虎杖苷对高脂喂养的中年 LDLr$^{-/-}$小鼠非酒精性脂肪肝炎的作用及机制研究

吉秋霞[1, 2]，许晓乐[2*]

1. 南通大学附属海安医院，江苏 南通 226001
2. 南通大学药学院 药理系，江苏 南通 226001

摘 要：目的 探讨虎杖苷对高脂喂养的中年低密度脂蛋白受体基因敲除（low-density lipoprotein receptor knockout，LDLr$^{-/-}$）小鼠非酒精性脂肪肝炎的保护作用及机制。**方法** 12 月龄雄性 LDLr$^{-/-}$小鼠随机分为对照组、模型组、白藜芦醇（200 mg/kg）组和虎杖苷低、高剂量（100、200 mg/kg）组，对照组给予常规饲料喂养，其余各组给予高脂饲料喂养；同时给予虎杖苷和白藜芦醇干预 12 周后，检测各组小鼠血清代谢参数；采用油红 O 染色、苏木素-伊红（HE）染色和 Masson 染色考察各组小鼠肝脏组织病理变化；采用试剂盒检测各组小鼠肝脏中三酰甘油（triglycerides，TG）、总胆固醇（total cholesterol，TC）、游离脂肪酸（free fatty acid，FFA）、肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）、白细胞介素-6（interleukin 6，IL-6）、丙二醛（malonaldehyde，MDA）、羟脯氨酸（hydroxyproline，HYP）水平及超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、过氧化氢酶（catalase，CAT）、谷胱甘肽过氧化物酶（glutathion peroxidase，GSH）活性；采用免疫共沉淀法检测各组小鼠肝脏组织中乙酰化肝激酶 B1（liver kinase B1，LKB1）表达情况；采用 Western blotting 法检测各组小鼠肝脏组织中氧化应激、纤维化及 sirtuin 1（SIRT1）信号通路相关蛋白表达情况。**结果** 虎杖苷显著改善高脂喂养的中年 LDLr$^{-/-}$小鼠代谢基础特征（P＜0.05），抑制肝脏脂肪变性和肝纤维化；显著降低肝脏组织中 TC、TG、TNF-α、IL-6、MDA 和 HYP 水平（P＜0.05）；显著升高 SOD、GSH 和 CAT 活性（P＜0.05）；显著降低肝脏中脂肪酸合成酶（fatty acid synthase，FASN）、硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1（stearoyl-CoA desaturase 1，SCD1）、转化生长因子-β（transforming growth factor-β，TGF-β）和 α-平滑肌动蛋白（α-smooth muscle actin，α-SMA）蛋白表达水平（P＜0.05），显著升高过氧化物酶体增殖激活受体 α（peroxisome proliferator-activated receptor α，PPARα）和肉毒碱棕榈酰基转移酶 1α（carnitine palmitoyltransferase1α，CPT1α）蛋白表达水平（P＜0.05）；显著增加核因子 E2 相关因子（nuclear factor E2-related factor 2，Nrf2）入核表达（P＜0.05）；显著升高 SIRT1 蛋白表达水平（P＜0.05），降低 SIRT1 靶蛋白肝激酶 B1（liver kinase B1，LKB1）乙酰化水平（P＜0.05）；显著升高 p-LKB1/LKB1 和磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶（phosphorylated AMP-activated protein kinase，p-AMPK）/AMPK 蛋白表达水平（P＜0.05），显著降低 p65 乙酰化水平和 p65 入核表达（P＜0.05）。**结论** 虎杖苷对高脂喂养的中年 LDLr$^{-/-}$小鼠非酒精性脂肪肝炎具有保护作用，且与 SIRT1 的激活有关。

关键词：虎杖苷；非酒精性脂肪肝炎；LDLr$^{-/-}$小鼠；SIRT1；肝脏

中图分类号：R285.5 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2021)12 - 3602 - 09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.12.017

Effect of polydatin on age- and diet-associated non-alcoholic steatohepatitis in LDL receptor knockout mice and its possible mechanisms

JI Qiu-xia[1, 2], XU Xiao-le[2]

1. Hai'an Hospital Affiliated to Nantong University, Nantong 226001, China
2. Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Nantong University, Nantong 226001, China

Abstract: Objective To explore the protective effect and mechanism of polydatin on high-fat-fed middle-aged low-density lipoprotein receptor knockout (LDLr$^{-/-}$) mice with non-alcoholic steatohepatitis. **Methods** Male LDLr$^{-/-}$ mice (12-month-old) were randomly divided into control group, model group, resveratrol (200 mg/kg) group, low- and high-dose polydatin (100, 200 mg/kg) group, rats in control group were fed with regular feed, and the others were fed with high-fat feed; After 12 weeks of intervention with polydatin and resveratrol, mice in each group were tested for serum metabolic parameters; Oil red O staining, hematoxylin-eosin

收稿日期：2020-12-18

作者简介：吉秋霞（1986—），女，硕士，主管药师，研究方向为中药药理。Tel: 15962743200 E-mail: 405180039@qq.com

***通信作者：**许晓乐（1980—），女，博士，教授，研究方向为中药药理。Tel: (0513)85051726 E-mail: xiaolexu@ntu.edu.cn

(HE) staining and Masson staining were used to investigate pathological changes of liver in mice of each group; Kits were used to detect levels of triglycerides (TG), total cholesterol (TC), free fatty acid (FFA), tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-6 (IL-6), malonaldehyde (MDA), hydroxyproline (HYP) and activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathion peroxidase (GSH) in liver of mice in each group. Immunoprecipitation method was used to detect expression of acetylated liver kinase B1 (LKB1) in liver of mice; Western blotting was used to detect expressions of oxidative stress, fibrosis and sirtuin 1 (SIRT1) signaling pathway related proteins in liver of mice in each group. **Results** Polydatin significantly improved the basic metabolic characteristics of middle-aged LDLr$^{-/-}$ mice induced by fed high-fat diet (P < 0.05), inhibited liver steatosis and liver fibrosis, reduced levels of TC, TG, TNF-α, IL-6, MDA and HYP in liver (P < 0.05), increased activities of SOD, GSH and CAT (P < 0.05), reduced expressions of fatty acid synthase (FASN), stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1), transforming growth factor-β (TGF-β) and α-smooth muscle actin (α-SMA) in liver (P < 0.05), increased expressions of peroxisome proliferator-activated receptor α (PPARα) and carnitine palmitoyltransferase 1α (CPT1α) in liver (P < 0.05), increased expression of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) into nucleus (P < 0.05), increased SIRT1 expression (P < 0.05), reduced SIRT1 target protein liver kinase B1 (LKB1) acetylation level (P < 0.05), increased expressions of p-LKB1/LKB1 and phosphorylated AMP-activated protein kinase (p-AMPK)/AMPK (P < 0.05), reduced p65 acetylation level and expression of p65 into nucleus (P < 0.05). **Conclusion** Polydatin has a protective effect on non-alcoholic steatohepatitis in middle-aged LDLr$^{-/-}$ mice fed with high fat, which is related to the activation of SIRT1.

