

青钱柳总三萜通过调节 FXR 介导的胆汁酸和脂质代谢途径改善高脂饮食诱导的小鼠代谢相关脂肪性肝病

张颖¹, 谈燕清^{2#}, 刘杰¹, 孔吉旭¹, 许杰², 贺海波^{1*}, 王洪武³, 孟子元¹, 李浩然², 唐海明⁴, 张继红^{2*}

1. 三峡大学 天然产物研究与利用湖北省重点实验室 药食同源大健康产品开发利用宜昌市重点实验室, 湖北 宜昌 443002

2. 三峡大学中医医院 湖北省功能性消化系统疾病中医临床医学研究中心, 湖北 宜昌 443002

3. 华中科技大学同济医学院附属同济医院 感染科, 湖北 武汉 430030

4. 华中农业大学食品科学技术学院, 湖北 武汉 430070

摘要: **目的** 探讨青钱柳总三萜 (total triterpenoid from *Cyclocarya paliurus*, CPT) 对高脂饮食 (high-fat diet, HFD) 诱导代谢相关脂肪性肝病 (metabolic-associated fatty liver disease, MAFLD) 小鼠的治疗作用及其机制。 **方法** 将 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组、模型组、CPT (100 mg/kg) 组、二甲双胍 (metformin, MET, 100 mg/kg) 组和 CPT+MET 组。除对照组给予普通饲料喂养外, 其余各组给予高脂饲料喂养 12 周建立 MAFLD 模型。模型成功建立后, 给予药物干预 8 周。实验期间观察小鼠活动水平, 定期测量体质量、进食量。给药结束前 1 周, 利用间接测热法测定小鼠耗氧量 (oxygen consumption, VO₂)、二氧化碳生成量 (carbon dioxide production, VCO₂) 和能量消耗量; 给药结束后, 进行葡萄糖耐量实验和胰岛素耐受实验, 检测葡萄糖耐量; 称量肝质量, 计算肝脏指数; 检测血清丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)、 γ -谷氨酰转肽酶 (γ -glutamyl transpeptidase, γ -GT)、三酰甘油 (triglycerides, TG)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG) 和空腹胰岛素 (fasting insulin, FINS), 计算胰岛素抵抗指数 (insulin resistance index, HOMA-IR); 检测肝脏和粪便中 TC、TG 水平, 以及血清、肝组织和粪便中总胆汁酸 (total bile acids, TBA) 水平; 采用苏木素-伊红、油红 O 染色观察小鼠肝脏病理变化; 每组随机选取 5 个肝组织和 5 个结肠内容物样本进行胆汁酸 (bile acids, BAs) 代谢组学分析; qRT-PCR 测定肝组织中固醇 7 α -羟化酶 (cholesterol 7 α -hydroxylase 1, *Cyp7a1*)、*Cyp7b1*、*Cyp27a1*、*Cyp8b1*、胆汁酰基辅酶 A 合成酶 (bile acid coenzyme A synthetase, *Bacs*)、氨基酸正酰基转移酶 (bile acid coenzyme a: amino acid *N*-acyltransferase, *Baat*)、胆盐输出泵 (bile salt export pump, *Bsep*)、钠离子-牛磺胆酸共转运蛋白 (recombinant Na⁺ taurocholate cotransporting polypeptide, *Ntcp*)、法尼醇 X 受体 (farnesoid X receptor, *FXR*)、小异二聚体伴侣 (small heterodimer partner, *SHP*)、成纤维细胞生长因子受体 4 (fibroblast growth factor receptor 4, *FGFR4*)、固醇调节元件结合蛋白-1c (sterol regulatory element-binding protein-1c, *SREBP-1c*)、硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1 (stearoyl-CoA desaturase 1, *SCD1*)、脂肪酸合成酶 (fatty acid synthase, *FASN*)、过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator-activated receptor α , *PPAR α*)、肉碱棕榈酰转移酶 1 (carnitine palmitoyltransferase 1, *CPT1*)、脂蛋白脂肪酶 (lipoprotein lipase, *LPL*)、微粒体甘油三酸酯转运蛋白 (microsomal triglyceride transfer protein, *MTTP*) 和回肠组织中 *FXR*、成纤维细胞生长因子 15 (fibroblast growth factor 15, *FGF15*)、顶端钠依赖性胆盐转运体 (apical sodium-dependent bile acid transporter, *Abst*)、胆汁酸结合蛋白 (intestinal bile acid-binding protein, *Ibabp*)、有机溶质转运蛋白- α (organic solute transporter- α , *Ost- α*)、*Ost- β* mRNA 表达; Western blotting 测定肝组织中 CYP7a1、Cyp7b1、Cyp27a1、Cyp8b1、FXR、SHP、FGFR4、SREBP-1c、SCD1、FASN、PPAR α 、CPT1、LPL、MTTP 和回肠组织中

收稿日期: 2025-10-12

基金项目: 湖北省科技厅重点研发项目 (2025BCB067); 宜昌市医疗卫生研究项目 (A22-2-059, A23-1-066); 湖北省科技厅重点研发大健康计划项目 (2022BCE017); 湖北省卫生健康委员会中医药重点项目 (ZY2023Z015); 湖北省卫生健康委员会中医药面上项目 (ZY2025M038); 湖北省科技厅自然科学基金项目 (2025AFB805, 2025AFB839, 2025AFD301, 2025AFD294, 2023AFB600, 2022CFB357, 2022CFB427); 湖北省卫生健康委员会科研资助项目 (WJ2023M153); 湖北省功能性消化系统疾病中医临床医学研究中心开放基金项目 (SXZ202303, SXZ202308, SXZ202311)

作者简介: 张颖 (2001—), 女, 硕士研究生, 主要从事中药药理学研究。E-mail: 2826720856@qq.com

#共同第一作者: 谈燕清 (1986—), 女, 硕士, 副主任医师, 主要从事中药防治脾胃疾病的基础与临床研究。E-mail: 455128707@qq.com

