

基于代谢组学方法探讨黄芪赤风汤对颈动脉粥样硬化大鼠肝脏脂质代谢的影响

刘秋月, 梁玉琴, 张弛, 刘洁, 陈平平, 卢芳, 刘树民*

黑龙江中医药大学 中医药研究院, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: **目的** 基于代谢组学方法探讨黄芪赤风汤 (HQCF) 对颈动脉粥样硬化 (CAS) 大鼠的肝脏脂质代谢的作用机制。**方法** SD 大鼠随机分为 5 组: 假手术组、模型组、阿托伐他汀钙片 (Ato, 1.8 mg·kg⁻¹) 组和 HQCF 低、高剂量 (1.53、3.06 g·kg⁻¹) 组, 采用动脉钳夹术联合高脂饲料喂养建立大鼠 CAS 模型, 假手术组大鼠只做分离颈动脉处理而不使用血管钳, 喂食基础饲料。造模时间持续 12 周, 造模结束后 ig 给药, 每天 1 次, 持续 28 d。HE 染色评估大鼠颈动脉、肝脏的病理学形态; 试剂盒法检测大鼠血清肝功能、血脂以及肝脏氧化指标水平; 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法测定大鼠肝组织炎症因子基因表达水平; Western blotting 法测定大鼠肝组织脂质代谢相关蛋白水平; 非靶向代谢组学分析大鼠肝组织代谢物谱。**结果** 与模型组比较, HQCF 组血清三酰甘油 (TG)、总胆固醇 (TC)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 水平显著下降 ($P < 0.01$); 颈动脉纤维斑块与钙化灶生成明显减少, 肝组织脂肪变性明显改善; 肝组织中超氧化物歧化酶 (SOD) 活力显著上调、丙二醛 (MDA) 含量显著下调 ($P < 0.01$), 肿瘤坏死因子 (TNF)- α 、白细胞介素 (IL)-6 和 IL-1 β 基因表达水平显著下调 ($P < 0.01$), 脂肪酸合成酶 (FAS)、胆固醇调节元件结合蛋白-1c (SREBP-1c)、前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 (PCSK9) 蛋白表达水平显著下调且过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) 蛋白表达水平显著上调 ($P < 0.01$); 肝脏非靶向代谢共鉴定出 30 个差异代谢物, 主要富集于初级胆汁酸生物合成、鞘脂代谢、色氨酸代谢等代谢途径。**结论** HQCF 改善 CAS 大鼠血脂紊乱的作用机制与调节肝脏组织代谢物水平, 从而改善肝脏脂质代谢相关。

关键词: 黄芪赤风汤; 颈动脉粥样硬化; 脂质代谢; 代谢组学; 初级胆汁酸生物合成; 鞘脂代谢; 色氨酸代谢

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2025)05-1091-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.05.002

Effect of Huangqi Chifeng Tang on liver lipid metabolism in carotid atherosclerosis rats based on metabolomics

LIU Qiuyue, LIANG Yuqin, ZHANG Chi, LIU Jie, Chen Pingping, LU Fang, LIU Shumin

Institute of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To investigate the effect of Huangqi Chifeng Tang (HQCF) on hepatic lipid metabolism in rats with carotid atherosclerosis (CAS) based on metabolomics. **Methods** SD rats were randomly divided into five groups: sham operation group, model group, atorvastatin calcium tablet (Ato, 1.8 mg·kg⁻¹) group and HQCF low and high dose (1.53, 3.06 g·kg⁻¹) groups. The rat CAS model was established by arterial clamp surgery combined with high-fat diet feeding. Rats in the sham operation group only underwent carotid artery separation without using vascular clamps and were fed with basic feed. The modeling period lasted for 12 weeks. After the modeling was completed, intragastric administration was given once a day for 28 d. HE staining was used to evaluate the pathological morphology of the carotid arteries and livers of the rats. The levels of liver function, blood lipids and liver oxidative indicators in rat serum were detected by kit method. The expression levels of inflammatory factor genes in rat liver tissues were determined by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). The levels of lipid metabolism-related proteins in rat liver tissues were determined by Western blotting. Non-targeted metabolomics was used to analyze the metabolite profiles of rat liver tissues. **Results** Compared with the model group, the levels of triglyceride (TG), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol

收稿日期: 2024-11-14

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目 (PL2024H239)

作者简介: 刘秋月, 硕士研究生, 从事中药药性理论及药效物质基础研究。E-mail: liuqiuyue0930@163.com

*通信作者: 刘树民, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药药性理论及药效物质基础研究。E-mail: keji-liu@163.com

(LDL-C), aspartate aminotransferase (AST), and alanine aminotransferase (ALT) in the serum of the HQCF groups were significantly decreased ($P < 0.01$); The formation of carotid artery fibrous plaques and calcification foci was significantly reduced, and the fatty degeneration of liver tissue was significantly improved; the activity of superoxide dismutase (SOD) in liver tissue was significantly increased, and the content of malondialdehyde (MDA) was significantly decreased ($P < 0.01$); The expression levels of tumor necrosis factor (*TNF*)- α , interleukin (*IL*)-6 and *IL-1 β* genes were significantly decreased ($P < 0.01$), and the expression levels of fatty acid synthase (FAS), sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c), and proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) proteins were significantly decreased, while the expression level of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) protein was significantly increased ($P < 0.01$); A total of 30 differential metabolites were identified in the liver tissues of rats by non-targeted metabolomics, mainly enriched in primary bile acid biosynthesis, sphingolipid metabolism, tryptophan metabolism and other metabolic pathways. **Conclusion** The mechanism by which HQCF improves lipid disorders in CAS rats is related to the regulation of liver tissue metabolite levels, thereby improving liver lipid metabolism.

Key words: Huangqi Chifeng Tang; carotid atherosclerosis; lipid metabolism; metabolomics; primary bile acid biosynthesis; sphingolipid metabolism; tryptophan metabolism

动脉粥样硬化 (AS) 是一种发生在动脉内膜的慢性炎症性疾病, 主要由脂质代谢紊乱引起, 通常累及多种大动脉和中动脉, 尤其是主动脉的分支、冠状动脉和颈动脉^[1-3]。颈动脉是临床 AS 评估的主要部位, 脑组织约 85% 的血液通过颈动脉供给^[4]。血液中过多的脂肪和胆固醇聚集在血管内壁形成脂质条纹, 导致纤维斑块组织增生, 钙质沉淀, 动脉壁失去弹性, 不稳定的粥样硬化斑块会使动脉壁破裂, 引起冠心病、卒中和致残性外周动脉疾病等心血管疾病 (CVD) ^[5-6]。高脂血症是 AS 最常见的危险因素, 高胆固醇和高脂肪的饮食会诱导血液循环中低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 的积累^[7]。肝脏是合成和代谢脂类物质的重要器官, 与机体脂质代谢密切相关, 血液循环中脂质主要来源于肝脏合成的脂蛋白。使用他汀类药物调节血脂紊乱是目前临床上药物治疗颈动脉粥样硬化 (CAS) 的常见策略, 但长期服用可能引起的他汀类药物相关肌肉症状、肝毒性、肾毒性等不良反应仍然存在很大的残余风险^[8-9]。

黄芪赤风汤 (HQCF) 由黄芪、赤芍、防风 3 味药组成, 清代医学著作《医林改错》中的经典方剂, 功在益气补虚、活血化瘀, 可用于气滞血瘀型 AS 的治疗, 本课题组前期研究表明黄芪赤风汤可以通过调控动脉粥样硬化小鼠的脂质代谢和胆汁酸代谢稳态从而抑制 AS 的发展并稳定斑块, 但其具体的分子机制尚未明确^[10-11]。

本研究中通过颈动脉结扎术结合高脂饲料喂养构建 CAS 大鼠模型, 评估 HQCF 对 CAS 大鼠肝脏脂质代谢的调节作用, 并通过肝脏代谢组学为 HQCF 的降脂和肝脏保护作用提供了更为深入和全