Key words: polydatin; nonalcoholic steatohepatitis; LDLr$^{-/-}$ mice; SIRT1; liver

非酒精性脂肪肝（non-alcoholic fatty liver disease，NAFLD）是世界最常见的肝脏疾病，肥胖、2 型糖尿病、高脂血症和高血压在 NAFLD 患者中普遍存在，NAFLD 的危险因素与代谢综合征的构成几乎相同[1-2]。NAFLD 是一个复杂的肝病谱，从无症状的脂肪变性发展为具侵略性的坏死炎性反应形式即非酒精性脂肪肝炎（non-alcoholic steatohepatitis，NASH）。NASH 病理表现为不同程度的脂肪变性、细胞骨架损伤（肝细胞气球样变）、小叶炎性反应伴或不伴纤维化，目前尚无药物被批准用于 NASH 的治疗。虎杖苷提取自蓼科植物虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.，是白藜芦醇的前体化合物。虎杖苷能够保护肝脏免受酒精、四氯化碳（CCl_4）、半乳糖/果糖过载和蛋氨酸胆碱缺乏饲料喂养引起的肝损伤[3-7]。虎杖苷能够通过恢复溶酶体功能和自噬通量，从而改善蛋氨酸胆碱缺乏饲料喂养的 db/db 小鼠模型 NASH[8]。本研究旨在探讨虎杖苷对高脂饮食喂养中年（12 月龄）低密度脂蛋白受体基因敲除（low-density lipoprotein receptor knockout，LDLr$^{-/-}$）小鼠形成的代谢综合征模型中 NASH 的保护作用及机制，为虎杖苷的临床应用提供依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 LDLr$^{-/-}$小鼠 40 只，5 周龄，购自南京大学模式动物研究所，动物许可证号 SCXK（苏）2018-0008。动物于室温（25±2）℃、相对湿度 50%～60%、昼夜 12 h 交替的环境中饲养，自由进食饮水。动物实验严格按照南通大学实验动物管理法规的规定和总则建议进行，伦理批准号 20190105。

1.2 药品与试剂

虎杖苷（批号 JZ17021204）、白藜芦醇（批号 JZ17110701）购自南京狄尔格生物科技有限公司，质量分数均为 98%；含 21%脂肪、0.21%胆固醇的高脂饲料购自常州开源饲料有限公司；三酰甘油（triglycerides，TG）检测试剂盒、总胆固醇（total cholesterol，TC）检测试剂盒、游离脂肪酸（free fatty acid，FFA）检测试剂盒、苏木素-伊红（HE）染液、丙二醛（malonaldehyde，MDA）检测试剂盒、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）检测试剂盒、过氧化氢酶（catalase，CAT）检测试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶（glutathion peroxidase，GSH）检测试剂盒、羟脯氨酸（hydroxyproline，HYP）检测试剂盒购自南京建成生物技术有限公司；肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）检测试剂盒、白细胞介素-6（interleukin 6，IL-6）检测试剂盒、组织总蛋白和核蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒、G/A beads 购自江苏海门碧云天生物技术研究所；小鼠胰岛素 ELISA 试剂盒购自美国 Millipore 公司；腺苷酸活化蛋白激酶（AMP-activated protein kinase，AMPK）抗体、磷酸化 AMPK（p-AMPK）抗体、组蛋白 H_2A 抗体、核因子 E2 相关因子（nuclear factor E2-related factor 2，Nrf2）抗体、乙酰化肝激酶 B1（liver kinase B1，LKB1）抗

体、硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1（stearoyl-CoA desaturase 1，SCD1）抗体购自美国 CST 公司；脂肪酸合成酶（fatty acid synthase，FASN）抗体（批号 10624-2-AP）、肉毒碱棕榈酰基转移酶 1α（carnitine palmitoyltransferase 1α，CPT1α）抗体（批号 15184-1-AP）、转化生长因子-β（transforming growth factor-β，TGF-β）抗体（批号 21898-1-AP）、α 平滑肌动蛋白（α-smooth muscle actin，α-SMA）抗体（批号 55135-1-AP）、α-tublin 抗体（批号 11224-1-AP）购自美国 ProteinTech 公司；p65 抗体、乙酰化 p65 抗体、过氧化物酶体增殖激活受体 α（peroxisome proliferator-activated receptor α，PPARα）抗体、sirtuin 1（SIRT1）抗体购自美国 Abcam 公司；LKB1 抗体、p-LKB1 抗体购自美国 Santa cruz 公司；甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）抗体购自康成生物工程有限公司；山羊抗小鼠 IgG 抗体购自美国 LI-COR 公司。

1.3 仪器

冰冻切片机（美国 Beckman Coulter 公司）；电泳及转膜系统（美国 Bio-Rad 公司）；Synergy H1 全功能微孔板检测仪（美国 Bio-TEK 公司）；显微镜（日本 Olympus 公司）。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

12 月龄 LDLr$^{-/-}$小鼠随机分成对照组、模型组、白藜芦醇（200 mg/kg）组和虎杖苷低、高剂量（100、200 mg/kg）组[4-5,8]，每组 8 只。白藜芦醇溶于 0.5%羧甲基纤维素钠配制成质量浓度为 20 mg/mL 的溶液，虎杖苷溶于 0.5%羧甲基纤维素钠分别配制成质量浓度为 10、20 mg/mL 的溶液。对照组给予常规饲料喂养，其余各组给予高脂饲料喂养；各给药组 ig 相应药物，对照组和模型组 ig 0.5%羧甲基纤维素钠，1 次/d，连续 12 周。

