

六棱菊提取物通过上调 Nrf2 信号通路对代谢相关脂肪性肝病模型小鼠的干预作用

黄晓东^{1,2}, 钟文¹, 青冰^{1,2}, 邓青梅², 周广运², 魏江存^{1,2*}

1. 广西中医药大学附属国际壮医医院, 广西 南宁 530201

2. 广西中医药大学, 广西 南宁 530200

摘要: 目的 通过网络药理学以及动物实验探讨六棱菊对代谢相关脂肪性肝病 (MAFLD) 模型小鼠的干预作用及潜在的分子机制。方法 通过文献检索得到六棱菊的活性成分, 通过 SwissTargetPredicton 和疾病数据库 (GeneCards) 和 Pharm Mapper 数据库预测六棱菊成分相关靶标, Genecards 数据库获取 MAFLD 和氧化应激相关靶标, 通过 STRING 和 Cytoscape 3.9.1 软件建立蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络模型并找到关键靶点。对六棱菊治疗 MAFLD 的靶标进行 GO 富集分析与 KEGG 通路富集分析。将 50 只 C57BL/6J 雄性无菌小鼠适应性饲养 1 周后随机分为 5 组, 分别为对照组、模型组及六棱菊提取物低、中、高剂量 (1.25、2.50、5.00 g·kg⁻¹) 组; 小鼠给予高脂饲料 8 周进行 MAFLD 造模, 造模后给药 6 周。实验第 14 周末处死小鼠, 比较各组小鼠肝脏指数、肝组织病理变化, 测定各组小鼠血清中炎症因子的水平及肝脏中脂肪含量, 测定血清转氨酶、肝脏脂肪水平以及肝组织的氧化损伤指标丙二醛 (MDA)、还原型谷胱甘肽 (GSH)、超氧化物歧化酶 (SOD) 水平, 检测核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 信号通路重要基因和蛋白 Nrf2、NAD (P) H 喹啉氧化酶 1 (Nqo1)、糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β) 和非受体酪氨酸蛋白激酶 (Fyn) 的表达水平。结果 网络药理学获得六棱菊、MAFLD、氧化应激的交集靶点共 304 个, 六棱菊可能通过 TNF、AKT1、ALB、EGFR、STAT3、NFE2L2 等核心靶点作用于 HIF-1、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE、甲状腺激素、FoxO、PI3K-Akt、TNF 信号通路等发挥 MAFLD 治疗作用。动物实验结果显示, 与对照组比较, 模型组小鼠的整体状态差, 肝脏组织大面积脂肪变性及脂质浸润, 血清转氨酶、肝脏脂肪水平明显升高, 证实了高脂饲料饮食喂养 8 周成功构建了小鼠 MAFLD 模型; 各药物干预治疗组小鼠肝脏指数、肝脏病理变化和肝脏脂肪水平, 血清转氨酶、脂质过氧化水平和 Nrf2 信号通路重要基因和蛋白表达均较模型组显著改变 ($P < 0.05$), 其中, 六棱菊提取物高剂量组改变最为明显。结论 不同剂量六棱菊提取物干预均能明显改善 MAFLD 小鼠血清中炎症因子水平, 肝脏脂质沉积、肝功能指标, 降低肝脏指数, 可能与调控 Nrf2 信号通路的表达, 降低肝组织中脂质过氧化水平和炎症反应的表达有关。

关键词: 代谢相关脂肪性肝病; 六棱菊; 核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 信号通路; 脂质过氧化; 炎症反应; 氧化应激

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2024) 09-1971-14

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.09.004

Effect of *Laggera alata* extract on alleviates metabolism-related fatty liver disease in mice by up-regulating Nrf2 signaling pathway

HUANG Xiaodong^{1,2}, ZHONG Wen¹, QING Bing^{1,2}, DENG Qingmei², ZHOU Guangyun², WEI Jiangcun^{1,2}

1. International Zhuang Medicine Hospital Affiliated to Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530201, China

2. Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530200, China

Abstract: Objective To investigate the effect and potential molecular mechanism of *Laggera alata* extract on alleviates metabolism-related fatty liver disease (MAFLD) through network pharmacology and drug intervention. **Methods** The active ingredients of

收稿日期: 2024-06-24

基金项目: 广西自然科学基金青年基金项目 (2024GXNSFBA010302); 广西重点研发计划项目 (桂科 AB21196057); 国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目-少数民族药学 (壮药学) [zyyzdxk-2023165]; 广西国际壮医医院“青苗工程”“人才培养项目” (编号: 2022001); 广西国际壮医医院培育项目 (2023GZYJKT008); 广西中医药多学科交叉创新团队项目 (GZKJ2309); 广西中医药大学“高层次人才培育创新团队”项目 (2022A008); 广西国际壮医医院 2023 年高层次人才队伍建设三年行动计划项目 (GZCX20231203); 广西中医药大学第三批“岐黄工程”高层次人才团队培育项目 (202414)

第一作者: 黄晓东, 硕士, 讲师, 主要从事中药及药效机制研究。E-mail: 25640068@qq.com

***通信作者:** 魏江存, 硕士, 助理研究员, 主要从事中药、民族药相关研究。E-mail: 960837714@qq.com

Laggera alata extract were analyzed through literature retrieval and the elated targets were predicted by SwissTargetPrediction and Pharm Mapper databases. MAFLD and oxidative stress-related targets were obtained by Genecards database. PPI network model was established and key targets were found by STRING and Cytoscape 3.9.1 software. Besides, GO enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis were performed on the targets of hexagon chrysanthemum in the treatment of MAFLD. 50 male sterile C57BL/6J mice were randomly divided into five groups after one week of adaptive feeding, which were control group, model group, low dose group, medium dose group and high dose group of *Laggera alata* extract. The experimental mice were given high-fat diet for MAFLD modeling, and the low, medium and high dose groups (1.25, 2.50, and 5.00 g·kg⁻¹) were given daily by gavage. Mice in each intervention treatment group were given ig administration once a day for six weeks. The mice were killed at the end of the 14th week of the experiment, and the liver index, liver tissue pathological changes, serum inflammatory factors and liver fat content, serum aminotransferase, liver fat level, oxidative damage index of liver malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH) and superoxide dismutase (SOD) levels and important genes and proteins of Nrf2 signaling pathway of the five groups of mice were compared. Expression levels of nuclear factor E2 associated factor 2 (Nrf2), NAD(P)H quinoline oxidase 1 (Nqo1), glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) and non-receptor tyrosine protein kinase (Fyn). **Results** A total of 304 intersection targets of *Laggera alata*, MAFLD and oxidative stress were obtained by network pharmacology. *Laggera alata* may act on HIF-1, AGE-RAGE, thyroid hormone, FoxO, PI3K-Akt and TNF signaling pathways in diabetic complications through core targets such as TNF, AKT1, ALB, EGFR, STAT3 and NFE2L2 to exert the therapeutic effect of MAFLD. Compared with the control group, the overall state of mice was poor, the liver tissues were large steatosis and lipid infiltration, and the serum aminotransferase and liver fat levels were significantly increased, which confirmed that the MAFLD model of mice was successfully constructed after eight weeks of high-fat diet. Liver index, liver pathological changes, liver fat level, serum aminotransferase, lipid peroxidation level and Nrf2 signaling pathway important gene and protein expression of mice in all drug intervention groups were significantly changed compared with model group, among which the changes were most obvious in high-dose group, and the results were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Different doses of *Laggera alata* extract can significantly improve the levels of serum inflammatory factors, liver lipid deposition, liver function, and decrease liver index in MAFLD mice, which may be related to regulating the expression of Nrf2 signaling pathway, reducing the level of lipid peroxidation and the expression of inflammation in liver tissues.