面的视角。本研究不仅拓宽了针对脂质代谢异常和肝脏损伤治疗 CAS 的药物研发视野, 也为 HQCF 的临床转化提供了重要的前期数据和理论参考。

1 材料

1.1 动物

50 只 SPF 级 SD 雄性大鼠, 8 周龄, 体质量 (200 ± 20) g, 购自辽宁长生生物技术股份有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (辽) 2020-0001。动物饲养于湿度 (55 ± 5) %、温度 (23 ± 2) °C、12 h 光/暗循环周期的实验条件下, 自由饮水与摄食。本实验由黑龙江中医药大学实验动物伦理委员会批准 (伦理批准号 2023122801)。

1.2 药品与试剂

中药饮片黄芪、赤芍和防风购自黑龙江修生堂药业有限公司, 由黑龙江中医药大学药学院药用植物教研室南洋副教授鉴定, 黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根, 赤芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根, 防风为伞形科植物防风 *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. 的干燥根; 阿托伐他汀钙片 (货号 FR0240) 购自美国辉瑞生物制药公司; 三酰甘油 (TG)、总胆固醇 (TC)、LDL-C、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和丙二醛 (MDA) 测定试剂盒 (南京建成生物有限公司, 货号分别为 A110-1-1、A111-1-1、A113-1-1、C010-2-1、C009-2-1、A001-3-2、A003-1-2); 脂肪酸合成酶 (FAS)、胆固醇调节元件结合蛋白-1c (SREBP-1c) 以及过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) 抗体 (武汉赛维尔生物科技有限公司,

货号分别为 GB12547、GB113804、GB11164); 前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 (PCSK9)、 β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体 (碧云天生物技术有限公司, 货号分别为 AF7692、AF2811)。

1.3 主要仪器

ETC811 型聚合酶链式反应 (PCR) 扩增仪 (北京东胜创新生物科技有限公司); QuantStudio™ 3 型实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 仪 (赛默飞世尔科技有限公司); TGL16E 型离心机 (长沙英泰仪器有限公司); M200 pro 型酶标仪 (瑞士 Tecan 公司); Eclipse Ci-L 型正置白光拍照显微镜 (日本 Nikon 公司); SVT-2 型转印电泳仪 (武汉赛维尔生物科技有限公司); Acquity™ 型 UPLC 液相色谱仪、Synapt G2-Si 质谱分析系统 (美国 Waters 公司)。

2 方法

2.1 HQCF 的制备

参考课题组前期方法^[12]进行 HQCF 的制备, 黄芪、赤芍、防风 3 种药材按照 10:3:2 的比例分别称取, 置于蒸馏水 (1:10) 中浸泡 1 h 后进行 3 次回流提取, 每次 1.5 h, 合并收集滤液。滤液通过旋转蒸发仪进行浓缩并使用真空冷冻干燥机进行冻干, 冻干粉末储存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。通过指纹图谱的建立, 并检测芍药内酯苷、芍药苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪甲苷等关键成分含量, 以实现 HQCF 的质量控制^[13]。

2.2 大鼠分组、CAS 模型的建立及给药

大鼠经基础饲料适应性喂养 1 周, 随机分为假手术组、模型组、阿托伐他汀钙片 (Ato, $1.8\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组和 HQCF 低、高剂量 (1.53 、 $3.06\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组, 每组 10 只。采用动脉钳夹术联合高脂饲料喂养建立大鼠 CAS 模型^[14], 提前准备好消毒的手术剪、玻璃分针、镊子以及扩创钩、止血钳、血管钳等手术器械; 术前 12 h 禁食不禁水, 大鼠经 20% 的乌拉坦 ip 麻醉后仰卧固定于鼠板上, 使用手术刀沿颈部中线纵行切口 2 cm, 手术剪和镊子钝性分离颈部肌肉, 玻璃分针仔细分离迷走神经, 暴露右侧颈总动脉; 使用血管钳夹住大鼠右侧颈总动脉, 通过物理压迫阻断颈动脉正常供血 20 min 后, 缓慢拔除血管钳, 恢复供血。假手术组 10 只大鼠只做分离颈动脉处理而不使用血管钳。术后造模组开始喂食加速 CAS 发生发展的高脂饲料 (配方: 基础饲料+10%猪油+10%蛋黄粉+1.25%胆固醇+0.5%胆酸钠), 假手术组喂食基础饲料, 造模时间持续 12 周。造模结束后

HQCF 各剂量组和 Ato 组分别给予 ig 相应药物, 每天 1 次, 持续 28 d。

2.3 生化分析法检测大鼠肝功能及血脂水平

血液样本静置 30 min, 以 $3\ 500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 分离血清, 按照试剂盒说明书操作, 使用全自动酶标仪测定各组大鼠血清中 TG、TC、LDL-C、AST 和 ALT 水平。

2.4 苏木素-伊红 (HE) 染色观察大鼠颈动脉和肝脏组织病理变化

将颈动脉和肝脏取出并浸泡至 4% 多聚甲醛中, 随后进行石蜡包埋、切片。石蜡切片依次放入梯度浓度的二甲苯和乙醇溶液进行脱蜡处理, 水洗去残余试剂。再将切片依次进行苏木素、伊红染色操作, 最后封片。通过光学显微镜观察大鼠主动脉和肝脏组织病理学形态变化。

2.5 qRT-PCR 分析

将肝脏组织放进 TRIzol 试剂后进行低温研磨提取总 RNA, 然后将其逆转录为 cDNA, 最后进行 PCR 扩增反应。反应程序为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 共 35 个循环。以 GAPDH 作为标准化的内参。使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 基因的相对表达水平。引物序列为 IL-1 β : 上游 5' - TCCAGCTGTAGAGTGGGCTT-3', 下游 5' - GCTGAGGAAGATGCTGGTTC-3'; IL-6: 上游 5' - CTGCAAGAGACTTCCATCCAG-3', 下游 5' - AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG-3'; TNF- α : 上游 5' - ATGGGCTCCCTCTCATCAGTTCC-3', 下游 5' - CCTCCGCTTGGTGGTTTGCTAC-3'; GAPDH: 上游 5' - CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG-3', 下游 5' - GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT-3'。

2.6 大鼠肝组织氧化水平检测

称取大鼠肝脏组织, 按照 1:9 的比例加入 9 倍体积 0.9% 氯化钠溶液, 制备肝脏组织匀浆, 按照试剂盒说明书操作, 使用全自动酶标仪测定各组大鼠肝脏组织中 SOD 的活力及 MDA 含量。

2.7 Western blotting 分析

用 0.9% 氯化钠溶液冲洗各组肝脏组织样本, 随后加入 RIPA 裂解液、PMSF、磷酸酶抑制剂匀浆机研磨, 冰上裂解 1 h, $13\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清, 提取总蛋白, 采用 BCA 法测定样本浓度, 并进行浓度归一化, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。根据蛋白相对分子质量大小选择合适的分离胶和浓缩胶, 经电泳、

转模、封闭等处理后加入 FAS (1 : 500)、SREBP-1c (1 : 1 000)、PCSK9 (1 : 2 000)、PPAR γ (1 : 1 000) 以及 β -actin (1 : 2 000) 一抗稀释液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育摇床过夜, TBST 洗膜, 加入 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜, 然后加入 1 : 1 混合的 ECL 显影液, 暗室曝光。

2.8 肝脏代谢组学分析

2.8.1 肝脏样本处理 称取假手术组、模型组和 HQCF 高剂量组大鼠 50 mg 肝脏样本, 加入预冷的内标提取液 (甲醇-水 3 : 1) 后使用低温研磨仪进行匀浆, 涡旋振荡 5 min, 冰水浴超声处理 10 min, -20°C 下静置 1 h。然后以 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件离心 15 min, 吸取上清液 200 μL 于内插管中后用于上样检测。肝脏上机样本制备完成后, 混合等量的所有待检测样本, 充分均质化后分装为 3 份, 作为 QC 样本。