2.2 虎杖苷对高脂喂养的中年 LDLr$^{-/-}$小鼠代谢参数的影响

给药结束后，小鼠禁食 12 h，自由饮水，称定质量。按试剂盒说明书检测胰岛素水平；采用全自动生化分析仪测定血糖水平；眼眶取血，按试剂盒说明书检测血清中 TG、TC 和 FFA 水平。

2.3 虎杖苷对高脂喂养的中年 LDLr$^{-/-}$小鼠肝脏组织病理变化的影响

末次给药 24 h 后，小鼠脱颈椎处死。取各组小鼠肝脏组织，以生理盐水洗涤，于 4%多聚甲醛中固定，分别进行油红 O 染色、HE 染色和 Masson 染色，于显微镜下观察并拍照。

2.4 虎杖苷对高脂喂养的中年 LDLr$^{-/-}$小鼠肝脏组织脂质水平的影响

取各组小鼠肝脏组织，按试剂盒说明书检测肝脏组织中 TG 和 TC 水平。

2.5 虎杖苷对高脂喂养的中年 LDLr$^{-/-}$小鼠肝脏组织 TNF-α 和 IL-6 水平的影响

取各组小鼠肝脏组织，按试剂盒说明书检测肝脏组织中 TNF-α 和 IL-6 水平。

2.6 虎杖苷对高脂喂养的中年 LDLr$^{-/-}$小鼠肝脏组织 SOD、CAT、GSH 活性以及 MDA、HYP 水平的影响

取各组小鼠肝脏组织，按试剂盒说明书检测肝脏组织中 SOD、CAT、GSH 活性以及 MDA、HYP 水平。

2.7 虎杖苷对高脂喂养的中年 LDLr$^{-/-}$小鼠肝脏组织乙酰化 LKB1 和 LKB1 表达的影响

G/A beads 和 LKB1 抗体于 PBS 溶液（pH＝8.2）中 4 ℃孵育 2 h，用 dimethylpimelimidate-Cl 在三乙醇胺（pH 8.2）中悬浮，室温孵育 30 min；G/A beads 在 Tris 缓冲液中悬浮 15 min，用含 5%聚山梨酯-20 的 Tris 缓冲液（pH 8.0）洗涤与 LKB1 抗体交联的 G/A 珠，洗涤 3 次，10min/次，4 ℃用封闭溶液悬浮。免疫沉淀珠用裂解缓冲液洗涤 4 次，用 30 μL 十二烷基磺酸钠样品缓冲液洗脱，用乙酰化 LKB1 和 LKB1 抗体进行免疫印迹。

2.8 虎杖苷对高脂喂养的中年 LDLr$^{-/-}$小鼠肝脏组织 AMPK、p-AMPK、Nrf2、SCD1、FASN、CPT1A、TGF-β、α-SMA、p65、乙酰化 p65、PPARα、SIRT1、LKB1 和 p-LKB1 蛋白表达的影响

按试剂盒说明书提取肝脏组织总蛋白和核蛋白，按 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质量浓度，蛋白样品经 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，加入封闭液 4 ℃孵育过夜；洗涤后，分别加入 FASN、SCD1、PPARα、CPT1A、GAPDH、α-tublin、H_2A、Nrf2、TGF-β、α-SMA、SIRT1、LKB1、p-LKB1、AMPK、p-AMPK、p65 和乙酰化 p65 抗体，4 ℃孵育过夜；洗涤后，加入山羊抗小鼠 IgG 抗体，室温孵育 2 h，洗涤后，采用 ODYSEEY 扫描仪显影，并用图像分析系统进行灰度分析。

2.9 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 Graphpad Prism 5 软件进行单因素方差分析，采用 Newman-Keuls multiple comparison test 进行组间比较。

3 结果

3.1 虎杖苷对高脂喂养的中年 LDLr$^{-/-}$小鼠代谢参数的影响

如表 1 所示，与对照组比较，模型组小鼠体质量显著增加（$P<0.05$），血清中 TC、TG 和 FFA 水平显著升高（$P<0.05$），血糖和胰岛素水平均显著增高（$P<0.05$）；与模型组比较，虎杖苷高剂量组和白藜芦醇组小鼠体质量明显降低（$P<0.05$），各给药组小鼠血清中 TC、TG 和 FFA 水平均显著降低（$P<0.05$），虎杖苷高剂量组和白藜芦醇组小鼠血糖和胰岛素水平显著降低（$P<0.05$）。

3.2 虎杖苷对高脂喂养的中年 LDLr$^{-/-}$小鼠肝脏组织病理变化的影响

如图 1 所示，与对照组相比，模型组小鼠肝脏油红 O 染色面积及颜色深度均增加，提示肝脏出现明显脂质聚积；各给药组小鼠肝脏油红 O 染色面积及颜色深度均降低。HE 染色结果显示，对照组小鼠肝脏细胞排列整齐，细胞质均匀；模型组小鼠肝脏细胞胞质内存在大量大小不一的脂滴空泡，可见气球样变；各给药组小鼠肝脏病理表现均有所缓解。Masson 染色结果显示，与对照组相比，模型组小鼠肝脏表现出广泛的纤维化；各给药组小鼠肝纤维化明显减轻。

3.3 虎杖苷对高脂喂养的中年 LDLr$^{-/-}$小鼠肝脏组织脂质水平的影响

如图 2 所示，与对照组比较，模型组小鼠肝脏中 TC 和 TG 水平显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，各给药组小鼠肝脏中 TC 和 TG 水平显著降低（$P<0.05$）。