Key words: alleviates metabolism-related fatty liver disease (MAFLD); *Laggera alata* (D.Don) Sch.Bip. ex Oliv; Nrf2 signaling pathway; lipid peroxidation; inflammatory response; oxidative stress

代谢相关脂肪性肝病(MAFLD)在医学上曾被称为非酒精性脂肪性肝病(NAFLD),近些年,随着人民生活水平不断提高,生活节奏和饮食习惯都发生明显改变,使MAFLD患病率明显上升。目前,在世界范围内,MAFLD的患病率高达32.4%^[1]。其中,30%~40%的MAFLD患者可能进一步发展为肝硬化或肝癌^[2]。但是,遗憾的是,MAFLD发生发展的分子机制目前并不十分清楚,目前的研究表明炎症和氧化应激可能对MAFLD发生发展起到重要的作用。临床上,虽然有一些化学药对MAFLD具有治疗效果,但是这些药物的不良反应大的缺陷很大程度限制了药物的应用^[2]。因此,找到安全有效的治疗MAFLD的药物是亟待解决的临床问题。

六棱菊 *Laggera alata* (D.Don) Sch.Bip. ex Oliv 系菊科六棱菊属植物,全株入药,具有祛风、除湿、解毒的作用,主要分布于我国广西、云南、四川及贵州,常作为抗菌消炎、清热解毒的良药,用于跌打损伤、风湿关节炎和调脂等^[3]。六棱菊主要含黄酮类、酚酸类^[4-5]等成分^[6],有研究表明,六棱菊具有治疗

急慢性炎症、抗肿瘤、抗肝炎、抗病毒和抗微生物等作用^[6]。六棱菊提取物是从六棱菊中提取的天然活性成分组合,其主要的成分包括5 α -羟基硬脂酸和羟基异硬脂酸这2种桉烷(eudesmane)型倍半萜烯,另外,还含有1种重要的成分异绿原酸。据相关研究报道,六棱菊具有抗炎、抗氧化的功效。同时,六棱菊可以有效调节机体的糖代谢和脂代谢^[7],有文献报道异绿原酸具有减轻肝炎损伤和MAFLD的作用^[8]。目前,临床中初步发现六棱菊提取物对肝脏的病变具有理想的治疗和调节作用,但目前对六棱菊提取物改善MAFLD的具体分子机制仍不清楚。

氧化应激是由活性氧(ROS)引发的,其是多种肝病的共同病理生理基础^[9]。少量的ROS不具有细胞毒性,可作为机体第二信号分子维持细胞生理功能;当发生病理生理改变时,氧化应激损伤会因增加的ROS而加重疾病进展。当氧化应激状态时,为保护机体组织细胞免受氧化应激损伤,机体可以通过激活抗氧化应激通路而抑制MAFLD发生发展,从而保护机体肝细胞。此外,核因子E2相关因

子2 (Nrf2)信号通路参与MAFLD发生,与ROS促炎和促纤维化作用不同,Nrf2信号通路具有抗炎和抗纤维化作用,研究表明Nrf2信号通路表达与ROS水平存在高度相关性。已有研究表明,不同剂量的六棱菊提取物可以明显上调小鼠肝脏细胞Nrf2以及细胞浆中血红素加氧酶-1(HO-1)的表达^[10],推测六棱菊提取物可能通过Nrf2信号通路发挥相关药理作用。

在本研究中,先通过网络药理学^[11]预测六棱菊治疗MAFLD的潜在机制和靶点,并建立高脂饲料诱导的MAFLD小鼠模型考察六棱菊提取物的治疗效果,验证其与Nrf2信号通路和氧化应激相关的作用机制,为六棱菊提取物可能成为治疗MAFLD的潜在药物提供理论基础和实验依据。

1 材料与方法

1.1 六棱菊治疗MAFLD网络药理学预测

1.1.1 六棱菊成分获取及靶点预测 根据文献获取六棱菊活性成分,将成分导入SwissTargetPrediction (<http://swisstargetprediction.ch/>)与Pharm Mapper (<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>)数据库进行靶点预测和搜集,生成六棱菊预测靶点信息,将所得靶点信息进行合并去重,得到六棱菊的潜在活性靶点。

1.1.2 六棱菊与MAFLD和氧化应激交集靶点筛选 使用“metabolic fatty liver disease”和“oxidative stress”作为检索条件,利用Gene Cards数据库(<https://www.genecards.org/>)获得MAFLD和氧化应激相关的作用靶点,保留相关性得分大于均值的基因,合并去重处理后利用Venny在线工具(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)与六棱菊靶点取交集,即为六棱菊通过氧化应激改善MAFLD的潜在靶点。

1.1.3 交集靶点蛋白质-蛋白质相互作用网络(PPI)的构建 将“1.1.2”项获得的交集靶点导入STRING数据库(<https://string-db.org/>),选择物种为homo sapiens,设置minimum required interaction score为medium confidence (0.400),获得TSV格式文件。将TSV格式文件导入Cytoscape 3.9.1软件进行可视化分析,运用其中的插件“Centiscape2.2”分析拓扑参数筛选出核心靶点。

1.1.4 基因本体(GO)注释及京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 将筛选得到的六棱菊抗MAFLD的核心靶点导入STRING数据库(<https://string-db.org/>),选择物种为homo

sapiens,设置minimum required interaction score为medium confidence (0.400),物种来源为Homo sapiens,进行基因功能富集分析和KEGG通路富集分析,从细胞组成(CC)、分子功能(MF)、生物过程(BP)及KEGG信号通路等方面提供基因功能的详细注释,通过微生信基迪奥生物平台(<https://www.genedenovo.com/>)进行可视化操作。

1.2 六棱菊提取物对MAFLD模型小鼠的影响

1.2.1 动物 选用SPF级无菌雄性健康C57BL/6J小鼠50只,体质量(22±5)g,购自北京斯贝福实验动物科技有限公司,许可证号:SCXK(京)2021-0002。正式实验开始前,将小鼠分笼适应性喂养1周,环境温度控制在(25±2)℃,相对湿度控制在(55±5)%,动物房每天自然光照12h,所有小鼠自由饮水,进食,并保持通风及清洁卫生。动物实验遵循《实验动物护理和使用指南》的要求,并经过广西中医药大学伦理委员会批准,动物伦理委员会审批号:DW20230512-015。

1.2.2 药品与试剂 六棱菊提取物购自MedChemExpress LLC公司(批号:20230312,其中含总黄酮32.51%、总酚酸21.78%);实时荧光定量PCR(qRT-PCR)试剂Power SYBR Green PCR Master Mix、TaqMan Universal PCR Mix和M-MLV逆转录酶均购自天根生化科技(北京)有限公司;苏木精-伊红(HE)染色试剂盒和细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司;超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和还原型谷胱甘肽(GSH)试剂盒购自南京建成生物工程研究所公司;肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)和单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒购自江苏酶免实业有限公司;糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)和非受体酪氨酸蛋白激酶(Fyn)、Nrf2和p-GSK-3 β 抗体购自美国Cell Signaling Technology公司;NQO1抗体购自英国Abcam公司;p-Fyn抗体购自美国Invitrogen公司。

1.2.3 小鼠分组、MAFLD模型建立及药物干预处理^[12] 雄性小鼠适应性饲养1周后,按照自由随机方法,分为2大组,对照组10只,造模组40只。对照组给予普通饲料,造模组给予高脂饲料。全部小鼠喂养8周后,分别从对照组和造模组中随机挑选1只小鼠,测量其体质量和肝质量,并取2只小鼠的肝脏组织进行病理切片观察,通过组织病理学观察发现,对照组小鼠的肝小叶组织结构完整,细胞核分

布均匀,且肝细胞大小一致,无明显病变;造模组小鼠出现明显的弥漫性肝细胞脂肪变性,细胞核分布明显不均,肝细胞大小不一,这些特征证实小鼠MAFLD模型建立成功^[13]。

将造模组所有39只小鼠随机分为4组:模型组(9只)及六棱菊提取物低、中、高剂量(1.25、2.50、5.00 g·kg⁻¹,其中2.50 g·kg⁻¹为临床等效剂量^[14])组,每组各10只。六棱菊提取物各给药组均ig给药处理6周,每日给药1次。对照组及模型组小鼠每日ig等剂量蒸馏水。同时,每周对各组小鼠进行称体质量,仔细观察并记录小鼠的精神状态、进食情况、粪便情况、毛发光泽度、死亡数量等特征。