***通信作者:** 贺海波 (1972—), 博士, 教授, 主要从事中药防治内分泌及代谢性研究。E-mail: hjy219@126.com

张继红 (1967—), 女, 硕士, 主任医师/教授, 主要从事中药防治脾胃疾病的基础与临床研究。E-mail: 13872605766@163.com

FXR、FGF15、Abst 蛋白表达。结果 与模型组比较, CPT 和 CPT 与 MET 联用可显著降低小鼠体质量、改善葡萄糖耐量、提高胰岛素敏感性, 降低肝脏质量、肝脏指数, 增加 VO_2 、 VCO_2 、 VO_2/VCO_2 值及白天、晚上能量消耗和总能量消耗量 ($P<0.01$); 降低血清中 ALT、AST、ALP、 γ -GT、TC、TG、LDL-C、FINS、FBG、TBA 和肝组织中 TC、TG 水平及 HOMA-IR, 升高血清中 HDL-C 和粪便中 TC、TG、TBA 水平, 降低肝组织病理学评分、脂质沉积 ($P<0.01$); 升高肝组织中 TBA 水平, 降低肝组织中非结合 BAs、初级 BAs、次级 BAs 含量和初级 BAs/次级 BAs 值及结肠内容物中非结合 BAs、次级 BAs 含量, 增加肝组织中结合 BAs 含量和结合 BAs/非结合 BAs 值及结肠内容物中结合 BAs、初级 BAs 含量、结合 BAs/非结合 BAs 值和初级 BAs/次级 BAs 值 ($P<0.01$); 上调肝组织中 *Cyp7a1*、*Cyp7b1*、*Cyp27a1*、*Bacs*、*Baat*、*FXR*、*SHP*、*Bsep*、*Ntcp*、*PPAR α* 、*CPT1*、*LPL*、*MTTP* mRNA 和 *Cyp7a1*、*Cyp7b1*、*Cyp27a1*、*FXR*、*SHP*、*PPAR α* 、*CPT1*、*LPL*、*MTTP* 蛋白表达, 下调肝组织 *Cyp8b1*、*FGFR4*、*SREBP-1c*、*SCD1*、*FASN* mRNA 和蛋白表达, 下调回肠组织中 *FXR*、*FGF15*、*Asbt*、*Ibapb*、*Ost- α* 、*Ost- β* mRNA 和 *FXR*、*FGF15*、*Asbt* 蛋白表达 ($P<0.01$)。CPT 与 MET 联用较 CPT 单独使用效果更好 ($P<0.05$ 、 0.01)。结论 CPT 可能通过抑制肠道 FXR/FGF15 信号传导, 进而激活肝脏 FXR/SHP 通路, 促进肝肠循环中 BAs 合成, 抑制其回肠再吸收、促进 BAs 随粪便排泄; 激活的肝脏 FXR/SHP 通路通过抑制 SREBP-1c/SCD1/FASN 信号轴来抑制脂质合成, 激活的肝脏 FXR 通过激活 PPAR α /CPT1 和 LPL/MTTP 信号轴来促进脂质氧化和脂质分解, 从而治疗 MAFLD。

关键词: 青钱柳总三萜; 代谢相关脂肪性肝病; 胆汁酸; 脂质代谢; 法尼醇 X 受体

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)03-0949-19

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.03.014

Total triterpenoid from *Cyclocarya paliurus* improves high-fat diet-induced metabolic-associated fatty liver disease in mice by regulating FXR-mediated bile acid and lipid metabolism pathways

ZHANG Ying¹, TAN Yanqing², LIU Jie¹, KONG Jixu¹, XU Jie², HE Haibo¹, WANG Hongwu³, MENG Ziyuan¹, LI Haoran¹, TANG Haiming⁴, ZHANG Jihong²

1. Hubei Key Laboratory of Natural Products Research and Development, Yichang Laboratory of Development and Utilization of Health Products with Drug and Food Homology, China Three Gorges University, Yichang 443002, China
2. Traditional Chinese Medicine Hospital of China Three Gorges University, Hubei Clinical Research Center for Functional Digestive Diseases of Traditional Chinese Medicine, Yichang 443002, China
3. Department of Infectious Diseases of Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China
4. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract: Objective To investigate the therapeutic effect and mechanism of total triterpenoid from *Cyclocarya paliurus* (CPT) on high-fat diet (HFD)-induced metabolic-associated fatty liver disease (MAFLD) mice. **Methods** C57BL/6J mice were randomly divided into control group, model group, CPT (100 mg/kg) group, metformin (MET, 100 mg/kg) group and CPT + MET group. Except for the control group receiving regular feeding, all other groups were fed HFD for 12 weeks to establish MAFLD models. After successful establishment of MAFLD model, drugs were given eight weeks. During the experiment, the activity levels of mice were observed, their body weight and food intake were measured regularly. One week before the end of medication, the oxygen consumption (VO_2), carbon dioxide production (VCO_2) and energy consumption of mice were measured using indirect calorimetry. After the end of administration, glucose tolerance test and insulin resistance test were conducted to detect glucose tolerance. Liver weight was measured, and liver index was calculated. The levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), γ -glutamyl transpeptidase (γ -GT), triglycerides (TG), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), fasting blood glucose (FBG), fasting insulin (FINS) in serum were detected, and insulin resistance index (HOMA-IR) was calculated. The levels of TC and TG in hepatic tissues and feces, as well as the levels of total bile acids (TBA) in serum, hepatic tissues and feces were measured. Hematoxylin-eosin and oil red O staining were used to observe the pathological changes in hepatic tissues of mice. Five hepatic tissue and five colon content samples from each group were randomly selected for bile acid (BAs) metabolomics analysis. The mRNA expressions of cholesterol 7 α -hydroxylase 1 (*Cyp7a1*), *Cyp7b1*,

