

【实验研究】

雷公藤红素调控NLRP3炎症小体改善大鼠代谢相关脂肪性肝病研究

景 铭¹, 王美灵², 张媛媛¹, 张 红¹, 梁皓楠¹, 赵亚南¹, 周 辉¹, 辛文好^{1*}

1. 滨州医学院 药学院, 山东 烟台 264003

2. 烟台大学 药学院, 山东 烟台 264005

摘要: 目的 评价雷公藤红素对高脂饮食诱导的代谢相关脂肪性肝病(MAFLD)大鼠的保护作用,并探讨其可能的作用机制。方法 60只健康雄性Wistar大鼠,随机分为6组:对照组、模型组、水飞蓟素胶囊组(阳性对照,100 mg·kg⁻¹)和雷公藤红素低、中、高剂量(125、250、500 μg·kg⁻¹)组,每组10只。对照组给予普通饲料喂养,其余5组给予高脂饲料喂养建立MAFLD模型,造模4周后,从第5周开始给药,ig给予相应剂量的药物至第8周。记录大鼠体质量和肝脏湿质量,计算肝脏系数;腹主动脉取血,检测大鼠血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白-胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白-胆固醇(HDL-C)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和白细胞介素-1β(IL-1β)水平;HE染色观察肝脏病理变化;Western blotting法检测肝脏中NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)和半胱氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)蛋白表达水平。结果 与模型组比较,雷公藤红素各剂量组的肝脏病理学表现均有所改善,肝脏系数均显著降低($P<0.05, 0.01$);中、高剂量组大鼠血清中TC、TG、LDL-C、AST、ALT、TNF-α和IL-1β水平均显著降低($P<0.05, 0.01$);肝脏中NLRP3和Caspase-1的蛋白表达显著减少($P<0.05, 0.01$)。结论 雷公藤红素可明显减轻MAFLD大鼠的肝脏病理学损伤,改善血脂水平,其机制可能与调控NLRP3通路密切相关。

关键词: 雷公藤红素; 代谢相关脂肪性肝病; NLRP3炎症小体; 炎症反应

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)04-0624-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.04.004

Celastrol regulates NLRP3 inflammasome signal pathway to improve metabolic dysfunction-associated fatty liver disease in rats

JING Ming¹, WANG Meiling², ZHANG Yuanyuan¹, ZHANG Hong¹, LIANG Haonan¹, ZHAO Yanan¹, ZHOU Hui¹, XIN Wenyu¹

1. School of Pharmacy, Binzhou Medical University, Yantai 264003, China

2. School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005, China

Abstract: Objective To evaluate the protective effect of celastrol on metabolic dysfunction-associated fatty liver disease (MAFLD) rats induced by high-fat diet and explore its possible mechanism. **Method** Sixty healthy male Wistar rats were randomly divided into six groups: control group, model group, silymarin capsules group (100 mg·kg⁻¹), celastrol low dose group (125 μg·kg⁻¹), middle dose group (250 μg·kg⁻¹) and high dose group (500 μg·kg⁻¹), with ten rats in each group. The control group was fed with normal diet, and the other five groups were fed with high-fat diet to establish MAFLD model. After four weeks, the rats were given medicine from the fifth week, and the corresponding dose was given by intragastric administration to the 8th week. The body weight and wet weight of liver were recorded. The blood of abdominal aorta was taken to detect the biochemical indexes including alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), triacylglycerol (TG), Total cholesterol (TC), low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C), high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C), tumor necrosis factor -α (TNF-α) and interleukin-1 β (IL-1β) in rat serum. The pathological changes of liver tissue were observed by HE staining. The expression levels of NLRP3 and caspase-1 in liver were

收稿日期: 2021-08-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(81803546); 山东省自然科学基金项目(ZR2018LH024); 科研启动基金项目(BY2013KYQD09)

第一作者: 景 铭 E-mail: jingmingecho@163.com

*通信作者: 辛文好, 女, 博士, 副教授, 从事抗炎免疫药理学研究。Tel: (0535) 6913216 E-mail: xinwenyu1391139@163.com

detected by Western blotting. **Results** Compared with the model group, the liver pathology of each celastrol group was improved. The liver index, the contents of TC, TG, LDL-C, AST and ALT in serum and the expression of NLRP3 and caspase-1 in liver in middle and high dose celastrol groups were significantly lower than those in model group ($P < 0.05$ and 0.01). **Conclusion** Celastrol can significantly reduce the liver pathological damage and improve the level of blood lipids in MAFLD rats, and its mechanism may be closely related to the regulation of NLRP3 pathway.

Key words: celastrol; metabolic dysfunction-associated fatty liver disease; NLRP3 inflammasome; inflammatory reaction

代谢相关脂肪性肝病 (metabolic dysfunction-associated fatty liver disease, MAFLD) 是一种无过量饮酒史的情况下, 伴有脂肪变性和脂肪过度积累 [三酰甘油 (TG) 浸润超过 5% 的肝细胞] 的临床病理综合征, 包括单纯性脂肪肝 (simple fatty liver, SFL)、非酒精性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH)、肝硬化和肝癌^[1-2]。随着对 MAFLD 发病机制研究的不断深入, 发现炎症反应在 MAFLD 的病理过程中发挥驱动作用, 炎症因子的释放, 如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 (IL)-1 β 和 IL-18 等, 导致肝细胞损伤、肝炎及肝脏纤维化^[3-4]。最新研究表明, NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体在 MAFLD 中发挥重要作用, NF- κ B 信号通路的激活以及多种危险信号, 促进 NLRP3 蛋白的表达和成熟, 成熟的 NLRP3 炎症小体又可将 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 转变为 IL-1 β 和 IL-18, 进而加重肝细胞的炎症反应, 加快 MAFLD 病情的发展^[5-6]。因此, 抑制 NLRP3 炎症小体的激活, 有望成为治疗 MAFLD 的有效途径之一。

