

马钱苷调控 AMPK 信号通路改善果糖饮食小鼠肝脏脂代谢紊乱的作用机制

熊阳昆¹, 龚名洋¹, 罗颖熙², 屈雅琴³, 宋莹莹³, 张 聪^{1,4*}

1. 三峡大学基础医学院, 湖北 宜昌 443002

2. 三峡大学生物与制药学院, 湖北 宜昌 443002

3. 湖北中医药大学药学院, 湖北 武汉 430065

4. 肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室, 湖北 宜昌 443002

摘要: **目的** 探究马钱苷改善果糖饮食小鼠肝脏脂代谢功能紊乱的作用及其机制。**方法** 将 40 只雄性 C57BL/6 小鼠随机分为对照组、模型组、非诺贝特 (50 mg/kg) 组和马钱苷低、高剂量 (25、50 mg/kg) 组, 每组 8 只。对照组小鼠正常饮水, 其余各组小鼠均给予 30% 果糖水饲养, 同时非诺贝特组和马钱苷低、高剂量组小鼠分别 ig 给予相应药物治疗, 每天 1 次, 连续给药 8 周。实验结束后收集各组小鼠血清和肝脏样本, 记录各组小鼠体质量、肝质量, 并计算肝脏指数; 检测各组小鼠血清中天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 和丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 的活力、三酰甘油 (triglyceride, TG)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇 (high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 和低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 的水平, 同时检测各组小鼠肝脏中 TG、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、总超氧化物歧化酶 (total-superoxide dismutase, T-SOD)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 的水平; 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin staining, HE) 和油红 O 染色观察肝脏病理学变化; 通过转录组测序筛选马钱苷干预后果糖饮食小鼠肝脏中差异表达的基因, 并对差异表达基因进行功能富集分析; 通过分子对接分析马钱苷与单磷酸腺苷活化蛋白激酶 α (adenosine monophosphate activated protein kinase α , AMPK α) 蛋白的相互作用; 采用 Western blotting 检测各组小鼠肝组织中 AMPK α 、磷酸化 AMPK α (phosphorylation-AMPK α Thr172, p-AMPK α)、固醇调节元件结合蛋白-1 (sterol regulatory element binding protein-1, SREBP-1) 和脂肪酸合成酶 (fatty acid synthetase, FASN) 的蛋白表达量; 采用免疫组织化学法检测各组小鼠肝组织中 p-AMPK α 蛋白表达。**结果** 与模型组比较, 马钱苷治疗组小鼠体质量、肝质量和肝脏指数显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 血清中 AST、ALT、AST/ALT、TG、TC、LDL-c 的水平显著降低 ($P < 0.01$)、HDL-c 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 肝组织中 TG、MDA、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平显著降低 ($P < 0.01$)、T-SOD 活性显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 肝脏脂肪变性和脂质蓄积明显减轻, 转录组测序结果显示马钱苷治疗组小鼠肝脏多种基因表达变化且与 AMPK 信号通路密切相关, 分子对接显示马钱苷与 AMPK α 蛋白具有较好的结合能力, 且肝脏 p-AMPK α 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)、SREBP-1 和 FASN 的蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$)。**结论** 马钱苷具有改善果糖饮食小鼠肝脏脂代谢紊乱的作用, 其机制与调控 AMPK 信号通路抑制肝脏脂肪酸合成有关。

关键词: 马钱苷; 肝脏脂代谢紊乱; 果糖饮食; AMPK 信号通路; 脂肪酸合成

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)21-7325-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.21.013

Effects and mechanism of loganin regulating AMPK signaling pathway to ameliorate hepatic lipid metabolism disorders in fructose-fed mice

XIONG Yangkun¹, GONG Mingyang¹, LUO Yingxi², QU Yaqin³, SONG Yingying³, ZHANG Cong^{1,4}

1. College of Basic Medical Sciences, China Three Gorges University, Yichang 443002, China

2. College of Biological & Pharmaceutical Sciences, China Three Gorges University, Yichang 443002, China

3. School of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

4. Hubei Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Immunotherapy, China Three Gorges University, Yichang 443002, China

收稿日期: 2024-07-25

基金项目: 湖北省自然科学基金青年基金项目 (2024AFB140); 中药资源与中药化学湖北省重点实验室开放课题项目 (KLRCM2303); 武当特色中药研究湖北省重点实验室 (湖北医药学院) 开放课题项目 (WDCM2024001); 三峡大学人才科研启动基金项目 (2024RCKJ009)

作者简介: 熊阳昆, 男, 本科, 研究方向为分子药理学与毒理学。E-mail: 15926607933@163.com

***通信作者:** 张 聪, 男, 讲师, 从事慢性肝病发生机制及药物防治研究。E-mail: zzcyyc520@126.com

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of loganin ameliorating hepatic lipid metabolism disorder in fructose-fed mice. **Methods** Male C57BL/6 mice were randomly divided into control group, model group, fenofibrate (50 mg/kg) group, and low-, high-dose loganin group (25, 50 mg/kg), with eight mice in each group. The mice in the control group were given normal drinking water, and the mice in the other groups were fed 30% fructose water, while the mice in the fenofibrate group and the low- and high-dose loganin groups were given the corresponding drugs by gavage once a day for eight weeks. At the end of the experiment, serum and liver samples were collected from each group of mice, and their body weights and liver weights were recorded, and liver indexes were calculated; serum viability of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and triglyceride (TG), total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) were detected, respectively. Meanwhile, the levels of TG, malondialdehyde (MDA), total-superoxide dismutase (T-SOD), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 β (IL-1 β) were detected in the livers of the mice in each group. Histopathological changes in the liver observed by hematoxylin-eosin (HE) staining and oil red O (ORO) staining. Transcriptome sequencing was used to screen differentially expressed genes in the liver of fructose-fed mice after loganin intervention, and functional enrichment analysis of differentially expressed genes was performed. Interaction of loganin between adenosine monophosphate activated protein kinase α (AMPK α) protein was analysis by molecular docking. The expression levels of AMPK α , phosphorylated-AMPK α (p-AMPK α), sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1), and fatty acid synthetase (FASN) were detected by Western blotting, and the expression level of p-AMPK α protein in the liver tissues of mice was detected by immunohistochemistry. **Results** Compared with the model group, the body weight, liver weight and liver index of mice in loganin-treated group were significantly reduced ($P < 0.05$, 0.01), serum levels of AST, ALT, AST/ALT, TG, TC, LDL-c were significantly reduced ($P < 0.01$), HDL-c levels were significantly increased ($P < 0.05$, 0.01), the levels of TG, MDA, TNF- α , IL-6, IL-1 β in liver tissues were significantly reduced ($P < 0.01$), the activity of T-SOD was significantly increased ($P < 0.05$, 0.01), and the liver steatosis and lipid accumulation were significantly reduced. Transcriptomic sequencing results showed that compared with the model group, the liver of mice in the loganin-treated group showed changes in the expression of many genes, which were closely related to the AMPK signaling pathway. Meanwhile, molecular docking showed that loganin had a superior binding ability with AMPK α protein, and the hepatic p-AMPK α protein expression level of mice in the loganin-treated group was significantly increased ($P < 0.05$, 0.01), and the protein expression levels of SREBP-1 and FASN were significantly reduced ($P < 0.01$). **Conclusion** Loganin can improve hepatic lipid metabolism disorders in fructose-fed mice, and its mechanism is related to the regulation of AMPK signaling pathway to inhibit hepatic lipogenesis.

