

## 基于 AMPK/SREBP-1c 及 PPAR $\alpha$ 信号通路的玳玳果黄酮调控脂质代谢作用机制研究

马国萍<sup>1,2</sup>, 陈丹<sup>1\*</sup>, 陈红<sup>2\*</sup>, 熊朝栋<sup>1</sup>, 余文静<sup>1</sup>

1. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122

2. 福建省立医院 干部特诊科, 福建 福州 350001

**摘要:** 目的 探究玳玳果黄酮调控脂质代谢作用及其分子机制。方法 建立预防性高脂血症 (hyperlipidemia) 大鼠病理模型, 以非诺贝特、辛伐他汀为阳性对照药, 考察玳玳果黄酮调控脂质代谢的作用, 光镜下观察肝脏组织形态学; 采用实时荧光定量 RT-PCR 法、Western blotting 法检测大鼠肝脏腺苷酸激活蛋白激酶 (adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK)、固醇调节元件结合蛋白-1c (sterol regulatory element binding protein-1c, SREBP-1c) 及过氧化物酶增殖物激活受体  $\alpha$  (peroxidase proliferators activate receptors  $\alpha$ , PPAR $\alpha$ ) 信号通路相关基因、蛋白的表达。结果 预防性给药玳玳果黄酮后, 与模型组相比, 各剂量玳玳果黄酮对高脂血症大鼠血脂及肝脏脂肪变性均有明显的改善作用 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ); 可促 AMPK 磷酸化, 使其 mRNA 及蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ); 显著抑制并明显下调 SREBP-1c、脂肪酸合成酶 (fatty acid synthase, FAS)、乙酰辅酶A羧化酶 (acetyl CoA carboxylase, ACC) 蛋白和 mRNA 表达水平 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ); 可促进 PPAR $\alpha$ 、肉毒碱棕榈酰基转移酶-1 (carnitine palmitoyl transferase-1, CPT-1) 蛋白及 mRNA 表达水平升高 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。结论 玳玳果黄酮可有效改善脂质代谢紊乱, 防治高脂血症。其作用机制是通过激活 AMPK 促其磷酸化, 从而抑制脂质合成, 促进脂肪酸氧化分解, 由此减少脂肪沉积, 发挥调控脂质代谢的作用。

**关键词:** 玳玳果黄酮; 脂质代谢; 腺苷酸激活蛋白激酶; 固醇调节元件结合蛋白; 过氧化物酶增殖物激活受体

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)21-6598-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.21.018

## Studies on mechanism of lipid metabolism regulation of *Citrus aurantium* var. *daidai* flavonoids extract based on AMPK/SREBP-1 and PPAR $\alpha$ pathway

MA Guo-ping<sup>1,2</sup>, CHEN Dan<sup>1</sup>, CHEN Hong<sup>2</sup>, XIONG Chao-dong<sup>1</sup>, YU Wen-jing<sup>1</sup>

1. Department of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

2. Cadre Special Department, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350001, China

**Abstract: Objective** To explore the lipid metabolism regulation effect and molecular mechanism of flavonoids from Daidai (*Citrus aurantium* L. var. *daidai* Tanaka) fruit. **Methods** The hyperlipidemia (HLP) rat pathological model was established, and Fenofibrate and Simvastatin were used as positive control drugs to explore the effect of different doses of flavonoids from Daidai fruit on the regulation of lipid metabolic mechanism. The morphology of liver tissues was observed by light microscope. Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) and Western blotting were used to measure the mRNA and the protein levels that are related to adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK), sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c), and peroxidase proliferators activate receptors  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) signal pathway of rat liver tissues respectively. **Results** As compared to the model group, the result showed dose dependency after preventive administration of flavonoids from Daidai fruit, each dose of flavonoids from Daidai fruit were significantly able to improve blood lipid and liver steatosis in the hyperlipidemia rats ( $P < 0.05$ ,  $0.01$ ); promote the phosphorylation of AMPK, and increase the levels of mRNA and protein expression for AMPK significantly ( $P < 0.05$ ,  $0.01$ ); significantly inhibit and down-regulate the levels of mRNA and protein expression for SREBP-1c, fatty acid synthase (FAS), and acetyl

收稿日期: 2021-04-15

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (2018J01253); 福建省医学创新项目 (2016-CX-45); 福建省科技计划项目 (2010Y2004)

作者简介: 马国萍 (1992—), 女, 硕士, 研究方向为中药药效物质基础及质量评价。Tel: 18344980693 E-mail: 1342341856@qq.com

\*通信作者: 陈丹 (1961—), 女, 博士, 教授。Tel: 13515026709 E-mail: 2536282060@qq.com

陈红 (1966—), 女, 学士, 主任医师。Tel: 18950339443 E-mail: chyed@sina.com

CoA carboxylase (ACC) ( $P < 0.05, 0.01$ ); increase the levels of mRNA and protein expression for PPAR $\alpha$  and carnitine palmitoyl transferase-1 (CPT-1) ( $P < 0.05, 0.01$ ). **Conclusion** The flavonoids from Daidai fruit can effectively improve lipid metabolism disorder and prevent hyperlipidemia. Its mechanism of action is to activate AMPK to promote its phosphorylation, which inhibits lipid synthesis and promotes the oxidative decomposition of fatty acids, thereby reducing fat deposition and regulating lipid metabolism.

**Key words:** flavonoids of *Citrus aurantium* var. *daidai* fruit; lipid metabolism; adenosine monophosphate activated protein kinase; sterol regulatory element binding protein-1c; peroxidase proliferators activate receptors  $\alpha$

现代社会随着人口老龄化及生活和饮食习惯的改变,患高脂血症(hyperlipidemia)的人群不断增长,严重威胁人类健康。药物治疗是目前调控脂质代谢异常的主要方法,但临床上使用的化学类调脂药物存在诸多毒副作用。因此,寻找有效而低毒的调脂中药,探讨其调控脂质代谢的作用机制,具有十分重要的意义。玳玳 *Citrus aurantium* L. var. *daidai* Tanaka (Daidai) 又称代代,是芸香科柑桔亚属植物,酸橙的变种,未成熟果实称玳玳花枳壳或苏枳壳<sup>[1]</sup>;据《饮片新参》<sup>[2]</sup>记载:“玳玳性微寒,味苦、酸,有行气宽中、消食、化痰的功能,药食同源”。课题组前期研究表明,由玳玳果制备的有效部位提取物玳玳果黄酮<sup>[3]</sup>具有良好的调血脂、抗氧化作用<sup>[4-5]</sup>;该提取物的主要效应组分为新橙皮苷及柚皮苷,并已明确了药效物质基础和体内处置过程,经体内外质量评价,提取物组分群整体表征稳定<sup>[6-7]</sup>。