目前治疗 MAFLD 主要的有效方法是去除病因、改变生活方式和控制体质量。同时应选取相应的治疗药物, 如熊去氧胆酸、水飞蓟素、维生素 E、罗格列酮等; 或联合用药, 如多烯磷脂酰胆碱与二甲双胍合用, 改善胰岛素抵抗和脂质代谢紊乱^[7]。但是, 目前尚未有特异性治疗 MAFLD 的药物。中药具有调控多通路、多靶点的治疗 MAFLD 的优势。已有研究表明^[8-9], 参苓白术散能够通过激活核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)/抗氧化反应元件 (ARE) 信号通路和沉默信息调节因子 1 (SIRT1)/解偶联蛋白 2 (UCP2) 通路, 发挥改善高脂饮食诱导的 MAFLD 大鼠肝脏脂肪代谢紊乱, 减轻肝脏脂质蓄积。

雷公藤红素是从雷公藤根皮中提取的一种红色针状的醌甲基三萜类化合物, 具有抗炎、免疫抑制及抗肿瘤等多种药理活性^[10-11]。本课题组前期研究发现, 雷公藤红素能特异性抑制 NLRP3 炎症小体的活化, 进而抑制炎症反应的发生^[6], 但尚未进行雷公藤红素对 MAFLD 的治疗效果的研究。本实验采

用高脂饮食构建 MAFLD 大鼠模型, 研究雷公藤红素是否通过调控 NLRP3 炎症小体通路对 MAFLD 大鼠发挥治疗作用。

1 材料

1.1 实验动物

60 只健康雄性 Wistar 大鼠, 清洁级, 10 周龄, 体质量 (210 \pm 6) g, 购于济南朋悦实验动物繁育有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (鲁) 20190003, 饲养于滨州医学院药学院无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级动物房, 自由摄食和饮水。动物实验按照实验动物伦理委员会 (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC) 指导方案执行。

1.2 药物与主要试剂

高脂饲料 (基础饲料 77.6%、猪油 10%、蛋黄 5%、蔗糖 5%、胆固醇 2%、丙基硫氧嘧啶 0.2% 和脱氧胆酸钠 0.2%) 购于江苏省协美有限责任公司; 雷公藤红素购于科曼斯特医药科技发展有限公司 (批号 2070203, 质量分数 99.4%)。水飞蓟素胶囊 (利加隆) 购于德国马博士大药厂 (生产批号 B1403146, 规格每粒 140 mg); DMSO 购于 Sigma 公司, 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 购于北京索莱宝科技有限公司; 丙氨酸氨基转移酶 (alanine transaminase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、TG、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白-胆固醇 (low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C) 和高密度脂蛋白-胆固醇 (high density lipoprotein-cholesterol, HDL-C) 试剂盒均购于南京成建生物工程研究所; SDS-PAGE 凝胶配制、TNF- α 酶联免疫吸附剂分析 (ELISA) 和 IL-1 β ELISA 试剂盒均购于北京索莱宝科技有限公司; Caspase-1 抗体购于 Abcam 公司, NLRP3 和 GAPDH 抗体购于 Cell Signaling Technology。

1.3 主要仪器

全波长酶标仪 (美国 Bio Tek 公司); HC-1014 高速离心机 (长沙维尔康湘鹰离心机有限公司); ME204 电子天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司); SDS-

PAGE电泳装置(Bio Rad公司)。

2 方法

2.1 动物分组、模型的建立及给药

将60只Wistar雄性大鼠,普通饲料适应性饲养1周后,按体质量随机分为6组:对照组、模型组、水飞蓟素胶囊组(阳性对照,100 mg·kg⁻¹)和雷公藤红素低、中、高剂量(125、250、500 μg·kg⁻¹)组,每组10只。对照组给予普通饲料喂养,其余50只大鼠给予高脂饲料喂养,连续喂养4周建立MAFLD大鼠模型^[12]。

将雷公藤红素溶解在2%的DMSO中,充分溶解后,用0.5%的CMC-Na溶液充分混匀成混悬液;将水飞蓟素胶囊根据药品规格和给药体积换算为相应的浓度后,用0.5% CMC-Na溶液充分混匀成混悬液。从第5周开始,给药组ig相应混悬液,对照组和模型组ig等量0.5% CMC-Na,6个组的大鼠每天固定时间,按10 mL·kg⁻¹给药1次,连续给药4周,给药期间,造模动物继续给予高脂饲料喂养,对照组给予普通饲料喂养。

2.2 取材与肝脏系数测定

于第8周最后1次给药后,称大鼠体质量,并禁食12 h。用10%的水合氯醛麻醉后,腹主动脉取血。室温下放置2 h后,3 500 r·min⁻¹离心15 min,取上清得到淡黄色血清。分离大鼠的肝脏、漂洗,称质量,计算肝脏系数。取部分肝脏浸泡在4%多聚甲醛中用于病理学检查。

肝脏系数=肝脏湿质量/体质量

2.3 血脂水平和肝功能评价

严格按照TG、TC、LDL-C、HDL-C、ALT、AST试剂盒说明书步骤操作,分别检测大鼠血清中TG、TC、LDL-C、HDL-C、ALT、AST的含量。

2.4 肝脏病理学检查

将选取的大鼠肝脏,用4%的多聚甲醛固定过夜,常规石蜡包埋,进行切片处理,之后将组织样本切片脱蜡和水化,再进行苏木素-伊红(HE)染色,于光镜下观察肝脏脂肪变化情况,并拍照。