Key words: loganin; hepatic lipid metabolism disorders; fructose diet; AMPK signaling pathway; fatty acid synthesis

非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是以肝脏脂代谢紊乱导致肝细胞内过量脂质蓄积引起肝脏脂肪样变性为主要特征的临床病理综合征^[1]。调查显示, NAFLD 已成为全球最常见的慢性肝脏代谢性疾病, 影响着全球超过 25% 的人群^[2], 且这种恶劣影响仍在持续加剧, 给全球公共卫生带来了巨大负担。目前, NAFLD 的发病机制并未完全阐明, 且临床上仍缺乏特异性有效治疗药物^[3]。因此, 探寻有效防治 NAFLD 的策略已成为肝病防治领域亟待解决的关键问题。

马钱苷是一种主要来源于山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果肉中的环烯醚萜苷类成分, 已被证实具有预防肥胖、改善糖尿病、抗炎、抗肿瘤等多种生物学活性^[4-7]。研究表明, 山茱萸提取物具有改善肥胖和糖尿病小鼠血脂紊乱的作用^[8-9], 提示马钱苷作为山茱萸的指标性成分可能具有防治 NAFLD 的潜力。然而, 马钱苷

改善 NAFLD 的作用及机制至今仍未阐明。果糖是日常生活中普遍消费的甜味剂, 与多种代谢性疾病患病风险呈正相关, 尤其被认为是驱动 NAFLD 发生的关键诱因^[10]。因此, 本研究运用果糖饮食诱导建立小鼠 NAFLD 模型, 并探讨马钱苷改善果糖饮食小鼠肝脏脂代谢紊乱的作用及分子机制, 旨在为马钱苷及富含马钱苷成分的中药 (如山茱萸) 应用于防治 NAFLD 及其他慢性肝脏代谢性疾病提供理论依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 40 只, 体质量 (18 $\pm$ 2) g, 购自河南斯克贝斯生物科技股份有限公司, 动物生产许可证号 SCXK (豫) 2020-0005。动物饲养于武汉华联科模型动物研究院实验动物中心 (温度 20~25 °C、相对湿度 55%), 动物实验经武汉华联科模型动物研究院实验动物伦理学委员会批

准(批准号 HLK20220601001)。

1.2 药品与试剂

马钱苷对照品(质量分数 $\geq 98\%$,批号 4917),购自成都植标化纯生物技术有限公司;非诺贝特对照品(质量分数 $\geq 98\%$,批号 F129682)、果糖(质量分数 $\geq 99\%$,批号 F108331)均购自上海阿拉丁科技有限公司;瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)检测试剂盒(批号 202401280904)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)检测试剂盒(批号 202401230902)、IL-1 β 检测试剂盒(批号 202401280905)均购自泉州睿信生物科技有限公司;天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)试剂盒(批号 20240211)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)试剂盒(批号 20240226)、三酰甘油(triglycerides, TG)试剂盒(批号 20240322)、总胆固醇(total cholesterol, TC)试剂盒(批号 20240328)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)试剂盒(批号 20240326)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)试剂盒(批号 20240326)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒(批号 20231225)、总超氧化物歧化酶(total-superoxide dismutase, T-SOD)试剂盒(批号 20231120)均购自南京建成生物工程研究所;苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒(批号 CR2311064)、油红 O 染色试剂盒(批号 G1015)、5 $\times$ 蛋白上样缓冲液(批号 CR2303006)、磷酸盐缓冲液(TBST,批号 GA2401053)、电泳缓冲液(批号 CR2401078)、转膜液(批号 GA2312051)、无蛋白快速封闭液(批号 CR2311065)、 β -actin 抗体(批号 AC231101001)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;Omni-Easy™一步法 PAGE 凝胶快速制备试剂盒(批号 03851180)、双色预染蛋白 Marker(批号 02612850)均购自上海雅酶生物医药科技有限公司;BCA 蛋白定量试剂盒(批号 VC294999)、M-PER 组织蛋白裂解液(批号 78501)、ECL 化学发光液(批号 UF304274)均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;兔/鼠通用型 Streptavidin-HRP 试剂盒(批号 001824)、蛋白酶抑制剂混合物(批号 331322)、磷酸酶抑制剂混合物(批号 009324)均购自北京康为世纪生物科技有限公司;单磷酸腺苷活化蛋白激酶 α (adenosine monophosphate activated protein kinase α , AMPK α)抗体(批号

33515663105)、磷酸化 AMPK α (phosphorylation-AMPK α Thr172, p-AMPK α)抗体(批号 2160131006)、固醇调节元件结合蛋白-1(sterol regulatory element binding protein-1, SREBP-1)抗体(批号 550086)、脂肪酸合成酶(fatty acid synthetase, FASN)抗体(批号 5500009913)、HRP 标记的兔抗山羊二抗(批号 AS014)均购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。

1.3 仪器

360EP 型电子天平(瑞士 Precisa 公司);B-JY88-IIN 型超声波破碎仪(上海铂温仪器有限公司);5418R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);SynergyH4 型多功能酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);IX73&DP80 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司);PowerPac 型通用电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);Turbo 型蛋白快速转膜仪美国(Bio-Rad 公司);G:BOX-F3 型凝胶成像系统(英国 Syngene 公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模与给药

将 40 只 C57BL/6 小鼠随机分为对照组、模型组、非诺贝特(50 mg/kg)组和马钱苷低、高剂量(25、50 mg/kg)^[1]组,每组 8 只。对照组小鼠正常饮水,其余各组小鼠均给予 30%果糖水饲养,同时非诺贝特组和马钱苷低、高剂量组小鼠分别 ig 给予相应药物治疗,每天 1 次,连续给药 8 周。

2.2 肝脏指数的测定

末次给药 24 h 后,称量并记录各组小鼠体重,无痛条件下将各组小鼠处死后完整取出小鼠肝脏并称量肝脏质量,计算肝脏指数。

肝脏指数=肝脏质量/体重

2.3 血清生化指标检测

末次给药 24 h 后,各组小鼠眼球取血,室温下静置 30 min,然后在 4 $^{\circ}$ C、3 000 r/min(离心半径 8 cm)条件下离心 10 min,取上清,置于-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。按照试剂盒说明书测定血清中 AST、ALT 活性及 TG、TC、LDL-C、HDL-C 水平。