Cyp27a1, *Cyp8b1*, bile acid coenzyme A synthetase (*Bacs*), bile acid coenzyme a: amino acid *N*-acyltransferase (*Baat*), bile salt export pump (*Bsep*), recombinant Na⁺ taurocholate cotransporting polypeptide (*Ntcp*), farnesoid X receptor (*FXR*), small heterodimeric partner (*SHP*), fibroblast growth factor receptor 4 (*FGFR4*), sterol regulatory element-binding protein-1c (*SREBP-1c*), stearyl coenzyme A desaturation enzyme 1 (*SCD1*), fatty acid synthetase (*FASN*), peroxisome proliferator-activated receptor α (*PPAR\alpha*), carnitine palmitoyl transferase 1 (*CPT1*), lipoprotein lipase (*LPL*), microsomal triglyceride transfer protein (*MTTP*) in hepatic tissues and *FXR*, fibroblast growth factor 15 (*FGF15*), apical sodium-dependent bile acid transporter (*Abst*), intestinal bile acid-binding protein (*Ibapb*), organic solute transporter- α (*Ost-\alpha*), *Ost-\beta* in ileum tissues were determined by qRT-PCR. Western blotting was used to detect the protein expressions of *CYP7a1*, *Cyp7b1*, *Cyp27a1*, *Cyp8b1*, *FXR*, *SHP*, *FGFR4*, *SREBP-1c*, *SCD1*, *FASN*, *PPAR\alpha*, *CPT1*, *LPL*, *MTTP* in hepatic tissues and *FXR*, *FGF15*, *Abst* in ileum tissues. **Results** Compared with model group, CPT and its association with MET significantly reduced the body weight, improved glucose tolerance, elevated insulin sensitivity, lowered liver weight and liver index, raised VO₂, VCO₂, VO₂/VCO₂, and daytime and nighttime energy consumptions and total energy consumption in mice ($P < 0.01$). CPT and its association with MET reduced ALT, AST, ALP, γ -GT, TC, TG, LDL-C, FINS, FBG, TBA levels in serum and TC and TG levels in hepatic tissue as well as HOMA-IR, elevated levels of HDL-C in serum and TC, TG, TBA in feces, reduced liver histopathological scores and lipid deposition ($P < 0.01$). CPT and its association with MET elevated hepatic tissue TBA level, lowered the contents of unconjugated BAs, primary BAs, secondary BAs and the ratio of primary BAs/secondary BAs in hepatic tissues, as well as the levels of unconjugated BAs and secondary BAs in colon contents, elevated the content of conjugated BAs and the ratio of conjugated BAs/unconjugated BAs in hepatic tissue, as well as the levels of conjugated BAs, primary BAs and the ratios of conjugated BAs/unconjugated BAs, primary BAs/secondary BAs in colon contents ($P < 0.01$). In addition, CPT and its association with MET elevated *Cyp7a1*, *Cyp7b1*, *Cyp27a1*, *Bacs*, *Baat*, *FXR*, *SHP*, *Bsep*, *Ntcp*, *PPAR\alpha*, *CPT1*, *LPL*, *MTTP* mRNA expressions and *Cyp7a1*, *Cyp7b1*, *Cyp27a1*, *FXR*, *SHP*, *PPAR\alpha*, *CPT1*, *LPL*, *MTTP* protein expressions in hepatic tissues, reduced the mRNA and protein expressions of *Cyp8b1*, *FGFR4*, *SREBP-1c*, *SCD1*, *FASN* in hepatic tissues, depressed *FXR*, *FGF15*, *Asbt*, *Ibapb*, *Ost-\alpha*, *Ost-\beta* mRNA expressions and *FXR*, *FGF15*, *Asbt* protein expressions in ileum tissues ($P < 0.01$). The combination of CPT and MET showed better efficacy than CPT alone ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** CPT may activate the hepatic *FXR*/*SHP* pathway by inhibiting intestinal *FXR*/*FGF15* signaling, facilitating the synthesis of BAs in the hepatic intestinal circulation, repressing their ileal reabsorption, and boosting the excretion of BAs with feces. The activated hepatic *FXR*/*SHP* pathway restrains lipid synthesis by suppressing *SREBP-1c*/*SCD1*/*FASN* signaling axis, while activated hepatic *FXR* promotes lipid oxidation and lipid decomposition through activating the *PPAR\alpha*/*CPT1* and *LPL*/*MTTP* signaling axes to treat MAFLD.

Key words: total triterpenoid from *Cyclocarya paliurus*; metabolic-associated fatty liver disease; bile acid; lipid metabolism; farnesoid X receptor

代谢相关脂肪性肝病 (metabolic-associated fatty liver disease, MAFLD) 是除酒精之外病因引起的以肝细胞脂肪变性和脂肪贮积增加为特征的病理综合征^[1]。MAFLD 已成为一种遍布全球的肝脏疾病。据相关研究数据显示, 全球 MAFLD 的患病率为 25%~30%, 亚洲地区的患病率为 27%, 我国的情况更为突出, MAFLD 患病率高达 29.8%。随着人民生活水平提高, 久坐不动的生活方式和不良饮食习惯使得肥胖症及其伴随的脂肪肝、糖尿病的发病率不断提高, 导致 MAFLD 患病率急剧上升^[2]。目前, 最佳治疗是通过均衡饮食和大量运动来减肥, 但多难以坚持, 药物干预成为 MAFLD 治疗的首选。然而, 长期药物治疗 MAFLD 可能会增加肝损伤^[3]。因此, 探索安全有效的 MAFLD 治疗方法非常重要。