2.5 MAFLD活动度积分(MAFLD activity score, NAS)

(1)肝细胞脂肪变:0分(<5%)、1分(5%~33%)、2分(34%~66%)、3分(>66%);(2)小叶内炎症(20倍镜计数坏死灶):0分(无)、1分(<2个)、2分(2~4个)、3分(>4个);(3)肝细胞气球样变:0分(无)、1分(少见)、2分(多见)^[13]。总分8分。

2.6 血清中炎症因子的检测

采用ELISA法,严格按照TNF-α和IL-1β ELISA试剂盒的说明,分别检测各组大鼠血清中炎症因子TNF-α和IL-1β的含量。

2.7 肝脏中NLRP3和Caspase-1的表达

采用Western blotting法检测大鼠肝脏中NLRP3和Caspase-1的蛋白表达。将大鼠的肝脏在冰上剪碎,后加入裂解液裂解,离心,收取上清。用BCA法测定提取的蛋白浓度。取上清液,加入上样缓冲液,煮沸5 min,待恢复至室温后,放-20℃冰箱保存备用。按SDS-PAGE凝胶配制试剂盒的说明,配制10%分离胶,再配制浓缩胶,待完全凝固后,上样,电泳。切下目的蛋白,内参选用GAPDH,将其转至PVDF膜。室温下5%脱脂奶粉(TBST)封闭2 h,一抗4℃孵育过夜,TBST洗膜3次,每次10 min,二抗室温下孵育2 h,TBST洗膜3次,每次10 min。加超敏显影A、B液(1:1混合)显影,用Image J软件分析灰度值。

2.8 统计学分析

采用SPSS 22.0软件进行统计学分析,所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用One-ANOVA进行统计学检验。

3 结果

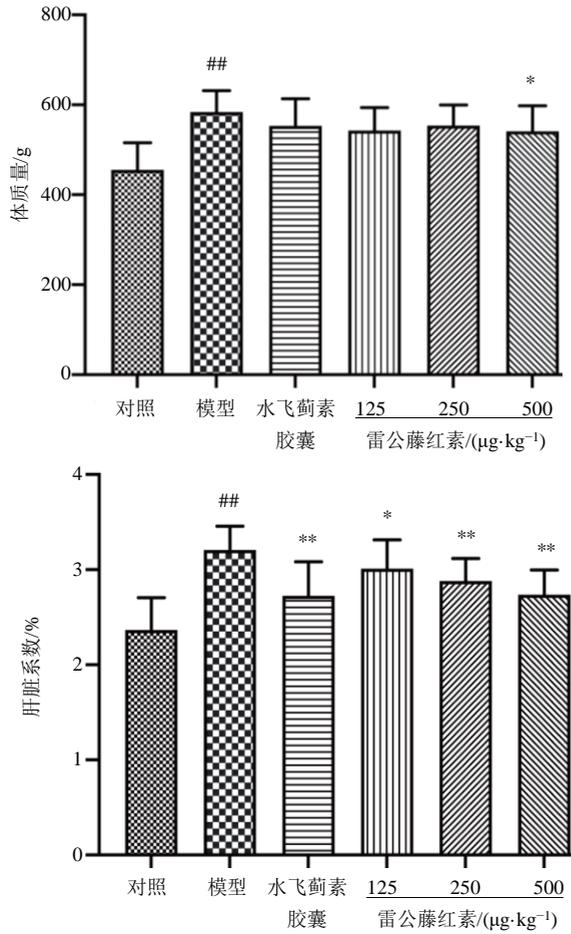
3.1 雷公藤红素对MAFLD大鼠体质量和肝脏系数的影响

如图1所示,与对照组比较,模型组大鼠体质量和肝脏系数均显著增加($P < 0.01$)。与模型组比较,水飞蓟素胶囊组和雷公藤红素低、中剂量组大鼠体质量均无统计学差异,雷公藤红素高剂量组大鼠体质量显著减少($P < 0.05$);水飞蓟素胶囊组和雷公藤红素低、中、高剂量组的肝脏系数均显著降低($P < 0.05, 0.01$)。

3.2 雷公藤红素对MAFLD大鼠肝脏组织病理学及NAS的影响

如图2所示,对照组大鼠肝细胞边界清晰,结构和形态完整,于中央静脉周围呈现放射状排列,细胞质丰富呈红染,无空泡现象;模型组大鼠肝细胞气球样变和肝脏脂肪变显著,肝细胞排列不齐,可见炎症细胞浸润,间隔增大;与模型组比较,水飞蓟素胶囊组和雷公藤红素各剂量组大鼠的肝脏脂肪变程度显著减轻,炎症细胞浸润明显减少。

与对照组比较,模型组大鼠NAS显著增加($P < 0.01$)。与模型组比较,水飞蓟素胶囊组和雷公藤红素低、中、高剂量组的NAS均显著降低($P < 0.05, 0.01$)。



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1 雷公藤红素对MAFLD大鼠体质量和肝脏系数的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 1 Effects of celastrol on body weight and liver index of MAFLD rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

