 [J]. *江西医药*, 2012, 47(2): 175-176.
Tu Q, Liu Y, Yuan S. Study and application of one-step staining with hematoxylin and eosin [J]. *Jiangxi J Med Pharm*, 2012, 47(2): 175-176.
- [27] 全国卫生专业技术资格考试专家委员会. 2007全国卫生专业技术资格考试指导-超声波医学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007.
National Health Professional Technical Qualification Examination Expert Committee. *2007 National Health Professional and Technical Qualification Examination Guidance-Ultrasound Medicine* [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2007.
- [28] 任秀花, 闫爱华, 任知春. 显示肝、肾上腺脂类油红O方法探讨 [J]. *四川解剖学杂志*, 2001, 9(2): 104.
Ren X H, Yan A H, Ren Z C. Discussion on the method of displaying oil red O of liver and adrenal lipids [J]. *Sichuan J Anat*, 2001, 9(2): 104.
- [29] 徐明堂, 张秀智, 赵静, 等. 介绍一种脂肪染色: 油红滴染法 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2017, 33(2): 221-222.
Xu M T, Zhang X Z, Zhao J, et al. Introducing a fat stain: oil red drip staining [J]. *Chin J Clin Exp Pathol*, 2017, 33(2): 221-222.
- [30] 胡谋波, 吕军影. 三种特殊染色方法在显示系统性硬化症小鼠肺组织胶原纤维的比较 [J]. *湖北民族学院学报: 医学版*, 2017, 34(4): 11-14.
Hu M B, Lv J Y. Comparison of three special staining methods in showing collagen fibers in lung tissue of systemic scleroderma mice [J]. *J Hubei Inst Nat (Med Ed)*, 2017, 34(4): 11-14.
- [31] 聂金涛. 基于BDNF介导的PI3K/AKT信号通路补肾活血方药对血管性痴呆大鼠海马神经元保护机制研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2015.
Nie J T. The research of protective mechanism on hippocampal neurons of vascular dementia rats by BuShenHuoXueFang base on PI3K/AKT signal pathway mediated by BDNF [D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2015.
- [32] 宣王益, 胡爱荣. 桑葚提取物对非酒精性脂肪性肝病的防治作用及机制 [J]. *现代实用医学*, 2020, 32(5): 506-507, 517, 603.
Xuan W Y, Hu A R. Preventive and therapeutic effects of mulberry extract on nonalcoholic fatty liver disease and its mechanism [J]. *Mod Pract Med*, 2020, 32(5): 506-507, 517, 603.
- [33] 李玉洁, 刘树民, 罗明媚, 等. 黄药子对小鼠肝脏毒性的表达及其机理研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2005, 11(1): 40-42.
Li Y J, Liu S M, Luo M M, et al. The express and principle study of liver toxicity of *Dioscorea bulbifera* L [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2005, 11(1): 40-42.
- [34] 赵杰, 齐永芬, 鱼艳荣. 氧化应激在肝纤维化发生发展中的作用 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2019, 35(9): 2067-2071.
Zhao J, Qi Y F, Yu Y R. Research advances in the role of oxidative stress in the development and progression of liver fibrosis [J]. *Chin J Clin Hepatol*, 2019, 35(9): 2067-2071.
- [35] Altamirano-Barrera A, Barranco-Fragoso B, Méndez-Sánchez N. Management strategies for liver fibrosis [J]. *Ann Hepatol*, 2017, 16(1): 48-56.
- [36] Zoubek M E, Trautwein C, Strnad P. Reversal of liver fibrosis: From fiction to reality [J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2017, 31(2): 129-141.
- [37] Dulai P S, Singh S, Patel J, et al. Increased risk of mortality by fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver

- disease: systematic review and meta-analysis [J]. *Hepatology*, 2017, 65(5): 1557-1565.
- [38] 顾怡瑾, 陆新元, 付华辉, 等. Masson 染色在辅助诊断肝纤维化中的应用 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2012, 28(1): 101-102.
- Gu Y J, Lu X Y, Fu H H, et al. Application of Masson staining in auxiliary diagnosis of hepatic fibrosis [J]. *Chin J Clin Exp Pathol*, 2012, 28(1): 101-102.
- [39] 于斐, 雷鸣, 曾晖, 等. 特殊染色技术在骨关节炎软骨形态学研究中的比较 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2015, 23(19): 1801-1807.
- Yu F, Lei M, Zen H, et al. Different special staining methods on cartilage tissue of osteoarthritis morphology: a comparison study [J]. *Orthop J China*, 2015, 23(19): 1801-1807.
- [40] 宋广军. 非酒精性脂肪性肝病的临床与发病机制的研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2005.
- Song G J. Study on the clinical and pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease [D]. Changsha: Central South University, 2005.
- [41] 岳维芸, 李莹. 非酒精性脂肪肝的诊断与中医药治疗进展 [A]//中华中医药学会第十五届内科肝胆病学术会议暨国家中医药管理局专科专病协作组(肝病组、传染病组)会议论文集 [C]. 济南: 中华医药学会, 2012: 542-546.
- Yue W Y, Li Y. Progress in diagnosis and treatment of non-alcoholic fatty liver with traditional Chinese medicine [A]//Proceedings of the 15th internal medicine hepatobiliary disease academic conference of the Chinese society of traditional Chinese medicine and the meeting of the cooperative group of specialized diseases (liver disease group and infectious disease group) of the State Administration of traditional Chinese Medicine [C]. Jinan: Chinese Medical Association, 2012: 542-546.
- [42] 郑寒星, 张薇薇. 非酒精性脂肪性肝病的中医健康干预措施述评 [J]. *中医研究*, 2019, 32(12): 66-70.
- Zheng H X, Zhang W W. Review of TCM health intervention measures for non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Tradit Chin Med Res*, 2019, 32(12): 66-70.
- [43] 赵婷, 王维. 中医药治疗非酒精性脂肪肝分子机制研究进展 [J]. *中国民族民间医药杂志*, 2019, 28(7): 54-58.
- Zhao T, Wang W. Advances in molecular mechanism of non-alcoholic fatty liver disease treated by traditional Chinese medicine [J]. *Chin J Ethnomed Ethnopharm*, 2019, 28(7): 54-58.
- [44] Kahn B B, Alquier T, Carling D, et al. AMP-activated protein kinase: Ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism [J]. *Cell Metab*, 2005, 1(1): 15-25.
- [45] Smith B K, Marcinko K, Desjardins E M, et al. Treatment of nonalcoholic fatty liver disease: role of AMPK [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2016, 311(4): E730-E740.
- [46] Yaribeygi H, Farrokhi F R, Butler A E, et al. Insulin resistance: review of the underlying molecular mechanisms [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(6): 8152-8161.
- [47] Naderali E, Fatani S, Itua I, et al. The effects of diet-induced obesity on hepatocyte insulin signaling pathways and induction of non-alcoholic liver damage [J]. *Int J Gen Med*, 2011: 211.
- [48] Cantley L C. The phosphoinositide 3-kinase pathway [J]. *Science*, 2002, 296(5573): 1655-1657.
- [49] Herzig S, Shaw R J. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(2): 121-135.
- [50] Garcia D, Shaw R J. AMPK: mechanisms of cellular energy sensing and restoration of metabolic balance [J]. *Mol Cell*, 2017, 66(6): 789-800.
- [51] Cool B, Zinker B, Chiou W, et al. Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome [J]. *Cell Metab*, 2006, 3(6): 403-416.

[责任编辑 兰新新]