2.4 肝脏生化指标检测

取部分小鼠肝组织,用生理盐水清洗后,加入适量生理盐水置于超声破碎仪中进行破碎,制备 10%的肝组织匀浆。按照试剂盒说明书测定肝组织匀浆中 T-SOD 活性及 TG、MDA、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平。按照 BCA 蛋白定量试剂盒说明书测定肝组织匀浆中的蛋白浓度。

2.5 肝脏病理学染色

取部分小鼠肝组织,置于 4%多聚甲醛溶液中固定,随后运用石蜡包埋,并制成 5 μm 的切片。肝组织石蜡切片脱蜡后进行 HE 染色,并在显微镜下观察各组小鼠肝组织病理学变化。根据 NAFLD 病理评分系统^[12]对各组小鼠肝脏脂肪变性程度进行评估:0 分(脂肪变性占比小于 5%)、1 分(脂肪变性占比 5%~33%)、2 分(脂肪变性占比 34%~66%)、3 分(脂肪变性占比大于 66%)。同时,取部分 4%多聚甲醛溶液固定的肝组织,冰冻切片后运用 ORO 染色液进行染色,然后清洗掉多余的染色液,并在显微镜下观察各组小鼠肝组织中脂质蓄积情况。

2.6 肝脏转录组测序分析

取 100 mg 肝组织,提取肝组织样本中的总 RNA,以构建 RNA 文库,并使用 NovaSeq 6000 系统进行高通量测序。运用基迪奥生物信息云平台对测序结果进行表达量差异分析和基因集分析。

2.7 分子对接

通过 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获取马钱苷的分子结构。通过 ProteinData Bank 数据库(<http://www.rcsb.org/>)获取 AMPK α 蛋白晶体的三维结构,运用 Auto Dock Tools 1.5.6 软件对 AMPK α 蛋白结构进行除去水分子、添加氢原子、添加电荷等处理。运用 AutoDock Vina 1.1.2 软件分析马钱苷与 AMPK α 蛋白的相互作用,获取分子对接结合自由能。运用 PYMOL 2.5.0 软件对马钱苷与 AMPK α 分子对接结果进行可视化分析。

2.8 Western blotting 检测肝脏组织相关蛋白表达

利用 M-PER 蛋白裂解液提取各组小鼠肝组织中的总蛋白,并按照 BCA 蛋白含量检测试剂盒测定蛋白浓度。将肝脏蛋白提取液与蛋白上样缓冲液按 4:1 的体积比混匀后,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min。分别取各组小鼠肝脏蛋白样品 100 μg ,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,并运用无蛋白快速封闭液封闭 15 min, p-AMPK α 、AMPK α 、SREBP-1、FASN、 β -actin 一抗(稀释比例均为 1:1000)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 清洗 3 次后,加入 HRP 标记的兔抗山羊二抗(稀释比例为 1:10000)室温孵育 1 h, TBST 清洗 3 次。加入 ECL 化学发光液后运用 G:BOX 凝胶成像分析系统成像,使用 Image-Pro Plus 6.0 软件计算目标蛋白条带的灰度值。

2.9 免疫组织化学法检测肝脏组织中 p-AMPK α 蛋白表达

取石蜡包埋的小鼠肝脏样本制备肝组织切片,然后按照兔/鼠通用型 Streptavidin-HRP 免疫组化染色试剂盒说明书进行操作,显微镜下观察小鼠肝组织中的 p-AMPK α 蛋白表达。

2.10 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0 软件对实验结果进行分析,实验结果计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 对果糖饮食小鼠体质量、肝脏质量、肝脏指数及肝功能的影响

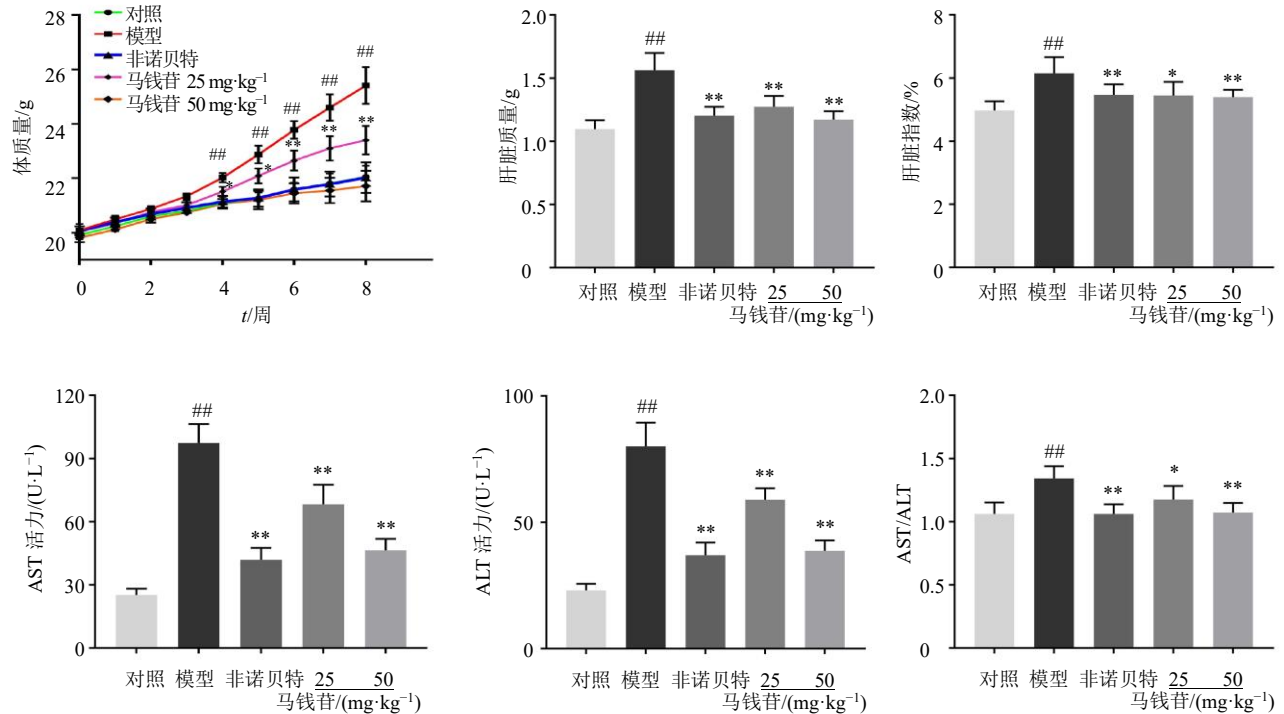
如图 1 所示,实验第 1~3 周,各组小鼠体质量无明显差异;实验第 4~8 周,与对照组比较,模型组小鼠体质量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,非诺贝特组、马钱苷低、高剂量组小鼠体质量均显著降低($P<0.05$ 、 0.01)。实验结束后,记录各组小鼠肝脏质量,计算肝脏指数,并检测血清中肝功能酶的活性。与对照组比较,模型组小鼠肝脏质量和肝脏指数显著升高($P<0.01$)、血清 AST、ALT 活性及 AST/ALT 比值均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,非诺贝特组、马钱苷低、高剂量组小鼠肝脏质量、肝脏指数及血清 AST、ALT 活性、AST/ALT 均显著降低($P<0.01$)。结果表明,马钱苷具有抑制果糖饮食小鼠体质量增长并减轻肝功能损伤的作用。

