

白术水提物对肥胖小鼠血管稳态失衡的影响

陈钰岚, 魏柯健, 刘 静, 郭静妍, 吕圭源*, 苏 洁*

浙江中医药大学 药学院, 浙江 杭州 310053

摘要: 目的 探讨白术 *Atractylodes macrocephala* 水提物对肥胖小鼠血管稳态失衡的改善作用和潜在机制。方法 选取 40 只 ICR 小鼠, 随机分为正常组、模型组、依折麦布片 (1 mg/kg) 组和白术水提物 (4、2 g/kg) 组, 每组 8 只, 除正常组给予普通饲料外, 其余各组每天给予高糖高脂饲料喂养, 造模的同时分别 ig 相应药物, 正常组及模型组 ig 蒸馏水, 1 次/d, 连续 11 周。给药期间检测小鼠体重及面温、舌色等中医证候指标; 末次给药后, 检测血清中一氧化氮 (nitric oxide, NO)、内皮素-1 (endothelin-1, ET-1)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 及总胆固醇 (total cholesterol, TC) 水平; 取主动脉观察其组织形态学变化, 并检测主动脉中白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)、TNF- α 、磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶 (phosphorylated adenylyate-activated protein kinase, p-AMPK)、沉默信息调节因子 1 (silent information regulator, SIRT1)、过氧化物酶体增殖物活化受体 γ 共激活因子-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α , PGC-1 α) 的蛋白表达。**结果** 白术水提物可显著提高肥胖小鼠旷场水平移动总距离和水平移动速度、排便量、排尿量及面温 ($P < 0.01$), 增加尾部微循环血流量 ($P < 0.05, 0.01$), 显著降低尿液吸光度、足温 ($P < 0.01$), 并改善舌色变化 ($P < 0.01$), 显著降低 TC、LDL-C、TNF- α 和 ET-1 水平 ($P < 0.01$), 升高 NO 含量 ($P < 0.01$), 改善主动脉组织结构异常, 降低主动脉 IL-6、TNF- α 、TLR4 蛋白表达 ($P < 0.05, 0.01$), 提高 p-AMPK、SIRT1、PGC-1 α 蛋白表达 ($P < 0.05, 0.01$)。**结论** 白术水提物能够有效缓解倦怠乏力、排便无力、四肢烦热等证候表现, 并能改善肥胖引起的主动脉损伤、血管内皮紊乱等血管稳态失衡, 其作用机制可能和激活 AMPK/SIRT1/PGC-1 α 通路有关。

关键词: 白术; 阴火理论; 血管稳态; 肥胖; 腺苷酸活化蛋白激酶/沉默信息调节因子 1/过氧化物酶体增殖物活化受体 γ 共激活因子-1 α 信号通路; 白术内酯 III; 白术内酯 II

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)05-1578-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.05.016

Effect of *Atractylodes macrocephala* water extract on vascular steady-state imbalance in obese mice

CHEN Yulan, WEI Kejian, LIU Jing, GUO Jingyan, LYU Guiyuan, SU Jie

School of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract: Objective To explore the improvement effect and potential mechanism of *Atractylodes macrocephala* water extract on vascular homeostasis imbalance in obese mice. **Methods** A total of 40 ICR mice were randomly divided into normal group, model group, Ezetimibe Tablets (1 mg/kg) group and *A. macrocephala* water extract (4, 2 g/kg) groups, with eight mice in each group. Except for the normal group, which was given regular feed, the other groups were given high sugar and high-fat feed every day. While modeling, the corresponding drugs were administered intragastrically separately. The normal group and model group were given distilled water once a day for 11 consecutive weeks. During the administration period, body weight and traditional Chinese medicine syndrome indicators such as facial temperature and tongue color were detected; After the last administration, levels of nitric oxide (NO), endothelin-1 (ET-1), tumor necrosis factor- α (TNF- α), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and total cholesterol (TC) in serum were detected; The aorta was collected and its histological changes was observed; The protein expressions of interleukin-6 (IL-

收稿日期: 2023-10-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82003977); 国家自然科学基金资助项目 (82304760); 浙江省重点研发计划项目 (2020C04020); 浙江省重点实验室 (2012E10002)

作者简介: 陈钰岚, 本科, 从事中药抗代谢性疾病药理研究。E-mail: chenyan1116@126.com

*通信作者: 苏 洁, 副研究员, 硕士生导师, 从事中药抗代谢性疾病药理研究。E-mail: sujie198169@126.com

吕圭源, 教授, 博士生导师, 从事中药药理与新产品开发研究。E-mail: zjtcmlgy@163.com

6), Toll like receptor 4 (TLR4), TNF- α , phosphorylated adenylylated protein kinase (p-AMPK), silent information regulator 1 (SIRT1), peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α) in aorta were detected. **Results** *A. macrocephala* water extract significantly increased the total distance and speed of horizontal movement in the open field, defecation volume, urine output, and surface temperature of obese mice ($P < 0.01$), increased tail microcirculation blood flow ($P < 0.05, 0.01$), significantly reduced urine absorbance and foot temperature ($P < 0.01$), and improved tongue color changes ($P < 0.01$), significantly reduced levels of TC, LDL-C, TNF- α and ET-1 ($P < 0.01$), increased the content of NO ($P < 0.01$), improved abnormal aortic tissue structure, reduced IL-6, TNF- α and TLR4 protein expressions in aorta ($P < 0.05, 0.01$), increased p-AMPK, SIRT1 and PGC-1 α protein expressions ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** *A. macrocephala* water extract can effectively alleviate symptoms such as fatigue, weakness in defecation, and restlessness in the limbs, and can improve vascular homeostasis imbalances such as aortic injury and endothelial dysfunction caused by obesity. Its mechanism may be related to the activation of AMPK/SIRT1/PGC-1 α pathway.

Key words: *Atractylodes macrocephala* Koidz.; yin fire theory; vascular homeostasis; obesity; adenylylated-activated protein kinase/silent information regulator/peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α signaling pathway; atractylenolide III; atractylenolide II

据国家卫生健康委员会发布的《中国居民营养与慢性病状况报告(2020年)》显示,我国超重肥胖的成年居民超过50%^[1]。肥胖导致血管阻力增加,导致血管稳态失衡^[2]。血管稳态的失衡与重构机制涉及代谢、氧化应激、炎症等,其中能量代谢是血管重构的关键机制之一^[3]。腺苷酸激活蛋白激酶(adenylylated-activated protein kinase, AMPK)信号通路与线粒体功能关系密切,为改善线粒体功能的关键途径^[4]。

中医学认为血脉稳态失衡是多种病机作用下的慢性、长程的病理改变,其中血管稳态失衡以气虚和火热为本^[5]。气虚见于多脏功能不足,而脾胃为气血生化之源,是气机升降的枢纽,主运化与统血^[6],故推测血管稳态失衡与脾胃气虚有关。脾胃气虚的首要原因为过食肥甘^[7],过食肥甘者常见倦怠乏力、口渴少饮、五心烦热等临床表现^[8],与“阴火”患者的临床表现相似,阴火证是以脾胃气虚为主和火热亢盛为次的证候群^[9],故认为肥胖与阴火证密切相关。李东垣治疗阴火证以“甘温除热”“益气升阳”为主,补中益气,健运中焦^[10]。白术为菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎,味甘,性温,归脾、胃经,具有健脾益气、燥湿利水的功效^[11]。同时现代临床发现,白术能影响机体内脂质代谢转运,调节血脂紊乱^[12],因此,白术或可治疗肥胖所致的血管稳态失衡。本研究通过高糖高脂饲料的肥胖小鼠,结合各药效指标综合评价白术水提物对肥胖相关中医证候表现影响,并探讨其对肥胖小鼠主动脉血管稳态的作用机制。

1 材料

1.1 动物

SPF级雄性ICR小鼠40只,6~8周龄,购自

上海市计划生育科学研究所实验动物经营部,许可证号SCXK(沪)2018-0006,合格证号20180006023028。饲养环境温度20~25℃,相对湿度40%~65%,光照时间12h/d,循环通风换气。动物实验经浙江中医药大学实验动物管理与伦理委员会批准(批准号ZSLL-2016-118)。