1.2.4 样本采集与处理 从动物造模开始计算,在第14周末当晚小鼠禁食,但不禁水,次日上午将小鼠称体质量后,用10%水合氯醛ip麻醉,腹主动脉取血保存,取小鼠肝脏组织。用0.9%氯化钠溶液冲洗新鲜肝脏组织,称取肝组织湿质量,计算小鼠肝脏指数。在小鼠的肝右叶离边缘1 cm处,横切一块肝组织,用10%多聚甲醛固定,HE染色法观察,剩余肝组织放于-80℃保存备用。血清样本4℃静置2 h后,离心半径8 cm,3 000 r·min⁻¹离心10 min,检测小鼠肝功能和血脂指标。

1.2.5 HE染色法观察肝组织病理形态 将肝组织切片依次放入二甲苯无水乙醇和75%乙醇中漂洗,进行连续脱水处理。随后,将组织切片放入85%、95%乙醇中连续漂洗,各5 min。再放入伊红染液中漂染5 min,将组织切片进行脱水透明化处理;最后采用中性树胶进行组织切片封片,使用光学显微镜观察病理切片并采集相应的组织图像。

1.2.6 全自动生化分析仪测血清转氨酶及肝脏脂肪含量 采用全自动生化分析仪检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)和γ-谷氨酰基转移酶(GGT)水平,以及肝组织的三酰甘油(TG)和总胆固醇(TC)的含量。3 000 r·min⁻¹、4℃离心10 min,分离出全

部小鼠血清样本,直接进行全自动生化分析仪检测。

1.2.7 检测肝组织中MDA、SOD和GSH水平 制作相应的含量测定标准曲线,采用MDA、SOD和GSH检测试剂盒,使用酶标仪检测肝组织样本中的MDA、SOD、GSH水平。

1.2.8 ELISA法检测血清中炎症因子水平 使用ELISA检测试剂盒检测血清IL-1β、IL-6、TNF-α和MCP-1水平。

1.2.9 qRT-PCR法测定相关的基因的表达量 取肝组织,采用Trizol法提取小鼠肝组织总RNA, NanoDrop ND-2000仪检测提取组织总RNA浓度及质量,使用试剂盒将组织总RNA逆转录成cDNA,加入PCR扩增反应体系中进行扩增,反应结束后用2^{-ΔΔCt}法进行相对定量计算和分析,检测全部目的基因mRNA的相对表达水平。以GAPDH基因为内参基因,全部基因的qRT-PCR引物序列见表1。

1.2.10 Western blotting法测定相关蛋白表达量 取各组小鼠肝组织,提取肝组织总蛋白,使用BCA试剂盒对肝组织总蛋白进行定量。取蛋白样本进行SDS凝胶电泳,PVDF转膜、5%脱脂牛奶进行封闭、一抗过夜孵育和二抗室温孵育后,用增强型化学发光法进行蛋白曝光,蛋白扫描仪扫描蛋白条带。以GAPDH蛋白为内参蛋白。

1.3 统计学处理

采用统计学软件SPSS 24.0进行全部实验数据分析与整理,全部的实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为数据差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 网络药理学结果

2.1.1 六棱菊成分与靶点分析 通过文献获取六棱菊活性成分共计15个:3,4-*O*-二咖啡酰奎宁酸甲酯(3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester)、4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸甲酯(4,5-di-*O*-caffeoylquinic

表1 qRT-PCR引物序列
Table 1 Sequences of qRT-PCR primers

基因名称	引物序列(5'→3')	产物长度/bp
<i>Nrf2-F</i>	CGAAAAGGAAAGACAAGAGCAAC	160
<i>Nrf2-R</i>	GTGGGCAACCTGGGAGTAGC	
<i>Nqo1-F</i>	GAGTGGCATCCTGCGTTTCTGTG	135
<i>Nqo1-R</i>	GCGGGCATCTGGTGGAGTGTG	
<i>GAPDH-F</i>	CGGTGCTGAGTATGTCGTGGAGTC	100
<i>GAPDH-R</i>	GGCGGAGATGATGACCCCTTTTG	

acid methyl ester)、3,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸甲酯(3,5-di-*O*-caffeoylquinic methyl ester)、3,4-*O*-二咖啡酰奎宁酸(3,4-dicaffeoylquinic acid)、4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸(isochlorogenic acid C)、3-*O*-咖啡酰奎宁酸(3-*O*-caffeoylquinic acid)、4-*O*-咖啡酰奎宁酸(4-CQA)、3,4-二甲氧基肉桂酸(3,4-dimethoxycinnamic acid)、阿魏酸(ferulic acid)、邻苯二酚(catechol)、3,4-二羟基苯乙醇[2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethanol]、尿嘧啶[2,4-(1H,3H-pyrimidinedione)]、胸腺嘧啶(thymine)、邻羟基苯甲酸(salicylic acid)、 β -谷甾醇(beta-sitosterol),对应靶点624个。

2.1.2 六棱菊与MAFLD、氧化应激交集靶点分析以“metabolic fatty liver disease”和“oxidative stress”作为检索条件收集MAFLD及氧化应激相关靶点,其中MAFLD相关作用靶点个数为9 587,相关性得分(Relevance score)大于均值的靶点为3 205个,氧化应激相关作用靶点个数为13 632个,相关性得分大于均值的靶点为3 974个。通过网络药理学蛋白交集 Venny 2.1.0 在线工具获取六棱菊、MAFLD、氧化应激的交集靶点共304个,韦恩图见图1。

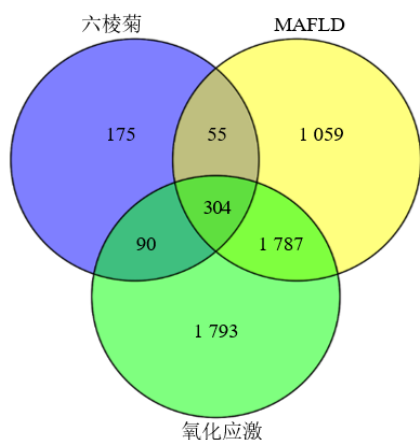


图1 交集靶点韦恩图

Fig. 1 Venny plot of interaction targets

2.1.3 PPI网络和核心靶点 利用STRING数据库对交互靶点进行PPI分析,绘制PPI网络图(图2),图中网络节点为303个,相互作用边数有6 172条,平均节点度值为40.7。节点表示由此蛋白质编码基因位点单独产生的所有蛋白,颜色表示聚类,大小反映度值;节点间的连线则表示连线两端的蛋白存在直接或间接的相互作用,颜色反映作用类型和相互关系判定来源。Cytoscape 3.9.1对获得的PPI图进行进一步拓扑分析,得到67个核心作用靶点(具

有显著性统计学差异的靶点蛋白并与治疗MAFLD及发挥氧化应激相关的差异表达蛋白),具体见图3。

2.1.4 GO和KEGG富集分析 从STRING数据库中确定GO条目1 519条,其中BP 1 348条,主要涉及细胞对化学刺激的反应、细胞对含氧化合物的反应、细胞对有机物质的反应、对内源性刺激的反应、对脂质的反应、细胞死亡的调节等;CC 66条,涉及膜筏、细胞内细胞器腔、细胞内膜结合细胞器、线粒体、细胞质、内膜系统等;MF 105条,涉及酶结合、蛋白质结合、有机环状化合物结合、离子结合、转录共调节因子结合、RNA聚合酶II特异性DNA结合转录因子结合等。KEGG分析可以对蛋白靶点交互网络在各种细胞活动中起的作用做出预测,找出关键作用通路。本实验中,KEGG富集分析共收集到191条主要通路,主要涉及HIF-1信号通路、糖尿病并发症中的AGE-RAGE信号通路、甲状腺激素信号通路、FoxO信号通路、PI3K-Akt信号通路、TNF信号通路等。以上分析均根据显著性选取排名靠前的20个条目进行可视化,具体见图4。