2.8.2 检测条件 色谱条件: ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱 (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm), 流动相 0.1% 甲酸 (A) - 乙腈 (B), 流动相梯度洗脱程序: 0~0.5 min, 1~20% B; 0.5~2.5 min, 20%~60% B; 2.5~4.0 min, 60%~66% B; 4.0~5.0 min, 66%~80% B; 5.0~7.5 min, 80%~86% B; 7.5~8.0 min, 86%~99% B; 8.0~9.0 min, 99% B; 体积流量 0.4 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 2 μL 。

质谱条件: 采用配备热电喷雾离子源 (ESI) 的质谱仪进行质谱分析, ESI^{+} 与 ESI^{-} 模式下的离子源电压分别为 2 kV 和 1.5 kV; 离子源温度:

120 $^{\circ}\text{C}$; 脱溶剂气温度: 500 $^{\circ}\text{C}$; 脱溶剂气体积流量: 1 000 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$; 碰撞能: 15~45 V; TOF-MS 扫描范围 m/z 50~1 000。

2.8.3 数据处理 利用 Progenesis QI 软件对采集的原始 LC/MS 数据进行分析处理。利用人类代谢组数据库 (HMDB), 基于精确的 m/z 、二级碎片离子和同位素分布进行化合物的定性。进行主成分分析 (PCA) 和偏正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA)。基于 OPLS-DA 分析观察组间代谢轮廓的整体分布和差异, 根据变量投影重要度 (VIP) ≥ 1 和 $P < 0.05$ 筛选潜在的生物标记物。最后, 通过 MetaboAnalyst 6.0 数据库对已鉴定的差异代谢物进行代谢通路分析。

2.9 统计学分析

采用 Graph Pad Prism 9.5 和 SPSS 22.0 统计软件进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 单因素方差分析 (One-way ANOVA) 用于多组间差异分析。

3 结果

3.1 CAS 大鼠颈动脉组织病理学变化

大鼠颈动脉 HE 染色结果显示, 与假手术组相比, 模型组大鼠颈动脉组织可见显著的纤维斑块和钙化灶形成, 血管腔狭窄, 伴有内皮脱落、局部结缔组织增生和淋巴细胞浸润。与模型组比较, HQCF 各干预组颈动脉组织中 CAS 相关病理损伤呈不同程度的减轻, 血管腔形态规则, 内皮脱落减少, 未观察到明显的纤维斑块和钙化灶形成, 以 HQCF 高剂量组改善效果最佳。结果见图 1。

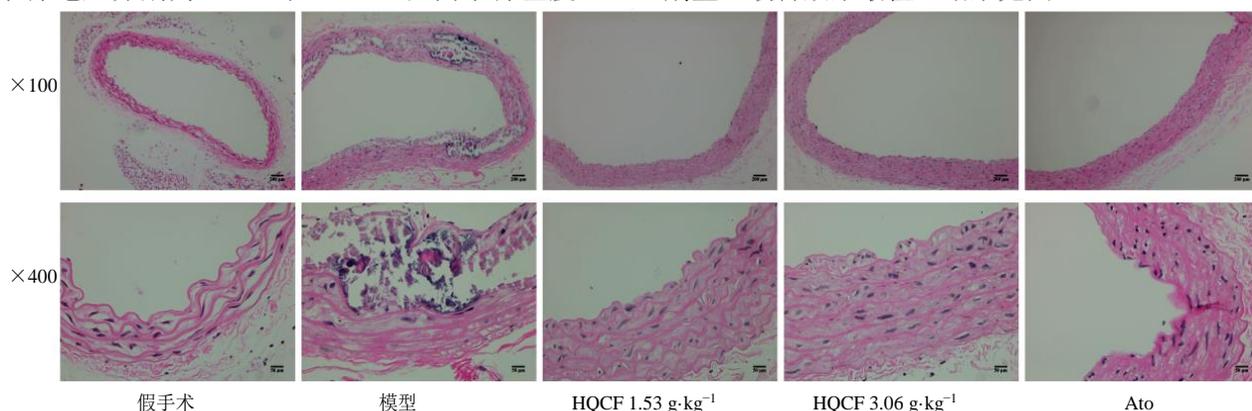


图 1 各组大鼠颈动脉组织病理学变化 (HE 染色)

Fig. 1 Pathological changes of carotid artery tissue in each group of rats (HE stain)

3.2 HQCF 对 CAS 大鼠肝功能及血脂水平的影响

ELISA 结果 (表 1) 显示, 与假手术组相比, 模型组大鼠的转氨酶 (AST 和 ALT) 水平和脂质 (TC、TG 和 LDL-C) 水平显著升高 ($P < 0.01$);

与模型组相比, 除 HQCF 低剂量组的 TG 外, HQCF 干预后大鼠 AST、ALT、TC、TG 和 LDL-C 水平显著降低 ($P < 0.01$)。结果表明, HQCF 对 CAS 模型大鼠的肝功能以及血脂水平具有一定的恢复作用。

表 1 各组大鼠肝功能及血脂水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)Table 1 Comparison of liver function and blood lipid levels in each group of rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TC/ (mmol·L ⁻¹)	TG/ (mmol·L ⁻¹)	LDL-C/ (mmol·L ⁻¹)	ALT/ (U·L ⁻¹)	AST/ (U·L ⁻¹)
假手术	—	1.78±0.17	0.46±0.08	0.80±0.12	35.27±3.29	30.64±3.58
模型	—	4.06±0.37 ^{##}	1.25±0.15 ^{##}	2.69±0.26 ^{##}	72.26±5.44 ^{##}	85.63±6.04 ^{##}
HQCF	1.53	3.15±0.34 ^{**}	1.13±0.10	1.81±0.20 ^{**}	64.78±3.89 ^{**}	75.68±5.44 ^{**}
	3.06	2.56±0.24 ^{**}	0.79±0.07 ^{**}	1.99±0.16 ^{**}	47.38±4.03 ^{**}	58.13±4.29 ^{**}
Ato	0.001 8	2.77±0.28 ^{**}	1.01±0.08 ^{**}	1.72±0.17 ^{**}	45.73±3.67 ^{**}	50.64±4.23 ^{**}

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.

3.3 HQCF 对 CAS 大鼠肝脏组织病理变化的影响

大鼠肝脏 HE 染色结果显示,与假手术组相比,模型组观察到肝细胞内脂肪变性,肝细胞形状不一且肿胀明显,胞质中可见大量脂肪空泡,并伴有炎性浸润;与模型组相比,HQCF 干预明显减少了 CAS 大鼠肝细胞脂肪变性,改善肝细胞肿胀,并明显减轻炎性浸润。结果见图 2。

3.4 HQCF 对 CAS 大鼠肝脏组织炎症因子基因表达的影响

qRT-PCR 结果(表 2)显示,与假手术组比较,模型组大鼠肝组织 *TNF- α* 、*IL-6* 和 *IL-1 β* 基因表达水平显著上调($P<0.01$);与模型组相比,HQCF 干预后 CAS 大鼠肝组织 *TNF- α* 、*IL-6* 和 *IL-1 β* 基因表达显著下调($P<0.01$)。结果表明 HQCF 具有抑制肝组织炎症作用。