1.2 药材

麸炒白术饮片(批号202007069)购自浙江钱王中药有限公司,经浙江中医药大学朱波副教授鉴定为菊科植物白术 *A. macrocephala* Koidz. 的干燥根茎。

1.3 药品与试剂

依折麦布片(批号W018665)购自杭州默沙东制药有限公司;高糖高脂饲料(由20.0%蔗糖、15%猪油、0.8%胆固醇、0.2%胆酸钠及适量的酪蛋白、磷酸氢钙、石粉等组成,批号20220923、20221126)购自南通特洛菲饲料科技有限公司;对照品白术内酯III(批号22010404,质量分数为99.98%)、白术内酯IV(批号20091003,质量分数为99.56%)购自成都普菲德生物技术有限公司;低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)试剂盒(批号220811301)购自美康生物科技股份有限公司;总胆固醇(total cholesterol, TC)试剂盒、一氧化氮(nitric oxide, NO)试剂盒(批号分别为20230104、20230424)均购自南京建成生物工程研究所;肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)试剂盒、内皮素1(endothelin-1, ET-1)试剂盒(批号分别为202301、23021460)均购自江苏酶免实业有限公司;Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)抗体、沉默信息调节因子2相关酶1(silent mating type information regulation 2 homolog 1, SIRT1)抗体(批号分别为00105090、00130130)均购自武汉三鹰生

物技术有限公司; TNF- α 抗体(批号 B8905)购自苏州睿瀛生物技术有限公司; 白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)抗体(批号 HH0827)购自杭州华安生物技术有限公司; 磷酸化 AMPK (p-AMPK) 抗体(批号 16)购自美国 CST 公司; 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子-1 α (peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator-1 α , PGC-1 α) 抗体、AMPK 抗体(批号分别为 M27MA02、L220C04)购自成都正能生物技术有限责任公司。

1.4 仪器

SENCOR-501 型旋转蒸发器(上海申顺生物科技有限公司); FA2204B 型电子天平(上海精科天美科学仪器有限公司); 1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); TBA40-FR 型全自动生化分析仪(东芝三广医疗株式会社); EC360 型全自动包埋机(美康仪器设备制造高淳县有限公司); Tissue-Tek VIPTM 5Jr 型全封闭组织脱水机(日本樱花检验仪器株式会社); RM2245 型半自动切片机(德国 Leica 公司); HS-KP-G 型烤片机(沈阳恒松科技有限公司); Power wave 340 型酶标仪(美国 Bio-Tek 公司); SCIENTZ-48 型高通量组织研磨器(宁波新芝生物科技股份有限公司); FLIR ONE Pro 型红外热像仪(美国 FLIR 公司)。

2 方法

2.1 白术水提取物中有效成分含量测定

2.1.1 白术水提取物的制备 取麸炒白术粗粉 500 g, 加入 20 倍量水, 提取 3 次, 每次 2 h, 滤过, 合并滤液, 60 $^{\circ}$ C 减压浓缩至 1 g/mL, 4 $^{\circ}$ C 备用。临用前使用蒸馏水将其分别配制成为质量浓度为 0.2、0.4 g/mL 的溶液。

2.1.2 色谱条件 Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), 流动相为 0.1%磷酸水溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱: 0~20 min, 50%~60% B; 20~30 min, 60%~70% B; 30~35 min, 70%~100% B; 35~40 min, 100% B; 40~45 min, 100%~50% B。体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 222 nm; 柱温 25 $^{\circ}$ C; 进样量 10 μ L。

2.1.3 混合对照品溶液的制备 精密称取白术内酯 III、白术内酯 II 对照品 1.48、0.71 mg, 置 10 mL 棕色量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 密塞, 摇匀, 得白术内酯 III、白术内酯 II 质量浓度分别为 148、71 μ g/mL 的混合对照品溶液。

2.1.4 供试品溶液的制备 取 1 g/mL 白术水提取物,

离心, 过 0.22 μ m 滤膜, 即得。

2.1.5 线性关系的考察 精密称取白术内酯 III、白术内酯 II 混合对照品, 加甲醇制成系列梯度质量浓度的对照品溶液, 以白术内酯 III、白术内酯 II 的质量浓度为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y)得到标准曲线, 白术内酯 III: $Y=24.6130X$, $r=0.9998$; 白术内酯 II: $Y=30.9020X+3.1547$, $r=0.9999$ 。结果表明白术内酯 III 在质量浓度 2.3125~74.0000 μ g/mL、白术内酯 II 在质量浓度 1.1094~35.5000 μ g/mL 线性关系良好。

2.2 分组、造模与给药

40 只 ICR 小鼠适应性喂养 1 周后, 按体质量随机分为正常组、模型组、依折麦布片(1 mg/kg, 依折麦布片用蒸馏水配制成 0.1 mg/mL 的溶液)组和白术水提取物高、低剂量(4、2 g/kg)组。除正常组给予普通饲料外, 其余各组每天给予高糖高脂饲料喂养, 造模的同时分别 ig 相应药物(10 mL/kg), 正常组及模型组 ig 等体积的蒸馏水, 1 次/d, 连续 11 周。

2.3 体质量测定

于给药第 0、3、6、9 周, 称定小鼠体质量。

2.4 中医证候指标检测

2.4.1 排尿量 于给药 11 周后, 采用代谢笼下放置 15 mL 离心管收集各组小鼠 24 h 的新鲜尿液, 计量尿液量。

2.4.2 尿液吸光度(A) 于给药 11 周后, 采用代谢笼收集小鼠新鲜尿液 200 μ L, 用移液枪准确吸取“2.4.1”项下所得各组小鼠尿液 200 μ L, 加于 96 孔板上, 并使用酶标仪在 450 nm 下测定 A 值。

2.4.3 排便量 于给药 11 周后, 记录小鼠 24 h 内排出的粪便粒数。

2.4.4 面温 于给药 11 周后, 安静环境下, 用非接触式红外测温仪对准小鼠面部, 当测温仪稳定后记录所测数据, 测定 3 次, 取平均值。

2.4.5 足温 于给药 9 周后, 安静环境下, 轻抓小鼠, 采用热成像仪拍摄每组小鼠的热成像, 通过 FLIR-Tools 软件分析各组小鼠足温, 并统计其平均值。

2.4.6 旷场实验 于给药 10 周后, 进行旷场实验。握住小鼠尾根部处, 轻轻将小鼠放入蓝色立方形旷场箱的正中, 开始同步录像、计时。旷场箱正上方安置摄像头, 在安静无干扰并杜绝参照物的环境条件下进行, 观察 5 min 内小鼠活动情况。取出小鼠后, 用毛巾蘸清水及低质量分数乙醇彻底擦拭箱底, 并等待其挥发扩散, 避免留有气味而干扰下只小鼠

的观察结果。运用动物行为活动标记分析系统,对 各组小鼠的行为进行分析评价。

2.4.7 舌象 于给药 9 周后,将小鼠进行麻醉,使用单反相机拍摄小鼠舌头表面,并统计舌表的 R 值、RGB 值。

2.5 尾部微循环检测

于给药 11 周后,用异氟烷呼吸麻醉机对小鼠进行呼吸麻醉,使用 Moor FLPI 扫描成像系统测定小鼠尾部微循环血流量。测量面积为尾部约 1 cm² 处的相同面积大小,检测时间 30 s,扫描速度 25 Hz/s。使用 Moor FLPI Review 3.0 软件对所记录的数据进行处理。

2.6 血清 TC、LDL-C 水平检测

末次给药后,各组小鼠眼眶取血,4 °C 凝血 2 h,3 500 r/min 离心 15 min,取上层血清,采用全自动生化分析仪检测 TC、LDL-C 水平。

2.7 血清 NO、TNF-α 和 ET-1 水平检测

末次给药后,取各组小鼠血清,按照试剂盒说明书检测血清中 NO、ET-1 和 TNF-α 水平。

2.8 主动脉组织病理学观察

末次给药后,眼眶取血致死,取小鼠主动脉,放入盛有 10%中性福尔马林缓冲液的瓶中。经固定、取材、脱水、包埋、切片,制得 4 μm 石蜡切片,采用苏木素-伊红(HE)、Masson、Gomori 醛品红弹力纤维染色,中性树脂封片,干燥后于显微镜下观察主动脉组织病理变化。