3.2 对果糖饮食小鼠血脂指标变化的影响

如图 2 所示,与对照组比较,模型组小鼠血清中 TG、TC、LDL-C 的水平显著升高、HDL-C 水平显著降低($P<0.01$);与模型组比较,非诺贝特组、马钱苷低、高剂量组小鼠血清中 TG、TC、LDL-C 的水平显著降低($P<0.05$ 、 0.01)、HDL-C 水平显著升高($P<0.05$ 、 0.01)。结果表明,马钱苷具有改善果糖饮食小鼠血脂紊乱的作用。

3.3 对果糖饮食小鼠肝脏病理学变化的影响

如图 3 所示,对照组小鼠肝组织细胞形态结构正常,排列整齐,无明显的肝细胞脂肪变性和炎性浸润,与对照组比较,模型组小鼠肝脏大量肝细胞呈大泡样脂肪变性,并伴有过量脂质沉积和炎性细胞浸润,肝脏脂肪变性评分和肝脏 TG 含量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,非诺贝特组、马钱苷低、高剂量组小鼠肝脏脂肪变性程度明显减轻、



与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 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 1 马钱苷对果糖饮食小鼠体重、肝脏质量、肝脏指数及肝功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 1 Effect of loganin on body weight, liver weight, liver index, and liver function in fructose-fed mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

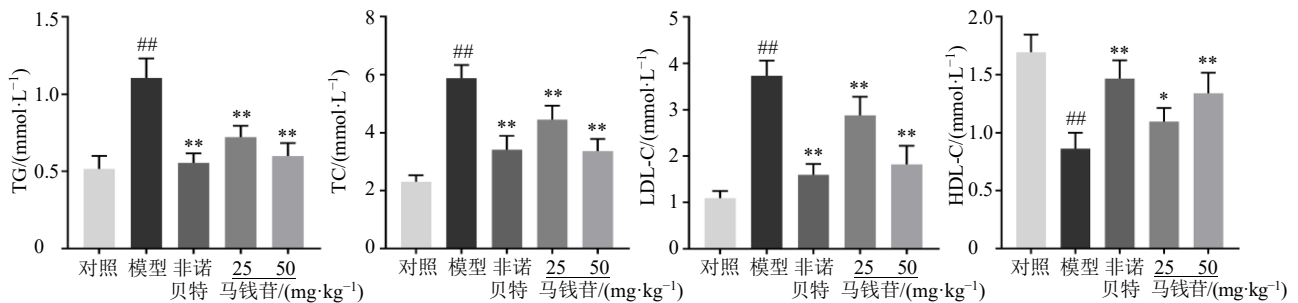


图 2 马钱苷对果糖饮食小鼠血脂指标变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 2 Effect of loganin on changes in lipid parameters in fructose-fed mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

肝脏脂质蓄积明显减少、未见明显的炎性细胞浸润,且肝脏脂肪变性评分和肝脏 TG 含量显著降低 ($P < 0.01$)。结果表明,马钱苷具有改善果糖饮食小鼠肝脏脂肪变性的作用。

3.4 对果糖饮食小鼠肝脏小鼠氧化应激的影响

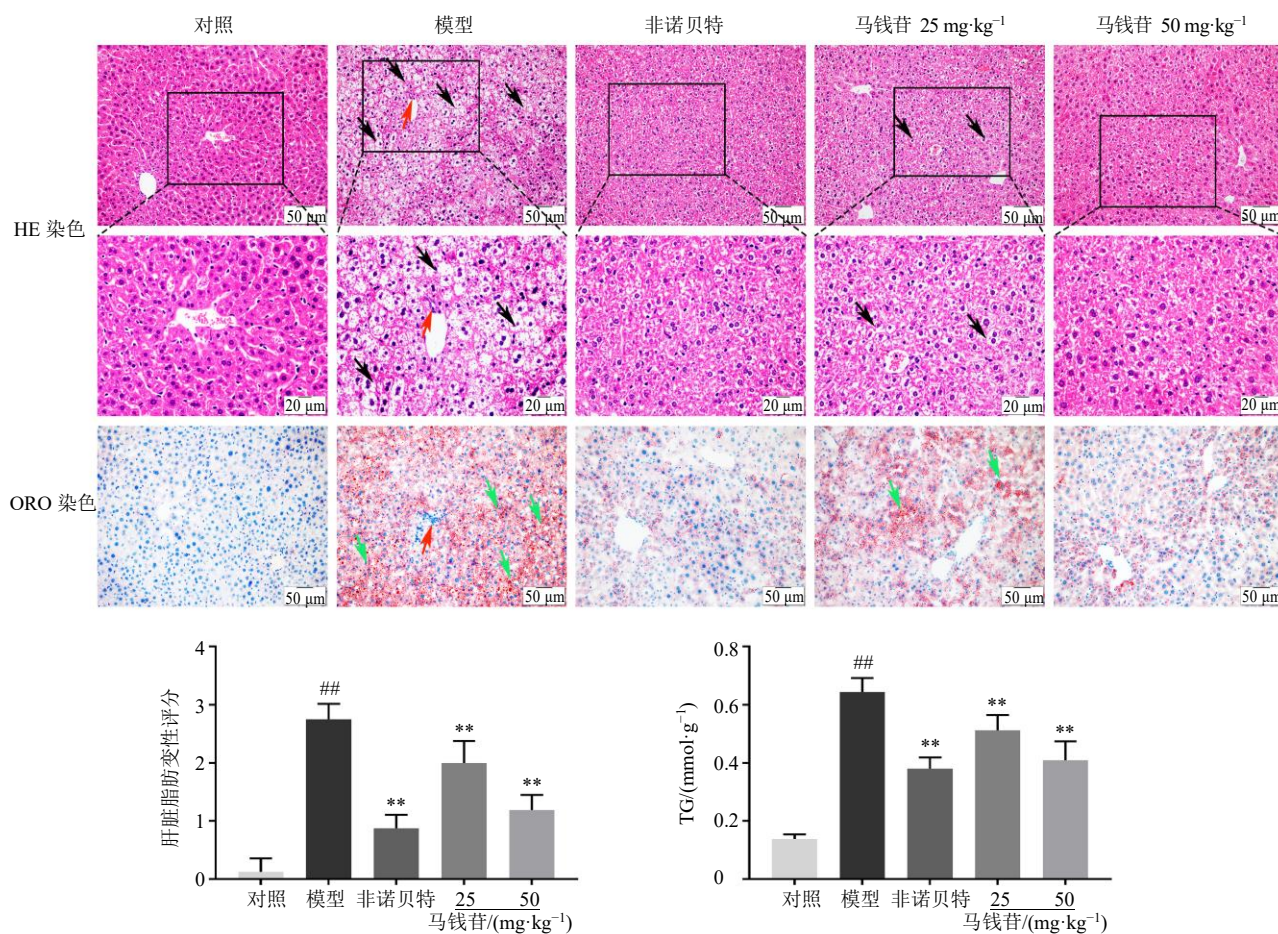
如图 4 所示,与对照组比较,模型组小鼠肝组织中 MDA 的含量显著升高、T-SOD 活力显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,非诺贝特组、马钱苷低、高剂量组小鼠肝组织中 MDA 的含量显著降低、T-SOD 活力显著升高 ($P < 0.05, 0.01$)。结果表明,马钱苷具有改善果糖饮食小鼠肝脏氧化应激的作用。