腺苷酸激活蛋白激酶(adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK)是近年来发现的一种能量传感器,被认为是调节细胞新陈代谢、调节脂肪含量、影响脂质代谢平衡的关键酶蛋白<sup>[8-9]</sup>。活化 AMPK 磷酸化,若激活下游分子通路信号,既可增加能量的分解代谢(如脂肪酸氧化分解代谢)又可能关闭合成代谢(如脂质的从头合成途径),是脂质代谢的 2 条重要通路<sup>[10-12]</sup>。固醇调节元件结合蛋白(sterol regulatory element binding protein-1c, SREBP-1c)和过氧化物酶增殖物激活受体(peroxisome proliferators-activated receptor  $\alpha$ , PPAR $\alpha$ )分别是调控脂质从头合成途径与脂肪酸氧化分解代谢途径中的重要转录因子<sup>[13-16]</sup>,其下游的关键靶基因还包括乙酰辅酶A羧化酶(acetyl CoA carboxylase, ACC)、脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, FAS)、肉毒碱棕榈酰基转移酶(carnitine palmitoyltransferase-1, CPT-1)等<sup>[17-19]</sup>。因此,为探究玳玳果黄酮调控脂质代谢机制,基于 AMPK/SREBP-1c、ACC、FAS 及 PPAR $\alpha$ 、CPT-1 调控脂质代谢的重要信号通路关键酶,以临床上常用

的调脂药物非诺贝特(Fenofibrate)、辛伐他汀(Simvastatin)为阳性对照,通过预防性高脂血症大鼠病理模型实验方法,评价低、中、高剂量玳玳果黄酮调控脂质代谢作用,并进一步考察玳玳果黄酮是否通过激活 AMPK 促进其磷酸化(p-AMPK)上调,由此对其下游的脂质从头合成途径以及脂类氧化分解代谢途径的靶基因和蛋白产生影响,阐释玳玳果黄酮体现其整体作用的调控脂质代谢的多靶点分子作用机制,为玳玳果黄酮的研发提供理论依据。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

电泳转模仪(美国 Bio-Rad 公司); ChemiDocXRS+化学发光成像系统(美国 Bio-Rad 公司); C1000TMTermalcircle PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司); ABI7900 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystem 公司); DM4000B LED 光学显微镜(德国 Leica 公司); Infinite M200 PRO 多功能酶标仪(瑞士 TECAN 公司); HFUU586 超低温冰箱(美国 ThermoFisherScientific)等。

### 1.2 试药

玳玳果黄酮<sup>[3]</sup>(自制,总黄酮质量分数 85.83%,批号 20171114);辛伐他汀片(规格 20 mg/片,批号 H20171161,杭州默沙东制药有限公司产品),非诺贝特胶囊(规格 200 mg/粒,批号 H20160155,法国利博福尼制药公司)。总胆固醇(total cholesterol, TC,批号 20180104)、三酰甘油(triglycerides, TG,批号 20180605)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C,批号 20180107)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C,批号 20180317)等试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;苏木素伊红(HE)染色试剂盒(批号 20171216)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 080919190917)、增强型 RIPA 裂解液(批号 080919180723)均购自碧云天生物科技有限公司;超敏 ECL 化学发光检测试剂盒(批号 20180904,苏州宇恒生物技术有限公司)。RNA 提

取试剂盒(货号 R401-01)、RNA 逆转录试剂盒(货号 R123-01)、CPT-1 抗体(货号 15184-1-AP)均购自南京诺维赞生物科技有限公司; AMPK $\alpha$  抗体(货号 10929-2-AP)、ACC 抗体(货号 21923-1-AP)、FAS/CD95 抗体(货号 13098-1-AP)、SREBP1 抗体(货号 14088-1-AP)、PPAR $\alpha$  抗体(货号 15540-1-AP)、 $\beta$ -actin 抗体(货号 66009-1-ig)、羊抗鼠 IgG (H+L)、羊抗兔 IgG (H+L)等均购自武汉三鹰生物技术有限公司; phospho-AMPK (Thr172)抗体(货号 bs-4002R, 北京博奥森生物技术公司)。中性树脂、组织包埋盒等购自索莱宝科技有限公司。

### 1.3 饲料

大鼠基础饲料(福建中医药大学实验动物中心); 高脂饲料(HD001, 北京博泰宏达生物技术有限公司), 总热量比为 4.7 kcal/g, 热量百分比为蛋白质 19.8%、碳水化合物 35.2%、脂肪 45.0%。

### 1.4 动物

清洁级 SD 大鼠, 雄性, 7~8 周龄, 56 只, 体质量(260 $\pm$ 10) g (上海斯莱克实验动物有限责任公司), 实验动物许可证号 SCXK (沪) 2017-0005。饲养环境温度(24 $\pm$ 4)  $^{\circ}$ C, 环境湿度(50 $\pm$ 5)%, 昼夜 12 h 交替, 基础饲料适应性喂养 7 d。定点投喂, 自由饮水, 每日更换饮水及饲料。医学实验动物环境设施由福建中医药大学实验动物中心提供, 使用许可证号 SYXK (闽) 2014-0005。实验操作均按照福建中医药大学动物伦理学委员会要求严格执行(批准号 [2018] 福中医伦理审字第(031)号)。

## 2 方法

### 2.1 动物分组

大鼠随机分为对照组、高脂血症模型组、非诺贝特阳性对照组(Fen)、辛伐他汀阳性对照组(Sim)及吡嗪果黄酮低、中、高剂量组, 每组 8 只。

### 2.2 药液制备

**2.2.1 吡嗪果黄酮药液** 精密称取吡嗪果黄酮适量, 加 0.5% CMC-Na 生理盐水, 分别配制成质量浓度为 0.012、0.024、0.036 g/mL 的低、中、高剂量吡嗪果黄酮药液。

**2.2.2 阳性药液** 非诺贝特胶囊临用前配制成 4 mg/mL 的非诺贝特阳性药液。辛伐他汀片临用前配制成 0.4 mg/mL 的辛伐他汀阳性药液。

### 2.3 给药方案及造模

对照组大鼠基础饲料喂养, 模型组及各给药组大鼠高脂饲料喂养。对照组和模型组大鼠以 0.01

g/(kg·d) 剂量 ig 0.5% CMC-Na 生理盐水。Sim 组大鼠以 0.004 g/(kg·d) 剂量 ig 辛伐他汀阳性药液, Fen 组以 0.04 g/(kg·d) 剂量 ig 非诺贝特阳性药液。吡嗪果黄酮低、中、高剂量组大鼠分别以 0.12、0.24、0.36 g/(kg·d) 剂量(参照课题组前期药效学实验结果<sup>[4]</sup>, 按人体与鼠体表面积换算, 从生药量折算) ig 吡嗪果黄酮药液。预防性给药, 模型组及各给药组高脂饲料喂养的同时每天 9:00~10:00 ig 给药 1 次, 连续给药 45 d。大鼠自由饮水。

实验期间, 观察大鼠的一般情况、饮食状况、行为活动、精神状态、毛发情况等, 每天监测各组大鼠进食量。每周称量各组大鼠体质量并记录。直至 45 d 时, 从对照组、模型组分别随机取 3 只大鼠, 眼眶取血, 分离血清, 检测其中 TG、TC、LDL-C、HDL-C 含量, 判断高脂血症模型是否制备成功。

### 2.4 标本采集

实验结束, 大鼠 ip 2%戊巴比妥钠(2 mL/kg)麻醉后, 腹主动脉采血, 血液室温静置 30 min 后, 3000 r/min 离心 15 min, 分离血清。分离肝脏, 称质量并根据公式计算脏器指数。取部分肝脏组织, 分装于不同冻存管, 置于液氮中速冻, 再转移至 -80  $^{\circ}$ C 冰箱保存, 用于相关基因、蛋白指标的测定。