2.9 免疫组化法检测主动脉中 TLR4、IL-6、TNF-α 的蛋白表达

取各组小鼠主动脉石蜡切片(4 μm),经过消除内源性过氧化氢酶活性、抗原修复、牛血清白蛋白封闭后,滴加 TLR4、IL-6、TNF-α 抗体,4 °C 孵育

过夜;滴加二抗,37 °C 孵育 30 min;经 DAB 显色、苏木素染色、乙醇脱水及中性树脂封片干燥后,于显微镜下观察 TLR4、IL-6、TNF-α 蛋白的表达情况,并用 Image J 软件进行分析。

2.10 免疫荧光检测主动脉 p-AMPK、SIRT1 和 PGC-1α 的蛋白表达

取各组小鼠主动脉石蜡切片(4 μm),经抗原修复、封闭、4 °C 孵育一抗过夜、孵育二抗、DAPI 核染,蔡司荧光正置显微镜下观察主动脉中 p-AMPK、SIRT1、PGC-1α 的表达情况。

2.11 Western blotting 检测主动脉 p-AMPK、SIRT1 和 PGC-1α 的蛋白表达

取各组小鼠主动脉组织,液氮充分研磨后,加入适量 RIPA 裂解液,冰上静置 10 min,离心取上清,提取组织蛋白。BCA 法测定蛋白浓度,蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,5%脱脂牛奶封闭 2 h,分别加入 p-AMPK、SIRT1、PGC-1α 抗体,4 °C 孵育过夜;PBST 洗膜 3 次,每次 15 min;加入二抗,室温孵育 2 h;PBST 洗膜 3 次,每次 15 min;加入 ECL 化学发光液后,采用 Modena 凝胶成像仪检测蛋白条带,并用 Image J 软件进行分析。

2.12 统计学分析

数据用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 白术水提取物中有效成分的测定

分别取混合对照品溶液和供试品溶液,分别按“2.1.2”项下色谱条件进样分析,记录色谱图(图 1)。测得 1 g/mL 白术水提取物中白术内酯 III、白术内酯 II 的质量浓度分别为 11.97、2.56 μg/mL。

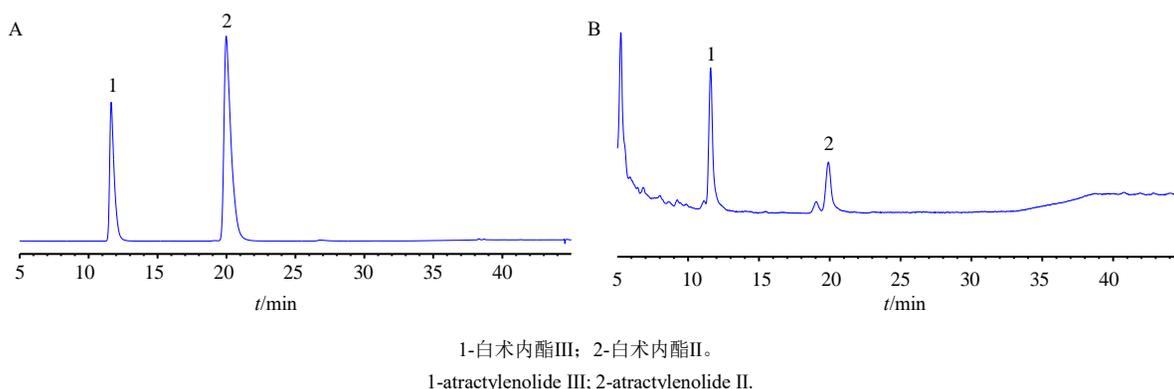


图 1 混合对照品 (A) 和白术水提取物 (B) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substance (A) and *A. macrocephala* water extract (B)

3.2 白术水提物对肥胖小鼠体质量的影响

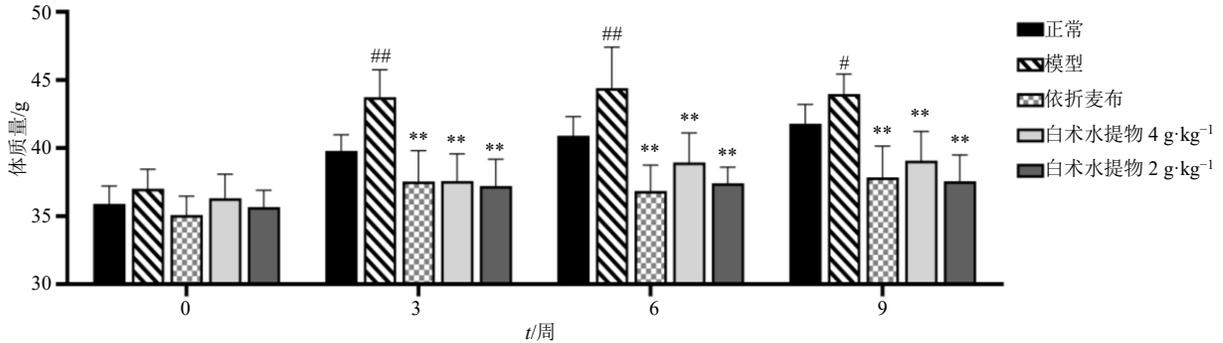
如图2所示, 给药3、6、9周后, 与正常组比较, 模型组小鼠的体质量显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与模型组比较, 各给药组小鼠的体质量均显著降低

($P < 0.01$)。

3.3 白术水提物对肥胖小鼠中医证候指标的影响

3.3.1 对排尿量的影响

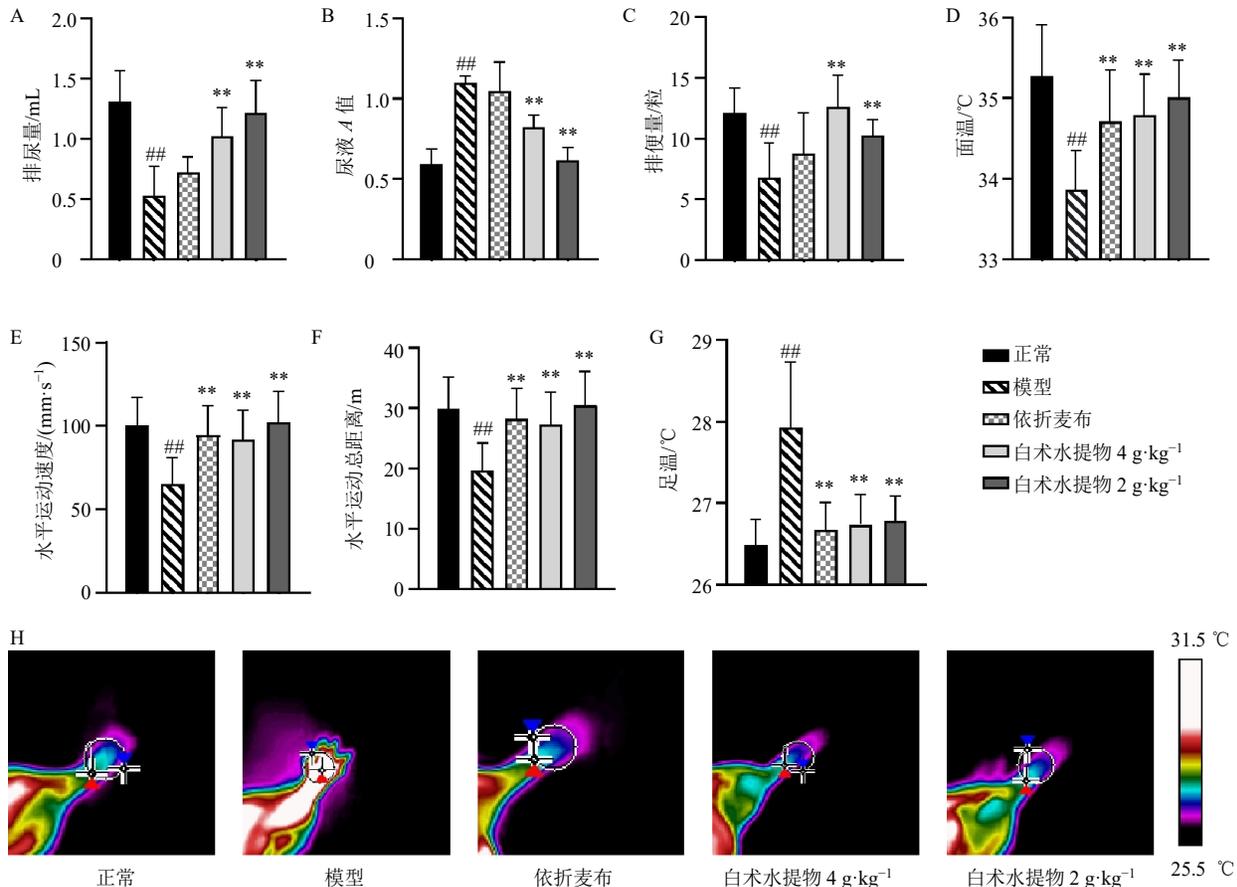
如图3-A所示, 与正常组比较, 模型组小鼠的排尿量显著降低 ($P < 0.01$);