3.5 对果糖饮食小鼠肝脏炎症因子水平的影响

如图 5 所示,与对照组比较,模型组小鼠肝组织中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等炎症因子水平显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,非诺贝特组、马钱苷低、高剂量组小鼠肝组织中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等炎症因子水平显著降低 ($P < 0.01$)。结果表明,马钱苷具有改善果糖饮食小鼠肝脏炎症反应的作用。

3.6 转录组测序分析马钱苷改善果糖饮食小鼠肝脏脂肪变性的作用途径

本研究对模型组和马钱苷高剂量组的 6 个肝脏样本进行了转录组测序分析。如图 6 所示,与



黑色表示肝细胞脂肪变性；绿色表示肝细胞脂质蓄积；红色表示炎性细胞浸润。

Black arrows indicate hepatocellular steatosis; green arrows indicate hepatocellular lipid accumulation; red arrows indicate inflammatory cell infiltration.

图 3 马钱苷对果糖饮食小鼠肝脏病理学变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 3 Effect of loganin on liver pathological changes in fructose-fed mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

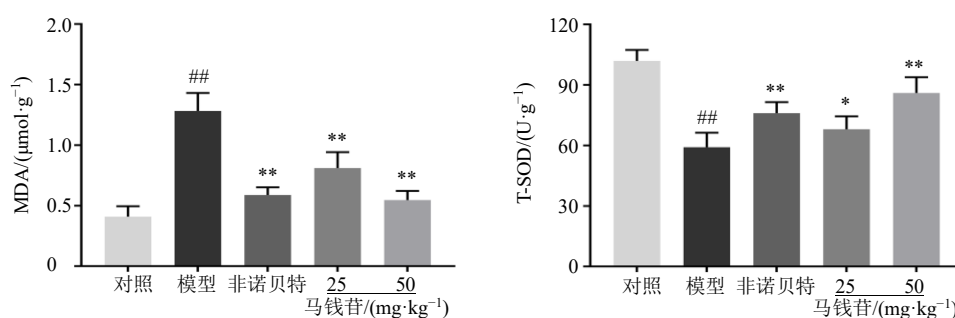


图 4 马钱苷对果糖饮食小鼠肝脏小鼠氧化应激的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 4 Effect of loganin on oxidative stress in liver of fructose-fed mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

模型组比较，马钱苷高剂量组小鼠肝组织中有 2 315 个差异表达的基因，其中 1 075 个基因表达水平显著升高、1 240 个基因表达水平显著降低。通过对筛选出来的差异表达基因进行 KEGG 功能富集分析，结果显示，富集的 KEGG 通路主

要包括 AMPK 信号通路、脂肪酸代谢、NF-κB 信号通路等，其中 AMPK 信号通路是变化最显著的信号通路。结果表明，AMPK 信号通路可能是马钱苷改善果糖饮食小鼠肝脏脂肪变性的重要分子途径。

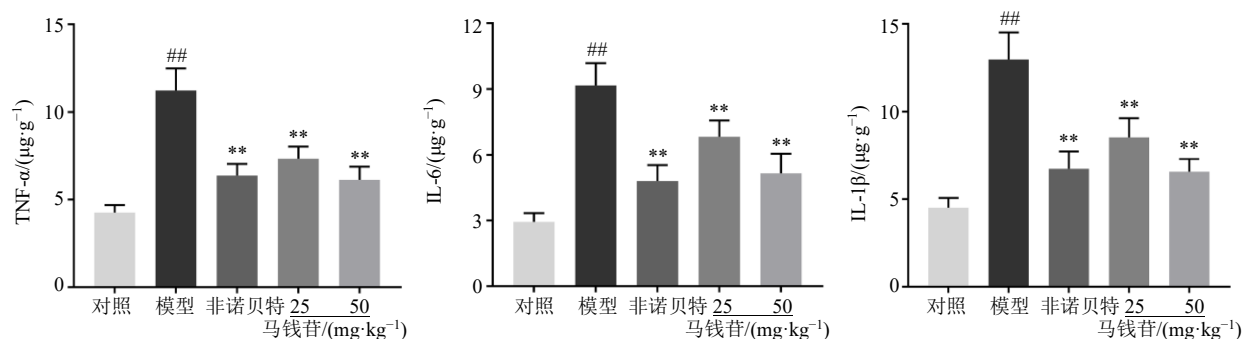
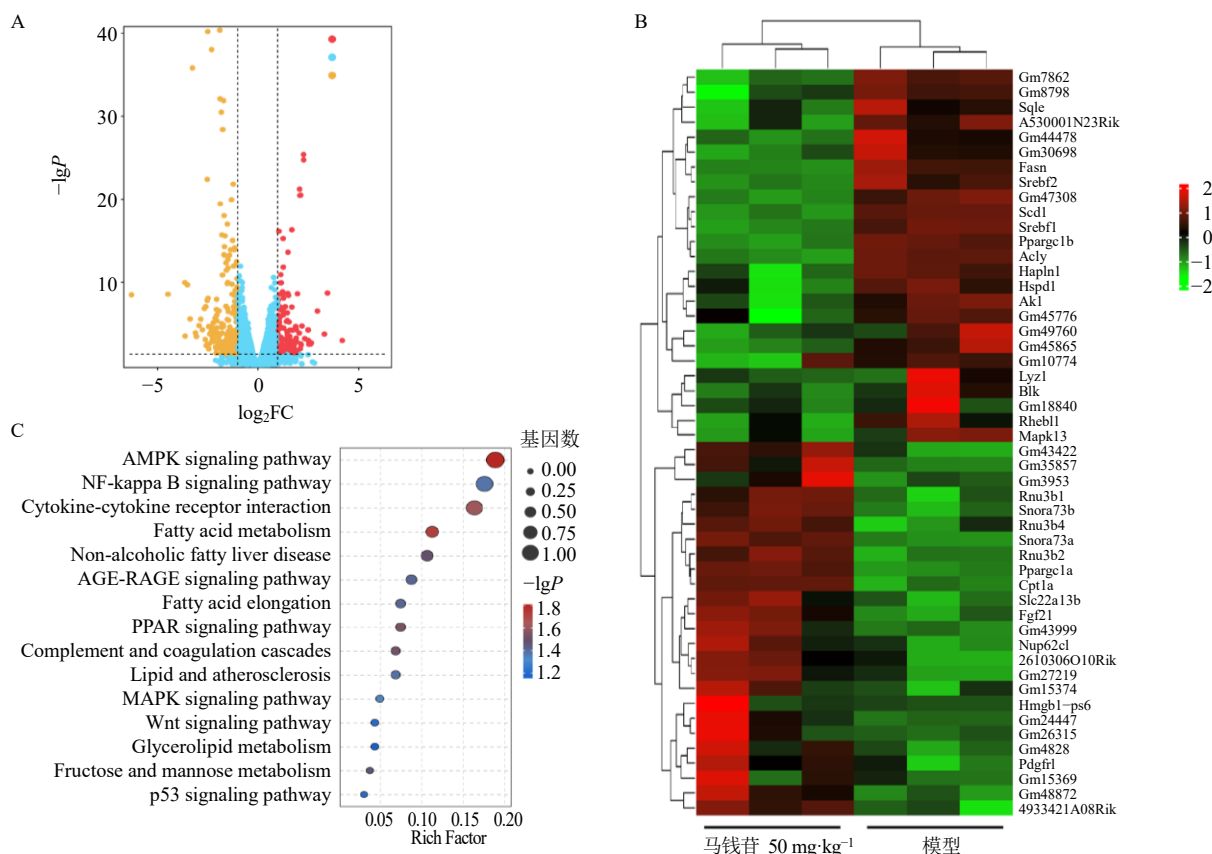