脏器指数 = 脏器湿质量/体质量

### 2.5 血清及肝脏脂质含量测定

取部分肝脏右叶组织制作匀浆, 按相关试剂盒说明书提供的方法, 分别测定大鼠血清、肝脏组织中 TG、TC、LDL-C、HDL-C 含量。

### 2.6 肝脏组织形态学观察

取大鼠肝脏, 肉眼观察肝脏组织外观形态及色泽。采用常规石蜡包埋、切片制片、HE 染色, 经脱水、透明、中性树脂封片, 光学显微镜下观察肝脏组织的形态学病理变化。

### 2.7 大鼠肝脏组织相关指标 mRNA 相对表达量检测

按试剂盒说明书步骤操作, 提取大鼠肝脏组织总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。

实验所用相关蛋白基因 AMPK、SREBP-1c、ACC、FAS、PPAR $\alpha$ 、CPT-1 等内参序列, 由上海尚亚生物技术公司代为设计并合成引物(订单编号 SY805387)。引物序列见表 1。

### 2.8 大鼠肝脏组织相关指标蛋白表达量检测

取各组大鼠的肝脏组织, 加入 RIPA 裂解液裂解匀浆, AMPK 提取蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样品经 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶

表 1 各引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	种属	引物序列 (5'→3')	长度/bp
AMPK	Rattus	F: GTTGGACTATGAATGGAAGGTTGT	64
		R: GGAGGTCACGGATGAGGTAA	
PPAPa	Rattus	F: TCACGATGCTGTCTCCTT	52
		R: CGCAGAATGGCTTCTCAG	
SREBP-1c	Rattus	F: CGCTACCGTTCCTCTATCAATG	125
		R: TGGTTGCTGTGCTGTAAGAAG	
CPT-1	Rattus	F: GCTCGCACATTACAAGGACAT	86
		R: ACACCACATAGAGGCAGAAGA	
FAS	Rattus	F: GAGAGCCTGCCACCTATGA	38
		R: ACTGCGGATTCCAATTCACATT	
ACC	Rattus	F: GGTGGTGGCATTGAAGGAG	260
		R: TGTGAGCAGGAAGGACTTGA	
GAPDH	Rattus	F: ACGGCAAGTTCACGGCACAG	146
		R: GAAGACGCCAGTAGACTCCACGAC	

电泳, 转至 PVDF 膜, 加入 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 分别加入 AMPK、p-AMPK、SREBP-1c、ACC、FAS、PPARa、CPT-1 抗体, 4 °C 孵育过夜。室温二抗孵育 1~2 h。采用凝胶成像分析系统曝光条带, 使用 Image J 软件对条带进行定量分析。

### 2.9 数据处理与统计学分析

采用 PrismDemo 绘图软件作图, SPSS 20.0 统计软件处理数据。所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示。符合正态分布的计量资料, 两组间比较用 *t* 检验, 多组间两两比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 检验, 两两比较采用最小显著性差异 (LSD) 方法, 不符合正态分布的数据采用非参数检验。*P* < 0.05 表示有显著性差异, *P* < 0.01 表示有极显著性差异。

## 3 结果

### 3.1 玳玳果黄酮对高脂血症大鼠脂质代谢的影响

**3.1.1 大鼠一般状况与摄食量变化** 给药期间, 各组大鼠均无死亡, 对照组大鼠精神状况良好, 灵敏多动, 皮毛整洁光亮, 饮食饮水正常, 大小便正常,

体质量保持稳定增长。模型组大鼠反应较迟钝, 不活跃, 常静卧不动, 毛色光亮, 饮食饮水量及尿量明显增多, 部分大鼠大便稀软异味重, 体质量明显增加; 而玳玳果黄酮低、中、高剂量组及阳性对照组大鼠的一般状况较模型组均有明显改善。

实验前 3 周, 大鼠的摄食量逐渐增多, 至实验第 5 周后各组大鼠的摄食量趋于稳定, 模型组总体摄食量水平高于对照组, 对照组的摄食水平总体趋于稳定。阳性对照组及玳玳果黄酮各剂量组, 实验初期由于 ig 的刺激及药物干预, 摄食量有所下降, 但在 ig 适应后各组的摄食量又恢复上升, 且经造模后各组大鼠的体质量较造模前均明显增加。结果见图 1。

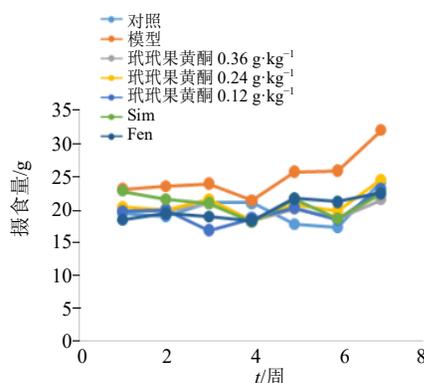


图 1 各组大鼠摄食量变化

Fig. 1 Changes in food in take of rats in each group

**3.1.2 各组大鼠体质量、肝质量与肝指数变化** 高脂饮食诱导造模 45 d 后, 与对照组相比, 模型组大鼠体质量、肝质量、肝脏指数均明显增加 (*P* < 0.05)。与模型组比较, 阳性对照组及玳玳果黄酮各剂量组大鼠体质量、肝质量、肝脏指数均不同程度明显降低 (*P* < 0.05)。提示玳玳果黄酮的干预可不同程度降低大鼠的体质量、肝质量和肝脏指数, 中剂量组和高剂量组表现尤为突出, 高剂量组的降低作用与阳性对照组相近。结果见表 2。

表 2 给药 45 d 后大鼠体质量、肝质量及肝脏指数 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 2 Body weight, liver weigh, and liver index after 45 days of administration ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	体质量/g	肝质量/g	肝脏指数/%
对照	—	380.38 ± 75.10	14.29 ± 0.74	3.04 ± 0.01
模型	—	444.22 ± 102.39 <sup>#</sup>	19.55 ± 1.72 <sup>#</sup>	3.78 ± 0.02 <sup>#</sup>
玳玳果黄酮	0.12	423.13 ± 91.35*	18.33 ± 1.13*	3.73 ± 0.37*
	0.24	405.21 ± 83.64*	17.37 ± 0.73*	3.40 ± 0.23*
	0.36	386.68 ± 76.15*	15.95 ± 0.83*	3.27 ± 0.25*
	0.004	370.73 ± 71.77*	16.70 ± 1.16*	3.17 ± 0.24*
Sim	0.004	370.73 ± 71.77*	16.70 ± 1.16*	3.17 ± 0.24*
Fen	0.04	372.56 ± 74.71*	15.99 ± 0.94*	3.21 ± 0.28*