3.3 雷公藤红素对MAFLD大鼠血脂水平的影响

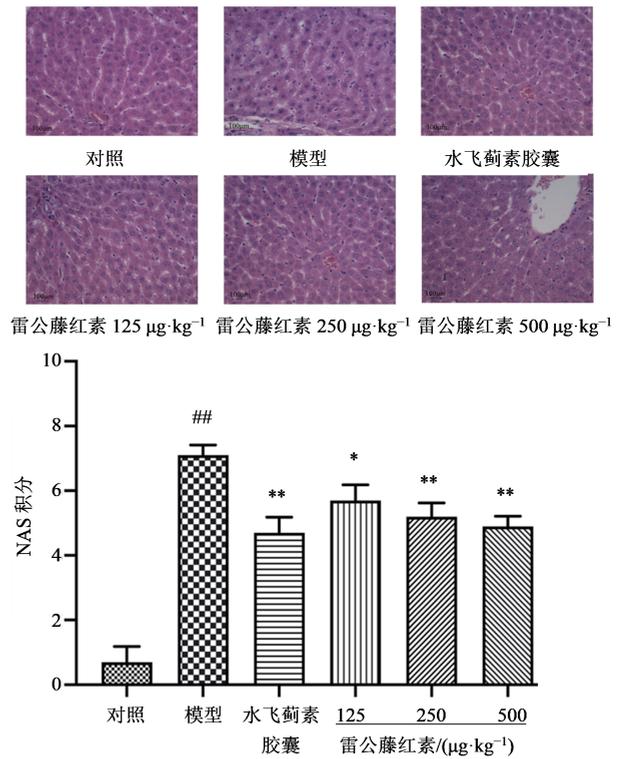
如表1所示,与对照组比较,模型组血清TC、TG和LDL-C水平显著升高($P < 0.01$),HDL-C水平显著降低($P < 0.01$)。与模型组比较,水飞蓟素胶囊组血清TC、TG和LDL-C水平显著降低($P < 0.01$),

表1 雷公藤红素对MAFLD大鼠血脂水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effect of celastrol on blood lipid level in MAFLD rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

分组	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)	LDL-C/(mmol·L ⁻¹)	HDL-C/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	1.86±0.77	0.81±0.29	0.62±0.58	1.78±0.34
模型	—	4.30±0.66 ^{##}	2.18±0.41 ^{##}	3.25±0.59 ^{##}	0.83±0.22 ^{##}
水飞蓟素胶囊	100	3.00±0.52 ^{**}	1.46±0.39 ^{**}	1.81±0.50 ^{**}	1.44±0.54 ^{**}
雷公藤红素	0.125	3.37±0.67 ^{**}	1.87±0.28	2.82±0.75	0.84±0.20
	0.250	3.07±0.72 ^{**}	1.70±0.19 ^{**}	1.96±0.58 ^{**}	1.05±0.28
	0.500	2.39±0.63 ^{**}	1.44±0.24 ^{**}	1.39±0.67 ^{**}	0.99±0.17

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



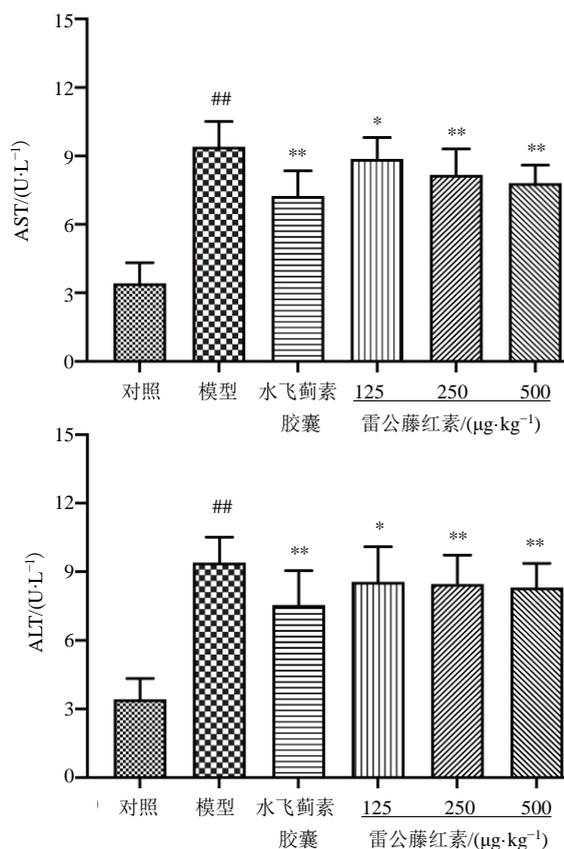
与对照组比较:^{##} $P < 0.01$;与模型组比较:^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$
^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group
图2 雷公藤红素对MAFLD大鼠肝脏组织病理学及NAS的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 2 Effect of celastrol on liver histopathology and NAS in MAFLD rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

HDL-C水平显著增加($P < 0.01$);雷公藤红素低剂量组血清TC水平显著降低($P < 0.01$),其他指标无统计学差异;雷公藤红素中、高剂量组血清TC、TG和LDL-C水平均显著降低($P < 0.01$),HDL-C水平均无统计学差异。

3.4 雷公藤红素对MAFLD大鼠肝功能的影响

如图3所示,与对照组比较,模型组大鼠血清AST和ALT活性显著增加($P < 0.01$),提示模型组大鼠出现严重的肝功能异常;与模型组比较,水飞



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3 雷公藤红素对MAFLD大鼠肝功能的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)
 Fig. 3 Effect of celastrol on liver function in MAFLD rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