与正常组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$, 下图同。
[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group, same as below figures.

图2 白术水提物对肥胖小鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 2 Effect of *A. macrocephala* water extract on body weight of obese mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)



A-排尿量; B-尿液A值; C-排便量; D-面温; E-水平运动速度; F-水平运动总距离; G-足温; H-足温对比图。

A-urine output; B-urine A value; C-defecation volume; D-face temperature; E-horizontal movement speed; F-total distance of horizontal movement; G-foot temperature; H-foot temperature comparison chart.

图3 白术水提物对肥胖小鼠中医证候指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 3 Effect of *A. macrocephala* water extract on TCM syndromes of obese mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

给药 11 周后,与模型组比较,各剂量白术水提物均能显著提高小鼠的排尿量 ($P<0.01$)。

3.3.2 对尿液 A 值的影响 如图 3-B 所示,与正常组比较,模型组小鼠的尿液 A 值显著提高 ($P<0.01$);给药 11 周后,与模型组比较,各剂量白术水提物均能显著降低小鼠的尿液 A 值 ($P<0.01$)。

3.3.3 对排便量的影响 如图 3-C 所示,与正常组比较,模型组小鼠的排便量显著降低 ($P<0.01$);给药 11 周后,与模型组比较,白术水提物各剂量均能显著提高模型小鼠的排便量 ($P<0.01$)。

3.3.4 对面温的影响 如图 3-D 所示,与正常组比较,模型组小鼠的面温显著降低 ($P<0.01$);给药 11 周后,与模型组比较,各给药组均能显著升高小鼠的面温 ($P<0.01$)。

3.3.5 对足温的影响 如图 3-G、H 所示,与正常

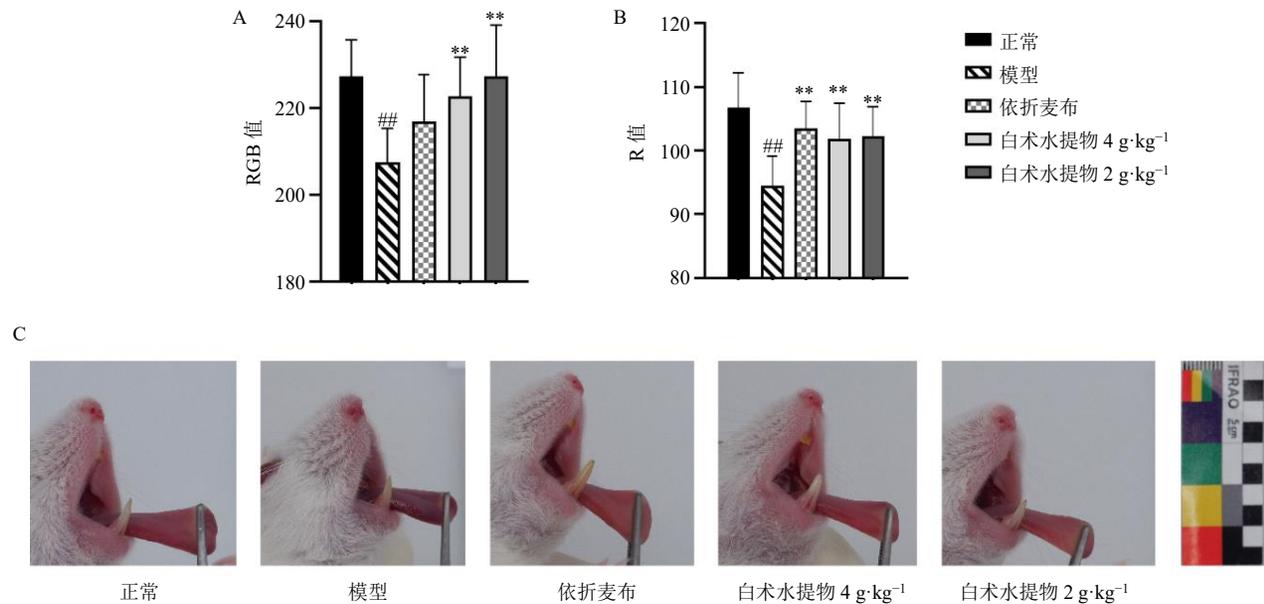
组比较,模型组小鼠的足温显著升高 ($P<0.01$);给药 9 周后,与模型组比较,各给药组均能显著降低小鼠的足温 ($P<0.01$)。

3.3.6 对旷场的影响 如图 3-E、F 所示,与正常组比较,模型组小鼠水平运动总距离显著减少 ($P<0.01$),水平运动速度显著降低 ($P<0.01$);给药 10 周后,与模型组比较,各给药组均能显著增加小鼠水平运动总距离和提高水平运动速度 ($P<0.01$)。

3.3.7 对舌象的影响 如图 4 所示,与正常组比较,模型组小鼠的舌色 R 值、RGB 值均显著降低 ($P<0.01$);给药 9 周后,与模型组比较,各给药组均能显著提高小鼠的舌色 R 值 ($P<0.01$),各剂量白术水提物能显著升高小鼠的舌色 RGB 值 ($P<0.01$)。

3.4 白术水提物对肥胖小鼠尾部微循环的影响

如图 5 和表 1 所示,与正常组比较,模型组小



A-舌象 RGB 值; B-舌象 R 值; C-舌象对比图。
A-RGB of tongue images; B-R of tongue images; C-comparison of tongue images.

图 4 白术水提物对肥胖小鼠舌象的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 4 Effect of *A. macrocephala* water extract on tongue manifestation of obese mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

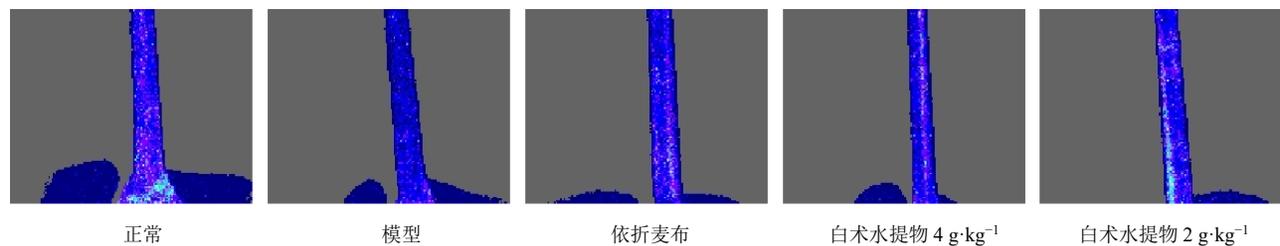


图 5 白术水提物对肥胖小鼠尾部微循环的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 5 Effect of *A. macrocephala* water extract on tail microcirculation of obese mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