图 5 马钱苷对果糖饮食小鼠肝脏炎症因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 5 Effect of loganin on level of inflammatory factors in liver of fructose-fed mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)



A-火山图; B-差异表达基因热图; C-差异表达基因 KEGG 功能富集分析图。

A-volcanic figure; B-heat map of differentially expressed genes; C-KEGG functional enrichment analysis of differentially expressed genes.

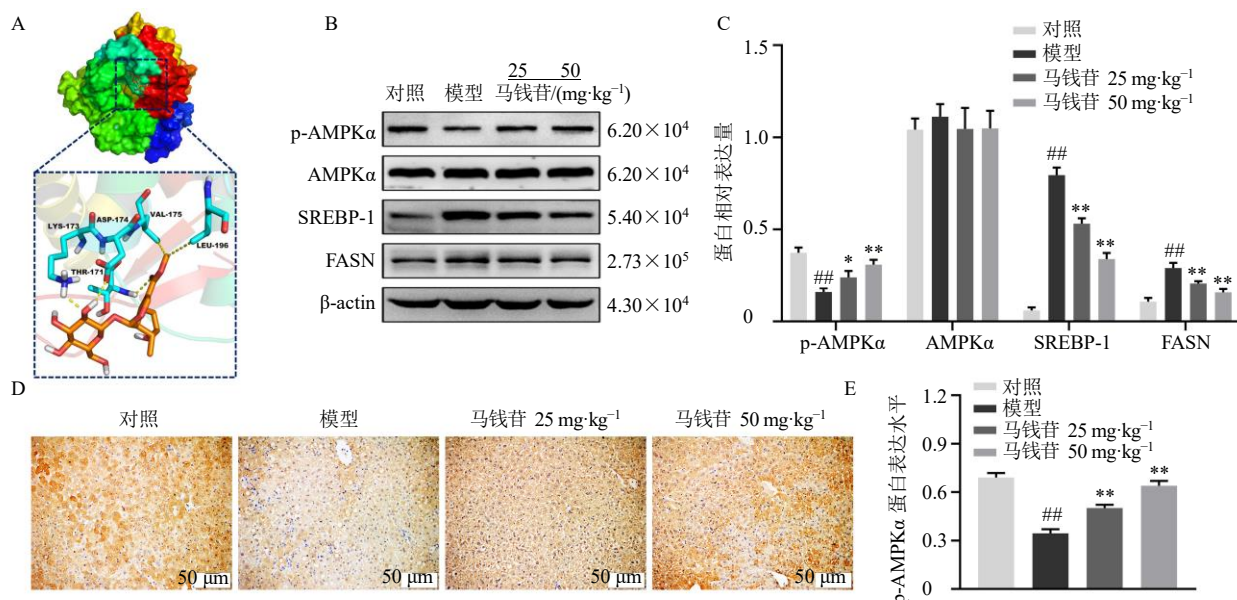
图 6 转录组测序分析马钱苷改善果糖饮食小鼠肝脏脂肪变性的作用途径

Fig. 6 Effect of loganin ameliorating hepatic steatosis in fructose-fed mice by transcriptome sequencing

3.7 对果糖饮食小鼠肝脏 AMPK 信号通路相关脂代谢蛋白表达的影响

AMPK α 是 AMPK 最重要的亚型之一, 且与肝脏脂代谢稳态调节密切相关^[13]。因此, 本研究进一步探讨了马钱苷对果糖饮食小鼠肝脏 AMPK 信号通路相关脂代谢蛋白表达的影响。如图 7-A 所示,

马钱苷能够与 AMPK α 蛋白的 Thr171、Lys173、Val175、Leu169 等位点结合, 结合能为-8.1 kcal/mol (1 kcal=4.182 kJ)。结果表明, AMPK α 可能是马钱苷调节脂代谢的作用靶点。如图 7-B、C 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肝组织中 p-AMPK α 的蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$), AMPK 信号通路下游脂



A-马钱苷与 AMPK α 蛋白互作的分子对接结果图; B-肝脏组织中 AMPK 信号通路相关脂代谢蛋白表达的免疫印迹图像; C-肝脏组织中 AMPK 信号通路相关脂代谢蛋白表达水平的统计图; D-肝脏组织 p-AMPK α 免疫组化染色 ($\times 200$); E-肝脏组织 p-AMPK α 蛋白表达水平统计图。
A-molecular docking results of the interaction between loganin and AMPK α protein; B-Western blotting image of lipid metabolism protein expression related to AMPK signaling pathway in liver tissue; C-statistical image of expression levels of lipid metabolism proteins related to AMPK signaling pathway in liver tissue; D-immunohistochemical staining of p-AMPK α in liver tissue ($\times 200$); E-statistical image of p-AMPK α protein expression levels in liver tissue.