3.4 虎杖苷对高脂喂养的中年 LDLr$^{-/-}$小鼠肝脏组织 FASN、SCD1、PPARα 和 CPT1α 蛋白表达的影响

如图 3 所示，与对照组比较，模型组小鼠肝脏

表 1 虎杖苷对高脂喂养的中年 LDLr$^{-/-}$小鼠代谢参数的影响（$\bar{x} \pm s$，$n=8$）

Table 1 Effect of polydatin on metabolic parameters in middle-aged LDLr$^{-/-}$ mice fed with high-fat ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量/(mg·kg^{-1})	体质量/g	TC/(mmol·L^{-1})	TG/(mmol·L^{-1})	FFA/(mmol·L^{-1})	血糖/(mmol·L^{-1})	胰岛素/(ng·mL^{-1})
对照	—	35.13±3.05	18.44±4.17	2.53±0.38	0.76±0.18	7.57±1.70	0.41±0.11
模型	—	48.13±4.76$^{\#}$	48.80±6.28$^{\#}$	6.46±1.09$^{\#}$	1.97±0.38$^{\#}$	20.78±5.42$^{\#}$	0.92±0.17$^{\#}$
虎杖苷	100	43.61±3.89	37.99±8.06*	4.36±0.69*	1.52±0.29*	18.97±4.03	0.82±0.23
	200	38.45±5.57*	28.71±6.18*	3.32±0.50*	1.28±0.29*	12.05±2.70*	0.72±0.12*
白藜芦醇	200	41.66±4.88*	36.10±6.16*	3.71±0.47*	1.25±0.27*	11.28±1.38*	0.66±0.16*

与对照组比较：$^{\#}P<0.05$；与模型组比较：$^{*}P<0.05$，下表同

$^{\#}P < 0.05$ *vs* control group; $^{*}P < 0.05$ *vs* model group, same as below tables

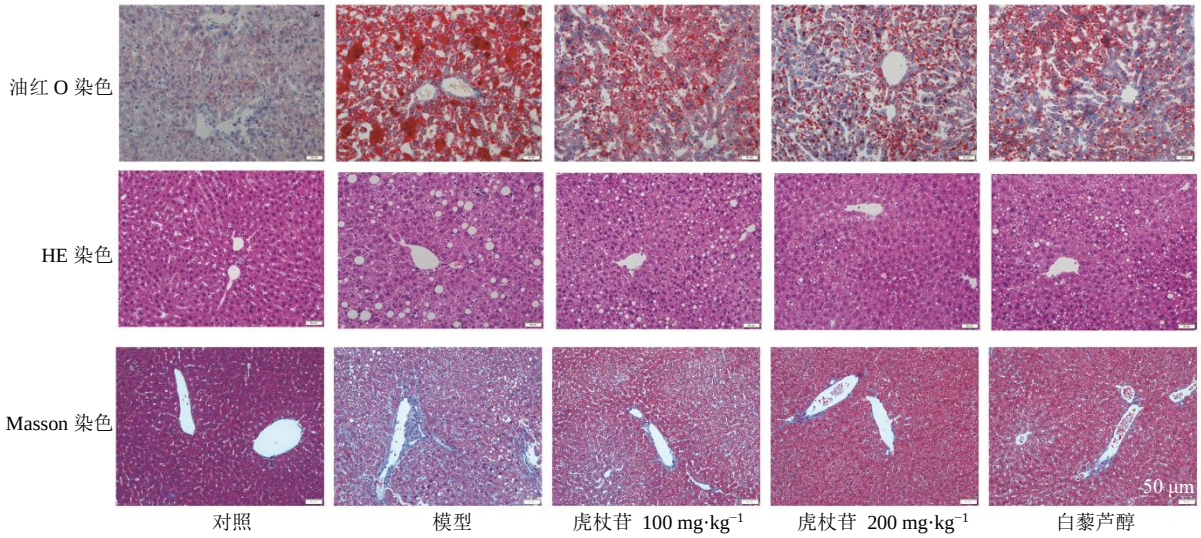
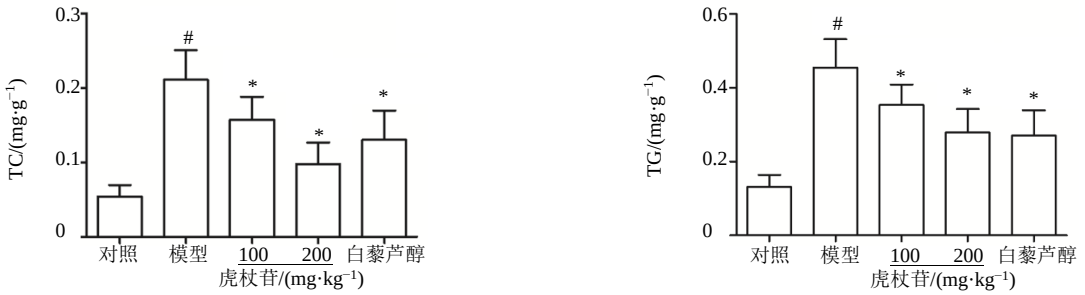


图 1 虎杖苷对高脂喂养的中年 LDLr$^{-/-}$小鼠肝脏组织病理变化的影响（×200）

Fig. 1 Effect of polydatin on pathological changes of liver tissue in middle-aged LDLr$^{-/-}$ mice fed with high-fat (× 200)



与对照组比较：$^{\#}P<0.05$；与模型组比较：$^{*}P<0.05$，下图同

$^{\#}P < 0.05$ *vs* control group; $^{*}P < 0.05$ *vs* model group, same as belows

图 2　虎杖苷对高脂喂养的中年 LDLr$^{-/-}$小鼠肝脏组织脂质水平的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 8$）

Fig. 2　Effect of polydatin on lipid levels in liver tissue in middle-aged LDLr$^{-/-}$ mice fed with high-fat（$\bar{x} \pm s$，$n = 8$）

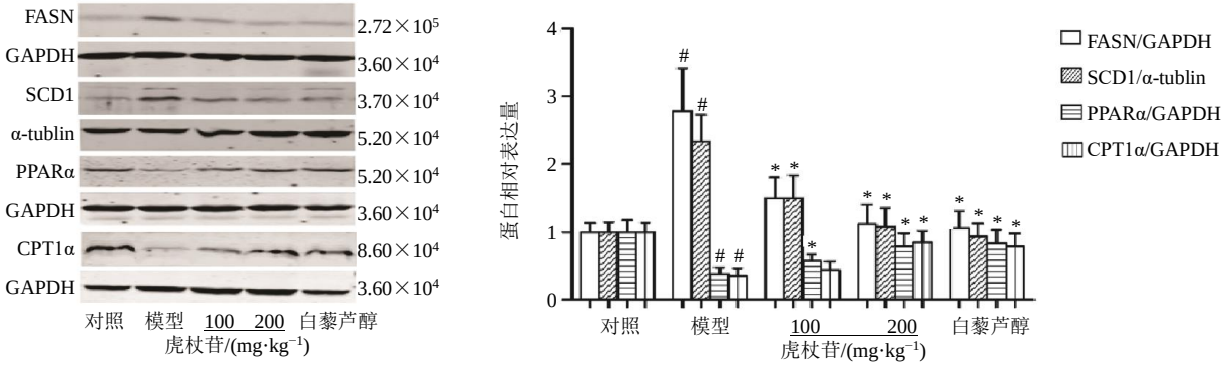


图 3　虎杖苷对高脂喂养的中年 LDLr$^{-/-}$小鼠肝脏组织 FASN、SCD1、PPARα 和 CPT1α 蛋白表达的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 8$）