表 1 白术水提取物对肥胖小鼠尾部微循环的影响
($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of *A. macrocephala* water extract on tail microcirculation of obese mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	尾部微循环血流量/PU
正常	—	97.28±21.96
模型	—	62.50±22.83 ^{##}
依折麦布片	0.001	84.82±29.10*
白术水提取物	4	94.64±19.15**
	2	88.04±8.25*

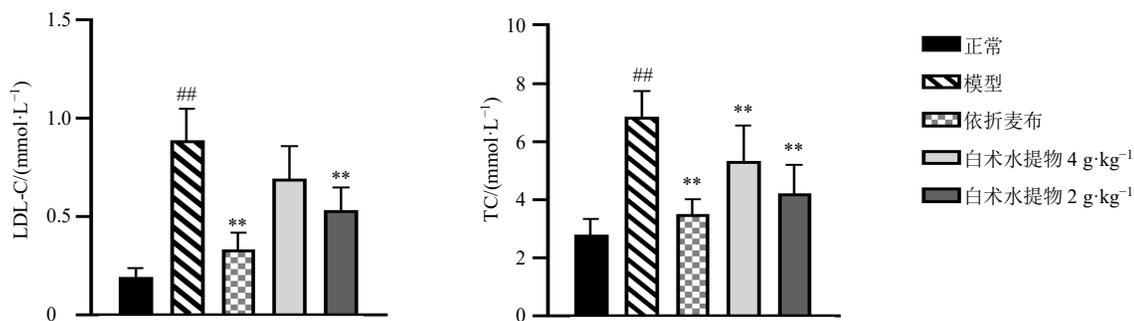


图 6 白术水提取物对肥胖小鼠血清 LDL-C 和 TC 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 6 Effect of *A. macrocephala* water extract on LDL-C and TC levels in serum of obese mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

LDL-C 水平显著降低 ($P < 0.01$), 各给药组小鼠血清中 TC 水平均显著降低 ($P < 0.01$)。

3.6 白术水提取物对肥胖小鼠血清 TNF- α 水平的影响

如图 7 所示, 与正常组比较, 模型组小鼠血清中 TNF- α 水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组均能显著降低小鼠血清中 TNF- α 水平 ($P < 0.01$)。

3.7 白术水提取物对肥胖小鼠血清 NO 和 ET-1 水平的影响

如图 8 所示, 与正常组比较, 模型组小鼠血清

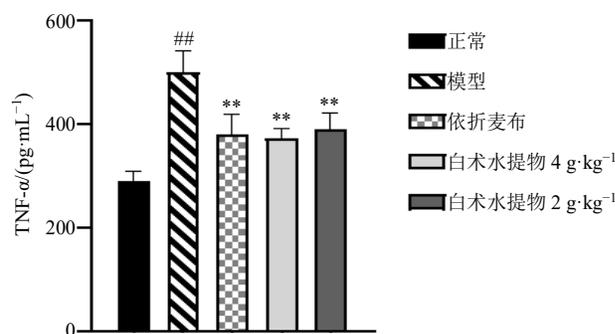


图 7 白术水提取物对模型小鼠血清 TNF- α 水平的影响
($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 7 Effect of *A. macrocephala* water extract on TNF- α level in serum of obese mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

鼠尾部微循环血流量显著降低 ($P < 0.01$); 给药 11 周后, 与模型组比较, 各给药组均能显著增加小鼠尾部微循环血流量 ($P < 0.05, 0.01$)。

3.5 白术水提取物对肥胖小鼠血清 LDL-C 和 TC 水平的影响

如图 6 所示, 与正常组比较, 模型组小鼠血清中 LDL-C 和 TC 水平均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 依折麦布片组和白术水提取物 (2 g/kg) 组

NO 水平显著降低 ($P < 0.01$), ET-1 水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组均能显著升高小鼠血清 NO 水平 ($P < 0.05, 0.01$), 显著降低小鼠血清 ET-1 水平 ($P < 0.01$)。

3.8 白术水提取物对肥胖小鼠主动脉组织形态学的影响

如图 9 所示, HE 染色结果显示, 与正常组比较, 模型组小鼠中层平滑肌细胞增生且排列紊乱, 存在内皮破裂; 各剂量白术水提取物均可缓解主动脉中膜增厚、血管平滑肌细胞排列紊乱状况。Masson 染色结果显示, 与正常组比较, 模型组小鼠可见血管内胶原纤维沉积明显增多, 胶原纤维面积显著增大; 各剂量白术水提取物均可使主动脉胶原沉积显著减小。Gomori 醛品红弹力纤维染色结果显示, 与正常组比较, 模型组小鼠弹力纤维断裂和增生, 血管壁重构; 与模型组比较, 各剂量白术水提取物均可缓解主动脉中弹力纤维断裂和增生状况。

3.9 白术水提取物对肥胖小鼠主动脉 TLR4、IL-6、TNF- α 蛋白表达的影响

如图 10 所示, 主动脉中 TLR4、IL-6、TNF- α 染色阳性产物表达在内皮细胞表面, 呈棕黄色。与正常组比较, 模型组小鼠主动脉中 TLR4、IL-6、TNF- α 蛋白表达显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组比

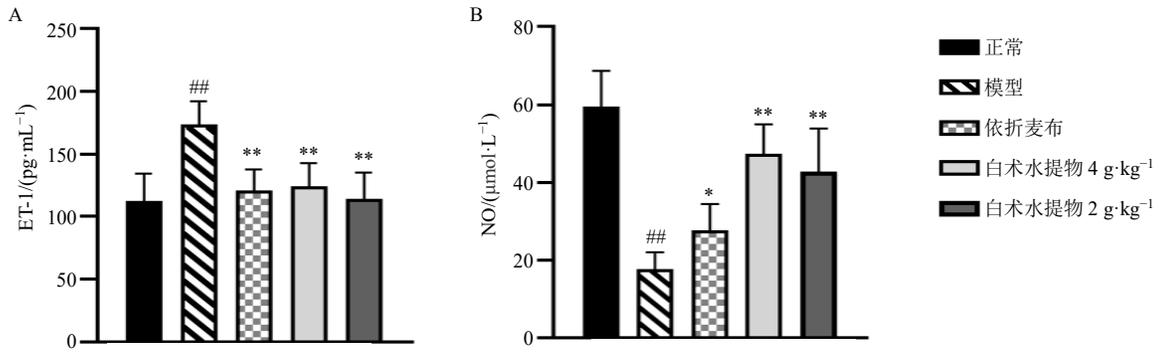


图 8 白术水提取物对肥胖小鼠血清 NO 和 ET-1 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 8 Effect of *A. macrocephala* water extract on NO and ET-1 levels in serum of obese mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