越来越多的证据表明, 胆汁酸 (bile acids,

BAs) 代谢异常会导致脂质代谢失调, 从而促进 MAFLD 的发生和发展^[4-5]。法尼醇 X 受体 (farnesoid X receptor, *FXR*) 是 BAs 的主要核受体, 在肝脏和肠道中广泛表达; BAs 广泛存在于肠道和肝脏中, BAs/*FXR* 轴是参与肝脏-肠道串扰的关键转录因子, 控制着 BAs 和脂质代谢^[6]。在肝脏中, *FXR* 一方面通过调节参与 BAs 合成关键酶 [如胆固醇 7 α -羟化酶 (cholesterol 7 α -hydroxylase, *Cyp7a1*)] 表达来调节 BAs 合成, 从而对 BAs 产生负反馈抑制。另一方面 *FXR* 激活后可上调小异二聚体伴侣 (small heterodimeric partner, *SHP*) 水平并下调胆固醇调节元件结合蛋白-1c (sterol regulatory element-binding protein-1c, *SREBP-1c*) 水平, 从而降低硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1 (stearyl coenzyme A desaturation enzyme 1, *SCD1*) 和脂肪酸合成酶 (fatty acid synthetase, *FASN*) 表达并抑

制肝脏脂质合成;上调过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator-activated receptor α , PPAR α)和肉碱棕榈酰转移酶 1 (carnitine palmitoyl transferase 1, CPT1) 表达, 增强脂质氧化;上调脂蛋白脂肪酶 (lipoprotein lipase, LPL) 和微粒体甘油三酸酯转运蛋白 (microsomal triglyceride transfer protein, MTTP) 表达, 从而促进脂质分解。在肠道中, FXR 的激活可以诱导成纤维细胞生长因子 15/19 (fibroblast growth factor 15/19, FGF15/19) 表达, 然后通过成纤维细胞生长因子受体 4 (fibroblast growth factor receptor 4, FGFR4) 抑制肝脏中 Cyp7a1 表达, 进一步调节 BAs 代谢^[4,7]。研究发现 MAFLD 患者血浆和肝组织中 BAs 水平升高^[8-9], 表明 BAs 失调与 MAFLD 发展之间存在关联;进一步研究发现 MAFLD 患者和小鼠 BAs 代谢异常抑制了肝脏中 FXR、SHP、SREBP-1c、PPAR α 、CPT、LPL 和 MTTP 表达, 导致了肝脏脂质合成增加、脂肪酸氧化和脂质分解降低^[10-11]。绞股蓝皂苷和青稞 β -葡聚糖对高脂饮食诱导的 MAFLD 小鼠具有较好的治疗作用, 可改善肝脏脂质或 BAs 代谢^[3-4], 证实与激活肝脏 FXR 信号通路或抑制肠道 FXR 信号通路有关。由此可见, FXR 介导的 BAs 和脂质代谢与 MAFLD 发生发展密切相关, 靶向 FXR 介导 BAs 和脂质代谢可为 MAFLD 提供一种有效治疗手段。

青钱柳 *Cyclocarya paliurus* (Batalin) Iljinsk. 为胡桃科青钱柳属植物, 又名青钱李、摇钱树、甜茶树等, 是我国特有的单种属乔木植物。《中国中药资源志要》记载, 青钱柳的树叶、树皮、树根均可入药, 具有清热解毒、止痛等功效, 可用于治疗顽癣^[12]。青钱柳叶为青钱柳主要药用部位, 也是国家卫生健康委员会认定的新食品原料。其性辛微苦, 味平, 归脾、胃经, 具有清热解毒、生津止渴、降压强心的功效^[13]。青钱柳总三萜 (total triterpenoid from *Cyclocarya paliurus*, CPT) 是其重要的活性成分, 研究发现 CPT 对高脂饮食诱导的 MAFLD 小鼠、大鼠有较好的治疗作用, 可减轻肥胖、减轻肝脏脂肪变性和炎症、改善脂质紊乱和胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR), 恢复受损的肠道屏障;可降低混合脂肪酸诱导小鼠原代肝细胞和 HepG2 细胞脂质堆积和三酰甘油 (triglycerides, TG) 水平;其作用机制与激活核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 来保护线粒体功能、改善氧化应激、激活

沉默调节蛋白 1 (sirtuin 1, Sirt1)/腺苷酸依赖的蛋白激酶 (adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK) 通路, 进而提高烟酰胺磷酸核糖基转移酶 (nicotinamide phosphoribosyltransferase, NAMPT) 介导的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺) 水平和触发自噬来调节脂质代谢有关^[14-16]。CPT 可改善高脂饮食诱导的小鼠 IR、降低高脂饮食诱导的小鼠空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG) 水平, 降低口服葡萄糖耐量试验 (glucose tolerance test, OGTT) 和胰岛素耐受试验 (insulin tolerance test, ITT) 的曲线下面积, 提示其协同改善糖代谢与胰岛素敏感性, 减少肝脏脂滴的蓄积, 证实 CPT 可通过调节 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)/核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)/NOD 样受体家族蛋白 3 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3) 信号通路, 改善高脂饮食诱导的 IR, 从而增强胰岛素敏感性和葡萄糖代谢^[17]。然而, CPT 在 BAs 和脂质代谢中的作用尚未见研究报道, CPT 是否可以通过肠-肝轴调节 FXR 介导的 BAs 和脂质代谢途径治疗 MAFLD 有待进一步研究。基于此, 本研究采用高脂饮食诱导的 MAFLD 小鼠模型, 探究 CPT 对 BAs 组成和脂质代谢的影响, 并从 FXR 介导 BAs 和脂质代谢途径深入探讨其可能的作用机制, 旨在为 CPT 作为潜在 MAFLD 治疗药物的开发提供理论依据和实验支持。

1 材料

1.1 动物

70 只 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠, 体质量 18~20 g, 购自三峡大学实验动物中心, 动物生产许可证号 SCXK (鄂) 2022-0012, 实验动物设施使用许可证号 SCXK (鄂) 2022-0061。动物饲养于动物中心, 于 12 h 黑暗/光照循环、相对湿度 (50 \pm 10)% 和温度 23~25 $^{\circ}$ C 的环境中饲养, 自由进食饮水。动物实验经三峡大学动物伦理委员会批准 (批准号 CTGUAEWC-2024-052)。