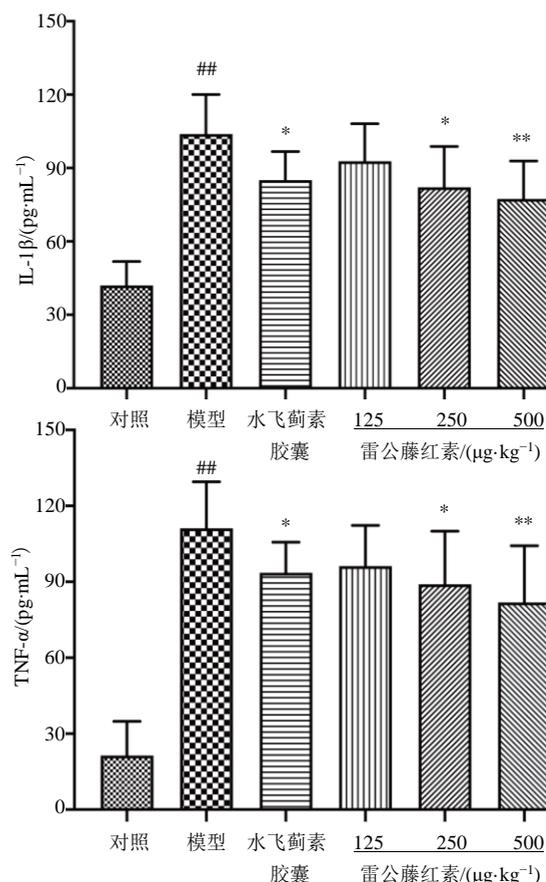
蓟素胶囊组和雷公藤红素各剂量组的AST和ALT活性均明显降低($P < 0.05, 0.01$),说明水飞蓟素和雷公藤红素均可以不同程度地改善MAFLD大鼠肝功能损伤。

3.5 雷公藤红素对MAFLD大鼠血清TNF- α 和IL-1 β 水平的影响

如图4所示,与对照组比较,模型组大鼠血清TNF- α 和IL-1 β 水平均显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,水飞蓟素胶囊组和雷公藤红素中、高剂量组大鼠血清TNF- α 和IL-1 β 水平均明显降低($P < 0.05, 0.01$)。

3.6 雷公藤红素对MAFLD大鼠肝脏中NLRP3和Caspase-1表达的影响

如图5所示,与对照组比较,模型组大鼠肝脏中的NLRP3和Caspase-1蛋白表达显著增加($P < 0.01$)。与模型组比较,水飞蓟素胶囊组的NLRP3表达显著降低($P < 0.05$),但Caspase-1的表达无明显差异;雷公藤红素各剂量均可显著降低MAFLD大鼠肝脏中Caspase-1蛋白表达($P < 0.05, 0.01$),



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

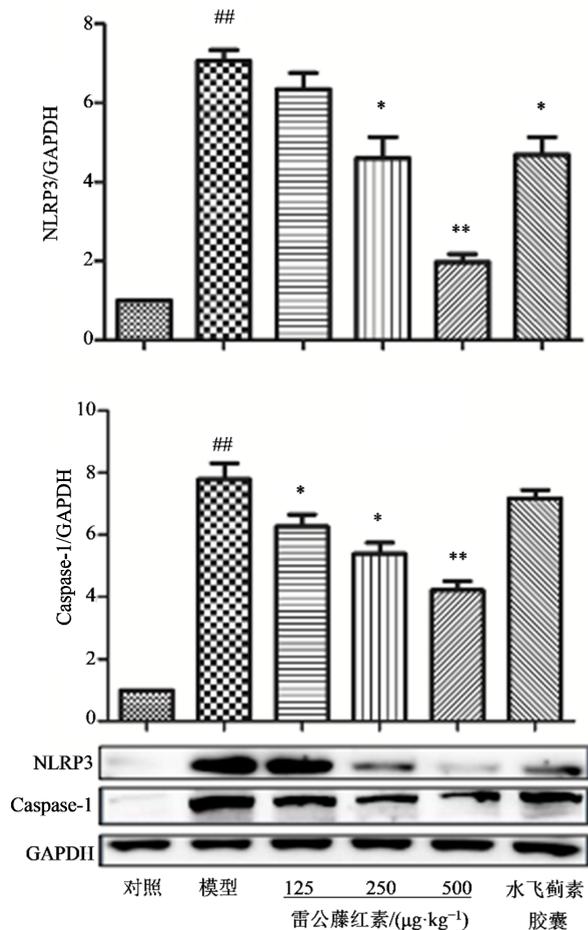
图4 雷公藤红素对大鼠血清中TNF- α 和IL-1 β 的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)
 Fig. 4 Effects of celastrol on TNF- α and IL-1 β in MAFLD rat serum ($\bar{x} \pm s, n=10$)

中、高剂量显著降低NLRP3蛋白表达($P < 0.05, 0.01$)。

4 讨论

MAFLD是包括从SFL到NASH的一系列的病理学过程,其特征是无或轻微炎症的脂肪变性,并伴有或不伴有纤维化^[14]。已有研究表明,在底物超载脂毒性损伤(substrate overload lipotoxic injury, SOLLI)模型的NASH发病机制中,由于碳水化合物和脂肪酸底物超载或脂肪酸处理途径受损,脂肪酸可能会促进脂毒素(如二酰甘油、神经酰胺和溶血磷脂酰胆碱)产生,导致内质网应激、线粒体功能障碍、肝细胞损伤、炎症和细胞凋亡,产生NASH的组织学表型^[15],这些过程进一步导致肝脏纤维化和肝癌。因此,控制脂质和碳水化合物的摄入,抑制炎症反应可能成为治疗MAFLD的有效途径。

中药雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook.f. 是卫矛科植物雷公藤的根、叶及花,其所含成分复杂,雷



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5 雷公藤红素对MAFLD大鼠肝脏中NLRP3和caspase-1表达的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 5 Effects of celastrol on texpression of NLRP3 and caspase-1 in liver of MAFLD rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