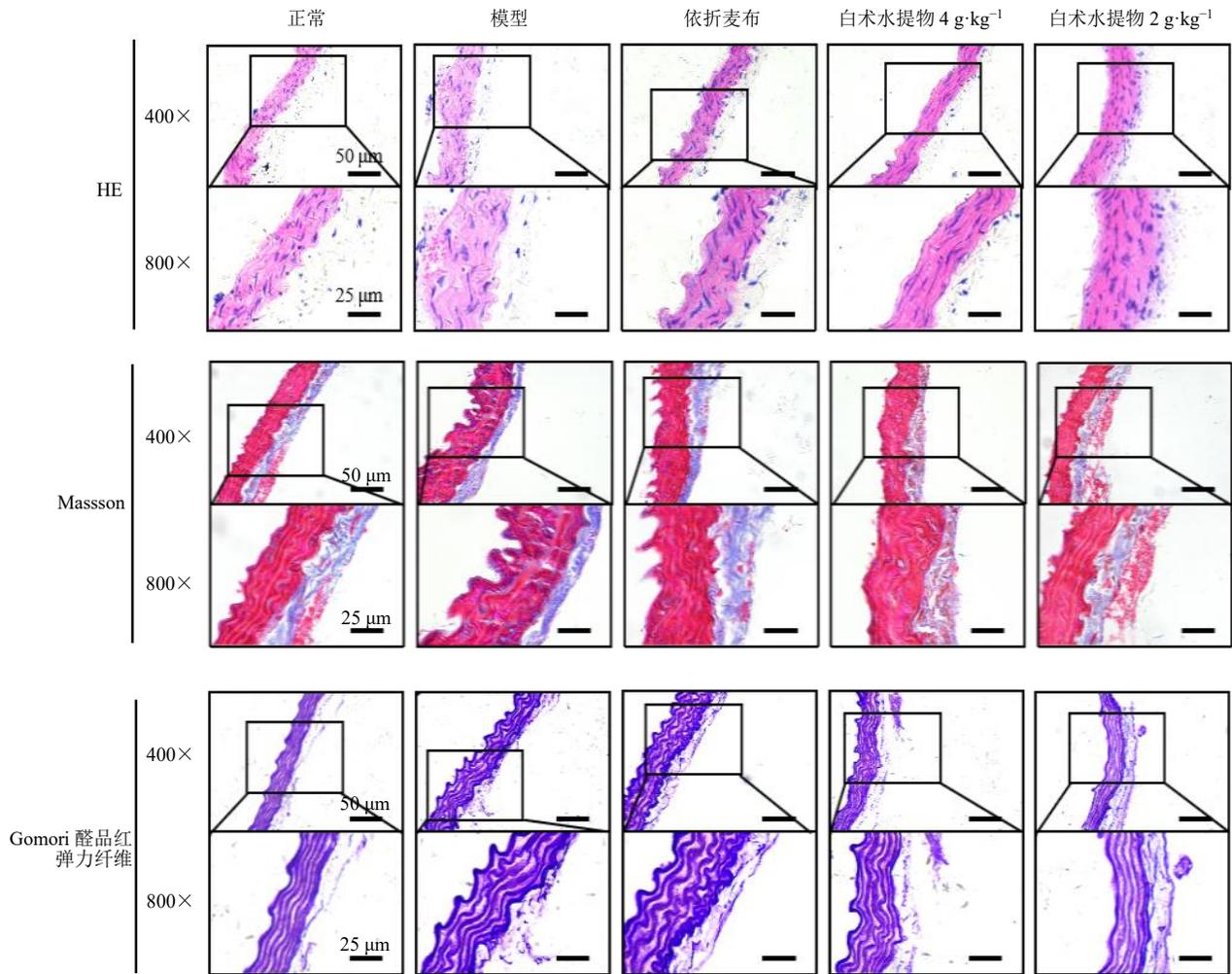


图 9 白术水提取物对肥胖小鼠主动脉组织形态学的影响

Fig. 9 Effect of *A. macrocephala* water extract on aorta histomorphology of obese mice

较, 各给药组主动脉 TLR4、IL-6、TNF- α 蛋白表达显著减少 ($P < 0.01$)。

3.10 白术水提取物对肥胖小鼠主动脉 AMPK、p-AMPK、SIRT1、PGC-1 α 蛋白表达的影响

免疫荧光结果(图 11)显示, 主动脉中 p-AMPK、

SIRT1、PGC-1 α 表达在内皮细胞表面。与正常组比较, 模型组小鼠主动脉中 p-AMPK、SIRT1、PGC-1 α 绿色荧光表达减少; 与模型组比较, 白术水提取物各剂量组主动脉 p-AMPK、SIRT1、PGC-1 α 绿色荧光表达增加。

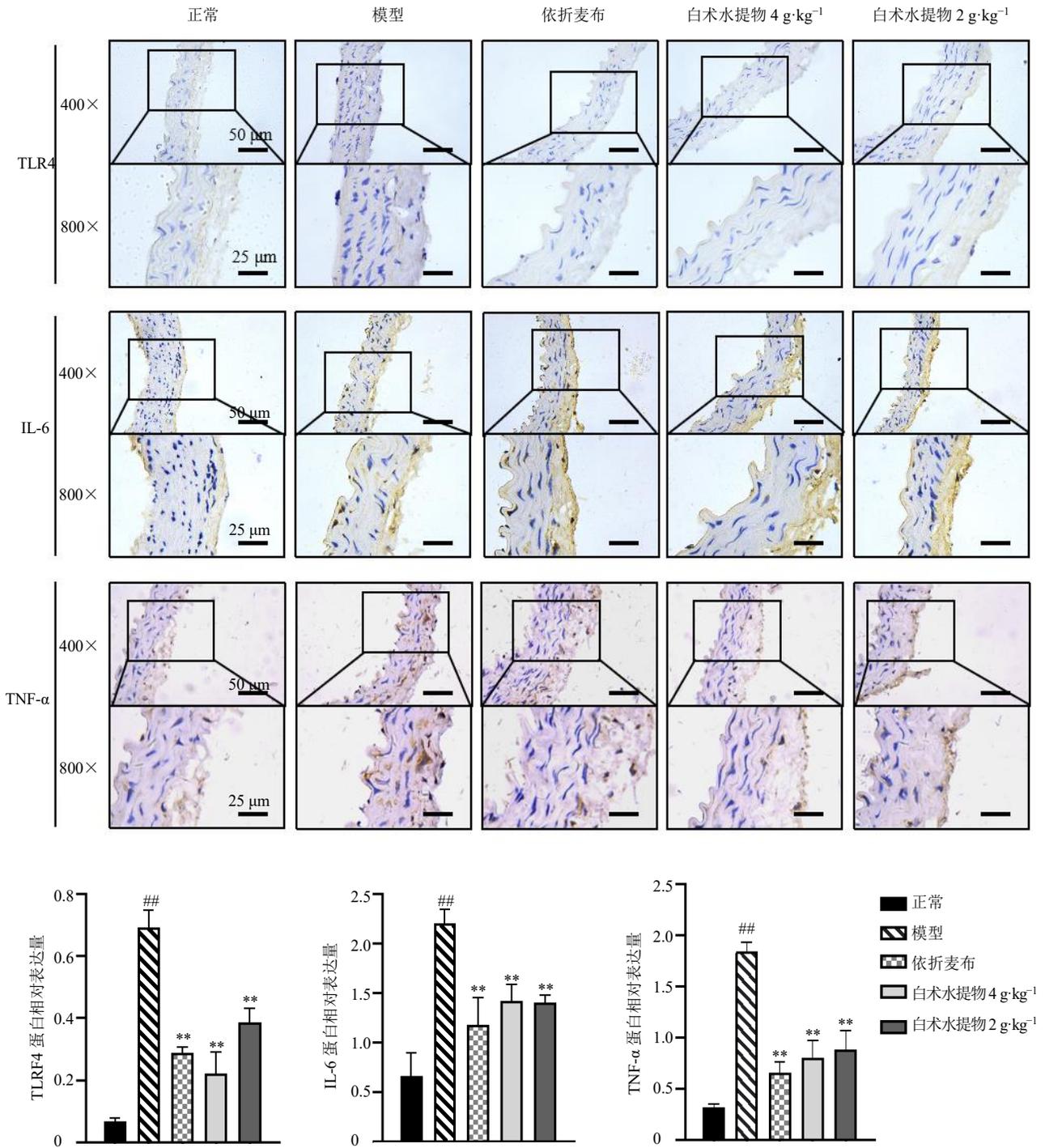


图 10 白术水提取物对肥胖小鼠主动脉 TLR4、IL-6 和 TNF-α 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 Effect of *A. macrocephala* water extract on TLR4, TNF-α and IL-6 expression in aorta of obese mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Western blotting 结果 (图 12) 显示, 与正常组比较, 模型组小鼠主动脉中 p-AMPK、SIRT1、PGC-1α 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$); 与模型组比较, 白术水提取物 (2 g/kg) 组 p-AMPK 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$), 白术水提取物各剂量组 SIRT1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05, 0.01$),