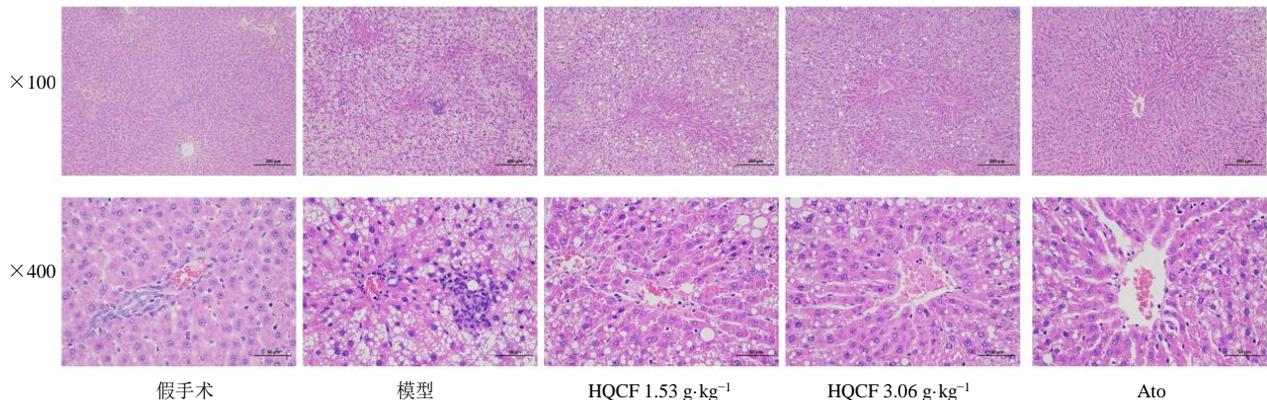


图 2 各组大鼠肝组织病理学变化 (HE 染色)

Fig. 2 Pathological changes in liver tissue of rats in each group (HE stain)

表 2 各组大鼠肝组织炎症因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)Table 2 Comparison of inflammatory factor levels in liver tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	<i>TNF-α</i> /GAPDH	<i>IL-1β</i> /GAPDH	<i>IL-6</i> /GAPDH
假手术	—	23.19±0.93	1.06±0.07	1.18±0.12
模型	—	95.34±6.62 ^{##}	4.37±0.31 ^{##}	5.67±0.39 ^{##}
HQCF	1.53	57.62±4.05 ^{**}	3.02±0.20 ^{**}	2.93±0.24 ^{**}
	3.06	53.22±4.29 ^{**}	2.84±0.27 ^{**}	2.90±0.26 ^{**}
Ato	0.001 8	48.71±3.89 ^{**}	2.25±0.19 ^{**}	3.34±0.29 ^{**}

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.

3.5 HQCF 对 CAS 大鼠肝脏组织氧化应激水平的影响

在肝组织中检测了 SOD 的抗氧化酶活性和脂质过氧化产物 MDA 的含量。结果显示,与假手术

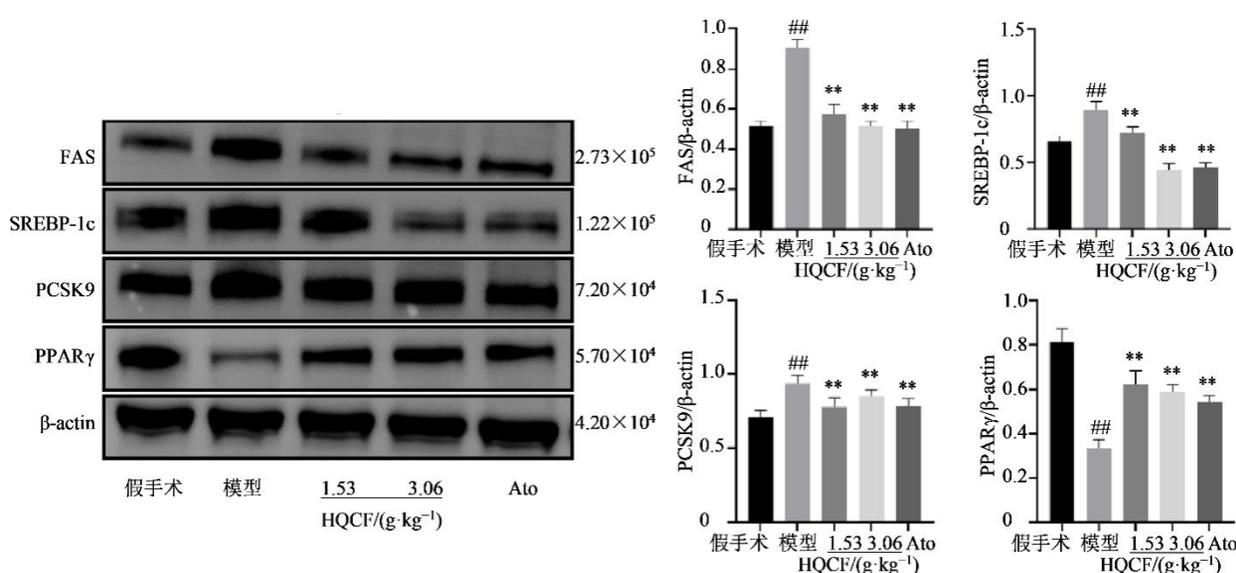
组相比,模型组 SOD 活性显著降低,MDA 含量显著增加($P<0.01$);与模型组相比,HQCF 干预组显著提高了 SOD 活性,显著降低了 MDA 含量($P<0.01$),表明 HQCF 具有抗氧化作用(表 3)。

表 3 各组大鼠肝组织氧化应激水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=10$)
Table 3 Comparison of oxidative stress levels in liver tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	SOD/ (U·mg ⁻¹)	MDA/ (nmol·mg ⁻¹)
假手术	—	201.53±9.87	1.75±0.06
模型	—	127.27±7.13 ^{##}	3.73±0.13 ^{##}
HQCF	1.53	144.06±10.79 ^{**}	3.25±0.12 ^{**}
	3.06	157.19±11.68 ^{**}	2.48±0.09 ^{**}
Ato	0.001 8	173.53±10.72 ^{**}	2.05±0.09 ^{**}

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.



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 各组大鼠肝组织 FAS、SREBP-1c、PCSK9 和 PPAR γ 蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Expression levels of FAS, SREBP-1c, PCSK9, and PPAR γ proteins in liver tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

对峰强度采用 PCA 和有监督的 OPLS-DA 进行模式识别。PCA 结果 (图 4) 显示, 3 组肝脏样本的代谢物轮廓均呈现了良好的分离与聚类效果。假手术组与模型组肝脏样本的代谢物轮廓分离趋势明显, 提示 CAS 模型的构建干扰了大鼠肝脏的正常代谢; 模型组与 HQCF 组样本代谢物轮廓同样明显分离, 并有向假手术组回调的趋势, 提示 HQCF 干预改变了 CAS 大鼠肝脏的代谢特征, 修复肝脏的代谢紊乱。通过 R^2_Y 和 Q^2 对 OPLS-DA 模型的解释率和预测能力进行评估, 结果显示 (图 5), 在负离子模式下, 假手术组与模型组模型参数为 $R^2_Y=0.989, Q^2=0.7$, 模型组与 HQCF 组模型参数为 $R^2_Y=0.997, Q^2=0.532$; 在正离子模式下, 假手术组与模型组模型参数为 $R^2_Y=$

3.6 HQCF 对 CAS 大鼠肝脏组织 FAS、SREBP-1c、PCSK9 和 PPAR γ 蛋白表达的影响

与假手术组比较, 模型组肝组织 FAS、SREBP-1c 和 PCSK9 蛋白表达显著上调, PPAR γ 表达显著下调 ($P < 0.01$); 与模型组比较, HQCF 干预组 FAS、SREBP-1c 和 PCSK9 蛋白表达显著下调, PPAR γ 表达显著上调 ($P < 0.01$) 结果见图 3。

3.7 肝脏代谢组学分析

3.7.1 多元统计分析 为了探究 HQCF 对 CAS 大鼠肝脏组织代谢物谱的影响, 将假手术组、模型组和 HQCF 高剂量组样品采集到的肝脏组织代谢物相

0.996, $Q^2=0.92$, 模型组与 HQCF 组模型参数为 $R^2_Y=0.997, Q^2=0.918$, 说明 2 种离子模式下 OPLS-DA 模型具有较好的解释能力和预测能力。