公藤红素是从中提取得到的一种化学单体,具有抗肿瘤、免疫抑制、神经保护等药理学活性,但具有一定的肝毒性、肾毒性和生殖毒性^[16-18]。同时有研究表明,雷公藤红素对MAFLD模型细胞具有一定的保护作用,并且可以通过调节脂质合成降低TG水平,减轻MAFLD的肝脂肪变和炎症细胞浸润^[19-20]。水飞蓟素是从菊科植物水飞蓟种子中提出的黄酮类天然化合物,具有抗炎、稳定肝细胞和抗肝纤维化的作用,且水飞蓟素是已经用于临床治疗MAFLD的药物^[21],本实验选取水飞蓟素作为阳性对照,通过高脂饮食构建MAFLD大鼠模型,评价雷公藤红素对MAFLD的作用效果及机制。

本研究结果显示,雷公藤红素能够显著降低高脂饮食诱导的MAFLD大鼠血清中TC、TG和LDL-C水平,进一步证明雷公藤红素能调节MAFLD大鼠的血脂水平,改善MAFLD大鼠脂质代谢紊乱。

血清中ALT和AST活性升高是肝功能受损的特异性指标。ALT主要存在于肝细胞内,AST主要存在于心肌细胞和肝细胞内,当肝细胞严重损伤时,由于细胞通透性增加,肝细胞中的ALT和AST释放入血,导致血清中ALT和AST活性升高^[22]。实验结果显示经雷公藤红素治疗的MAFLD大鼠肝细胞炎症细胞浸润、肝脂肪变明显减轻,血清中ALT和AST活性显著降低。说明雷公藤红素能减轻MAFLD脂质代谢紊乱引起的肝脏损伤,抑制MAFLD发展。

MAFLD发病机制的“多重打击”学说被广泛接受,由炎症因子诱导的慢性的低度炎症,参与了MAFLD整个的病理生理过程^[23]。已有研究表明,脂毒素通过释放危险相关分子模式(damage-associated molecular patterns, DAMPs)和病原激活的分子模式(pathogen-activated molecular patterns, PAMPs),触发炎症反应,最后激活了肝脏炎症的先天免疫,加剧纤维化、肝硬化的进程,导致肝癌^[24]。IL-1 β 是IL-1家族中具有多效性功能的免疫细胞因子,是急性和慢性炎症的重要驱动因素,在MAFLD病程发展中,IL-1 β 能通过抑制过氧化物酶体增殖物激活受体- α (PPAR- α)和增强TNF- α 诱导肝细胞死亡^[25-26]。本研究结果显示,模型组大鼠血清中TNF- α 和IL-1 β 含量显著增多,雷公藤红素能显著降低大鼠血清中TNF- α 和IL-1 β 的含量,说明雷公藤红素能通过抑制炎症反应,调控炎症因子的表达,改善炎症反应对MAFLD大鼠的肝脏损伤,从而发挥对MAFLD大鼠肝脏的保护作用。同时,IL-1 β 的成熟与活化受NLRP3炎症小体的调控。

NLRP3炎症体是最具特征性的炎症体之一,由NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)和pro-caspase-1组成^[27-28]。NLRP3是一种胞浆蛋白,包含C端的富含亮氨酸重复序列(LRR),具有ATPase活性的中心核苷酸结合和寡聚化结构域Nacht,以及N端招募ASC的吡啶结构域(PYD),在单核细胞、中性粒细胞、树突状细胞、淋巴细胞、成骨细胞和上皮细胞中表达^[29]。NLRP3炎症小体信号通路由2个信号通路激活,一个是启动信号,另一个是激活信号。启动信号由炎症刺激引发,可诱导NF- κ B介导的NLRP3和pro-IL-1 β 的表达,活化信号由PAMPs和DAMPs触发,例如ROS、Ca²⁺、K⁺外流,Cl⁻外流,三磷酸腺苷(ATP)等,这些因素可以促进NLRP3炎症小体的组装和成熟^[30]。

NLRP3炎症小体在MAFLD中发挥复杂的作用机制。在脂质积累过程中,脂肪酸、ATP、尿酸或来

自细胞外基质的蛋白质等分子,可作为DAMPs和PAMPs,可激活NLRP3炎症小体信号通路。此外,NLRP3炎症体的组装引发pro-Caspase-1蛋白水解为活性的Caspase-1,Caspase-1将细胞因子前体pro-IL-1 β 和pro-IL-18分别转化为成熟的和具有生物活性的IL-1 β 和IL-18分泌至细胞外^[31]。有研究表明,在MAFLD中,IL-1 β 的成熟与分泌促进胰岛素抵抗,促进动脉粥样硬化斑块形成^[32-33]。此外,最新研究表明IL-18依赖的信号是脂肪肝早期肝损害的调节因子,IL-18缺乏在很大程度上对NASH具有保护作用^[34]。NLRP3激活后诱导IL-1 β 的大量释放,IL-1 β 进一步促进TG合成及脂肪沉积,诱导肝脏中炎症反应,促进肝细胞变性和坏死,加剧MAFLD的发展。因此,抑制NLRP3炎症小体的可能是减轻NASH肝脏炎症和纤维化的有效方法。

有研究表明^[35],特异性NLRP3抑制剂MCC950在2种不同的模型中可以改善肝脏损伤,显著减少肝脏巨噬细胞和中性粒细胞的浸润,并调节脂肪性肝炎的纤维化进程。且在MAFLD中NLRP3炎症小体相关组分NLRP3、Caspase-1和IL-1 β 的mRNA表达均明显上调^[36]。本研究发现,高脂饮食诱导的MAFLD模型组大鼠的肝脏中NLRP3和Caspase-1蛋白表达显著增多,进一步说明NLRP3炎症小体与MAFLD发生发展有着密切联系。且本实验结果显示,雷公藤红素中、高剂量能够显著降低NLRP3和Caspase-1的表达。雷公藤红素可通过抑制NLRP3炎症小体的活化,抑制IL-1 β 的产生,降低脂质代谢紊乱和炎症反应对MAFLD的肝脏损伤。已有研究表明,雷公藤红素长期应用的安全剂量为470 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ^[37],本实验中应用的雷公藤红素最大剂量为500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,若长期应用该剂量,需进一步开展该剂量下雷公藤红素对MAFLD大鼠的毒性研究。