2.2 六棱菊提取物对MAFLD模型小鼠的药效学影响

2.2.1 对整体情况的影响 结果显示,高脂饲料长时间饮食会导致小鼠厌食,模型组小鼠比对照组小鼠进食量减少,六棱菊提取物并没有改善小鼠的厌食情况。喂养高脂饲料饮食8周后会改变小鼠的体质量,不同剂量六棱菊提取物组与模型组小鼠体质量无显著性差异($P>0.05$)。同时,在实验过程中,所有小鼠均无死亡现象,对照组小鼠饮食情况良好,活动度理想,毛发光洁亮泽;而模型组小鼠的饮食,食欲明显减退,体质量明显下降,反应相对迟钝,活动度下降,毛发灰暗无光泽。六棱菊提取物低、中和高剂量组小鼠整体情况较模型组有所改善,高剂量组的小鼠整体情况接近于对照组。

2.2.2 对MAFLD模型小鼠肝脏指数的影响 结果显示,模型组较对照组小鼠的肝脏指数明显升高,两组间比较差异具有统计学意义($P<0.05$);各给药组与模型组比较,小鼠的肝脏指数均不同程度降低,并且高剂量组的肝脏指数降低最为显著,差异具有统计学意义($P<0.05$),提示不同剂量的六棱菊提取物可明显改善MAFLD模型小鼠的肝脏指数,并且高剂量的六棱菊提取物具有更佳的治疗效果。见图5。

2.2.3 对MAFLD模型小鼠肝组织病理学变化的影

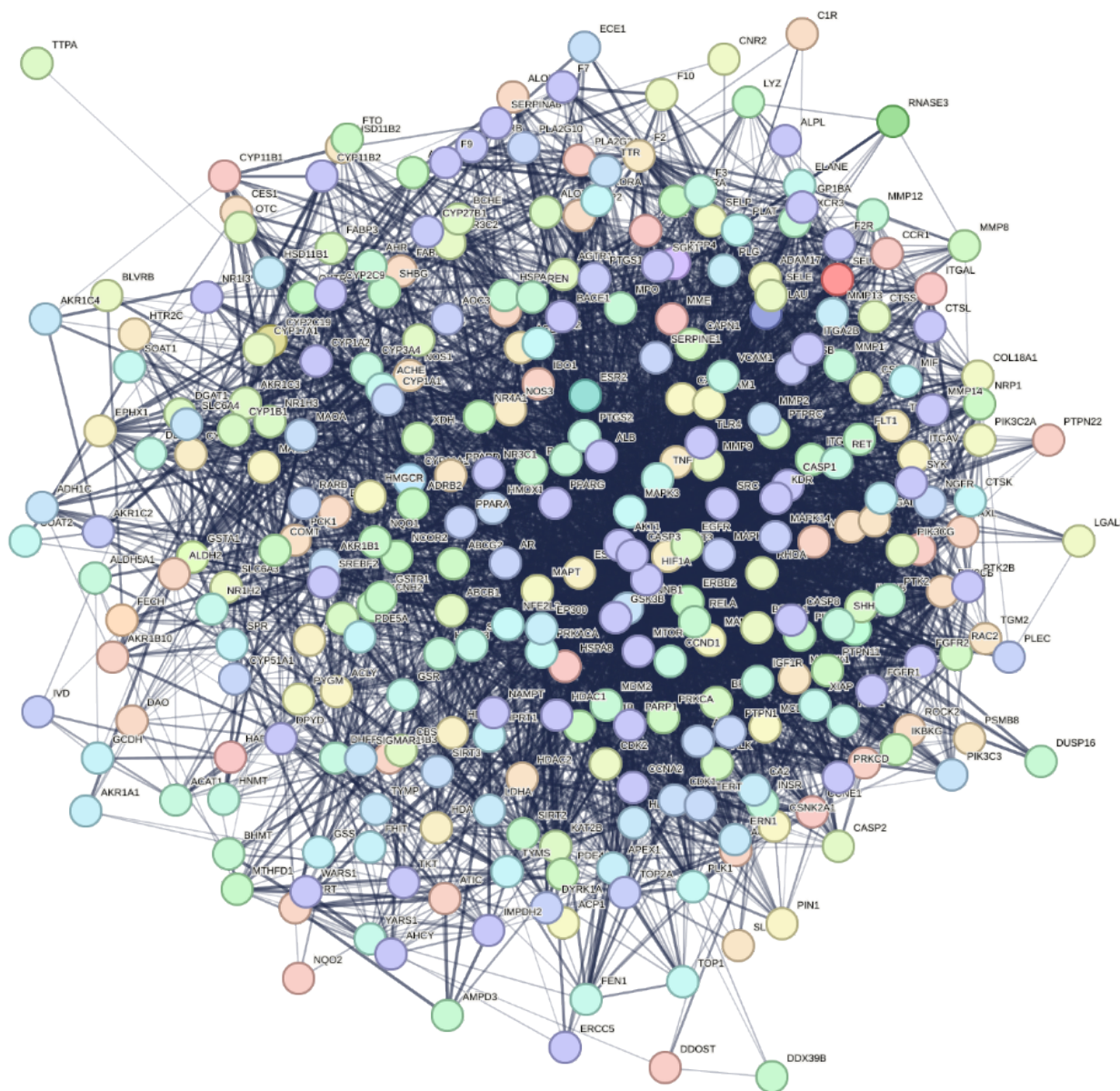


图2 六棱菊治疗MAFLD及发挥氧化应激作用核心靶蛋白PPI网络

Fig. 2 Hexathrin chrysanthemum treats metabolism-related fatty liver disease and plays the role of oxidative stress in the core target protein PPI network

响 结果显示,对照组小鼠的肝小叶组织结构完整,细胞核分布均匀,且肝细胞大小一致,无明显的病变;模型组小鼠出现明显的弥漫性的肝细胞脂肪变性,细胞核分布明显不均,肝细胞大小不一,并出现明显的炎症细胞浸润病变。各给药组与模型组比较,仍然存在一定程度的脂肪细胞浸润,但是,脂肪变性程度降低和脂肪空泡化程度降低,纤维化病变明显缓解,其中,高剂量组的小鼠肝组织脂肪变性程度最低,脂肪空泡数量最少,纤维化程度最轻。见图6。

2.2.4 对MAFLD模型小鼠肝功能的影响 结果显

示,与对照组比较,模型组小鼠血清中ALT、AST、ALP和GGT的水平明显升高,差异性均具有统计学意义($P < 0.05$);各给药组与模型组比较,血清中ALT、AST、ALP和GGT水平均有不同程度的降低,其中以高剂量组最为明显,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。该研究结果提示,不同剂量的六棱菊提取物可显著改善MAFLD模型小鼠的肝功能,并且高剂量的六棱菊提取物具有更佳的治疗效果。见图7。