与对照组比较: <sup>#</sup>*P* < 0.05; 与模型组比较: \**P* < 0.05

<sup>#</sup>*P* < 0.05 vs control group; \**P* < 0.05 vs model group

**3.1.3 对大鼠肝脏匀浆脂质含量影响** 与对照组相比, 模型组大鼠肝脏匀浆 TG、TC、LDL-C 含量均显著升高, HDL-C 含量均显著降低 ( $P < 0.01$ ), 提示高脂血症大鼠模型成功。与模型组相比, 玳玳果黄酮低、中、高剂量组及阳性对照组的大鼠肝匀浆 TG、TC、LDL-C 含量均显著降低 ( $P < 0.01$ ), HDL-C 含量均显著提高 ( $P < 0.01$ )。提示玳玳果黄酮表征出调控肝匀浆脂质积聚的作用, 且呈剂量依赖性。其中, 玳玳果黄酮中、高剂量组与阳性对照组效果相当; 高剂量组调控 TC、HDL-C 的效果优于阳性对照组。结果见表 3。

**3.1.4 大鼠肝脏组织形态学变化** 对照组大鼠肝脏颜色呈暗红色, 质地均匀, 表面光滑, 边缘锐利, 有韧性; 模型组大鼠肝脏颜色呈偏黄泛白, 表面明显弥漫性肿大, 边缘较厚且多不规则, 质脆并有油腻感, 肝脏体积较其他组明显增大, 切面呈极为明显花斑状; 与模型组相比, 阳性对照组及玳玳果黄酮各剂量组大鼠的肝脏颜色呈现不同程度的灰红色, 其中 Fen 组的颜色趋于暗红色, 肝脏质地松软, 表面较光滑, 有不同程度花斑; 玳玳果黄酮组肝脏颜色、质地均有好转, 中、高剂量组好转明显。提示玳玳果黄酮具有改善肝组织脂质积聚作用。结果见图 2。

表 3 玳玳果黄酮对大鼠肝脏脂质含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 3 Effect of flavonoids from Daidai fruit on liver lipid in rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	TG/(mmol·L <sup>-1</sup> )	TC/(mmol·L <sup>-1</sup> )	LDL-C/(mmol·L <sup>-1</sup> )	HDL-C/(mmol·L <sup>-1</sup> )
对照	—	0.711 ± 0.143	0.644 ± 0.033	0.479 ± 0.058	0.111 ± 0.010
模型	—	1.362 ± 0.030 <sup>##</sup>	1.153 ± 0.020 <sup>##</sup>	0.922 ± 0.051 <sup>##</sup>	0.042 ± 0.002 <sup>##</sup>
玳玳果黄酮	0.12	1.158 ± 0.160 <sup>**</sup>	1.013 ± 0.027 <sup>**</sup>	0.724 ± 0.054 <sup>**</sup>	0.069 ± 0.006 <sup>**</sup>
	0.24	1.029 ± 0.095 <sup>**</sup>	0.947 ± 0.071 <sup>**</sup>	0.622 ± 0.056 <sup>**</sup>	0.076 ± 0.001 <sup>**</sup>
	0.36	0.912 ± 0.035 <sup>**</sup>	0.815 ± 0.081 <sup>**</sup>	0.593 ± 0.047 <sup>**</sup>	0.100 ± 0.017 <sup>**</sup>
Sim	0.004	0.941 ± 0.075 <sup>**</sup>	0.932 ± 0.043 <sup>**</sup>	0.597 ± 0.058 <sup>**</sup>	0.095 ± 0.004 <sup>**</sup>
Fen	0.04	0.695 ± 0.028 <sup>**</sup>	0.854 ± 0.037 <sup>**</sup>	0.507 ± 0.036 <sup>**</sup>	0.087 ± 0.003 <sup>**</sup>

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

<sup>##</sup> $P < 0.01$  vs control group; <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs model group



图 2 各组大鼠肝脏形态

Fig. 2 Liver morphology of each group

**3.1.5 大鼠肝脏病理学组织切片观察** 对照组大鼠肝脏组织结构完整、清晰, 肝小叶结构无异常, 未发现肝细胞脂肪变性, 肝细胞排列为以中央静脉为中心呈放射状, 肝细胞内无脂滴分布。模型组大鼠肝脏出现重度弥漫性脂肪病变, 肝小叶结构破坏, 肝索排列紊乱, 肝细胞体积增大, 胞质疏松, 胞浆内出现大小不等、数量不一的弥散性空泡状脂滴, 为典型的脂肪肝。与模型组相比, 玳玳果黄酮各剂量干预后, 大鼠肝细胞脂肪变性均呈现出不同程度的改善, 胞浆内脂滴空泡数减少, 体积变小; Fen 组的肝细胞肿大和泡状脂肪变性基本恢复正常, 肝窦清晰可见, 胞浆质丰富, 细胞核位于肝细胞中央, 与对照组大鼠肝组织结构基本一致, 偶见脂滴; Sim 组大鼠的肝细胞脂肪变性

程度为轻度, 胞浆内中等细小脂滴较少, 脂滴泡不大, 但仍有少量大脂滴。提示玳玳果黄酮对高脂血症大鼠肝组织脂肪变性具有较明显的改善作用, 具有良好的调脂预防和治疗作用, 且呈剂量相关性。结果见图 3。

**3.1.6 玳玳果黄酮对大鼠血清脂质含量的影响** 与对照组相比, 模型组大鼠血清 TG、TC、LDL-C 含量显著升高, HDL-C 含量显著降低, 均具有极显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 提示高脂血症大鼠模型造模成功。与模型组相比, 玳玳果黄酮低、中、高剂量组及阳性对照组, 大鼠血清 TG、TC、LDL-C 含量均显著降低 ( $P < 0.05, 0.01$ ), HDL-C 含量均显著升高 ( $P < 0.05, 0.01$ )。提示玳玳果黄酮具有调控血清脂质 TG、TC、LDL-C、HDL-C 含量的作用, 效果

与阳性对照药相当，且呈一定的剂量相关性。其中，玳玳果黄酮降低血清 TC 含量水平趋势明显，调控

HDL-C 含量水平的效果优于辛伐他汀，而非诺贝特相似。结果见表 4。

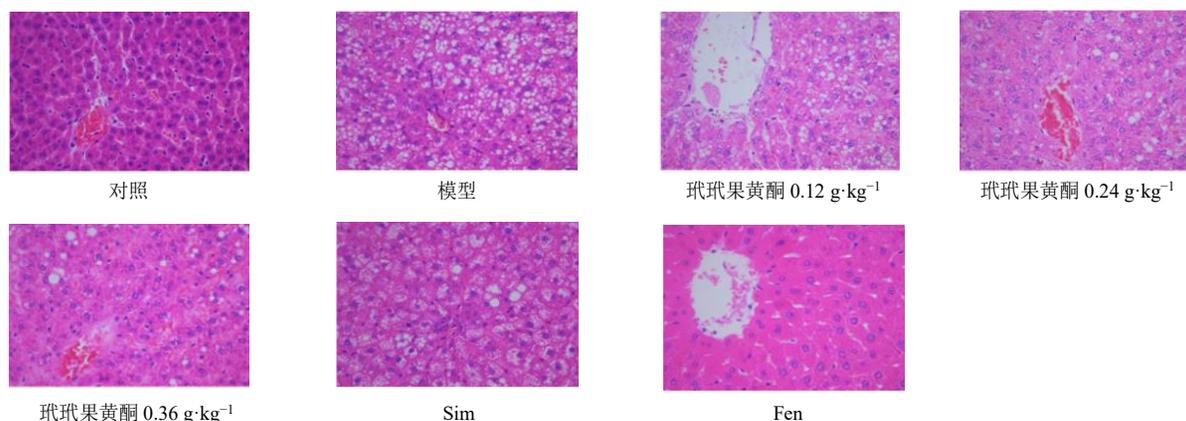


图 3 肝脏病理组织切片图 (10×40 倍镜)