综上所述,雷公藤红素中剂量(250 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)能明显改善MAFLD大鼠的血脂水平、肝脏病变、炎症反应,该剂量在安全剂量范围之内,可考虑作为雷公藤红素治疗MAFLD的安全有效剂量。同时,雷公藤红素可以减轻高脂诱导的MAFLD大鼠的肝脏病理学损伤,调控血脂水平、改善肝功能。其机制可能是与抑制NLRP3炎症反应通路,降低IL-1 β 的分泌,抑制炎症反应,从而减少脂质沉积,改善高脂饮食诱导的MAFLD大鼠的脂质代谢紊乱和炎症损伤有关。此外,雷公藤红素是一种热休克蛋白90(Hsp90)的抑制剂,有研究表明Hsp90可以与NLRP3相互作用增加NLRP3的稳定性,是为了维

持NLRP3处于不活跃但有信号能力的状态^[38-39]。雷公藤红素对MAFLD发挥治疗作用的分子机制,需要开展更深入的研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Hardy T, Oakley F, Anstee Q M, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: Pathogenesis and disease spectrum [J]. *Annu Rev Pathol*, 2016, 11: 451-496.
- [2] Byrne C D, Targher G. NAFLD: A multisystem disease [J]. *J Hepatol*, 2015, 62(1 Suppl): S47-S64.
- [3] Gao B, Tsukamoto H. Inflammation in alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease: Friend or Foe? [J]. *Gastroenterology*, 2016, 150(8): 1704-1709.
- [4] Schuster S, Cabrera D, Arrese M, et al. Triggering and resolution of inflammation in NASH [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018, 15(6): 349-364.
- [5] Manne V, Handa P, Kowdley K V. Pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Clin Liver Dis*, 2018, 22(1): 23-37.
- [6] Xin W Y, Wang Q Y, Zhang D, et al. A new mechanism of inhibition of IL-1 β secretion by celastrol through the NLRP3 inflammasome pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 814: 240-247.
- [7] 付丽娜, 张秋瓚. 非酒精性脂肪性肝病治疗进展 [J]. *实用医学杂志*, 2017, 33(13): 2075-2078.
Fu L N, Zhang Q Z. Progress in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease [J]. *J Pract Med*, 2017, 33(13): 2075-2078.
- [8] 张玉佩, 杨钦河, 金玲, 等. 参苓白术散对NAFLD大鼠肝脏脂质代谢及SIRT1/UCP2通路的影响 [J]. *中药新药与临床药理*, 2016, 27(1): 38-44.
Zhang Y P, Yang Q H, Jin L, et al. Effects of Shen Ling Baizhu Powder on lipid metabolism and SIRT1/UCP2 pathway in liver tissues of rats with non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*, 2016, 27(1): 38-44.
- [9] 金玲, 杨钦河, 张玉佩, 等. 参苓白术散对NAFLD大鼠肝组织Nrf2/ARE信号通路的影响 [J]. *中药新药与临床药理*, 2016, 27(3): 327-332.
Jin L, Yang Q H, Zhang Y P, et al. Effects of shenling baizhu powder on Nrf2/ARE pathway in liver tissue of nonalcoholic fatty liver disease rats [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*, 2016, 27(3): 327-332.
- [10] 陈铭祥, 冯玉静, 王定勇, 等. 雷公藤红素的研究进展 [J]. *中成药*, 2010, 32(3): 473-476.
Chen M X, Feng Y J, Wang D Y, et al. Research progress of celastrol [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2010, 32(3): 473-476.