3.7.2 差异代谢物鉴定 基于 OPLS-DA 模型的数据进行 S-plot 分析, 以 $P < 0.05$ 、VIP ≥ 1 作为筛选条件, 结合 HMDB 数据库进行差异代谢物的鉴定 (图 6)。分别将假手术组与模型组、模型组与 HQCF 组进行比较, 两组比较结果取交集, 共鉴定出 30 个潜在生物标志物, 包括 1-磷酸鞘氨醇 (sphinganine 1-phosphate)、半乳糖鞘氨醇 (galactosylsphingosine)、牛磺胆酸 (taurocholic acid)、胆酸 (cholic acid)、烟酸单核苷酸 (nicotinic acid mono-nucleotide)、5-羟基-L-色氨酸 (5-hydroxy-L-tryptophan) 和 6-脱

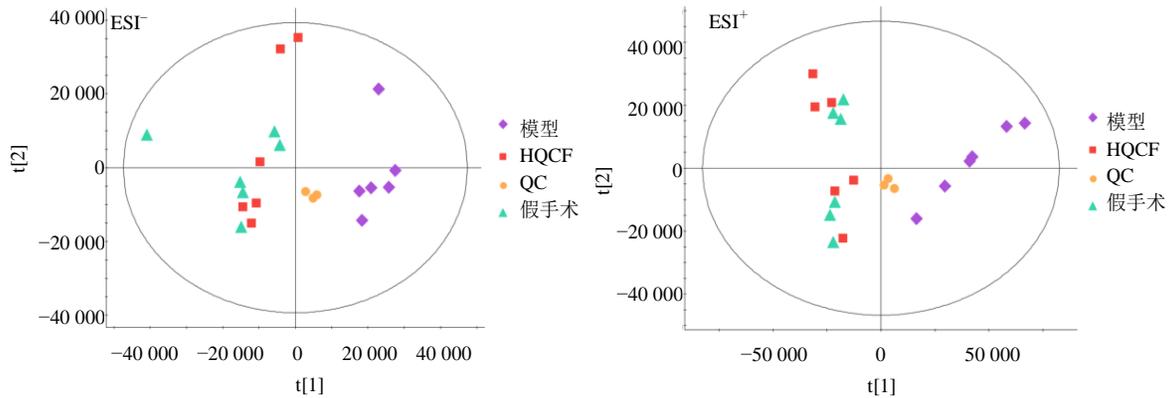


图 4 各组大鼠肝组织代谢物分布的 PCA 得分

Fig. 4 PCA score plot of metabolite distribution in liver tissue of rats in each group

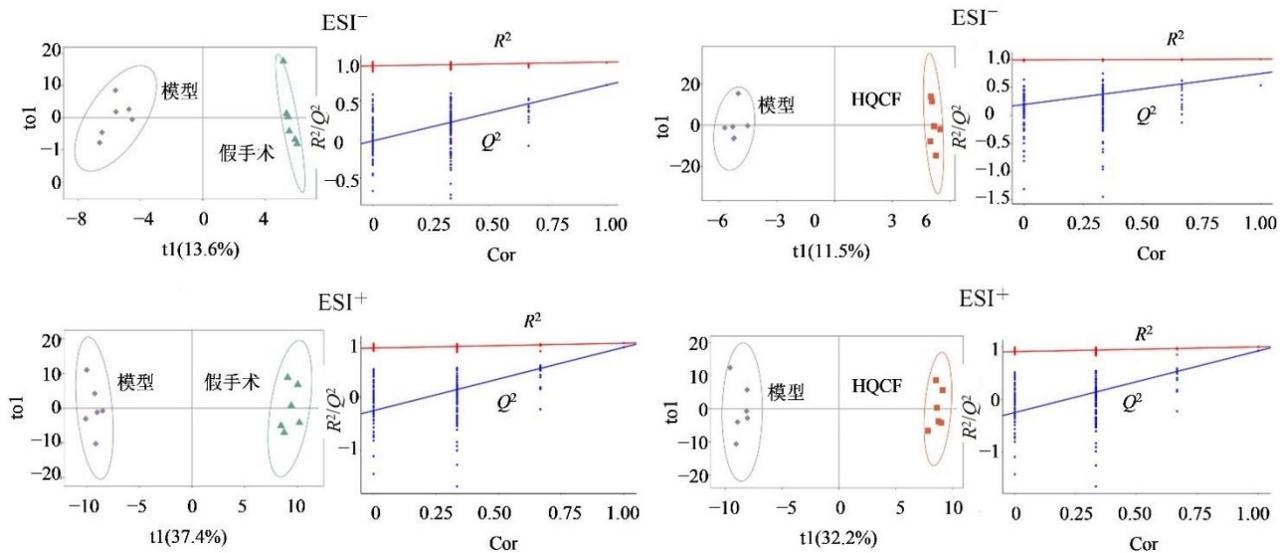


图 5 各组大鼠肝组织代谢物分布的 OPLS-DA 得分及模型检验

Fig. 5 OPLS-DA score plot and model test of metabolite distribution in liver tissue of rats in each group

氢甾酮葡萄糖苷酸(6-dehydrotestosterone glucuronide)等(表 4)。为了直接观察各组之间代谢变化,构建了热图对所鉴定的差异代谢物进行了聚类分析(见图 7-A)。结果显示 HQCF 干预后的 30 个差异代谢物中有 28 个有回调趋势。将差异代谢物导入 MetaboAnalys 6.0 数据库进行潜在代谢通路分析。筛选出 11 条代谢通路,包括初级胆汁酸生物合成、嘧啶代谢、鞘脂代谢、色氨酸代谢、烟酸和烟酰胺代谢等(图 7-B、C)。

4 讨论

高脂饮食喂养会增加大鼠的血脂水平与血液黏度,颈动脉结扎术会影响血液循环导致局部缺血缺氧,两者结合改变局部颈动脉血流动力学状态,颈动脉内膜损伤,激活血管内膜炎症,进而加速

CAS 的发生。因此,本研究使用 CAS 模型大鼠为研究对象,与预期结果一致,CAS 大鼠表现出脂质代谢障碍、机体炎症激活、粥样斑块形成等病理特征,与人类 CAS 的病理特征相似。

近年来,中医药作为补充和替代药物,具有疗效更好、不良反应更少等优势,在 CAS 的防治中逐渐成为热点。中医学根据 CAS 临床症状将其归为“胸痹”“中风”“脉痹”和“眩晕”等病症范畴。中医理论认为脉属“奇恒之腑”,附属于心,“心主血脉”,为气血的通道。脉痹为病,以虚为主,本虚标实,多见于年老体衰,或先天禀赋不足,心主血脉功能失调而为病。气虚导致血瘀,从而促进血管中粥样硬化斑块的形成。HQCF 方中重用黄芪为君药,补气升阳,兼行滞通痹,可通过“以补为通”以