图 7 马钱苷对果糖饮食小鼠肝脏 AMPK 信号通路相关脂代谢蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of loganin on expression of lipid metabolism proteins related to AMPK signaling pathway in liver of fructose-fed mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

代谢关键转录因子 SREBP-1 和脂肪酸合成功能酶 FASN 的蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 马钱苷低、高剂量组小鼠肝组织中 p-AMPK α 的蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)、SREBP-1 和 FASN 的蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$)。如图 7-D、E 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肝组织中 p-AMPK α 蛋白的表达水平显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 马钱苷低、高剂量组小鼠肝组织中 p-AMPK α 蛋白的表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。免疫组织化学染色结果表明, 马钱苷能够通过调控 AMPK/SREBP-1/FASN 信号通路从而改善果糖饮食小鼠肝脏脂代谢功能紊乱。

4 讨论

肝脏作为机体能量代谢调节的中枢器官, 在调节全身糖脂代谢通量中起到核心作用^[14]。肝脏脂质来源主要通过摄入食物或外周组织释放的游离脂肪酸和肝脏脂肪酸从头合成途径, 并通过 β 氧化进行分解代谢。一旦当肝细胞摄取和/或脂肪酸从头合成的脂质超过了脂肪酸 β 氧化代谢的能力, 即可导致过量脂质在肝细胞内外堆积形成脂肪样变性^[15-16]。同时, 过量脂质及有害的脂代谢中间产物堆积在肝

细胞内还能够产生脂毒性, 进而诱导肝细胞损伤、氧化应激、炎症反应等, 从而加速 NAFLD 进展^[17-18]。根据 NAFLD 发生机制的二次打击学说和多重打击学说, 脂代谢紊乱导致肝细胞过量脂质蓄积已经被公认是驱动 NAFLD 的中心环节^[19-20], 不减轻脂代谢紊乱导致的肝细胞过量脂质蓄积, NAFLD 将无法治愈^[21]。因此, 纠正肝细胞脂代谢紊乱是任何防治 NAFLD 策略的基础。

果糖是一种膳食单糖, 广泛存在于多种食品、软饮料及水果中, 其过量摄入被认为是诱发 NAFLD 重要的独立危险因素^[22-24]。根据世界卫生组织 2018 年发布的《成人和儿童糖摄入量指南》, 膳食添加糖的能量应低于膳食能量摄入的 5%, 但是在常见的西方饮食中, 膳食糖 (主要是果糖) 提供的能量已经超过摄入总能量的 15%^[25-27]。因此, 过量膳食糖消费, 尤其是果糖, 已经成为了全球公共卫生问题。以往人们普遍认为高脂饮食是引起 NAFLD 发生的重要原因。值得注意的是, 随着全球软饮料以及高果糖玉米糖浆的消费量大幅增加, 长期果糖摄入被认为是比高脂饮食更应该被关注的 NAFLD 诱因^[24]。流行病学调查报告显示, 近十年全球果糖消

费量显著增加,且果糖消费量显著升高与青少年和儿童 NAFLD 患病率升高密切相关^[27]。因此,迫切需要关注日常生活中果糖摄入的潜在危害以及对机体代谢健康的影响。

肝脏是果糖代谢最主要的器官。果糖摄入后首先经过肠道吸收,然后通过葡萄糖转运体转运至肝脏,在多种功能酶的作用下代谢转化为乙酰辅酶 A 为脂肪酸从头合成提供底物从而驱动脂肪酸从头合成,并损害脂肪酸 β 氧化从而诱导肝脏脂代谢紊乱^[28-29]。研究表明,日常生活中长期摄入过多的糖分(尤其是果糖)可诱导胰岛素抵抗从而导致肥胖及机体糖脂代谢功能紊乱,最终诱发多种代谢性疾病,如 NAFLD^[26,30-31]。长期摄入果糖能够导致肝脏脂代谢功能紊乱从而驱动 NAFLD 及相关代谢相关疾病发生^[31-33]。分子机制上,果糖饮食能够通过抑制 AMPK 活化从而导致肝细胞脂代谢紊乱,且 AMPK 信号抑制对于果糖饮食诱发 NAFLD 至关重要^[34-35]。AMPK 是细胞能量代谢的重要感受器,其在维持细胞能量代谢动态平衡过程中发挥着核心作用。AMPK 是由 α 亚基、 β 亚基和 γ 亚基组成的异源三聚体,其中 α 亚基起催化作用,其苏氨酸位点(Thr172)的磷酸化是活化 AMPK 所必需的,而 β 和 γ 亚基在维持三聚体稳定性和底物特异性方面起重要作用^[36]。SREBP-1 是 AMPK α 信号下游最重要的脂肪酸从头合成转录调控因子之一,其活化能够转录调控脂肪酸合成关键酶 FASN 的表达从而促进肝细胞新生脂肪过度生成^[37-38]。课题组前期研究证实,调控 AMPK/SREBP-1/FASN 信号通路抑制肝细胞脂肪酸从头合成能够改善肝细胞脂代谢紊乱^[31-32]。提示,AMPK 调控脂肪酸从头合成可作为 NAFLD 防治的关键分子靶标。

山茱萸是湖北省道地药材“一县一品”特色中药,具有巨大的开发应用前景。马钱苷是山茱萸中环烯醚萜苷类成分,且是《中国药典》2020 年版规定的山茱萸含量测定的指标性成分之一^[39],是山茱萸发挥药效学作用的潜在活性物质。因此,本研究探讨了马钱苷调节脂代谢稳态改善果糖饮食诱导小鼠 NAFLD 发生的作用及机制。结果显示,马钱苷能够改善果糖饮食小鼠血脂紊乱和肝功能异常,并减轻肝脏脂肪变性、氧化应激和炎症反应。通过转录组测序筛选马钱苷改善果糖饮食小鼠 NAFLD 的核心分子途径,发现马钱苷干预对果糖饮食小鼠肝脏 AMPK 信号通路影响最为显著。进一步研究发

现,马钱苷与 AMPK α 蛋白之间存在直接相互作用,并在果糖饮食诱导的动物模型中,观察到了马钱苷促进肝脏 AMPK α (Thr172)磷酸化激活的作用,并能够抑制脂肪酸从头合成关键因子 SREBP-1 和 FASN 的蛋白表达水平。这些结果提示,马钱苷能够直接结合并活化 AMPK α 抑制脂肪酸从头合成关键因子(如 SREBP-1、FASN)的表达从而发挥调节肝细胞脂代谢的作用。

综上,马钱苷对果糖饮食诱导的小鼠 NAFLD 具有改善作用,其作用机制可能与激活 AMPK 信号抑制脂肪酸从头合成逆转肝细胞过量脂质蓄积有关。本研究提示马钱苷及富含马钱苷的中药(如山茱萸)对于防治 NAFLD 及其他慢性肝脏代谢性疾病具有重要的作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Eslam M, Sanyal A J, George J, *et al.* MAFLD: A consensus-driven proposed nomenclature for metabolic associated fatty liver disease [J]. *Gastroenterology*, 2020, 158(7): 1999-2014.
- [2] Younossi Z M. Non-alcoholic fatty liver disease - A global public health perspective [J]. *J Hepatol*, 2019, 70(3): 531-544.
- [3] Ratziu V, Francque S, Sanyal A. Breakthroughs in therapies for NASH and remaining challenges [J]. *J Hepatol*, 2022, 76(6): 1263-1278.
- [4] Jeon H, Lee C G, Jeong H, *et al.* Inhibitory effects of loganin on adipogenesis *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(5): 4752.
- [5] 安淑静. 山茱萸马钱苷对肥胖小鼠的干预作用及肠道菌群的影响 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2022.
- [6] Du Q, Fu Y X, Shu A M, *et al.* Loganin alleviates macrophage infiltration and activation by inhibiting the MCP-1/CCR2 axis in diabetic nephropathy [J]. *Life Sci*, 2021, 272: 118808.
- [7] 张聪, 胡娜, 李珊, 等. 马钱苷对肝癌细胞 HepG2 增殖与凋亡的影响及机制研究 [J]. *中国药房*, 2020, 31(7): 782-788.
- [8] Cao L, Wu Y, Li W W, *et al.* *Cornus officinalis* vinegar reduces body weight and attenuates hepatic steatosis in mouse model of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *J Food Sci*, 2022, 87(7): 3248-3259.
- [9] 崔永霞, 尚子慧, 侯亚迪, 等. 基于血清代谢组学探究山茱萸多糖对 2 型糖尿病大鼠的干预机制 [J]. *中草药*, 2024, 55(9): 2976-2986.
- [10] Herman M A, Birnbaum M J. Molecular aspects of fructose metabolism and metabolic disease [J]. *Cell Metab*, 2021, 33(12): 2329-2354.
- [11] Guo Y X, Xia C Y, Yan Y, *et al.* Loganin improves chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like