白术水提取物 (4 g/kg) 组 PGC-1α 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。

4 讨论

中医学者认为, 肥则碍胃、甘则滞脾。脾胃功能受损, 可致气郁下焦或湿随气险郁于下焦, 化火而上炎, 火热伏于血脉, 煎熬阴血, 灼津为痰, 血

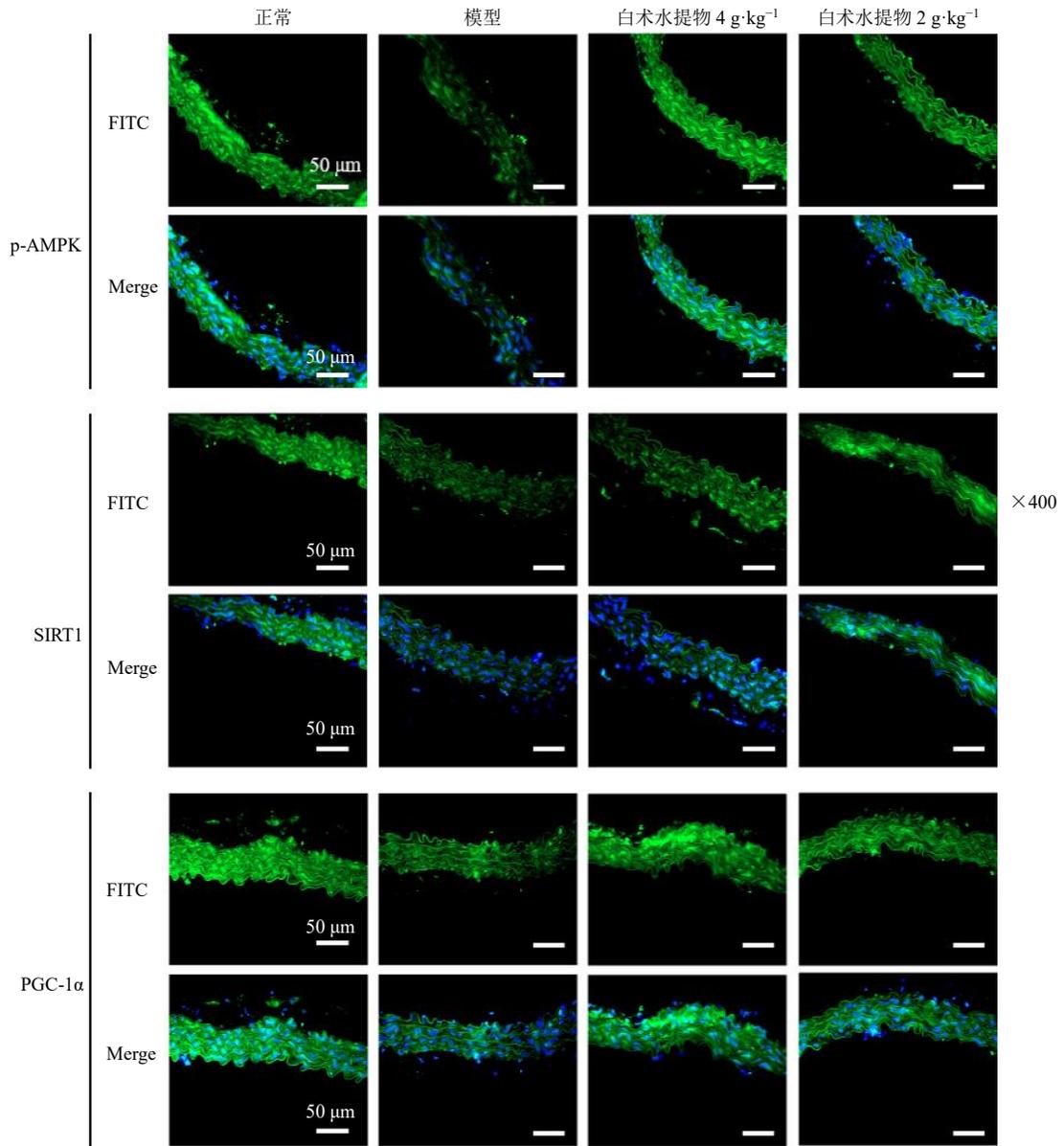


图 11 白术水提取物对肥胖小鼠主动脉 p-AMPK、SIRT1 和 PGC-1 α 蛋白表达的影响

Fig. 11 Effect of *A. macrocephala* water extract on p-AMPK, SIRT1 and PGC-1 α protein expressions in aorta of obese mice

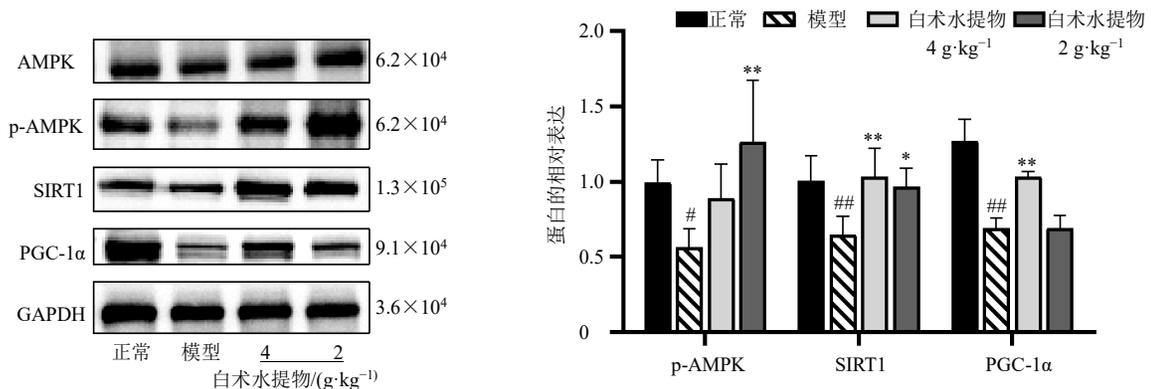


图 12 白术水提取物对肥胖小鼠主动脉 AMPK、p-AMPK、SIRT1 和 PGC-1 α 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 12 Effect of *A. macrocephala* water extract on AMPK, p-AMPK, SIRT1 and PGC-1 α protein expressions in aorta of obese mice ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

稠成瘀，瘀阻络脉，使脉道失于温养，经脉痉挛而病，加重瘀滞，进一步阻碍气血津液的代谢，同时体内痰瘀过久，加重脾胃亏虚的程度，最终导致血管稳态失衡的发生^[13]。李东垣在《脾胃论·饮食劳倦所伤始为热中论》中指出：“脾胃气衰，元气不足，而心火独盛。心火者，阴火也”，故而脾胃失调，可致元气衰弱，营血不足，气火失调，君相不安，血中伏火，导致阴火的产生^[9]，此病机与肥胖引起的脾胃亏虚致血管稳态失衡的病机具有同一性。故而推测肥胖可致脾胃虚弱，而使机体产生阴火，损伤血管，并表现出相关证候，影响健康。

阴火证以脾胃气虚为主和火热亢盛为次，脾胃气虚常见口淡不渴、倦怠乏力、排便无力，其舌脉为舌淡或伴齿痕、苔薄白，脉弱无力^[14]。火热亢盛以发热、口渴饮冷、胸腹灼热、面红目赤、大便秘结、小便短黄为常见症^[15]。本研究以排尿量量化“口淡不渴”，尿液 A 值量化“小便短黄”，排便量量化“排便无力”，面部温度和足部温度量化“发热”，旷场实验量化“倦怠乏力”，舌象量化“舌淡”。李东垣主张补脾胃、升阳气、祛湿热、畅气机以散阴火，白术为菊科多年生草本植物白术的干燥根茎，具有健脾益气、燥湿利水、止汗的功效，临床多用于脾气虚弱、运化失常所致的脘腹胀满、倦怠乏力等证，为“健脾补气第一要药”^[16]，历代古籍中均有记载。《本草经疏》记载：“术，其气芳烈，其味甘浓，其性纯阳，为除风痹之上药，安脾胃之神品”；《本草通玄》记载：“白术，补脾胃之药，更无出其右者。土旺则能健运，故不能食者，食停滞者，有痞积者，皆用之也”。白术健脾胃、祛湿热，或可缓解过食肥甘所导致的气虚和火热。本研究发现白术水提物可显著提高肥胖小鼠旷场水平移动总距离和水平移动速度，显著提高排便量和排尿量，降低尿液 A 值，升高面温，降低足温，改善舌象变化，证明白术水提物能够有效改善肥胖小鼠倦怠乏力、排便无力、四肢烦热等证候，并推测此功效可能由改善阴火的途径而发挥。