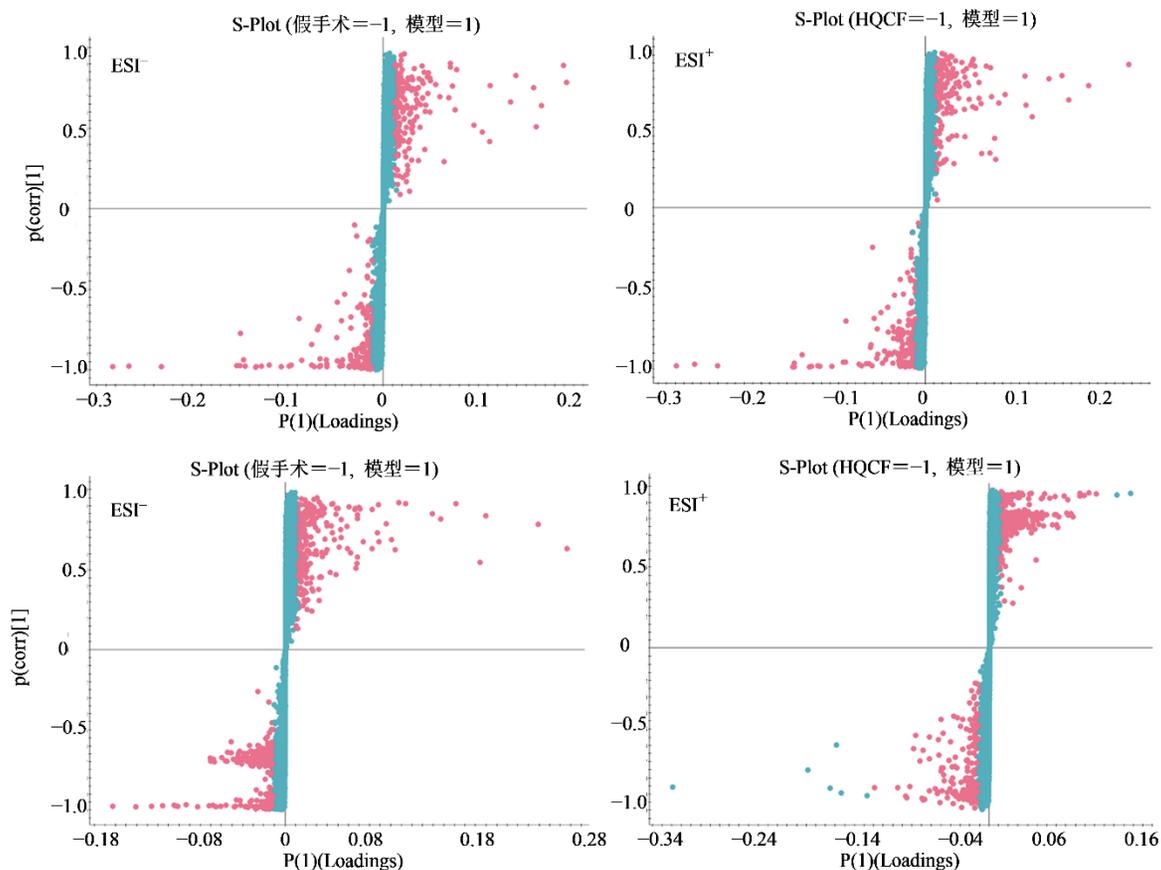


图 6 各组大鼠肝组织代谢物 S-plot 图

Fig. 6 S-plot of metabolites in liver tissue of rats in each group

表 4 各组大鼠肝组织差异代谢物

Table 4 Differential metabolite of liver tissue in each group of rats

编号	离子模式	代谢产物英文名称	代谢物中文名称	化学式	<i>m/z</i>	模型 vs 假手术	HQCF vs 模型
1	[M-H] ⁺	sphinganine 1-phosphate	1-磷酸鞘氨醇	C ₁₈ H ₄₀ NO ₅ P	399.302 1	↑##	↓**
2	[M-H] ⁺	2'-deoxyguanosine 5'-monophosphate	2'-脱氧鸟苷	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₇ P	365.097 7	↑#	↓*
3	[M-H] ⁺	D-2-hydroxyglutaric acid	D-2-羟基戊二酸	C ₅ H ₈ O ₅	166.073 5	↑##	↓*
4	[M-H] ⁺	terephthalic acid	对苯二甲酸	C ₈ H ₆ O ₄	184.061 9	↑##	↓**
5	[M-H] ⁺	taurohyocholate	牛磺酸胆酸盐	C ₂₆ H ₄₅ NO ₇ S	498.285 5	↑##	↓**
6	[M-H] ⁺	xanthine	黄嘌呤	C ₅ H ₄ N ₄ O ₂	151.024 7	↓#	↑*
7	[M-H] ⁻	taurocholic acid	牛磺胆酸	C ₂₆ H ₄₅ NO ₇ S	514.281 0	↑##	↓**
8	[M-H] ⁻	taurochenodesoxycholic acid	牛磺熊去氧胆酸	C ₂₆ H ₄₅ NO ₆ S	498.289 1	↑##	↓**
9	[M-H] ⁻	3a, 12b-dihydroxy-5b-cholanoic acid	3a, 12b-二羟基-5b-胆酸	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	437.290 1	↓##	↓**
10	[M-H] ⁻	allocholic acid	别胆酸	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	453.285 1	↑#	↓*
11	[M-H] ⁻	cholic acid	胆酸	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	453.285 3	↑##	↓**
12	[M-H] ⁻	ursocholic acid	熊果酸	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	453.285 3	↑##	↓*
13	[M-H] ⁻	N-acetyl-L-glutamic acid	N-乙酰-L-谷氨酸	C ₇ H ₁₁ NO ₅	188.055 2	↓##	↑*
14	[M-H] ⁻	FAD	黄素腺嘌呤二核苷酸	C ₂₇ H ₃₃ N ₉ O ₁₅ P ₂	784.151 0	↑#	↑*
15	[M-H] ⁻	docosahexaenoic acid	二十二碳六烯酸	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	327.232 6	↑##	↓*
16	[M-H] ⁻	13-HODE	13-羟基十八碳二烯酸	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	341.232 3	↓#	↑**
17	[M-H] ⁻	12, 13-EpOME	12, 13-环氧十八烯酸	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	295.227 1	↓#	↑*

表 4 (续)

编号	离子模式	代谢产物英文名称	代谢物中文名称	化学式	m/z	模型vs 假手术	HQCF vs 模型
18	[M-H] ⁻	12, 13-DHOME	12, 13-二羟基-9Z-十八烯酸	C ₁₈ H ₃₄ O ₄	313.237 7	↓##	↑**
19	[M-H] ⁻	ononin	芒柄花苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	429.125 0	↓#	↓*
20	[M-H] ⁻	2, 3-dihydroxycarbamazepine	2, 3-二羟基卡马西平	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₃	267.072 5	↑##	↓**
21	[M-H] ⁻	9, 10-epoxyoctadecanoic acid	反式-9, 10-环氧十八烷酸	C ₁₈ H ₃₄ O ₄	313.237 7	↓#	↑*
22	[M-H] ⁻	nicotinic acid mononucleotide	烟酸单核苷酸	C ₁₁ H ₁₅ NO ₉ P ⁺	671.081 0	↓#	↑*
23	[M-H] ⁻	inosine	肌苷	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₅	267.072 5	↑#	↓**
24	[M-H] ⁻	5-hydroxy-L-tryptophan	5-羟基-L-色氨酸	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₃	265.082 0	↓##	↑*
25	[M-H] ⁻	L-tryptophan	L-色氨酸	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	203.081 3	↓#	↑*
26	[M-H] ⁻	6-dehydrotestosterone glucuronide	6-脱氢甾酮葡萄糖苷酸	C ₂₅ H ₃₄ O ₈	507.223 3	↑#	↓*
27	[M-H] ⁻	ursodeoxycholic acid	熊去氧胆酸	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	437.289 5	↑##	↓**
28	[M-H] ⁻	fexofenadine	非索非那定	C ₃₂ H ₃₉ NO ₄	500.278 2	↑##	↓**
29	[M-H] ⁻	galactosylsphingosine	半乳糖鞘氨醇	C ₂₄ H ₄₇ NO ₇	506.325 1	↑#	↓**
30	[M-H] ⁻	gingerol	姜酚	C ₁₇ H ₂₆ O ₄	293.178 3	↑#	↓*

与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; ↑-上调; ↓-下调。

$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group; ↑-up-regulation; ↓-down-regulation.