Fig. 3　Effect of polydatin on expressions of FASN, SCD1, PPARα and CPT1α in liver tissue in middle-aged LDLr$^{-/-}$ mice fed with high-fat（$\bar{x} \pm s$，$n = 8$）

中 FASN 和 SCD1 蛋白表达水平显著升高（$P<0.05$），PPARα 和 CPT1α 蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$）；与模型组比较，各给药组小鼠肝脏中 FASN 和 SCD1 蛋白表达水平显著降低（$P<0.05$），虎杖苷高剂量组和白藜芦醇组 PPARα 和 CPT1α 蛋白表达水平显著升高（$P<0.05$），虎杖苷低剂量组 PPARα 蛋白表达水平显著升高（$P<0.05$）。

3.5　虎杖苷对高脂喂养的中年 LDLr$^{-/-}$小鼠肝脏组织炎性反应、氧化应激和胶原沉积的影响

如表 2 所示，与对照组比较，模型组小鼠肝脏中 TNF-α 和 IL-6 水平显著升高（$P<0.05$），MDA 水平显著升高（$P<0.05$），抗氧化物酶 SOD、CAT 和 GSH 活性显著降低（$P<0.05$），胶原沉积标志物 HYP 水平显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，各给药组小鼠肝脏中 TNF-α 和 IL-6 水平均显著降低（$P<0.05$），MDA 水平显著降低（$P<0.05$），SOD 和 GSH 活性显著升高（$P<0.05$）；虎杖苷高剂量组和白藜芦醇组小鼠肝脏中 CAT 活性显著升高（$P<0.05$），HYP 水平显著降低（$P<0.05$）。

3.6　虎杖苷对高脂喂养的中年 LDLr$^{-/-}$小鼠肝脏组织 Nrf2 蛋白表达的影响

如图 4 所示，与对照组比较，模型组小鼠肝脏

表 2　虎杖苷对高脂喂养的中年 LDLr$^{-/-}$小鼠肝脏组织炎性反应、氧化应激和胶原沉积的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 8$）

Table 2　Effect of polydatin on hepatic inflammation, oxidative stress and collagen deposition in liver tissue in middle-aged LDLr$^{-/-}$ mice fed with high-fat（$\bar{x} \pm s$，$n = 8$）

组别	剂量/(mg·kg^{-1})	TNF-α/(pg·mL^{-1})	IL-6/(pg·mL^{-1})	MDA/(nmol·mg^{-1})	SOD/(U·mg^{-1})	GSH/(U·mg^{-1})	CAT/(U·mg^{-1})	HYP/(μg·mg^{-1})
对照	—	569.25±144.38	1 042.00±226.49	2.10±0.40	142.33±28.56	43.66±8.70	257.36±55.97	0.21±0.05
模型	—	1 249.75±229.71$^{\#}$	1 804.13±322.85$^{\#}$	7.55±1.30$^{\#}$	63.41±18.37$^{\#}$	15.11±3.88$^{\#}$	148.79±49.93$^{\#}$	0.54±0.08$^{\#}$
虎杖苷	100	953.89±285.11*	1 511.00±350.57*	5.47±1.00*	98.37±19.92*	23.59±3.61*	169.75±30.27	0.40±0.10
	200	866.50±170.61*	1 283.38±234.63*	3.68±1.09*	124.28±26.03*	30.15±6.94$^{*\#}$	222.94±37.61*	0.29±0.05*
白藜芦醇	200	787.25±137.08*	1 332.25±251.71*	4.27±1.27*	107.43±15.20*	34.08±7.00*	210.52±53.48*	0.34±0.06*

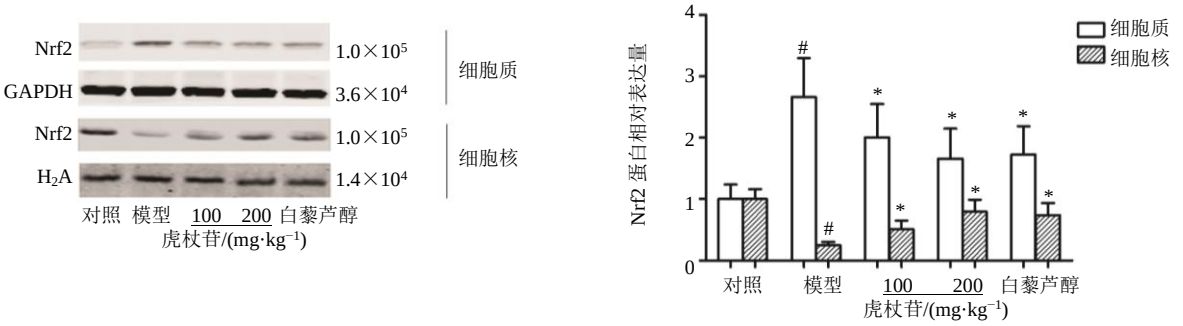


图 4 虎杖苷对高脂喂养的中年 LDLr$^{-/-}$小鼠肝脏组织 Nrf2 蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

Fig. 4 Effect of polydatin on Nrf2 expression in liver tissue in middle-aged LDLr$^{-/-}$ mice fed with high-fat（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

Nrf2 入核表达显著减少（$P<0.05$）；与模型组比较，各给药组小鼠肝脏 Nrf2 入核表达显著增加（$P<0.05$）。

3.7 虎杖苷对高脂喂养的中年 LDLr$^{-/-}$小鼠肝脏组织 TGF-β 和 α-SMA 蛋白表达的影响

如图 5 所示，与对照组比较，模型组小鼠肝脏中促纤维化关键因子 TGF-β 和 α-SMA 蛋白表达水平显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，各给药组小鼠肝脏中 TGF-β 和 α-SMA 蛋白表达水平显著降低（$P<0.05$）。