- behaviors and neurochemical dysfunction [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 308: 116288.
- [12] Kleiner D E, Brunt E M, van Natta M, *et al.* Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Hepatology*, 2005, 41(6): 1313-1321.
- [13] Steinberg G R, Hardie D G. New insights into activation and function of the AMPK [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24(4): 255-272.
- [14] Frazier K, Manzoor S, Carroll K, *et al.* Gut microbes and the liver circadian clock partition glucose and lipid metabolism [J]. *J Clin Invest*, 2023, 133(18): e162515.
- [15] Ding L G, Sun W F, Balaz M, *et al.* Peroxisomal β -oxidation acts as a sensor for intracellular fatty acids and regulates lipolysis [J]. *Nat Metab*, 2021, 3(12): 1648-1661.
- [16] Zhou B, Luo Y C, Ji N N, *et al.* Orosomucoid 2 maintains hepatic lipid homeostasis through suppression of *de novo* lipogenesis [J]. *Nat Metab*, 2022, 4(9): 1185-1201.
- [17] Liu K P, Qiu D B, Liang X, *et al.* Lipotoxicity-induced STING1 activation stimulates MTORC1 and restricts hepatic lipophagy [J]. *Autophagy*, 2022, 18(4): 860-876.
- [18] Dong J R, Viswanathan S, Adami E, *et al.* Hepatocyte-specific IL11 cis-signaling drives lipotoxicity and underlies the transition from NAFLD to NASH [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 66.
- [19] Zhao L, Zhang C, Luo X X, *et al.* CD36 palmitoylation disrupts free fatty acid metabolism and promotes tissue inflammation in non-alcoholic steatohepatitis [J]. *J Hepatol*, 2018, 69(3): 705-717.
- [20] Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis E A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. *Metabolism*, 2016, 65(8): 1038-1048.
- [21] Sanyal A J. Past, present and future perspectives in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(6): 377-386.
- [22] Park S H, Helsley R N, Fadhlul T, *et al.* Fructose induced KHK-C can increase ER stress independent of its effect on lipogenesis to drive liver disease in diet-induced and genetic models of NAFLD [J]. *Metabolism*, 2023, 145: 155591.
- [23] Ghannem L, Beaufrère A, Zucman-Rossi J, *et al.* Liver adenomatosis and NAFLD developed in the context of hereditary fructose intolerance [J]. *Liver Int*, 2020, 40(12): 3125-3126.
- [24] Jensen T, Abdelmalek M F, Sullivan S, *et al.* Fructose and sugar: A major mediator of non-alcoholic fatty liver disease [J]. *J Hepatol*, 2018, 68(5): 1063-1075.
- [25] Sheng H G, Zhang H W, Zhang W D, *et al.* Dietary fructose intake is correlated with fat distribution in the Newfoundland population [J]. *Nutrition*, 2022, 93: 111434.
- [26] Buziau A M, Eussen S J P M, Kooi M E, *et al.* Fructose intake from fruit juice and sugar-sweetened beverages is associated with higher intrahepatic lipid content: The maastricht study [J]. *Diabetes Care*, 2022, 45(5): 1116-1123.
- [27] Nier A, Brandt A, Conzelmann I B, *et al.* Non-alcoholic fatty liver disease in overweight children: Role of fructose intake and dietary pattern [J]. *Nutrients*, 2018, 10(9): 1329.
- [28] Zhao S, Jang C, Liu J, *et al.* Dietary fructose feeds hepatic lipogenesis via microbiota-derived acetate [J]. *Nature*, 2020, 579(7800): 586-591.
- [29] Todoric J, Di Caro G, Reibe S, *et al.* Fructose stimulated *de novo* lipogenesis is promoted by inflammation [J]. *Nat Metab*, 2020, 2(10): 1034-1045.
- [30] Geidl-Flueck B, Hochuli M, Németh Á, *et al.* Fructose- and sucrose- but not glucose-sweetened beverages promote hepatic *de novo* lipogenesis: A randomized controlled trial [J]. *J Hepatol*, 2021, 75(1): 46-54.
- [31] Zhang C, Song Y Y, Yuan M, *et al.* Ellagitannins-derived intestinal microbial metabolite urolithin A ameliorates fructose-driven hepatosteatosis by suppressing hepatic lipid metabolic reprogramming and inducing lipophagy [J]. *J Agric Food Chem*, 2023, 71(9): 3967-3980.
- [32] Lu Y Z, Zhang C, Song Y Y, *et al.* Gallic acid impairs fructose-driven *de novo* lipogenesis and ameliorates hepatic steatosis via AMPK-dependent suppression of SREBP-1/ACC/FASN cascade [J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 940: 175457.
- [33] Zhang C, Song Y Y, Chen L, *et al.* Urolithin A attenuates hyperuricemic nephropathy in fructose-fed mice by impairing STING-NLRP3 axis-mediated inflammatory response via restoration of parkin-dependent mitophagy [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 907209.
- [34] Woods A, Williams J R, Muckett P J, *et al.* Liver-specific activation of AMPK prevents steatosis on a high-fructose diet [J]. *Cell Rep*, 2017, 18(13): 3043-3051.
- [35] Zhang C S, Hawley S A, Zong Y, *et al.* Fructose-1,6-bisphosphate and aldolase mediate glucose sensing by AMPK [J]. *Nature*, 2017, 548(7665): 112-116.
- [36] Crunkhorn S. A new route to regulating AMPK activity [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(3): 175.
- [37] Zhu X P, Bian H, Wang L, *et al.* Berberine attenuates nonalcoholic hepatic steatosis through the AMPK-SREBP-1c-SCD1 pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 141: 192-204.
- [38] Li Y, Xu S Q, 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.
- [39] 侯亚迪, 尚子慧, 陈培, 等. 山茱萸环烯醚萜苷的化学成分及生物活性研究进展 [J]. *中华中医药学刊*, 2024, 42(6): 69-76.

[责任编辑 罗 曦]