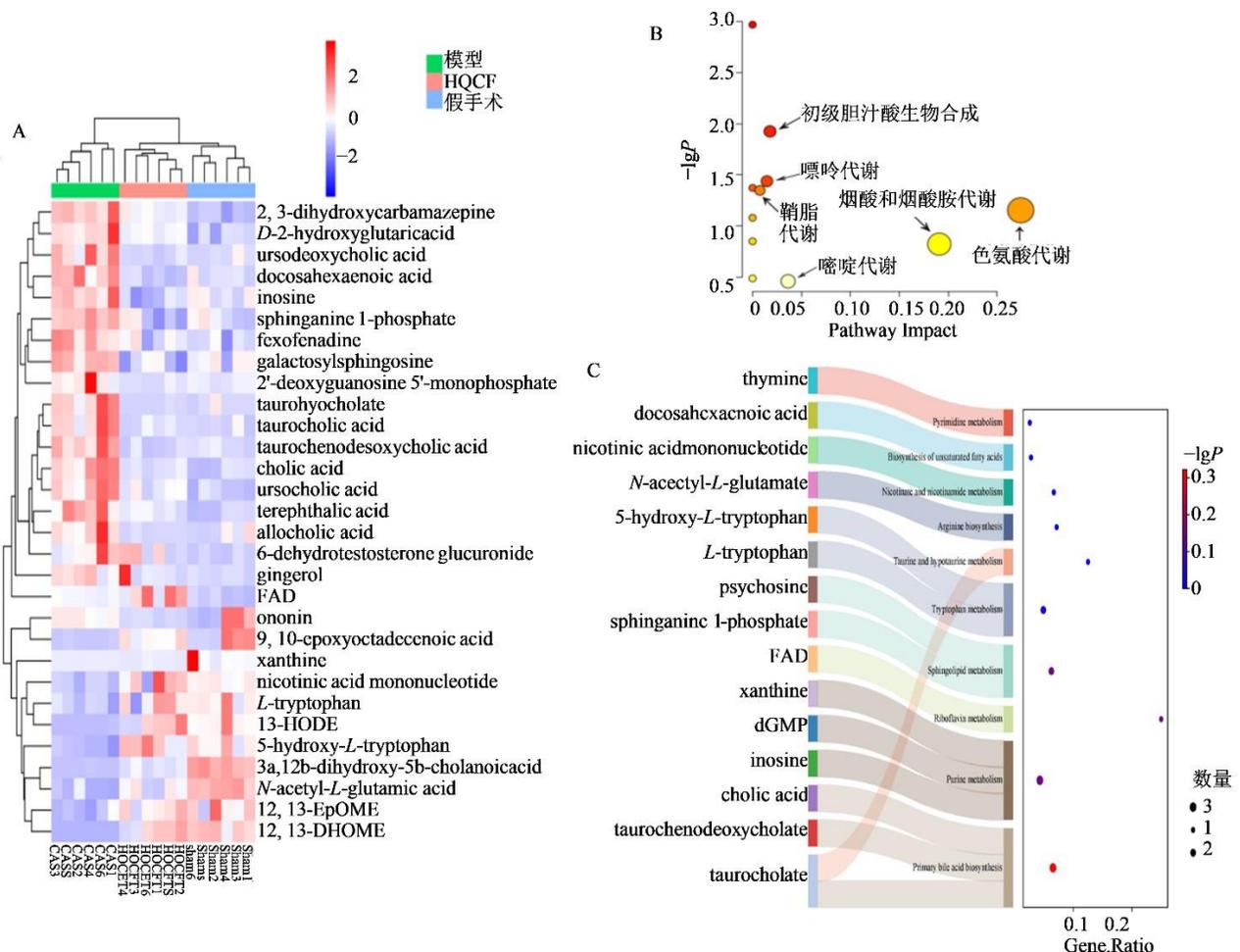


图 7 各组大鼠肝组织代谢物聚类 (A) 和代谢通路分析 (B、C)

Fig. 7 Cluster analysis of metabolites (A) and metabolic pathways (B and C) in liver tissue of rats in each group

治其本；以赤芍为臣药，长于活血化瘀，与黄芪配伍可用于治疗气虚引起的血瘀诸证；方中以防风为佐药，防风长于祛风，与黄芪和赤芍配伍在补气活血基础上加以行气，以防过补反致气滞，气滞为引起血瘀的因素之一，气行则血行通畅，瘀血难以在脉管中聚积。三药配伍，补气虚以治其本，活血化瘀、消癥瘕以治其标，标本兼治。本研究发现 HQCF 以剂量相关性方式减少 CAS 大鼠颈动脉中纤维斑块以及钙化灶的面积，并改善肝脏脂质代谢紊乱。降脂治疗是目前临床用于治疗 CAS 的主要策略，其核心在于调控脂质代谢，而肝脏作为体内脂质代谢的中枢器官，对于维持机体脂质代谢的平衡至关重要。前期研究基础已证实，HQCF 具有调节脂质代谢紊乱的药理效应，是防治 AS 和缺血性脑梗死等 CVD 的可行性治疗策略，但关于其确切的作用机制尚需进一步探索^[10, 15]。因此，本研究通过探究 HQCF 对 CAS 大鼠肝脏脂质沉积的调控作用，并结合代谢组学分析，初步揭示了 HQCF 抑制肝脏脂质沉积的代谢途径。

肝脏脂质代谢障碍是 CAS 血脂紊乱的重要驱动因素，因此 CAS 大鼠通常表现出肝功能损伤和肝脏脂质蓄积^[6]。血清中 TC、TG 和 LDL-C 水平可用于评估血脂水平，AST、ALT 水平除了用于评估肝功能，还可以侧面反映肝脏对脂质的代谢能力。本研究结果显示 HQCF 能显著下降 CAS 大鼠血清中 TC、TG、LDL-C、ALT、AST 水平。研究表明随着肝功能损伤进展，会诱发机体的氧化应激和炎症反应。SOD 和 MDA 的测定可以机体的氧化应激程度，其中 MDA 含量代表机体脂质氧化的程度，SOD 活力反映了机体清除氧自由基的能力。本研究结果显示 HQCF 能显著上调肝组织中 SOD 活力并下调 MDA 含量。此外，HQCF 还可抑制下调肝组织 *TNF- α* 、*IL-6* 和 *IL-1 β* 基因表达水平。提示 HQCF 可通过抑制氧化应激和炎症从而改善 CAS 大鼠肝功能损伤。PCSK9 是一种主要由肝脏合成的分泌型丝氨酸蛋白酶，是 LDL 受体 (LDLR) 的关键调节因子^[17]。在肝脏中，PCSK9 直接与肝细胞膜表面 LDLR 结合，将 LDLR 靶向溶酶体进行降解，进而影响血液循环中 LDL-C 水平^[18]。有研究表明 PPAR γ 脂肪生成和脂肪细胞分化的转录调节因子，过度激活的 PPAR γ 通过促进 SREBP-1c 表达协助肝脏脂肪变性的发展^[19]。SREBP-1c 是肝脏脂肪酰合成酶的转录因子，包括 FAS、乙酰辅酶 A

羧化酶和硬脂酰辅酶 A 去饱和酶，它们通过增加 TG 积累来诱导肝脂肪变性^[20]。本研究结果显示 HQCF 显著下调 CAS 大鼠肝脏组织 FAS、SREBP-1c 和 PCSK9 的蛋白表达，并显著上调 PPAR γ 的蛋白表达。

有研究表明肝脏代谢物的紊乱与肝脏脂质沉积的发展密切相关。肝脏非靶向代谢组学结果显示，CAS 大鼠肝脏代谢物轮廓相较假手术组存在着明显差异，HQCF 干预后代谢物轮廓有效向假手术组回调。3 组共鉴定出 30 种代谢物，包括 1-磷酸鞘氨醇、半乳糖鞘氨醇、胆酸、烟酸单核苷酸、5-羟基-L-色氨酸等，对差异代谢物进行通路富集分析，结果显示主要富集于色氨酸代谢、烟酸和烟酰胺代谢等代谢途径。色氨酸代谢是减轻 2 型糖尿病、脂肪肝、血脂异常和 AS 等代谢性疾病进程中低度炎症的潜在治疗靶点^[21-22]。色氨酸主要调节犬尿氨酸、5-羟色胺和吲哚途径代谢，犬尿氨酸通路受吲哚胺 2,3-双加氧酶 (IDO) 的调节，TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 等炎症因子是 IDO 的诱导剂^[23-24]。在本研究中，CAS 大鼠肝脏中色氨酸及其衍生物 5-羟基-L-色氨酸含量降低，HQCF 干预后有效恢复肝脏色氨酸及 5-羟基-L-色氨酸水平。烟酸在人体内转化为烟酰胺，烟酰胺是辅酶 I 和辅酶 II 的组成部分，参与体内脂质代谢，组织呼吸的氧化过程和糖类无氧分解的过程。烟酰胺可以转化为烟酸、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和烟酰胺腺嘌呤二核苷磷酸等生物活性物质，它参与调节细胞能力代谢的多种氧化还原和非氧化还原反应。烟酸单核苷酸是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸生物合成过程的中间底物之一，主要通过转化为烟酰胺腺嘌呤二核苷酸发挥作用。研究发现机体中烟酰胺腺嘌呤二核苷酸水平的下降与糖尿病、心血管疾病和认知障碍等年龄相关的慢性疾病显著性正相关^[25]。在本研究中，CAS 大鼠肝脏中的烟酸单核苷酸含量明显减少，提示氧化还原状态失衡，促进脂质蓄积；HQCF 可有效上调烟酸单核苷酸含量，恢复氧化还原系统。以上结果提示，HQCF 可通过调节肝脏代谢物水平，抑制炎症反应并恢复氧化应激障碍，从而调节肝脏脂质沉积。