Fig. 3 Histopathological slice of liver (10 × 40 times)

表 4 玳玳果黄酮对大鼠血清脂质含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 4 Effect of flavonoids from Daidai fruit on serum lipid in rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	TG/(mmol·L <sup>-1</sup> )	TC/(mmol·L <sup>-1</sup> )	LDL-C/(mmol·L <sup>-1</sup> )	HDL-C/(mmol·L <sup>-1</sup> )
对照	—	1.317 ± 0.413	2.368 ± 0.176	0.374 ± 0.097	1.795 ± 0.349
模型	—	2.614 ± 0.677 <sup>##</sup>	3.588 ± 0.263 <sup>##</sup>	0.970 ± 0.142 <sup>##</sup>	0.750 ± 0.086 <sup>##</sup>
玳玳果黄酮	0.12	2.436 ± 0.118	2.899 ± 0.150 <sup>**</sup>	0.617 ± 0.115 <sup>*</sup>	1.459 ± 0.268 <sup>**</sup>
	0.24	1.660 ± 0.140 <sup>**</sup>	2.942 ± 0.198 <sup>**</sup>	0.578 ± 0.126 <sup>*</sup>	1.564 ± 0.214 <sup>**</sup>
	0.36	1.347 ± 0.255 <sup>**</sup>	2.618 ± 0.056 <sup>**</sup>	0.474 ± 0.114 <sup>**</sup>	1.625 ± 0.312 <sup>**</sup>
Sim	0.004	1.744 ± 0.498 <sup>**</sup>	3.152 ± 0.157 <sup>**</sup>	0.568 ± 0.137 <sup>*</sup>	1.215 ± 0.242 <sup>*</sup>
Fen	0.04	0.846 ± 0.154 <sup>**</sup>	2.408 ± 0.281 <sup>**</sup>	0.427 ± 0.113 <sup>**</sup>	1.690 ± 0.142 <sup>*</sup>

与对照组比较: <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

<sup>##</sup> $P < 0.01$  vs control group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs model group

### 3.2 玳玳果黄酮对高脂血症模型大鼠肝脏 AMPK mRNA 和 p-AMPK 蛋白表达的影响

与对照组相比，模型组大鼠肝脏 AMPK mRNA 及 p-AMPK 蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.01$ )。与模型组相比，玳玳果黄酮中、高剂量组及 Sim 组的大鼠肝脏 AMPK mRNA 表达水平均明显上调 ( $P < 0.01$ )，且呈剂量相关性，玳玳果黄酮上调效果与阳性对照组相当，其中玳玳果黄酮高剂量组上调效果最佳。与模型组比较，玳玳果黄酮不同剂量组以及阳性对照组的大鼠肝脏 p-AMPK 蛋白表达水平明显上调 ( $P < 0.05, 0.01$ )，玳玳果黄酮各剂量组表征的效果与阳性对照药组相当。提示高脂饮食诱导高脂血症可引起大鼠肝脏 AMPK mRNA 及 p-AMPK 蛋白表达水平下调；玳玳果黄酮、阳性对照药辛伐他汀、非诺贝特均可使 AMPK mRNA 及 p-AMPK 蛋白表达水平明显升高，可激活 AMPK 磷酸化。结果见图 4。

### 3.3 玳玳果黄酮对高脂血症模型大鼠肝脏 SREBP-1c、ACC、FAS 蛋白和 mRNA 表达的影响

#### 3.3.1 高脂血症模型大鼠肝脏 SREBP-1c 蛋白和 mRNA 表达水平

与对照组相比，模型组大鼠肝脏 SREBP-1c 蛋白及 mRNA 表达水平均明显升高 ( $P < 0.01$ )。与模型组相比，玳玳果黄酮不同剂量组及阳性对照药组的大鼠肝脏 SREBP-1c 蛋白及 mRNA 表达水平均显著降低 ( $P < 0.01$ )，其中提取物高剂量组的抑制效果介于阳性对照 Sim 组与 Fen 组之间。提示玳玳果黄酮可显著抑制高脂血症大鼠肝脏 SREBP-1c 蛋白及 mRNA 表达水平。结果见图 5。

#### 3.3.2 高脂血症模型大鼠肝脏 ACC 蛋白和 mRNA 表达水平

与对照组相比，模型组大鼠肝脏 ACC 蛋白及 mRNA 表达水平明显升高 ( $P < 0.01$ )。与模型组相比，玳玳果黄酮不同剂量组以及阳性对照药组的大鼠肝脏 ACC 蛋白及 mRNA 表达水平均不同程度显著降低 ( $P < 0.01$ )，玳玳果黄酮各剂量组对大鼠肝

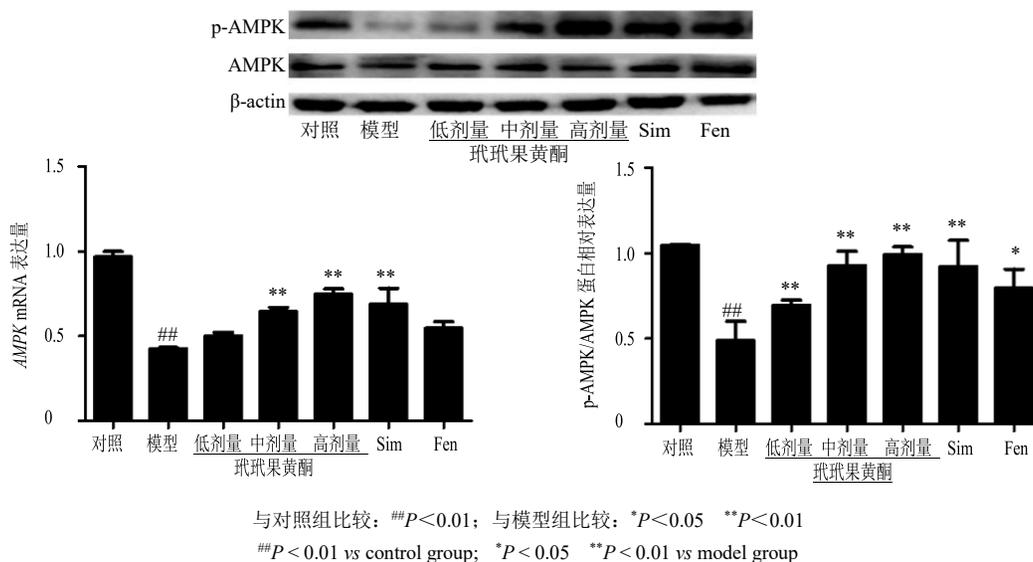


图 4 玳玳果黄酮对高脂血症模型大鼠肝脏中 AMPK mRNA 及 p-AMPK 蛋白水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 4 Effect of flavonoids from Daidai fruit on expression of AMPK mRNA and p-AMPK protein in liver of hyperlipidemia model rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