1.2 药品与试剂

CPT (批号 2024052706) 由本实验室从青钱柳 *C. paliurus* (Batalin) Iljinsk. 叶中分离制备^[17], 通过高效液相色谱法测定其质量分数为 96.54%; 盐酸二甲双胍片 (metformin, MET, 批号 LTABQ2958) 购自瑞士默克雪兰诺公司; 羧甲基纤维素钠 (carboxymethyl cellulose sodium, CMC-Na, 批号 20250321)、甲醇 (色谱纯, 批号 20241228)、乙酸

铵(色谱纯,批号 20241119)购自国药集团化学试剂有限公司;葡萄糖(批号 20231021)购自山东潍坊盛泰药业有限公司;胰岛素注射液(批号 20240326-5)购自江苏万邦生化医药集团有限责任公司;高脂饲料(批号 2024091207)购自江苏美迪森生物医药有限公司;血糖(glucose, GLU)、胰岛素(insulin, INS)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、 γ -谷氨酰转肽酶(γ -glutamyl transpeptidase, γ -GT)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、TG、总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、总胆汁酸(total bile acids, TBA)试剂盒(批号分别为 20250312、20250316、20250310、20250309、20250317、20250319、20250314、20250313、20250308、20250315、20250320)购自南京建成生物工程研究所有限公司;苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒(批号 DB0046-1)、油红 O 染色试剂盒(批号 XB0017-1)购自沈阳奥博瑞生物科技有限公司;乙酸(色谱纯,批号 20250312)购自天津市科密欧化学试剂有限公司;乙腈(色谱纯,批号 20250217)购自上海星可高纯溶剂有限公司;TRIzol(批号 12236752)、DEPC 水(批号 20250319)及 *Cyp7a1*、*Cyp8b1*、*Cyp7b1*、*Cyp27a1*、胆汁酰基辅酶 A 合成酶(bile acid coenzyme A synthetase, *Bacs*)、氨基酸正酰基转移酶(bile acid coenzyme a: amino acid *N*-acyltransferase, *Baat*)、胆盐输出泵(bile salt export pump, *Bsep*)、钠离子-牛磺胆酸共转运蛋白(recombinant Na⁺ taurocholate cotransporting polypeptide, *Ntcp*)、*FXR*、*SHP*、*FGF15*、*FGFR4*、顶端钠依赖性胆盐转运体(apical sodium-dependent bile acid transporter, *Abst*)、胆汁酸结合蛋白(intestinal bile acid-binding protein, *Ibabp*)、有机溶质转运蛋白- α (organic solute transporter- α , *Ost- α*)、*Ost- β* 、*SREBP-1c*、*SCD1*、*FASN*、*PPAR α* 、*CPT1*、*LPL*、*MTTP*、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*)引物(批号分别为 A0250318、A0250319、A0250317、A0250314、A0250321、A0250315、A0250317、A0250319、A0250320、A0250313、A0250319、A0250312、

A0250316、A0250310、A0250318、A0250308、A0250311、A0250320、A0250316、A0250305、A0250309、A0250317、A0250322、A0250313)购自生工生物工程(上海)股份有限公司;Prime ScriptTM RT reagent kit 试剂盒(批号 602745)、Taq DNA 聚合酶(批号 601938)购自日本 TaKaRa 公司;*Cyp7a1*、*Cyp27a1*、*Cyp8b1*、*FXR*、*SHP*、*FGFR4*、*FGF15*、*Abst*、*SREBP-1c*、*SCD1*、*FASN*、*PPAR α* 、*CPT1*、*LPL*、*MTTP*、 β -actin、*GADPH* 抗体(批号分别为 sc-15329、sc-24672、sc-2548S、sc-31249、sc-1658S、sc-30718、sc-3156S、sc-2765S、sc-25479、sc-3025S、sc-2043S、sc-21756、sc-30218、sc-2071S、sc-53017、sc-2542S、sc-4368S)购自美国 CST 公司;蛋白提取试剂盒(批号 P0312)、ECL 发光试剂盒(批号 P0127)购自南京碧云天生物技术有限公司;HRP 标记的 IgG 抗体(批号 ab17458)购自英国 Abcam 公司。

1.3 仪器

Oxymax/CLAMS 型小动物代谢监测系统(美国 Columbus 公司);VORTEX-6 型涡旋仪(美国 Aoran 公司);MA54 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);5427R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);Contour Plus One 型快速血糖仪(德国 Bayer 公司);Waters UPLC Acquity I-Class PLUS 型超高效液相色谱仪、Waters UPLC Xevo G2-XS QTOF 型高分辨质谱仪(美国 Waters 公司);HVA-110 型高压灭菌锅(日本 Hirayama 公司);Infinite 200PRO 型酶标仪(瑞士 Tecan 公司);HistoStar 型石蜡组织包埋机、Nano Drop One 型核酸测定仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);RM2245 型石蜡切片机(德国 Leica 公司);Eclipse80i 型正置光学显微镜(日本 Nikon 公司);MagNA Lyser 型组织匀浆仪、LightCycler[®] 480 II 型荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司);DYCZ-20G 型电泳仪、DYCZ-24A/B 型转膜电泳槽、DYCZ-40S 型垂直电泳槽(北京六一生物科技有限公司);Tanon T4600 型凝胶成像分析系统(上海天能生命科学有限公司)。

2 方法

2.1 MAFLD 模型的建立

C57BL/6J 小鼠适应性饲养 1 周后,随机分为对照组(20 只)和模型组(50 只),对照组给予普通饲料喂养,模型组给予高脂饲料喂养,喂养 12 周后,分别从对照组和模型组随机选取 10 只小鼠,模