2.2.5 对MAFLD模型小鼠血清炎症因子的水平影响 结果显示,与对照组比较,模型组小鼠血清中

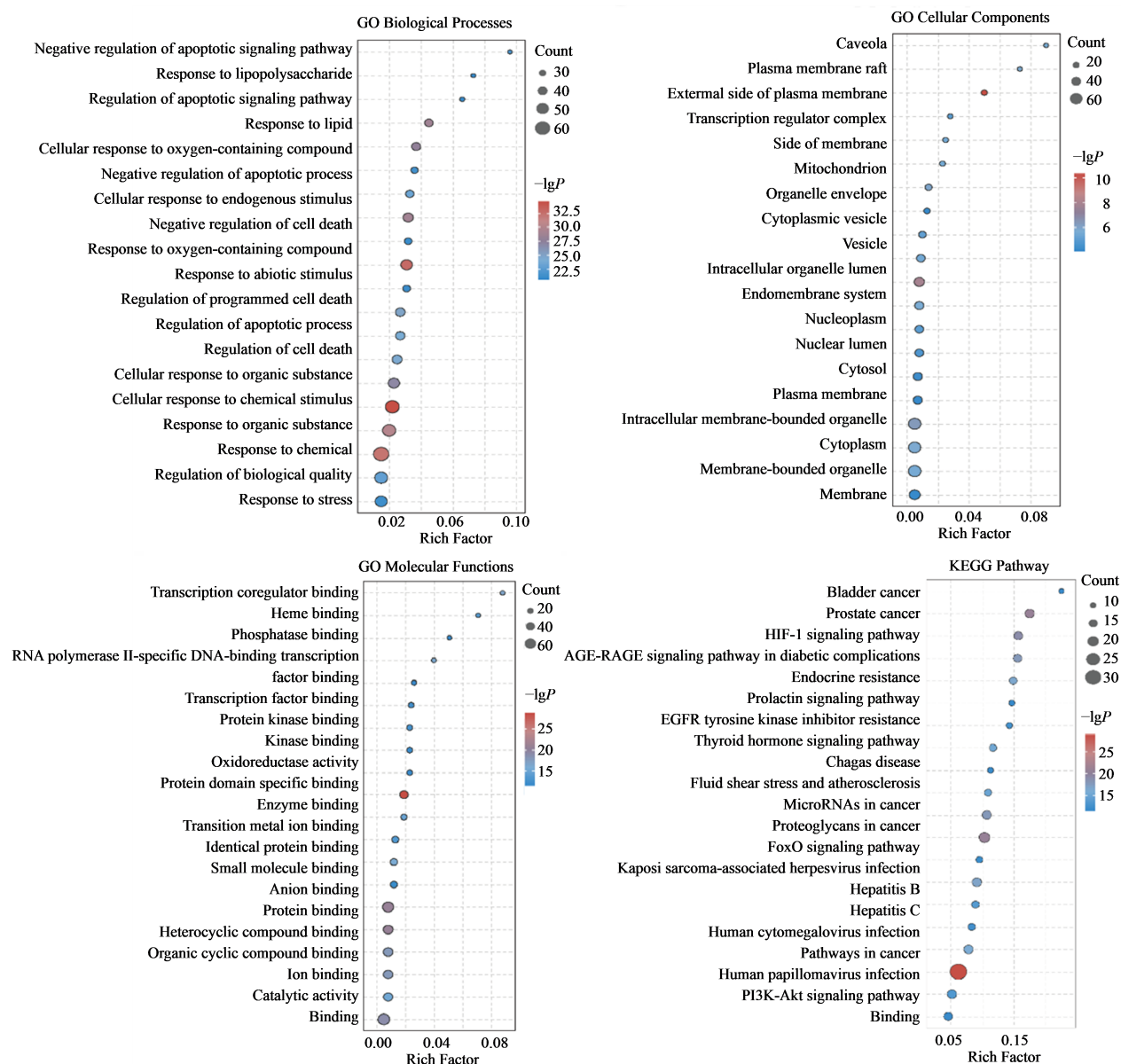


图4 GO功能富集分析、KEGG通路分析气泡图

Fig. 4 GO functional enrichment analysis and KEGG channel analysis

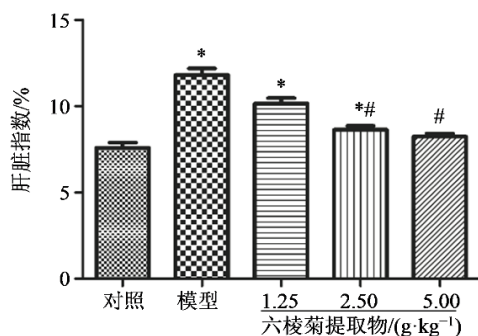
Nrf2 和 NQO1 的表达水平明显下调, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$); 各给药组与模型组比较, 肝组织的 p-Fyn 表达水平均有不同程度的降低, p-GSK-3 β 、Nrf2 和 NQO1 的表达水平均有不同程度的上调, 其中以高剂量组最为明显, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果表明, 不同剂量的六棱菊提取物可以调控 MAFLD 模型小鼠中 Nrf2 信号通路相关蛋白表达水平, 见图 12。

3 讨论

网络药理学研究结果发现, 六棱菊的主要成分为 3, 4-二-O-咖啡酰奎宁酸甲酯、4, 5-二-O-咖啡酰奎宁酸甲酯、3, 5-二-O-咖啡酰奎宁酸甲酯、3, 4-

二咖啡酰奎宁酸、异绿原酸 C、3-O-咖啡酰奎宁酸、3, 4-二甲氧基肉桂酸、阿魏酸、邻苯二酚、2-(3, 4-二羟基苯基)乙醇、2, 4-(1H, 3H-嘧啶二酮)、胸腺嘧啶、水杨酸和 β -谷甾醇, 其可能通过 TNF、AKT1、ALB、EGFR、STAT3、NFE2L2 等核心靶点作用于 HIF-1 信号通路、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、甲状腺激素信号通路、FoxO 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、TNF 信号通路等信号通路发挥抗氧化应激作用, 进而治疗 MAFLD。

众所周知, 高脂饲料饮食可诱导 C57BL/6 小鼠出现 MAFLD 的典型病理生理改变^[15]。在本研究中, 小鼠喂养高脂饲料饮食 8 周, 形成小鼠 MAFLD



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group.

图5 各组小鼠肝脏指数比较 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 5 Comparison of liver index of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=5$)

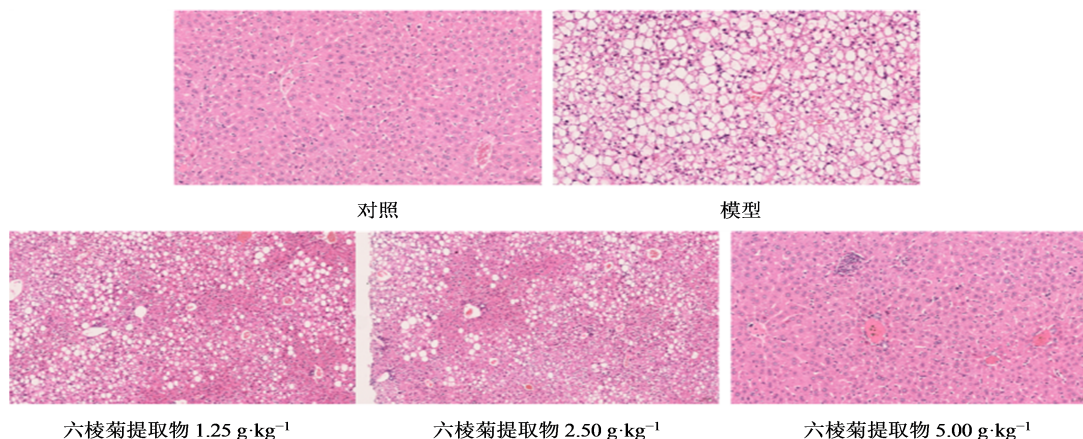


图6 各组小鼠肝组织病理学变化 (HE, $\times 100$)

Fig. 6 Comparison of liver histopathological changes of mice in each group (HE, $\times 100$)

脏中脂质沉积,改善肝功能,但其具体分子机制并不清楚^[18]。本研究发现,不同剂量的六棱菊提取物干预对MAFLD的治疗和保护作用可能与其上调肝脏细胞核内Nrf2信号通路的表达有关。在MAFLD发生发展过程中,炎症因子不仅促进肝脏的炎症反应,同时也能激活炎症细胞,诱导炎症反应和氧化应激反应的发生,从而进一步引起肝脏损伤和纤维化的发生。TNF- α 、IL-1 β 、IL-6和MCP-1是MAFLD发生发展过程中重要的促炎介质,它们能够激活分泌促炎因子的Kupffer细胞的增殖和分化^[19]。以前的研究表明,中药具有改善肝脏炎症反应的功能。Alharthi等^[20]报道葛根素可以改善2型糖尿病大鼠中血清和肝脏中的炎症反应,降低血清中的IL-18、IL-1 β 和TNF- α 的水平。在本实验中,模型组小鼠血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6和MCP-1水平明显上升,而不同剂量的六棱菊提取物干预能够明显下调血清中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6和MCP-1水平,这说明不同剂量