研究表明，脂代谢紊乱和肥胖是血管稳态失衡的常见病因，脂质氧化功能降低，导致脂肪酸代谢物的累积，使体内 TC、LDL-C 水平升高，出现血脂代谢异常^[17]，继而引发血管内皮细胞损伤以及弹力纤维的异常生长、增殖等血管稳态失衡^[18]。同时脂代谢紊乱可激活 TLR4 信号通路，TLR4 信号被激活后，向下游发出信号，下游因子通过经典途径转移到细胞核中激活一系列炎症基因如 IL-6、TNF-

α ，并促进其含量增加和释放^[19]。TNF- α 表达增加，促进巨噬细胞浸润，诱导 ET-1 生成^[20]，同时 IL-6 表达增加，减弱内皮细胞中 NO 信号通路，抑制 NO 生成，导致 ET-1/NO 系统失衡^[21-22]，NO 利用率减少，舒张血管作用减弱，平滑肌收缩，血管内皮功能受损，加重血管稳态失衡。

能量代谢作为血管重构的关键机制之一，在维持血管稳态的过程中起到重要作用。PGC-1 α 为调节线粒体功能的关键因子^[23]，研究发现，AMPK 可以激活 SIRT1 乙酰化，增加 PGC-1 α 的活性，缓解线粒体损伤，提高线粒体生物合成水平^[24-25]。线粒体合成水平提高可以改善脂质代谢，生成启动抗炎信号，从而缓解血管内皮功能损伤，改善血管稳态失衡^[26-27]。现已有研究发现白术内酯 III 通过激活 AMPK/SIRT1 信号通路，减少炎症反应^[28]；参苓白术散可激活 AMPK 信号通路从而降糖控脂^[29]。本研究发现白术水提物能明显上调血管 p-AMPK、SIRT1、PGC-1 α 的蛋白表达，下调主动脉 TLR4、IL-6、TNF- α 的蛋白表达，降低血清中 TC、LDL-C、TNF- α 水平，调节血清 NO/ET-1 的失衡，并减轻主动脉损伤。表明白术水提物可能是通过激活 AMPK/SIRT1/PGC-1 α 信号通路来调节线粒体功能，调节代谢，实现血管动态平衡。

综上，白术水提物能够有效改善缓解倦怠乏力、排便无力、四肢烦热等证候，减轻主动脉的损伤，并通过激活 AMPK/SIRT1/PGC-1 α 通道，起到调节能量代谢的作用，最终改善线粒体功能障碍引起的血管稳态失衡。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 国家卫生健康委员会. 中国居民营养与慢性病状况报告 (2020 年) [J]. 营养学报, 2020, 42(6): 521.
- [2] Volpe M, Gallo G. Obesity and cardiovascular disease: An executive document on pathophysiological and clinical links promoted by the Italian Society of Cardiovascular Prevention (SIPREC) [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2023, 10: 1136340.
- [3] 王新东, 祁晓霞. 从阴火认识血管稳态失衡综合征炎症机制的中医内涵 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2019, 25(2): 156-158.
- [4] Herzig S, Shaw R J. AMPK: Guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(2): 121-135.
- [5] 黄琦, 万强, 刘言薇, 等. 基于“阴火”理论试析动脉

- 粥样硬化炎症机制的中医内涵 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2020, 22(8): 2942-2947.
- [6] 赵桂丽. 李东垣对张仲景脾胃学术思想的继承与发展 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2023.
- [7] 魏子孝, 夏城东, 李惠林, 等. 糖尿病合并代谢综合征中医诊疗标准 [J]. 世界中西医结合杂志, 2011, 6(2): 177-179.
- [8] 刘懿萱. 应用德尔菲法探究辽宁地区肥胖型 2 型糖尿病常见中医证型及分类指标 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2023.
- [9] 伍小红. 论李东垣“阴火”证特征及临床运用体会 [J]. 四川中医, 2023, 41(2): 48-50.
- [10] 王清玉. 以《脾胃论》为代表李东垣因时用药特点的研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2021.
- [11] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 107.
- [12] 杨颖, 魏梦昕, 伍耀业, 等. 白术多糖提取分离、化学组成和药理作用的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(2): 578-584.
- [13] 丁丽. 扶土消糖方治疗脾虚湿瘀型 2 型糖尿病伴肥胖的临床观察 [D]. 张家口: 河北北方学院, 2022.
- [14] 张声生, 胡玲, 李茹柳. 脾虚证中医诊疗专家共识意见 (2017) [J]. 中医杂志, 2017, 58(17): 1525-1530.
- [15] 中医临床诊疗术语·证候 [S]. 1997: 34.
- [16] 张凤杰, 刘薇薇, 徐世红. 白术的健脾作用探讨 [J]. 内蒙古中医药, 2014, 33(9): 90-91.
- [17] Yang X, Liang J J, Ding L, *et al.* Phosphatidylserine synthase regulates cellular homeostasis through distinct metabolic mechanisms [J]. *PLoS Genet*, 2019, 15(12): e1008548.
- [18] Qin H L, Bao J H, Tang J J, *et al.* Arterial remodeling: The role of mitochondrial metabolism in vascular smooth muscle cells [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2023, 324(1): C183-C192.
- [19] Rocha D M, Caldas A P, Oliveira L L, *et al.* Saturated fatty acids trigger TLR4-mediated inflammatory response [J]. *Atherosclerosis*, 2016, 244: 211-215.
- [20] Virdis A, Duranti E, Rossi C, *et al.* Tumour necrosis factor- α participates on the endothelin-1/nitric oxide imbalance in small arteries from obese patients: Role of perivascular adipose tissue [J]. *Eur Heart J*, 2015, 36(13): 784-794.
- [21] Lee J, Lee S, Zhang H R, *et al.* Interaction of IL-6 and TNF- α contributes to endothelial dysfunction in type 2 diabetic mouse hearts [J]. *PLoS One*, 2017, 12(11): e0187189.
- [22] 李晓, 于浩泳, 胡兵, 等. 肥胖损伤血管内皮功能的机制研究进展 [J]. 上海医学, 2023, 46(2): 123-128.
- [23] 路攀. PGC-1 α 靶向 NFAT 信号通路影响血管内皮细胞损伤 [D]. 苏州: 苏州大学, 2017.
- [24] 龙清华, 朱麒行, 麦合丽娅·艾斯卡尔, 等. 酸枣仁汤通过激活 AMPK/SIRT1/PGC-1 α 信号通路改善阿尔茨海默病模型小鼠线粒体功能障碍 [J]. 中国药理学通报, 2023, 39(7): 1256-1262.
- [25] Johnson A M, Olefsky J M. The origins and drivers of insulin resistance [J]. *Cell*, 2013, 152(4): 673-684.
- [26] Zhou J, Waskowicz L R, Lim A, *et al.* A liver-specific thyromimetic, VK2809, decreases hepatosteatosis in glycogen storage disease type Ia [J]. *Thyroid*, 2019, 29(8): 1158-1167.
- [27] 于卫华. 线粒体稳态、氧化还原与巨噬细胞炎症调控 [A] // 中国毒理学会第十次全国毒理学大会论文集 [C]. 珠海: 中国毒理学会, 2023: 559.
- [28] 潘毅, 陈军喜, 闫智杰, 等. 白术内酯 III 调节 AMPK/SIRT1/NF- κ B 信号通路对脓毒症大鼠肝损伤的影响 [J]. 实用医学杂志, 2023, 39(7): 827-832.
- [29] 张淑芹, 李彦杰, 秦合伟, 等. 基于 AMPK 信号通路探讨参苓白术散改善肥胖型 2 型糖尿病小鼠的作用机制 [J]. 中药材, 2022, 45(11): 2737-2742.

[责任编辑 李亚楠]