本研究通过动脉结扎术联合高脂饲料喂养诱导 CAS 大鼠模型的建立，药效学实验验证了 HQCF 能有效减轻 CAS 大鼠血管损伤和肝脏脂质变性，降低血脂水平，改善机体氧化应激和炎症反应。并结合肝脏代谢组学分析，初步探讨了 HQCF 抑制

CAS 大鼠肝脏脂质沉积的代谢途径, 为后续机制研究奠定靶向基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Jebari-Benslaiman S, Galicia-García U, Larrea-Sebal A, et al. Pathophysiology of atherosclerosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(6): 3346.
- [2] Song Y Q, Chen C, Li W. Ginsenoside Rb₁ in cardiovascular and cerebrovascular diseases: A review of therapeutic potentials and molecular mechanisms [J]. *Chin Herb Med*, 2024, 16(4): 489-504.
- [3] Björkegren J L M, Lusis A J. Atherosclerosis: Recent developments [J]. *Cell*, 2022, 185(10): 1630-1645.
- [4] Song T, Chen W D. Berberine inhibited carotid atherosclerosis through PI3K/AKT mTOR signaling pathway [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 8135-8146.
- [5] Rothwell P M, Warlow C P. Low risk of ischemic stroke in patients with reduced internal carotid artery lumen diameter distal to severe symptomatic carotid stenosis: Cerebral protection due to low poststenotic flow? On behalf of the European Carotid Surgery Trialists' Collaborative Group [J]. *Stroke*, 2000, 31(3): 622-630.
- [6] van Dam-Nolen D H K, Truijman M T B, van der Kolk A G, et al. Carotid plaque characteristics predict recurrent ischemic stroke and TIA: The PARISK (plaque At RISK) study [J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2022, 15(10): 1715-1726.
- [7] Wouters K, Shiri-Sverdlov R, van Gorp P J, et al. Understanding hyperlipidemia and atherosclerosis: Lessons from genetically modified apoe and ldlr mice [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2005, 43(5): 470-479.
- [8] Bellosta S, Corsini A. Statin drug interactions and related adverse reactions: An update [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2018, 17(1): 25-37.
- [9] Ward N C, Watts G F, Eckel R H. Statin toxicity [J]. *Circ Res*, 2019, 124(2): 328-350.
- [10] Fu J Q, Liang Y Q, Shi Y H, et al. Huangqi Chifeng Decoction maintains gut microbiota and bile acid homeostasis through FXR signaling to improve atherosclerosis [J]. *Heliyon*, 2023, 9(11): e21935.
- [11] Fu J Q, Liang Y Q, Yu D H, et al. Radix Saposhnikoviae enhancing Huangqi Chifeng Decoction improves lipid metabolism in AS mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 320: 117479.
- [12] 梁玉琴, 付佳琪, 石云鹤, 等. 基于 16S rRNA 测序技术和代谢组学探讨黄芪赤风汤抗动脉粥样硬化的作用机制 [J/OL]. *中国实验方剂学杂志*, 2024: 1-16. (2024-05-08). <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=ZSFX20240429002&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ>.
- [13] Liang Y Q, Fu J Q, Shi Y H, et al. Based on 16S rRNA sequencing technology and metabonomics, the anti-atherosclerosis mechanism of Huangqi Chifeng decoction was discussed [J/OL]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2024: 1-16. (2024-05-08). <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=ZSFX20240429002&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ>.
- [13] 袁晋, 王秋月, 刘树民. 黄芪赤风汤指纹图谱建立及主要成分含量测定 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2024, 26(1): 69-73.
- [14] Yuan J, Wang Q Y, Liu S M. Establishment of fingerprint and determination of main components of Huangqi Chifeng Decoction (黄芪赤风汤) [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*, 2024, 26(1): 69-73.
- [14] Gong L L, Hao Y Y, Yin X J, et al. Joint effect of a combination of components from the fruit of *Crataegus pinnatifida* Bge. Var. major N.E. Br. and the root of *Salvia miltiorrhiza* Bge. with swimming on atherosclerosis in rats [J]. *RSC Adv*, 2018, 8(65): 37229-37242.
- [15] 刘舒毓, 王秋月, 刘树民. 黄芪赤风汤对脑梗死大鼠模型的治疗作用及对脑组织 ZO-1、Claudin-5、P-gp、MRP1 蛋白表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(6): 26-33.
- [15] Liu S Y, Wang Q Y, Liu S M. Therapeutic effect of Huangqi Chifengtang on cerebral infarction rat model and its effect on expression of ZO-1, claudin-5, P-gp and MRP1 protein in brain tissue [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2022, 28(6): 26-33.
- [16] Li H, Yu X H, Ou X, et al. Hepatic cholesterol transport and its role in non-alcoholic fatty liver disease and atherosclerosis [J]. *Prog Lipid Res*, 2021, 83: 101109.
- [17] Lai Q W, Giralt A, May C L, et al. E2F1 inhibits circulating cholesterol clearance by regulating Pcsk9 expression in the liver [J]. *JCI Insight*, 2017, 2(10): e89729.
- [18] Han L Z, Wu L Y, Yin Q N, et al. A promising therapy for fatty liver disease: PCSK9 inhibitors [J]. *Phytomedicine*, 2024, 128: 155505.
- [19] Chyau C C, Wang H F, Zhang W J, et al. Antrodan alleviates high-fat and high-fructose diet-induced fatty liver disease in C57BL/6 mice model via AMPK/Sirt1/SREBP-1c/PPAR γ pathway [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(1): 360.
- [20] Ferré P, Phan F, Fougelle F. SREBP-1c and lipogenesis in the liver: An update [J]. *Biochem J*, 2021, 478(20): 3723-

- 3739.
- [21] Gáspár R, Halmi D, Demján V, et al. Kynurenine pathway metabolites as potential clinical biomarkers in coronary artery disease [J]. *Front Immunol*, 2022, 12: 768560.
- [22] Luo Z Z, Liu Y Q, Wang X, et al. Exploring tryptophan metabolism: The transition from disturbed balance to diagnostic and therapeutic potential in metabolic diseases [J]. *Biochem Pharmacol*, 2024, 230(Pt 1): 116554.
- [23] Teunis C, Nieuwdorp M, Hanssen N. Interactions between tryptophan metabolism, the gut microbiome and the immune system as potential drivers of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and metabolic diseases [J]. *Metabolites*, 2022, 12(6): 514.
- [24] Chen W, Wen L, Bao Y Y, et al. Gut flora disequilibrium promotes the initiation of liver cancer by modulating tryptophan metabolism and up-regulating SREBP2 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119(52): e2203894119.
- [25] Soma M, Lalam S K. The role of nicotinamide mononucleotide (NMN) in anti-aging, longevity, and its potential for treating chronic conditions [J]. *Mol Biol Rep*, 2022, 49(10): 9737-9748.

[责任编辑 兰新新]