- [11] 徐资怡, 石金凤, 鲜静, 等. 雷公藤红素单用和联用抗肿瘤作用机制的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(14): 4372-4385.
Xu Z Y, Shi J F, Xian J, et al. Research progress on anti-tumor mechanism of celastrol alone and in combination [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(14): 4372-4385.
- [12] 张艳鹤, 郑亚云, 芦超, 等. 余甘子鞣质对代谢相关脂肪性肝病小鼠脂质代谢及肠道菌群的调节作用 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(2): 287-293.
Zhang Y H, Zheng Y Y, Lu C, et al. Effect and mechanism of tannin part of *Phyllanthus emblica* on lipid metabolism and intestinal flora in MAFLD mice [J]. Drug Eval Res, 2022, 45(2): 287-293.
- [13] von Schönfels W, Beckmann J H, Ahrens M, et al. Histologic improvement of NAFLD in patients with obesity after bariatric surgery based on standardized NAS (NAFLD activity score) [J]. Surg Obes Relat Dis, 2018, 14(10): 1607-1616.
- [14] Calzadilla Bertot L, Adams L A. The natural course of non-alcoholic fatty liver disease [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(5): 774.
- [15] Neuschwander-Tetri B A. Non-alcoholic fatty liver disease [J]. BMC Med, 2017, 15(1): 45-50.
- [16] 刘为萍, 刘素香, 唐慧珠, 等. 雷公藤研究新进展 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1215-1218.
Liu W P, Liu S X, Tang H Z, et al. New development of *Tripterygium wilfordii* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2010, 41(7): 1215-1218.
- [17] 吕英杰, 王帅珂, 吴苹, 等. 雷公藤红素的肝肾毒性分析及其对高脂饮食小鼠肠道菌群的调节作用 [J]. 现代食品科技, 2020, 36(5): 35-41.
Lyu Y J, Wang S K, Wu P, et al. Liver and kidney toxicity of celastrol and its regulating action of gut microbiota on a high-fat diet mice [J]. Mod Food Sci Technol, 2020, 36(5): 35-41.
- [18] 刘亮, 肖延凤, 尹春燕, 等. 内质网应激在高脂饲料诱导幼年大鼠脂肪性肝损伤中的作用 [J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2015, 36(6): 724-729.
Liu L, Xiao Y F, Yin C Y, et al. Effects of endoplasmic Reticulum stress on hepatocellular injury in young rats fed with high-fat diet [J]. J Xi'an Jiaotong Univ Med Sci, 2015, 36(6): 724-729.
- [19] 姜霞, 姜慧玲, 杨帆, 等. 雷公藤红素对非酒精性脂肪肝L02细胞内质网应激的影响及机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(14): 99-105.
Jiang X, Jiang H L, Yang F, et al. Effect and mechanism of celastrol on endoplasmic Reticulum stress in hepatic L02 cells of nonalcoholic fatty liver disease [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2019, 25(14): 99-105.
- [20] 李锋, 李义嘉, 李清仙, 等. 雷公藤红素抑制LDL及HAEC细胞氧化损伤作用 [J]. 中国药理学通报, 2016, 32(11): 1578-1584.
Li F, Li Y J, Li Q X, et al. The inhibitive effects of celastrol on LDL oxidation and HAEC cell oxidative damage [J]. Chin Pharmacol Bull, 2016, 32(11): 1578-1584.
- [21] 李慧, 潘竞锵, 郭洁文, 等. 水飞蓟素抗肝损伤及治疗糖尿病并发症作用的研究 [J]. 现代食品与药品杂志, 2007, 17(4): 18-22.
Li H, Pan J Q, Guo J W, et al. Study of silymarin on antagonizing hepatic damage, treating diabetes and its complications [J]. J Mod Food Pharm, 2007, 17(4): 18-22.
- [22] Lala V, Goyal A, Bansal P, et al. *Liver Function Tests* [M]. Treasure Island (FL): StatPearls, 2021.
- [23] 李秀丽, 王蒙. 非酒精性脂肪肝病发病机制的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(10): 2647-2648.
Li X L, Wang M. Research progress on the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease [J]. Shizhen J Med Mater Medica Res, 2010, 21(10): 2647-2648.
- [24] del Campo J A, Gallego P, Grande L. Role of inflammatory response in liver diseases: Therapeutic strategies [J]. World J Hepatol, 2018, 10(1): 1-7.
- [25] 陈洁, 陈佳良, 肖琨珉, 等. 炎症因子与非酒精性脂肪性肝病关系研究进展 [J]. 医学综述, 2019, 25: 2949-2954.
Chen J, Chen J L, Xiao K M, et al. Research advances in relationship between nonalcoholic fatty liver disease and inflammatory factors [J]. Med Recapitul, 2019, 25(15): 2949-2954.
- [26] Tilg H, Moschen A R, Szabo G. Interleukin-1 and inflammasomes in alcoholic liver disease/acute alcoholic hepatitis and nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis [J]. Hepatology, 2016, 64(3): 955-965.
- [27] Yang Y, Wang H N, Kouadir M, et al. Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(2): 128-138.
- [28] 穆瑞旭, 勾文峰, 魏会强, 等. 炎症小体NLRP3信号通路调控机制及其小分子靶点抑制剂的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35(11): 2283-2287.
Mu R X, Gou W F, Wei H Q, et al. Regulatory mechanism of inflammasome NLRP3 signaling pathway and its small molecular inhibitors [J]. Drugs Clin, 2020, 35(11): 2283-2287.
- [29] Zahid A, Li B F, Kombe A J K, et al. Pharmacological inhibitors of the NLRP3 inflammasome [J]. Front Immunol, 2019, 10: 2538.
- [30] Sutterwala F S, Haasken S, Cassel S L. Mechanism of NLRP3 inflammasome activation [J]. Ann N Y Acad Sci,

- 2014, 1319(1): 82-95.
- [31] He Y, Hara H, Núñez G. Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation [J]. Trends Biochem Sci, 2016, 41(12): 1012-1021.
- [32] Vandanmagsar B, Youm Y H, Ravussin A, et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance [J]. Nat Med, 2011, 17(2): 179-188.
- [33] Duewell P, Kono H, Rayner K J, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals [J]. Nature, 2010, 464(7293): 1357-1361.
- [34] Hohenester S, Kanitz V, Schiergens T, et al. IL-18 but not IL-1 signaling is pivotal for the initiation of liver injury in murine non-alcoholic fatty liver disease [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(22): 8602.
- [35] Mridha A R, Wree A, Robertson A A B, et al. NLRP3 inflammasome blockade reduces liver inflammation and fibrosis in experimental NASH in mice [J]. J Hepatol, 2017, 66(5): 1037-1046.
- [36] Ganz M, Csak T, Szabo G. High fat diet feeding results in gender-specific steatohepatitis and inflammasome activation [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(26): 8525-8534.
- [37] 王慧. 雷公藤红素的长期毒性研究 [J]. 中国民族民间医药, 2017, 26(6): 39-45.
Wang H. Study on the long-term toxicity of celastrol [J]. Chin J Ethnomedicine Ethnopharmacy, 2017, 26(6): 39-45.
- [38] Kelley N, Jeltama D, Duan Y H, et al. The NLRP3 inflammasome: An overview of mechanisms of activation and regulation [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(13): E3328.
- [39] Zhang T, Li Y Y, Yu Y K, et al. Characterization of celastrol to inhibit hsp90 and cdc37 interaction [J]. J Biol Chem, 2009, 284(51): 35381-35389.

[责任编辑 兰新新]