3.8 虎杖苷对高脂喂养的中年 LDLr$^{-/-}$小鼠肝脏组织中 SIRT1 信号通路相关蛋白表达的影响

如图 6-A 所示，与对照组比较，模型组小鼠肝脏中 SIRT1 蛋白表达水平显著降低（$P<0.05$）；与模型组比较，各给药组肝脏中 SIRT1 蛋白表达水平显著升高（$P<0.05$）。SIRT1 主要通过对底物靶点去乙酰化产生作用，且 LKB1 调控 AMPK。如图 6-B 所示，与对照组比较，模型组小鼠肝脏 LKB1 乙酰化水平显著升高（$P<0.05$），p-LKB1/LKB1 和 p-AMPK/AMPK 蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$）；与模型组比较，虎杖苷高剂量组和白藜芦醇组肝脏 LKB1 乙酰化水平显著降低（$P<0.05$），p-LKB1/LKB1 和 p-AMPK/AMPK 蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$）。如图 6-C 所示，与对照组比较，模型组 p65 乙酰化水平和 p65 入核表达均显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，各给药组 p65 乙酰化水平和 p65 入核表达均显著降低（$P<0.05$）。

4 讨论

NASH 是一种多方面的疾病，由于代谢并发症并存，其治疗复杂。由于大多数 NAFLD/NASH 患者伴有代谢综合征，理想的 NASH 动物模型应具有与人类NASH疾病发展相似的生理学变化如体质量增加、血脂紊乱、胰岛素抵抗、脂肪细胞因子的释放等，以及与人类 NASH 相似的不同阶段中的病理学模式和组织学变化等。常见的 NASH 模型为蛋氨酸胆碱缺乏饮食、肝脏化学毒素如 CCl_4 等诱导的动物模型。蛋氨酸胆碱缺乏饮食会诱导动物高代谢和低吞咽，导致血浆 TG 水平明显降低、体质量减轻、肝细胞气球状变小；肝脏化学毒素如 CCl_4 也会导致小鼠体质量减轻，与 NASH 的病因和病理表现不一

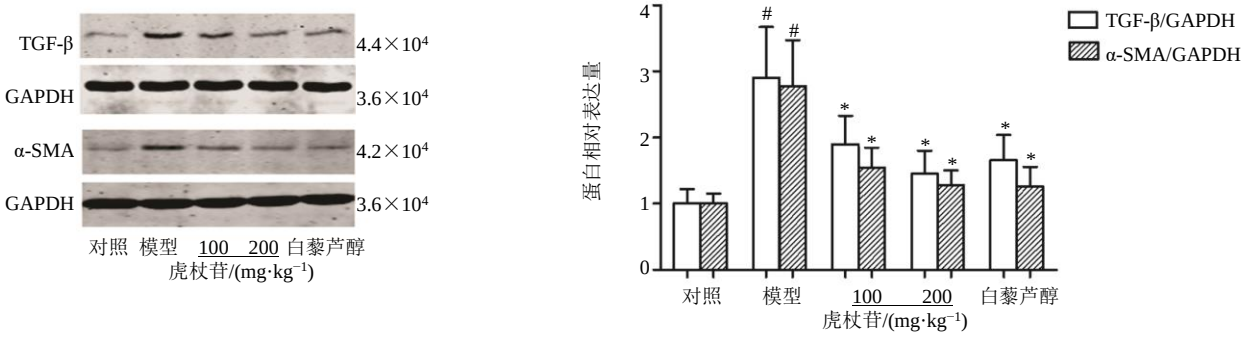


图 5 虎杖苷对高脂喂养的中年 LDLr$^{-/-}$小鼠肝脏组织 TGF-β 和 α-SMA 蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

Fig. 5 Effect of polydatin on expressions of TGF-β and α-SMA in liver tissue in middle-aged LDLr$^{-/-}$ mice fed with high-fat（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