模型。实验中发现,高脂饲料饮食8周后小鼠肝脏出现明显的脂肪沉积、炎症反应以及组织损伤和纤维化,表明小鼠MAFLD模型构建成功。在MAFLD模型造模成功后,采用不同剂量的六棱菊提取物干预,小鼠肝脏中组织纤维化、脂肪沉积、炎症反应及氧化应激反应均明显减轻。该结果表明不同剂量的六棱菊提取物可以明显改善小鼠MAFLD的发展。

临床研究表明MAFLD会进一步恶化为肝硬化,甚至肝癌,目前认为,炎症反应和氧化应激是引起MAFLD的最主要的两大原因^[16-17]。不同剂量的六棱菊提取物具有理想的抗炎和抗氧化的生物活性。临床研究提示,六棱菊提取物可以减轻肝

的六棱菊提取物在高脂饲料诱导的MAFLD小鼠模型中具有理想的抗炎作用。同时,病理检测的结果也证实了这一点。模型组小鼠肝脏中炎性细胞聚集明显,而不同剂量的六棱菊提取物干预后,其炎性细胞浸润明显减少。除了改善炎症反应之外,不同剂量的六棱菊提取物还改善了小鼠肝脏的纤维化程度。本研究肝脏组织HE染色显示,高脂饲料饮食能够引起肝脏纤维化,而加入不同剂量的六棱菊提取物干预后,肝脏纤维化明显改善。综上,本研究证明,六棱菊提取物可以改善小鼠肝脏损伤,改善肝脏炎症反应和纤维化程度。

机体氧化应激反应是MAFLD发生发展的重要诱导因素^[21]。氧化应激可以促进脂质的沉积和脂质的过氧化,激活肝脏中Kupffer细胞和肝星状细胞的增殖和分化从而引起炎症反应和肝纤维化^[22-23]。与模型组相比,不同剂量六棱菊提取物干预可以显著上调肝脏中抗氧化因子GSH和SOD的活性,并

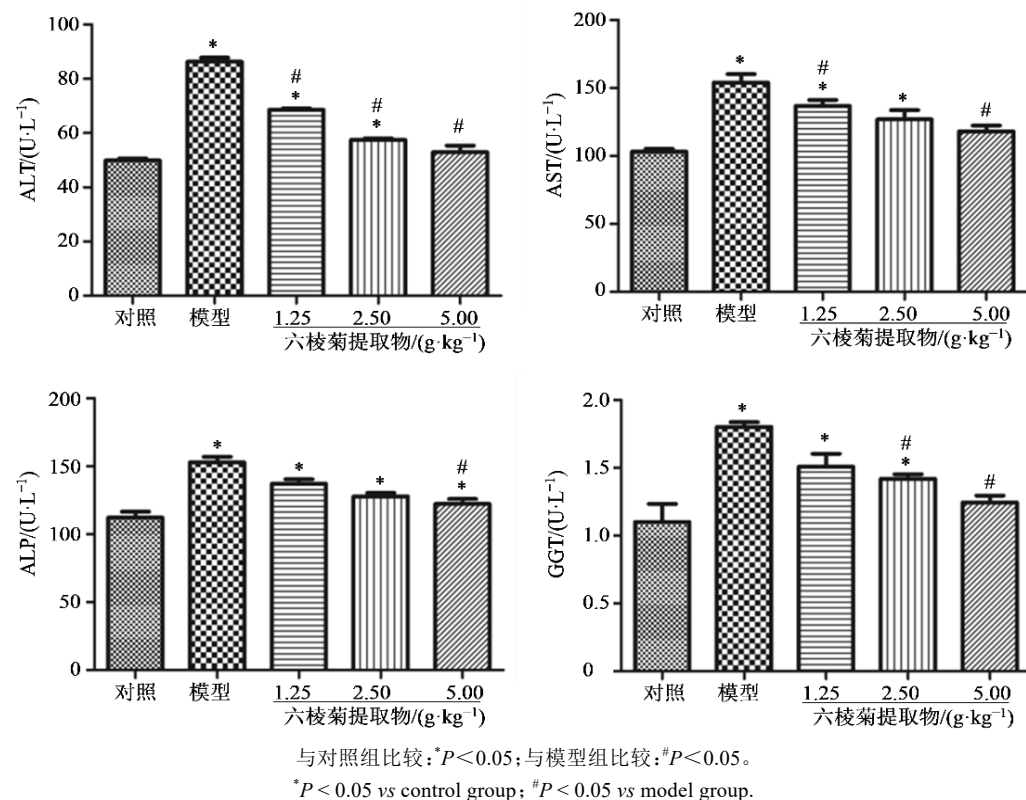


图7 各组小鼠肝功能指标比较 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 7 Comparison of liver function indicators of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=5$)

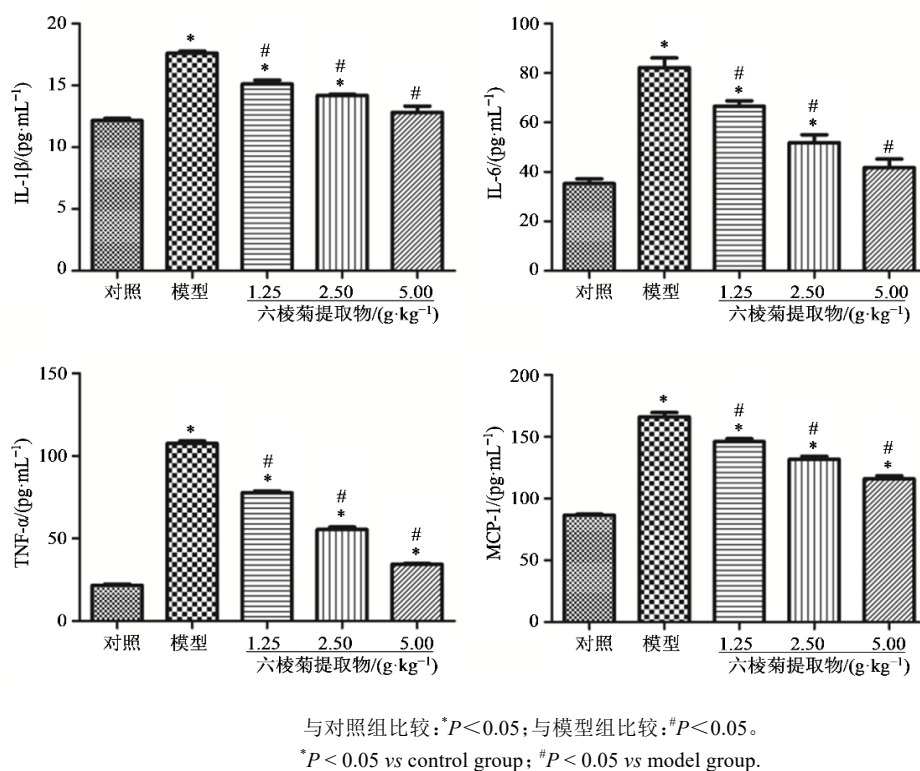
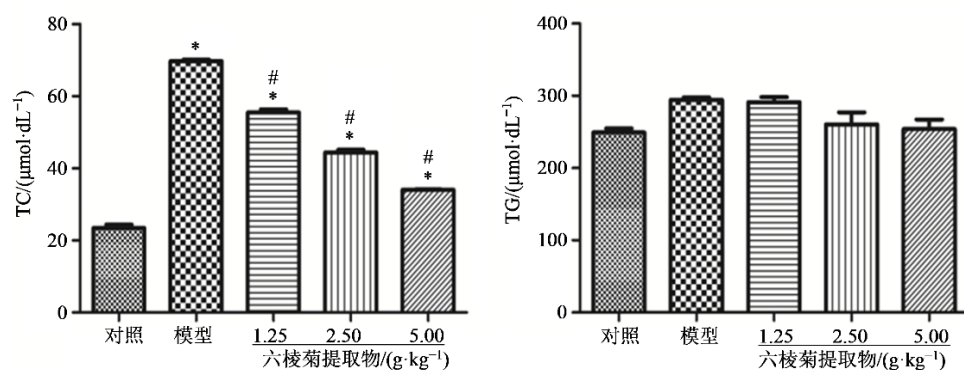


图8 各组小鼠血清炎症因子比较 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 8 Comparison of serum inflammatory factors in serum of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=5$)

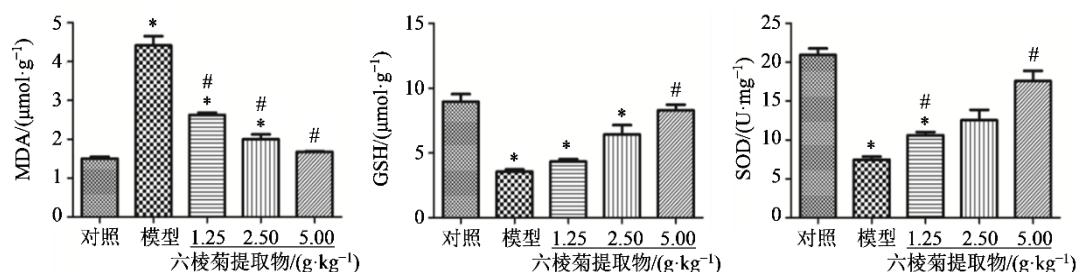


与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group.