型组小鼠皮毛变油腻、体质量增加,血清中 TC \geq 5.17 mmol/L、TG \geq 1.70 mmol/L、GLU \geq 8.00 mmol/L,肝脏 HE 染色可见肝细胞增大、空泡脂肪变性,油红 O 染色可见脂肪大量积聚,上述指标与对照组比较具有显著性差异 ($P < 0.01$),表明小鼠 MAFLD 模型建立成功^[18-19]。

2.2 分组与给药

将成功建立的 MAFLD 模型小鼠随机分为模型组、CPT (100 mg/kg)^[17]组、MET (100 mg/kg) 组和 CPT (100 mg/kg) + MET (100 mg/kg) 组,每组 10 只。取“2.1”项下余下的 10 只对照小鼠作为对照组。除对照组继续喂养普通饲料外,其余各组继续给予高脂饲料喂养;各给药组 ig 相应药物,对照组和模型组 ig 等体积的 0.5% CMC-Na 溶液,1 次/d,连续给药 8 周。每周称量体质量,给药期间观察小鼠活动水平,每周计算摄食量。

2.3 间接测热分析

给药结束前 1 周,将小鼠放入动物代谢系统适应 1 d 后,持续记录 24 h 内耗氧量 (oxygen consumption, VO₂)、二氧化碳生成量(carbon dioxide production, VCO₂)、能量消耗量,计算呼吸交换率及白天、晚上能量消耗量和总能量消耗量。

$$\text{呼吸交换率} = \text{VCO}_2 / \text{VO}_2$$

2.4 OGTT 和 ITT

2.4.1 OGTT 给药 8 周后,小鼠禁食 12 h,通过 ig 葡萄糖 (1.0 g/kg) 进行 OGTT。分别在 ig 葡萄糖 0、15、30、60、120 min 后尾尖采血,使用血糖仪检测血糖。

2.4.2 ITT 小鼠禁食 6 h 后,通过 ip 胰岛素 (0.5 U/kg) 进行 ITT。分别在 ip 胰岛素 0、15、30、60、120 min 后尾尖采血,使用血糖仪检测血糖。

2.5 标本采集

给药结束前 1 周,测定小鼠 FBG 和空腹胰岛素 (fasting insulin, FINS) 水平;给药结束后,小鼠禁食不禁水 12 h,ip 3%戊巴比妥钠溶液麻醉,进行心脏采血,4 °C、3 000 r/min 离心 15 min 后,收集血浆用于生化检测。采血后,颈椎脱臼处死小鼠,取肝脏,计算肝脏指数,在肝脏相同部位取肝组织用于形态学分析,余下肝组织在液氮中快速冷冻后,置于-80 °C 冰箱中用于进一步分析;取回肠、结肠内容物以及粪便,在液氮中快速冷冻后,置于-80 °C 冰箱中用于后续研究。

$$\text{肝脏指数} = \text{肝脏湿质量} / \text{体质量}$$

2.6 血清学指标和肝组织、粪便中 TC、TG 水平的检测

按照试剂盒说明书检测血清中 ALT、AST、ALP、 γ -GT、TC、TG、LDL-C、HDL-C、FINS、FBG 水平,计算胰岛素抵抗指数 (insulin resistance index, HOMA-IR)。按照 Yang 等^[20]方法检测肝组织和粪便中 TC、TG 水平。

$$\text{HOMA-IR} = \text{FBG} \times \text{FINS} / 22.5$$

2.7 肝组织形态学观察

取肝组织在 4%多聚甲醛固定 24 h 后,脱水、石蜡包埋,制成 5 μ m 切片,经 HE 染色后,置于显微镜下观察肝组织病理学变化,每个切片随机选取 3 个视野拍照,使用 Image J 软件随机定量 5 个视野,按照文献方法^[19]进行形态学和 MAFLD 活动度评分 (NAFLD activity score, NAS)。另取小鼠肝组织,用 OCT 固定液固定后,制成 8 μ m 切片,经油红 O 染色后,置于显微镜下观察肝组织中的脂质积累情况,每个切片随机选取 3 个视野拍照,使用 Image J 软件随机定量 5 个视野,按照文献方法^[21]观察肝组织脂肪浸润情况,并计算脂滴面积。

2.8 血清、肝脏和粪便中 TBA 检测

将-80 °C 冰箱中保存的肝组织、粪便置于冰冻的 PBS 缓冲液中制成匀浆,将肝组织和粪便匀浆液分别于 4 °C、3 000 r/min 离心 15 min,收集上清液,按照 Huang 等^[22]方法检测血清、肝脏和粪便中 TBA 含量。

2.9 肝组织和结肠内容物中 BAs 组成分析

2.9.1 样品处理 BAs 组成分析由武汉迈特维尔生物科技股份有限公司负责。从-80 °C 低温冰箱中每组随机选取 5 个肝组织和 5 个结肠内容物样本 (30 mg) 在球磨机中处理,研磨后的样品用 200 mL 甲醇提取。作为定量的内标,向提取物中加入 10 μ L 内标混合溶液 (1 μ g/mL)。在-20 °C 下放置 10 min 以沉淀蛋白质后,样品于 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min,上清液用 PVDF 微孔滤膜 (孔径 0.22 μ m) 滤过后,上机检测,每个样本进行 3 个生物学重复。