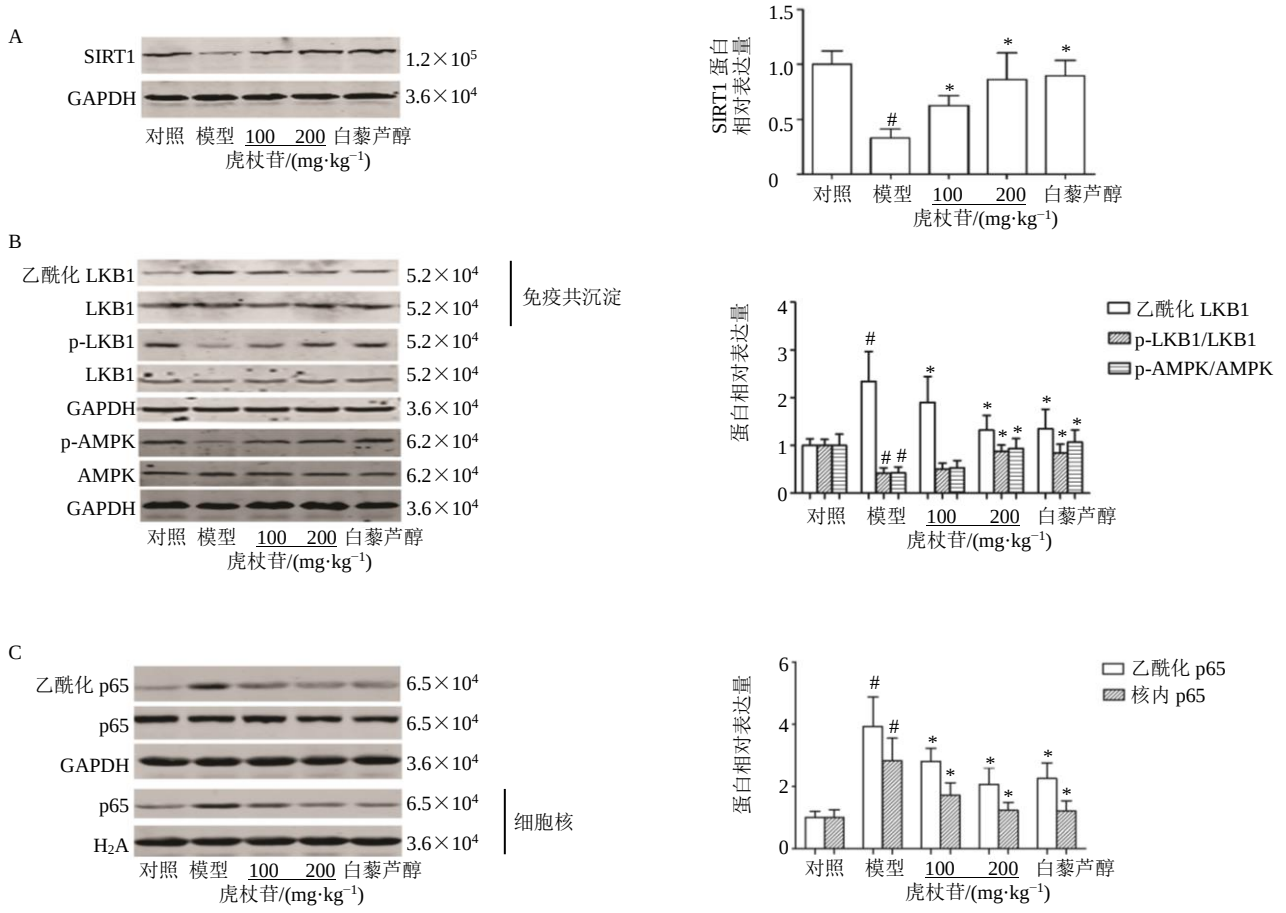


图 6　虎杖苷对高脂喂养的中年 LDLr$^{-/-}$小鼠肝脏组织中 SIRT1 信号通路相关蛋白表达的影响（$\bar{x} \pm s$, $n = 8$）

Fig. 6　Effect of polydatin on expressions of SIRT1 signaling related proteins in liver tissue in middle-aged LDLr$^{-/-}$ mice fed with high-fat（$\bar{x} \pm s$, $n = 8$）

致[9-10]。以上模型与以高脂血症、肥胖为主的代谢综合征或糖尿病患者的 NASH 有很大不同，近年遗传模型在 NASH 研究中被广泛应用，db/db 或 ob/ob 小鼠会出现代谢综合征和肝脂肪变性，但不会出现肝纤维化和炎性反应[1,9]。基于 NASH 与动脉粥样硬化机制的相似性，脂蛋白功能受损的基因小鼠模型被应用于 NASH 研究。研究发现，给予中年（12 月龄）雄性 LDLr$^{-/-}$小鼠高脂饮食喂养，可以在代谢综合征的背景下发展为 NASH，满足 5 项人类代谢综合征标准中的 4 项，并具有人类 NASH 的关键特征如肝脂肪变性、炎性反应、氧化应激和纤维化，且呈年龄相关性[10]。因此，本研究采用高脂喂养的中年 LDLr$^{-/-}$小鼠形成的代谢综合征模型探究虎杖苷对 NASH 的作用。

肥胖、血脂异常、空腹血糖升高和胰岛素升高是 NASH 患者的主要代谢综合征特征。结果显示，虎杖苷明显抑制高脂饲料喂养的中年 LDLr$^{-/-}$小鼠血脂紊乱，减轻体质量，降低血糖和胰岛素水平，表明虎杖苷能够改善代谢综合征小鼠模型的代谢基础特征参数。NASH 的病理发展涉及多重打击，肝脏脂肪变性使肝细胞易受到其他刺激，从而导致肝脏炎性反应、损伤和纤维化[1,3]。结果显示，高脂饲料喂养的中年 LDLr$^{-/-}$小鼠肝脏出现明显脂肪变性，虎杖苷明显减少肝脏脂肪变性。脂肪酸的从头生成和 β-氧化是脂质代谢的 2 个关键作用。新生脂肪生成受一系列脂酶如 FASN 和 SCD1 的调控。PPARα 和 CPT1α 是脂肪酸 β 氧化的 2 个关键酶[11]。本研究结果显示，虎杖苷显著降低肝脏中 FASN 和 SCD1 蛋白表达水平，提高 PPARα 和 CPT1α 蛋白表达水平，提示虎杖苷通过调节脂肪酸的新生脂肪生成和 β-氧化，有助于减轻血脂异常和肝脂肪变性。

炎性反应可以通过激活肝星状细胞和纤维化，在 NASH 发展中发挥主导作用，为 NASH 与肝脏的单纯性脂肪变性的主要区别。结果显示，虎杖苷抑制肝脏炎性因子 TNF-α 和 IL-6 水平，表明虎杖苷可以改善肝脏炎性反应，有助于抑制 NASH 进程。

多种内源性和外源性损伤、线粒体呼吸链衰竭、抗氧化元素如 SOD、CAT 活性或脂质过氧化水平升高的过度生成，能够导致持续性肝损伤、凋亡、炎性反应和纤维化。结果显示，虎杖苷抑制中年 LDLr$^{-/-}$小鼠肝脏脂质过氧化的最终产物 MDA 水平，增强肝脏抗氧化应激的主要抗氧化酶 SOD、GSH 和 CAT 活性。Nrf2 是抗氧化机制的关键调节器，作用于多种抗氧化物酶，为潜在的治疗 NAFLD/NASH 的靶点[12]。结果显示，虎杖苷能够促进 Nrf2 入核表达，从而增加抗氧化酶活性。在炎性反应和慢性肝损伤过程中，肝星状细胞通过产生异常数量的细胞外基质而被激活，并向肌纤维样细胞转化，从而导致肝纤维化。本研究结果显示，虎杖苷显著抑制肝脏胶原沉积和纤维化相关蛋白 TGF-β 和 α-SMA 表达，从而抑制肝脏纤维化。