图9 各组小鼠肝脏组织脂肪沉积水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 9 Comparison of lipid deposition levels in liver tissues of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=5$)

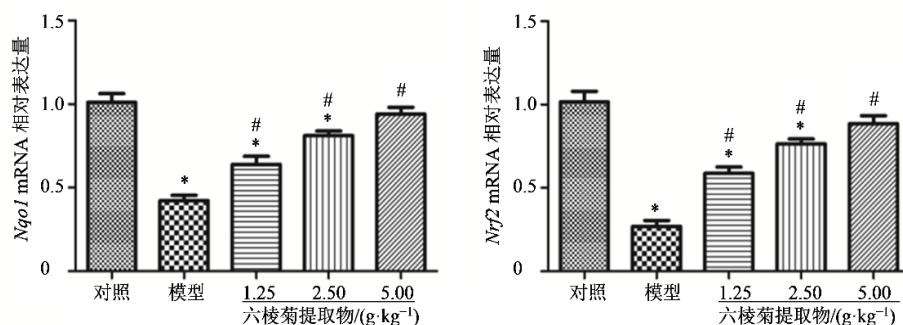


与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group.

图10 各组小鼠肝组织脂质过氧化水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 10 Comparison of lipid peroxidation levels in liver tissues of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=5$)



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group.

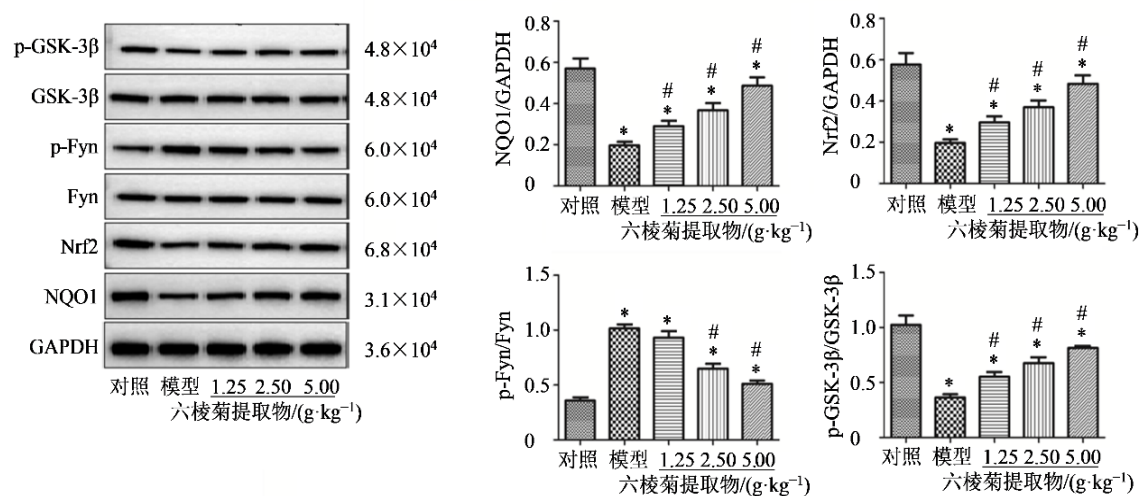
图11 各组小鼠肝组织Nrf2信号通路重要基因表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 11 Comparison of expression levels of important genes in Nrf2 signaling pathway in liver tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=5$)

且能够降低肝脏中脂质过氧化产物MDA的水平。

异绿原酸即4,5-二咖啡酰奎宁酸,是六棱菊在有氧呼吸过程中经莽草酸途径产生的一种苯丙素类化合物^[24]。目前研究表明异绿原酸药理活性十

分显著,具有抗氧化、抗炎、抗病毒和抗纤维化等多种药理作用^[25],在本研究中,六棱菊提取物可以激活Nrf2信号通路,进而抑制氧化应激和MAFLD的发生发展,推测异绿原酸可能参与Nrf2信号通路的



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group.

图12 各组小鼠肝组织Nrf2信号通路重要蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 12 Comparison of expression levels of important proteins in Nrf2 signaling pathway in liver tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=5$)

激活作用,在未来的研究工作中,需要在六棱菊提取物中分离纯化出来异绿原酸,进一步证实推测。

Nrf2是抑制氧化应激反应的关键调节因子,在机体氧化应激发生时,游离的Nrf2可以从胞质易位到细胞核并结合到抗氧化酶反应元件上,促进多种抗氧化酶的转录和翻译,发挥抗氧化的作用^[26-27]。Tanaka等^[28]研究发现,激活Nrf2信号通路可明显降低内质网应激反应,下调机体炎症因子和氧化应激标志物的表达,从而改善肝脏损伤和纤维化。既往研究表明,上调Nrf2信号通路能够明显改善饮食诱导的小鼠肝脏中的纤维化样变、脂肪变和炎症反应,而一旦上调小鼠肝脏中的Nrf2信号通路后,可延缓和预防MAFLD的纤维化进展^[29]。本实验中,小鼠MAFLD造模成功后,加入不同剂量六棱菊提取物干预后,小鼠肝脏组织细胞核内的Nrf2表达明显上调,其靶蛋白NQO1和磷酸化的GSK-3 β 在细胞浆中的表达上调,磷酸化的Fyn在细胞浆中的表达下调,说明六棱菊提取物对小鼠高脂饲料诱导的MAFLD模型的改善作用可能与上调Nrf2信号通路抑制肝脏组织的氧化应激反应有关。因此,本研究发现,六棱菊提取物可能通过上调Nrf2信号通路改善高脂饲料诱导的小鼠MAFLD模型。在未来的研究工作中,需要构建Nrf2基因敲除的小鼠来进一步证实本研究的结论。

六棱菊提取物对高脂饲养诱导的小鼠MAFLD

模型有保护和治疗作用,其主要通过减轻小鼠机体的氧化应激反应,抑制炎症反应从而减少脂质沉积,减弱肝脏损伤和纤维化。六棱菊提取物抑制小鼠MAFLD的发生发展,减轻肝脏组织炎症和纤维化,可能与六棱菊提取物激活并上调Nrf2信号通路进而抑制氧化应激反应有关。因此,本研究为深入了解MAFLD的发病机制提供了新的研究思路 and 基础,并为六棱菊提取物作为抗MAFLD的潜在药物提供了进一步的实验证据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Machado M V, Cortez-Pinto H. NAFLD, MAFLD and obesity: Brothers in arms? [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2023, 20(2): 67-68.
- [2] Tilg H, Effenberger M. From NAFLD to MAFLD: When pathophysiology succeeds [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2020, 17(7): 387-388.
- [3] 魏江存, 秦祖杰, 钟文, 等. 民族药六棱菊抗炎作用及其机制研究 [J]. 中国新药杂志, 2021, 30(9): 818-823.
Wei J C, Qin Z J, Zhong W, et al. Anti-inflammatory effect and its mechanism of national medicine *Laggera alata*(D. Don) Sch. Bip. ex Oliv [J]. Chin J New Drugs, 2021, 30(9): 818-823.
- [4] 魏江存, 陈勇, 谢臻, 等. 10批不同产地六棱菊中咖啡酸的工艺优化与含量测定 [J]. 中国药房, 2017, 28(34): 4792-4795.