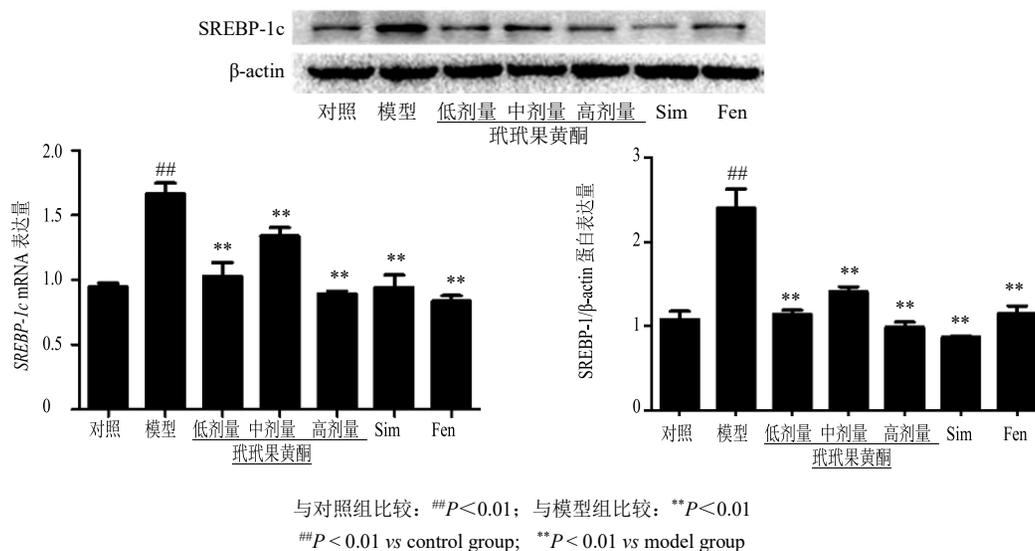


图 5 玳玳果黄酮对高脂血症模型大鼠肝脏 SREBP-1c 蛋白及 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 5 Effect of flavonoids from Daidai fruit on expression of SREBP-1c protein and mRNA in liver of hyperlipidemia model rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

脏 ACC mRNA 表达的抑制效果介于阳性对照 Sim 组与 Fen 组之间; 玳玳果黄酮高剂量组抑制大鼠肝脏 ACC 蛋白表达水平效果优于 Sim 组, 与 Fen 组相当, 并呈剂量相关性。提示玳玳果黄酮可使 ACC 蛋白及 mRNA 表达水平显著降低, 其中高剂量组与 Fen 组效果相当。结果见图 6。

**3.3.3 高脂血症模型大鼠肝脏 FAS 蛋白和 mRNA 表达水平** 与对照组相比, 模型组大鼠肝脏 FAS 蛋白及 mRNA 表达水平升高 ( $P < 0.05, 0.01$ )。与模型组相比, 玳玳果黄酮各剂量组与阳性对照药组的大鼠

肝脏 FAS 蛋白及 mRNA 表达水平均明显降低 ( $P < 0.05, 0.01$ ), 其中玳玳果黄酮中、高剂量组及 Sim 组对大鼠肝脏 FAS 蛋白及 mRNA 表达水平下调显著。提示玳玳果黄酮可显著抑制高脂血症大鼠肝脏 FAS 蛋白及 mRNA 表达水平上调, 使其在大鼠肝脏中表达水平明显降低。结果见图 7。

**3.4 玳玳果黄酮对高脂血症模型大鼠肝脏 PPAR $\alpha$ 、CPT-1 蛋白和 mRNA 表达的影响**

**3.4.1 高脂血症模型大鼠肝脏 PPAR $\alpha$  蛋白和 mRNA 表达影响** 与对照组相比, 模型组大鼠肝脏 PPAR $\alpha$

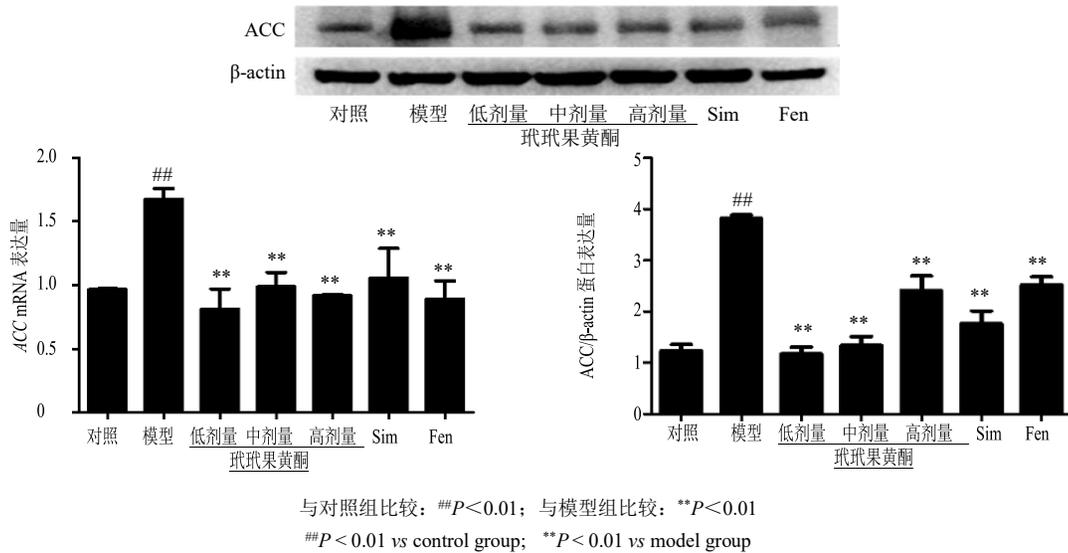


图 6 玳玳果黄酮对高脂血症模型大鼠肝脏 ACC 蛋白及 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 6 Effect of flavonoids from Daidai fruit on expression of ACC protein and mRNA in liver of hyperlipidemia model rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

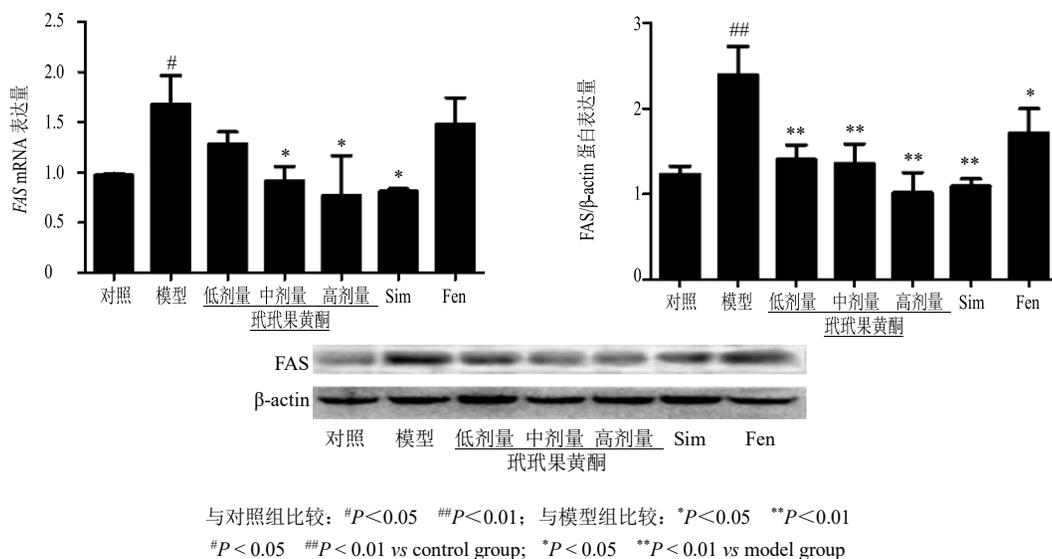


图 7 玳玳果黄酮对高脂血症模型大鼠肝脏 FAS 蛋白及 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 7 Effect of flavonoids from Daidai fruit on expression of FAS protein and mRNA in liver of hyperlipidemia model rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