2.9.2 色谱条件 Waters Acquity UPLC HSS T3 C₁₈ 色谱柱 (100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μ m);流动相 A 为 0.01% 乙酸和 5 mmol/L 乙酸铵的水, B 为 0.01% 乙酸乙腈溶液,梯度洗脱: 0~0.5 min, 5%~40% B; 0.5~4.5 min, 40%~50% B; 4.5~7.5 min, 50%~75% B; 7.5~10.0 min, 75%~95% B; 10.0~12.0

min, 95% B; 12.0~14.0 min, 95%~5% B。体积流量 0.35 mL/min; 柱温 40 °C; 进样量 3 μ L。

2.9.3 质谱条件 使用正离子多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式, 配备 ESI Turbo 离子喷雾接口, 运行参数负离子模式-4 500 V、正离子模式为 5 500 V; 离子源温度 550 °C; 离子源气体 1(ion source gas 1, GS1)、辅助气体 2(auxiliary Gas2, GS2)、帘气(curtain air, CUR)气压分别设置为 50、60、35 psi (1 psi=6.895 kPa); 碰撞诱导电离参数设置为高, 气体(氮气)设置为中等, 分别对每个时间段内洗脱的代谢物监测相应的 MRM 离子对。

2.9.4 BAs 组成分析 使用 Analyst 1.6.3 软件进行数据采集, 使用 Multiquant 3.0.3 软件量化 BAs 成分。对单个 MRM 跃迁的质谱参数, 包括去簇电位

(declustering potential, DP)和碰撞能量(collision energy, CE)进行 DP 和 CE 优化。根据在此期间洗脱的代谢物, 在每个时期监测一组特定的 MRM 转换。在仪器分析过程中, 基于等量的混合的肝脏和结肠内容物样本制备质量控制样本, 并每 10 个分析样本插入样本队列, 以监测和评估系统的稳定性和实验数据的可靠性^[3,21,23]。

2.10 qRT-PCR 检测肝组织和回肠组织中调控 BAs 代谢及肝组织中调控脂质代谢相关的基因表达

分别取肝组织和回肠组织, 采用 TRIzol 试剂盒提取肝组织和回肠组织总 RNA, 用 PrimeScript RT 将其反转录为 cDNA 后, 用 SYBR 荧光染料、高效 PCR 酶在实时荧光定量 PCR 仪上进行扩增, 以 GAPDH 作为内参, 扩增的结果用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示, 引物序列见表 1^[4,24]。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	上游引物序列 (5'-3')	下游引物序列 (5'-3')
<i>Cyp7a1</i>	GTACCTTGATGAAAGTGGGAA	ATTGCTTGATTTCTTGGACAG
<i>Cyp8b1</i>	CCAAGTGCCCCGGCAGGTTC	TCAGTGCAGGGGCTTCAGGC
<i>Cyp7b1</i>	CACGGGGATGTCTTCACGG	TGAGCACCAGTTCTTTGCATAG
<i>Cyp27a1</i>	CCAGGCACAGGAGAGTACG	GGGCAAGTGCAGCACATAG
<i>Bacs</i>	CTGAGAACATCCGCTGCTTC	ATAGATGAAGAGGGCAGGGC
<i>Baat</i>	CCCCGCAAACCAGAAGTAAC	GAAGGGGCTGATGGATCTGA
<i>Bsep</i>	AATGTTTCAGTTCCTCCGTTT	GTCCCCATACTTGATGTTGTC
<i>Ntcp</i>	GTCATCAATGTGGGCAACAGCA	TGAAAGGCATCAGGGAGGAGGTA
<i>FXR</i>	CAGATTTCTCCTCGTCTTAC	CCTGAGTTCATAGATGCCA
<i>SHP</i>	TTCCTTGCTTTGGATACAGTG	GAGGTTTGGGGAGTCATCA
<i>FGF15</i>	GAAGCCAGAAGGTATGAAGTC	CCAAGTTTGTAACCCAGT
<i>FGFR4</i>	CCTTCTGTTCAGCCTTATG	TTCTCTGAGGATGAGTCCAAG
<i>Abst</i>	TGGGTTTCTCCTGGCTAGACT	TGTTCTGCATTCCAGTTTCCA
<i>Ibabp</i>	AAGTGAGAAGAATTACGACGAGTTC	CTGCTGGACCTCTGTGATGAT
<i>Ost-α</i>	ACGGTGGTGTCTGTGTTCTG	GGTGTCTTCAGTGTCTTAGTA
<i>Ost-β</i>	TGCTGGAGGAAATGCTTTGG	CGTTGTCTTGTGGCTGCTT
<i>SREBP-1c</i>	GGAGCCATGGATTGCACATT	CCTGTCTCACCCCCAGCATA
<i>SCD1</i>	TGAGGGGCAGTGTCTGTAA	GGAAACTAAAGCAATGGATGG
<i>FASN</i>	GTGTGGTGGGTTTGGTGAAT	AGATGTGTTGCTGAGGTTGGA
<i>PPARα</i>	GAGGATGGGGACTTTTGTCTT	GGCTTTTGGCTGTAGGAGG
<i>CPT1</i>	ACCCAGTCAGATTCCAACC	ACAAAGCACCCATTACTTGAG
<i>LPL</i>	CGAGAGCGAGAACATTCCCT	TGTCCACCTCCGTGTAAATCAA
<i>MTTP</i>	CCACCAGAATCGTAAGGTTCA	GGACAGCAGGATGTTCTTCAC
<i>GAPDH</i>	GTGGACCTGACCTGCCGTCTAG	GAGTGGGTGTCGCTGTTGAAGTC

2.11 Western blotting 检测肝组织和回肠组织中调控 BAs 代谢及肝组织中调控脂质代谢相关的蛋白表达

分别取肝组织和回肠组织, 按照试剂盒说明书提取总蛋白, 蛋白样品定量后, 经十二烷基硫酸钠-

聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 封闭后分别孵育 Cyp7a1(1:1 000)、Cyp7b1(1:800)、Cyp27a1(1:1 000)、Cyp8b1(1:800)、FXR(1:1000)、SHF(1:1 000)、FGFR4(1:800)、FGF15(1:1 000)、Abst(1:800)、SREBP-1c(1:800)、SCD1

(1:800)、FASN (1:800)、PPAR α (1:1000)、CPT1 (1:600)、LPL (1:800) 和 MTTP (1:1000) 抗体, 洗涤后孵育二抗, 加入 ECL 化学发光试剂显影, 分析条带灰度值^[4,22]。