- Wei J C, Chen Y, Xie Z, et al. Technology optimization and content determination of caffeic acid in 10 batches of *Laggeta alata* from different areas [J]. China Pharm, 2017, 28(34): 4792-4795.
- [5] 魏江存, 陈勇, 谢臻, 等. 六棱菊薄层鉴别和绿原酸的提取工艺及其含量测定 [J]. 时珍国医国药, 2017, 28(11): 2611-2614.
- Wei J C, Chen Y, Xie Z, et al. TLC identification of hexagonal *Chrysanthemum*, extraction technology and content determination of chlorogenic acid [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2017, 28(11): 2611-2614.
- [6] 魏江存, 陈勇, 阙祖亮, 等. 六棱菊的质量标准初步研究 [J]. 井冈山大学学报(自然科学版), 2017, 38(4): 89-92, 101.
- Wei J C, Chen Y, Que Z L, et al. A preliminary study on the quality standard of *laggeta alata* [J]. J Jinggangshan Univ Nat Sci, 2017, 38(4): 89-92, 101.
- [7] Wei J C, Liang S, Yang P, et al. The therapeutic potential of *Laggeta alata* in alleviating inflammation and oxidative stress: Insights into the miR-150-5p/TRIM8 axis [J]. Mol Cell Toxicol, 2024, doi: 10.1007/s13273-024-00468-0.
- [8] Karimkhanloo H, Keenan S N, Bayliss J, et al. Mouse strain-dependent variation in metabolic associated fatty liver disease (MAFLD): A comprehensive resource tool for pre-clinical studies [J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 4711.
- [8] 戴天艺, 刘冬恋, 秦兴敏, 等. 基于氧化应激反应探讨绞股蓝皂苷对高脂血症豚鼠肝脏损伤的保护作用 [J/OL]. 食品工业科技, 1-14. [2024-08-12]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024020003>.
- Dai T Y, Liu D L, Qin X M, et al. Protective effect of *Gynostemma pentaphyllum* saponins on liver injury in guinea pigs of hyperlipemia based on oxidative stress [J]. Sci Technol Food Ind, 1-14. [2024-08-12]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024020003>.
- [10] Xu B T, Teng F Y, Wu Q, et al. Bdh1 overexpression ameliorates hepatic injury by activation of Nrf2 in a MAFLD mouse model [J]. Cell Death Discov, 2022, doi: 10.1038/s41420-022-00840-w.
- [11] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. «网络药理学评价方法指南»解读 [J]. 中草药, 2021, 52(14): 4119-4129.
- Niu M, Zhang S Q, Zhang B, et al. Interpretation of Network Pharmacology Evaluation Method Guidance [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [12] Escutia-Gutiérrez R, Rodríguez-Sanabria J S, Monraz-Méndez C A, et al. Pirfenidone modifies hepatic miRNAs expression in a model of MAFLD/NASH [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 11709.
- [13] 李昱芃, 臧超越. 温胆汤对代谢相关脂肪性肝病小鼠脂质代谢的影响 [J]. 天津中医药, 2023, 40(8): 1035-1042.
- Li Y P, Zang C Y. Effects of Wendan Decoction on lipid metabolism in mice with metabolism-related fatty liver disease [J]. Tianjin J Tradit Chin Med, 2023, 40(8): 1035-1042.
- [14] Eslam M, El-Serag H B, Francque S, et al. Metabolic (dysfunction)-associated fatty liver disease in individuals of normal weight [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2022, 19(10): 638-651.
- [15] 刘艳霞. 高脂饮食诱导下 C57BL/6J 小鼠外周血、骨髓单核细胞及骨髓造血干细胞的变化特点及机制研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2018.
- Liu Y X. Characteristics and mechanism of changes in peripheral blood, bone marrow mononuclear cells and bone marrow hematopoietic stem cells of C57BL/6J mice induced by high-fat diet [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2018.
- [16] Cook J R, Hawkins M A, Pajvani U B. Liver insulinization as a driver of triglyceride dysmetabolism [J]. Nat Metab, 2023, 5(7): 1101-1110.
- [17] Mori K, Tanaka M, Hosaka I, et al. Metabolic dysfunction-associated fatty liver disease is associated with an increase in systolic blood pressure over time: Linear mixed-effects model analyses [J]. Hypertens Res, 2023, 46(5): 1110-1121.
- [18] Tong J, Lan X T, Zhang Z, et al. Ferroptosis inhibitor liproxtatin-1 alleviates metabolic dysfunction-associated fatty liver disease in mice: Potential involvement of PANoptosis [J]. Acta Pharmacol Sin, 2023, 44(5): 1014-1028.
- [19] 李秋月, 许海玉, 杨洪军. 促炎因子 TNF- α , IL-1 β , IL-6 在神经病理性疼痛中的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(19): 3709-3712.
- Li Q Y, Xu H Y, Yang H J. Effect of proinflammatory factors TNF- α , IL-1 β , IL-6 on neuropathic pain [J]. China J Chin Mater Med, 2017, 42(19): 3709-3712.
- [20] Alharthi J, Bayoumi A, Thabet K, et al. A metabolic associated fatty liver disease risk variant in MBOAT7 regulates toll like receptor induced outcomes [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 7430.
- [21] 苏会吉, 颜耿杰, 彭子明, 等. 氧化应激及炎症因子在代谢相关脂肪性肝病中的作用机制研究进展 [J]. 广西医学, 2023, 45(6): 718-721, 740.
- Su H J, Yan G J, Peng Z M, et al. Mechanism of oxidative stress and inflammatory factors in metabolism-associated fatty liver disease: A research progress [J]. Guangxi Med J, 2023, 45(6): 718-721, 740.
- [22] Huang Y Z, Yang W C, Yang L, et al. Nrf2 inhibition increases sensitivity to chemotherapy of colorectal cancer

- by promoting ferroptosis and pyroptosis [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 14359.
- [23] Shimizu R, Hirano I, Hasegawa A, et al. Nrf2 alleviates spaceflight-induced immunosuppression and thrombotic microangiopathy in mice [J]. *Commun Biol*, 2023, 6: 875.
- [24] Verma S, Crawford D, Khateb A, et al. NRF2 mediates melanoma addiction to GCDH by modulating apoptotic signalling [J]. *Nat Cell Biol*, 2022, 24(9): 1422-1432.
- [25] Qi H, Shi H Y, Yan M B, et al. Ammonium tetrathiomolybdate relieves oxidative stress in cisplatin-induced acute kidney injury via NRF2 signaling pathway [J]. *Cell Death Discov*, 2023, 9: 259.
- [26] 李慧, 杨林. Nrf2 抗氧化的分子调控机制 [J]. *生物信息学*, 2018, 16(1): 1-6.
- Li H, Yang L. Molecular regulatory mechanism of Nrf2 antioxidant [J]. *Chin J Bioinform*, 2018, 16(1): 1-6.
- [27] 黎浩, 胡蕴然, 杨慧, 等. 基于 Keap1/Nrf2/HO-1 通路汉黄芩素 7-*O*- β -*D*-乙基葡萄糖醛酸苷体外抗氧化应激作用研究 [J]. *药物评价研究*, 2023, 46(4): 772-780.
- Li H, Hu Y R, Yang H, et al. Anti-oxidative stress effect of wogonin 7-*O*- β -*D*-ethylglucuronide in vitro by Keap1/Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Drug Eval Res*, 2023, 46(4): 772-780.
- [28] Tanaka T, Okuda H, Isonishi A, et al. Dermal macrophages set pain sensitivity by modulating the amount of tissue NGF through an SNX25-Nrf2 pathway [J]. *Nat Immunol*, 2023, 24(3): 439-451.
- [29] Fox D B, Garcia N M G, McKinney B J, et al. NRF2 activation promotes the recurrence of dormant tumour cells through regulation of redox and nucleotide metabolism [J]. *Nat Metab*, 2020, 2(4): 318-334.

[责任编辑 刘东博]