蛋白及 mRNA 表达水平明显下调 ( $P < 0.01$ )。与模型组相比, 玳玳果黄酮各剂量组及阳性对照药组的大鼠肝脏 PPAR $\alpha$  蛋白及 mRNA 表达水平均显著升高 ( $P < 0.05, 0.01$ ); 玳玳果黄酮各剂量组升高大鼠肝脏 PPAR $\alpha$  蛋白及 mRNA 表达水平的效果明显优于阳性对照组。提示玳玳果黄酮可明显抑制高脂血症大鼠肝脏 PPAR $\alpha$  蛋白及 mRNA 表达水平下调, 使其表达水平显著升高。结果见图 8。

### 3.4.2 高脂血症模型大鼠肝脏 CPT-1 蛋白和 mRNA

表达水平 与对照组相比, 模型组大鼠肝脏 CPT-1 蛋白及 mRNA 表达水平明显降低 ( $P < 0.01$ )。与模型组相比, 玳玳果黄酮各剂量组及阳性对照药组的大鼠肝脏 CPT-1 蛋白及 mRNA 表达水平均显著升高 ( $P < 0.01$ ); 玳玳果黄酮各剂量组升高大鼠肝脏 CPT-1 蛋白及 mRNA 表达水平的效果与阳性对照药基本相当。提示玳玳果黄酮可明显抑制高脂血症大鼠肝脏 CPT-1 蛋白及 mRNA 表达水平下调, 使 CPT-1 蛋白及 mRNA 表达水平明显升高。结果见图 9。

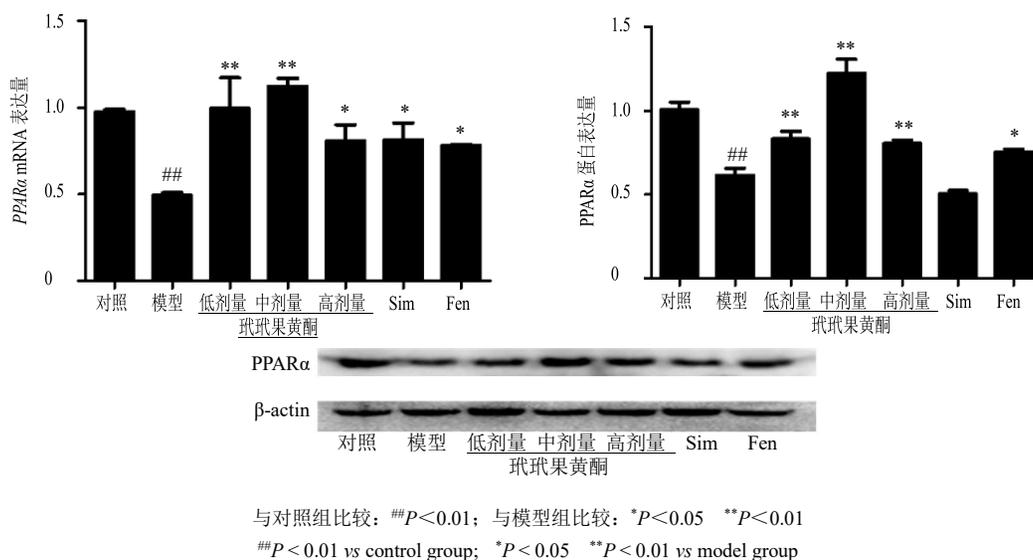


图 8 玳玳果黄酮对高脂血症模型大鼠肝脏中 PPARα 蛋白及 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 8 Effect of flavonoids from Daidai fruit on expression of PPARα protein and mRNA in liver of hyperlipidemia model rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

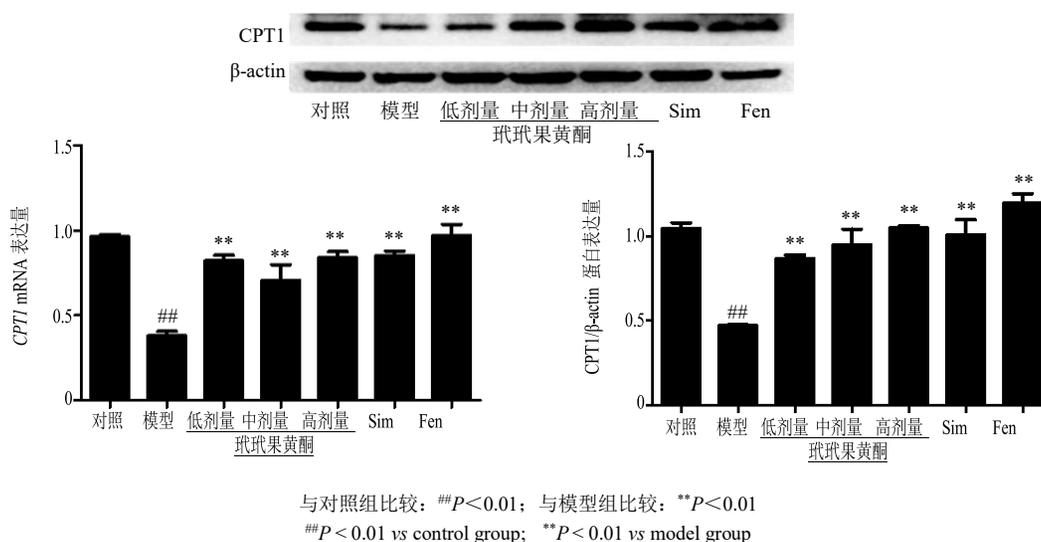


图 9 玳玳果黄酮对高脂血症模型大鼠肝脏 CPT-1 蛋白及 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 9 Effect of flavonoids from Daidai fruit on expression of CPT-1 protein and mRNA in liver of hyperlipidemia model rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

#### 4 讨论

研究表明<sup>[10-11]</sup>, 他汀类的代表药物之一辛伐他汀可显著降低体内 TC 和 LDL-C 水平, 多用于高胆固醇血症治疗, 可通过激活 AMPK, 调节下游受体蛋白 SREBP 和 PPARs 的转录和表达, 降低 TC 及胆固醇酯的生成, 减少内源性脂肪酸的合成; 非诺贝特是贝特类调脂药物的代表, 可显著降低体内 TG 和 LDL-C 水平, 同时也有增高 HDL-C 水平的作用, 且作为 PPARα 配体的激活剂, 可通过激活与其编码相关的脂肪酸氧化蛋白基因, 在转录水平诱导脂蛋