SIRT1 是肝脏脂质代谢、氧化应激和炎性反应的重要调节因子，可以预防和改善 NAFLD/NASH 的特征[13]。SIRT1 激活剂白藜芦醇能够通过 SIRT1 介导的信号转导途径改善 NAFLD[14]。结果显示，虎杖苷显著增强高脂喂养中年 LDLr$^{-/-}$小鼠肝脏中 SIRT1 蛋白表达水平。SIRT1 作为 1 种依赖于 NAD^+ 的脱乙酰化酶，催化组蛋白的脱乙酰化，也能够使非组蛋白底物去乙酰化。LKB1 和核因子-κB（nuclear factor-κB，NF-κB）是由 SIRT1 介导的去乙酰化调节代谢和细胞应激反应的转录调节因子。SIRT1 通过在 Lys48 处使 LKB1 去乙酰而作用于 AMPK 信号的上游，并激活 LKB1，导致 p-AMPK 表达增加[13-14]。AMPK 是肝脏脂质代谢的重要调节因子，AMPK 的激活能够抑制下游靶点 FASN 和 SCD1，从而抑制脂肪的从头合成；AMPK 的激活可以增强 CPT1 表达，增加肝脏脂肪酸 β-氧化；AMPK 调节脂肪酸 β-氧化的另 1 个重要分子 PPARα[11]。因此，SIRT1/LKB1/AMPK 通路在肝细胞脂质代谢中起重要作用。结果显示，虎杖苷显著增强 LKB1 去乙酰化水平和 AMPK 磷酸化水平，从而抑制 AMPK 靶基因 FASN 和 SCD1 参与脂肪的从头生成，促进 PPARα 和 CPT1α 参与脂肪酸 β 氧化，改善肝脏脂肪代谢、减轻肝脏脂肪变性。NF-κB 是炎性反应的主要调节因子，RelA/p65 是 NF-κB 最常见的杂二聚体。SIRT1 能够使 RelA/p65 亚基的赖氨酸 310 去乙酰，促进 p65/p50 复合物结合，使 NF-κB 转录活性失活，抑制其促炎靶基因的表达[15]。结果显示，虎杖苷降低 p65 乙酰化水平，即增加了 p65 的去乙酰化，从而抑制 p65 入核表达，抑制炎性反应。Nrf2 与 AMPK、NF-κB 信号通路相互影响[16-17]，虎杖苷对 Nrf2 的调控可能与其对 AMPK 和 NF-κB 信号通路的调控密切相关。

综上所述，本研究发现虎杖苷能够减轻高脂喂养的中年 LDLr$^{-/-}$小鼠形成的代谢综合征模型中 NASH，即改善代谢参数、脂肪变性、炎性反应、氧化应激和纤维化，以上作用可能与肝脏 SIRT1 的激活有关。虎杖苷能够通过调控肝脏脂质代谢相关蛋白如 p-AMPK、FASN、SCD1、PPARα、CPT1 表达减轻肝脏脂肪变性，通过增强 Nrf2 抗氧化信号通路减轻肝脏氧化应激，通过抑制转录因子 p65 活化减轻肝脏炎性反应，通过抑制促纤维化关键蛋白 TGF-β 和 α-SMA 表达减轻肝脏纤维化。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Farrell G, Schattenberg J M, Leclercq I, *et al*. Mouse models of nonalcoholic steatohepatitis: Toward optimization of their relevance to human nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Hepatology*, 2019, 69(5): 2241-2257.

[2] Liu Y Y, You J J, Xu W, *et al*. Gynura procumbens aqueous extract alleviates nonalcoholic steatohepatitis through CFLAR-JNK pathway *in vivo* and *in vitro* [J]. *Chin Herb Med*, 2019: 11(4): 369-378.

[3] Koneru M, Sahu B D, Gudem S, *et al*. Polydatin alleviates alcohol-induced acute liver injury in mice: Relevance of matrix metalloproteinases (MMPs) and hepatic antioxidants [J]. *Phytomedicine*, 2017, 27: 23-32.

[4] Zhang H, Yu C H, Jiang Y P, *et al*. Protective effects of polydatin from *Polygonum cuspidatum* against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice [J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e46574.

[5] Xu L Q, Xie Y L, Gui S H, *et al*. Polydatin attenuates *D*-galactose-induced liver and brain damage through its anti-oxidative, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects in mice [J]. *Food Funct*, 2016, 7(11): 4545-4555.

[6] Zhao X J, Yu H W, Yang Y Z, *et al*. Polydatin prevents fructose-induced liver inflammation and lipid deposition through increasing miR-200a to regulate Keap1/Nrf2 pathway [J]. *Redox Biol*, 2018, 18: 124-137.

[7] Li R, Li J Z, Huang Y J, *et al*. Polydatin attenuates diet-induced nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis in mice [J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14(11): 1411-1425.

[8] Chen X T, Chan H, Zhang L, *et al*. The phytochemical polydatin ameliorates non-alcoholic steatohepatitis by

restoring lysosomal function and autophagic flux [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(6): 4290-4300.

[9] Hansen H H, Feigh M, Veidal S S, *et al*. Mouse models of nonalcoholic steatohepatitis in preclinical drug development [J]. *Drug Discov Today*, 2017, 22(11): 1707-1718.

[10] Gupte A A, Liu J Z, Ren Y L, *et al*. Rosiglitazone attenuates age- and diet-associated nonalcoholic steatohepatitis in male low-density lipoprotein receptor knockout mice [J]. *Hepatology*, 2010, 52(6): 2001-2011.

[11] Wang Q, Liu S, Zhai A, *et al*. AMPK-mediated regulation of lipid metabolism by phosphorylation [J]. *Biol Pharm Bull*, 2018, 41(7): 985-993.

[12] Solano-Urrusquieta A, Morales-González J A, Castro-Narro G E, *et al*. NRF-2 and nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Ann Hepatol*, 2020, 19(5): 458-465.

[13] Chang H C, Guarente L. SIRT1 and other sirtuins in metabolism [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2014, 25(3): 138-145.

[14] Hubbard B P, Sinclair D A. Small molecule SIRT1 activators for the treatment of aging and age-related diseases [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2014, 35(3): 146-154.

[15] de Gregorio E, Colell A, Morales A, *et al*. Relevance of SIRT1-NF-κB axis as therapeutic target to ameliorate inflammation in liver disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11): 3858.

[16] Joo M S, Kim W D, Lee K Y, *et al*. AMPK facilitates nuclear accumulation of Nrf2 by phosphorylating at serine 550 [J]. *Mol Cell Biol*, 2016, 36(14): 1931-1942.

[17] Zeng X L, Yang J N, Hu O, *et al*. Dihydromyricetin ameliorates nonalcoholic fatty liver disease by improving mitochondrial respiratory capacity and redox homeostasis through modulation of SIRT3 signaling [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2019, 30(2): 163-183.

[责任编辑　李亚楠]