白酶的表达, 促进 TG 水解及脂肪酸氧化, 减少肝脏中 LDL 的合成与分泌。故实验选择辛伐他汀与非诺贝特为阳性对照药。

本研究采用预防性高脂血症病理模型实验方法评价玳玳果黄酮调控脂质作用。结果证实, 玳玳果黄酮可显著改善高脂血症大鼠体质量及肝脂比等体征状态; 可有效降低高脂血症大鼠血清及肝匀浆的 TC、TG 和 LDL 水平, 提升 HDL-C 水平; 病理学切片结果显示, 玳玳果黄酮可明显改善大鼠脂肪肝组织病变, 且均表现出良好的剂量相关性。提示玳

玳玳果黄酮具有良好的防治高脂血症的作用,可有效调控改善脂质代谢紊乱,且对 TC、HDL-C 水平的调控效果尤为显著。

AMPK 是机体能量代谢的关键性蛋白靶点, SREBP-1c 主要分布在肝脏、脂肪组织及大鼠骨骼肌中,可促进脂质转录合成,影响相关靶点 ACC、FAS 等表达, SREBP-1c 的过度表达将引起脂质代谢紊乱,而激活 AMPK 可下调 SREBP-1c 的表达,从而抑制 TG 和脂肪酸的合成<sup>[12-16]</sup>。PPAR $\alpha$  主要在肝脏、肠道及心脏组织中高表达,能诱导肝脏的线粒体脂肪酸氧化的限速酶 CPT-1 表达, AMPK 激活后蛋白磷酸化,可上调 PPAR $\alpha$  和 CPT-1 的表达,增强线粒体对脂肪酸的利用和氧化<sup>[16-19]</sup>。预试验表明,玳玳果黄酮调控脂质作用与 AMPK 存在量效关系,并表征出多靶点的特性。故实验提出基于 AMPK,探究玳玳果黄酮调控脂质作用与 AMPK 及其下游信号通路靶点 SREBP-1c、ACC、FAS 及 PPAR $\alpha$ 、CPT-1 信号通路的相关性,阐释其调控脂质代谢的作用靶点、通路及机制。

本研究结果表明,高脂饮食诱导高脂血症模型大鼠可引起肝脏 AMPK mRNA 和 p-AMPK 蛋白表达水平下调,使 SREBP-1c、ACC 和 FAS 的蛋白及 mRNA 表达均明显升高, PPAR $\alpha$ 、CPT-1 的蛋白和 mRNA 表达水平均明显降低。预防性给药玳玳果黄酮后,可显著激活大鼠肝脏组织的 AMPK,促使其磷酸化,使 AMPK mRNA 和 p-AMPK 蛋白表达水平明显升高,显著下调和抑制 SREBP-1c、FAS、ACC 的蛋白和 mRNA 表达;同时,明显促进 PPAR $\alpha$ 、CPT-1 蛋白和 mRNA 表达水平的显著提升。

综上所述,玳玳果黄酮可通过激活 AMPK 促其磷酸化,从而抑制 AMPK 下游信号通路转录因子 SREBP-1c 表达,进而调控抑制下游脂质生成相关靶点 FAS、ACC 表达,抑制脂质从头合成,降低肝脏脂质的生成;同时,玳玳果黄酮的干预可上调脂质代谢信号通路关键酶 PPAR $\alpha$  蛋白及 mRNA 表达,从而进一步调控增加下游脂质代谢相关酶 CPT-1 的表达,提高酶活性,促进脂肪酸氧化分解;由此起到调控改善脂质代谢紊乱,减少脂质沉积的作用。该研究结果也为探究中药多靶点协同调控脂质代谢作用提供了有益的研究思路。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

[1] 肖培根. 新编中药志 (第 3 卷) [M]. 北京: 化学工业出

版社, 2002: 443-452.

- [2] 王一仁主撰. 饮片新参 [M]. 上海: 千顷堂书局, 1936: 128.
- [3] 陈丹, 刘永静. 一种玳玳果总黄酮有效部位的制备方法: CN102058701A [P]. 2011-05-18.
- [4] 邱红鑫, 陈丹, 刘永静, 等. 玳玳果黄酮滴丸对高脂血症大鼠的降血脂作用研究 [J]. 中国现代应用药学, 2011, 28(7): 597-601.
- [5] 曾华平, 陈红, 陈丹, 等. 玳玳果黄酮降脂提取物效应组分大鼠肝肠微粒体代谢特性研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(4): 819-826.
- [6] Zeng L J, Chen D, Huang Q D, *et al.* Isolation of a new flavanone from Daidai fruit and hypolipidemic activity of total flavonoids extracts [J]. *Nat Prod Res*, 2015, 29(16): 1521-1528.
- [7] 曾令军, 陈丹, 郑利, 等. 玳玳黄酮提取物特征活性成分不同生理状态的药动学特性比较 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(2): 309-315.
- [8] Hardie D G, Ross F A, Hawley S A. AMPK: A nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(4): 251-262.
- [9] Slack C, Foley A, Partridge L. Activation of AMPK by the putative dietary restriction mimetic metformin is insufficient to extend lifespan in *Drosophila* [J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e47699.
- [10] Kim S J, Yuan H D, Chung S H. Ginsenoside Rg1 suppresses hepatic glucose production via AMP-activated protein kinase in HepG2 cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(2): 325-328.
- [11] 华冰. 甘草总黄酮的降血脂作用及机制的研究 [D]. 银川: 宁夏医科大学, 2015.
- [12] Ruderman N B, Carling D, Prentki M, *et al.* AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(7): 2764-2772.
- [13] Li Y, Xu S, Mihaylova M M, *et al.* AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice [J]. *Cell Metab*, 2011, 13(4): 376-388.
- [14] Li X, Li Y, Yang W, *et al.* SREBP-1c overexpression induces triglycerides accumulation through increasing lipid synthesis and decreasing lipid oxidation and VLDL assembly in bovine hepatocytes [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2014, 143: 174-182.

- [15] Ha J H, Jang J, Chung S I, *et al.* AMPK and SREBP-1c mediate the anti-adipogenic effect of  $\beta$ -hydroxyisovalerylshikonin [J]. *Int J Mol Med*, 2016, 37(3): 816-824.
- [16] 肖璐. 化湿祛浊方通过 SREBP1、PPAR $\alpha$  调节甘油三酯代谢的机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.
- [17] Kim M K, Kim S H, Yu H S, *et al.* The effect of clozapine on the AMPK-ACC-CPT1 pathway in the rat frontal cortex [J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2012, 15(7): 907-917.
- [18] Wan C W, Wong C N, Pin W K, *et al.* Chlorogenic acid exhibits cholesterol lowering and fatty liver attenuating properties by up-regulating the gene expression of PPAR- $\alpha$  in hypercholesterolemic rats induced with a high-cholesterol diet [J]. *Phytother Res*, 2013, 27(4): 545-551.
- [19] Kang O H, Kim S B, Mun S H, *et al.* Puerarin ameliorates hepatic steatosis by activating the PPAR $\alpha$  and AMPK signaling pathways in hepatocytes [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35(3): 803-809.

[责任编辑 潘明佳]