2.12 统计学分析

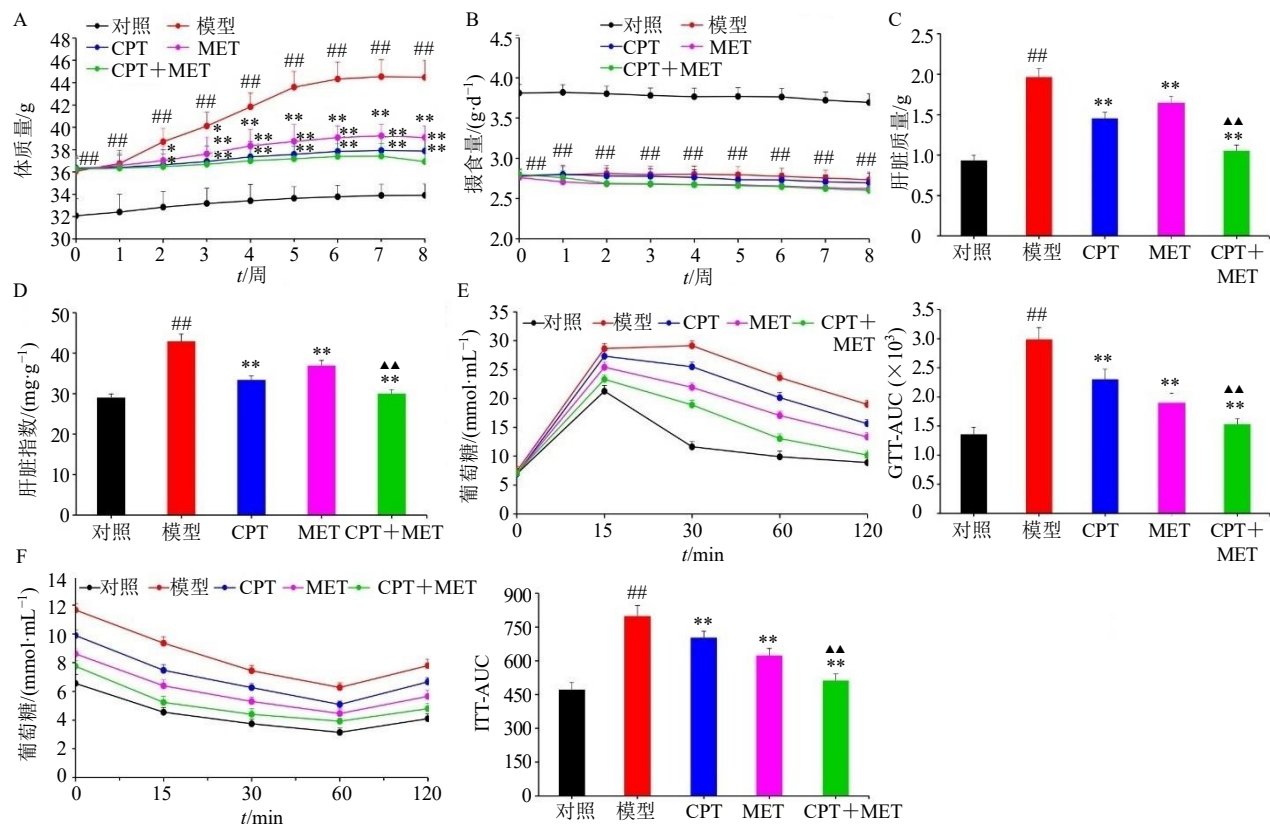
结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行数据分析。组间比较用 student's *t*-test, 方差一致时多组间比较用单因素方差分析。

3 结果

3.1 CPT 对高脂饮食诱导的 MAFLD 小鼠活动水平、体质量、摄食量、肝脏质量、肝脏指数和葡萄糖耐量的影响

与对照组比较, 模型组小鼠相对懒惰, 活动减少; 与模型组比较, CPT、MET 和联用组小鼠相对活跃。如图 1-A 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠随着时间增加体质量明显增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 给

予 CPT、MET 和联用治疗后, 从第 2 周开始, 小鼠体质量明显下降 ($P < 0.05$ 、 0.01)。如图 1-B 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠摄食量明显降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 给予 CPT、MET 和联用治疗后, 各组小鼠的摄食量没有明显差异。如图 1-C、D 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肝脏质量、肝脏指数明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 给予 CPT、MET 和联用治疗后, 小鼠肝脏质量、肝脏指数明显降低 ($P < 0.01$)。为了研究 CPT 对葡萄糖代谢的影响, 进行 OGTT 和 ITT, 结果见图 1-E、F, 与对照组比较, 模型组小鼠 AUC 明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 给予 CPT、MET 和联用治疗后, AUC 显著降低 ($P < 0.01$)。与 CPT 组比较, 给予 CPT 和 MET 联用治疗后, 小鼠肝脏质量、肝脏指数和 AUC 明显降低 ($P < 0.01$)。表明 CPT 可改善 MAFLD 小鼠葡萄糖耐量, 其中 CPT 与 MET 联用较 CPT 单独使用效果更好。



A-体质量; B-摄食量; C-肝脏质量; D-肝脏指数; E-OGTT 变化及 OGTT 的曲线下面积; F-ITT 变化及 ITT 的曲线下面积; 与对照组比较: $^{###}P < 0.01$; 与模型组比较: $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$; 与 CPT 组比较: $^{\Delta}P < 0.05$ $^{\Delta\Delta}P < 0.01$, 图 2~9 同。

A-body weight; B-food intake; C-hepatic weight; D-hepatic index; E-OGTT changes and its area under curve; F-ITT changes and its area under curve; $^{###}P < 0.01$ vs control group; $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ vs model group; $^{\Delta}P < 0.05$ $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ vs CPT group, same as Figs. 2~9.

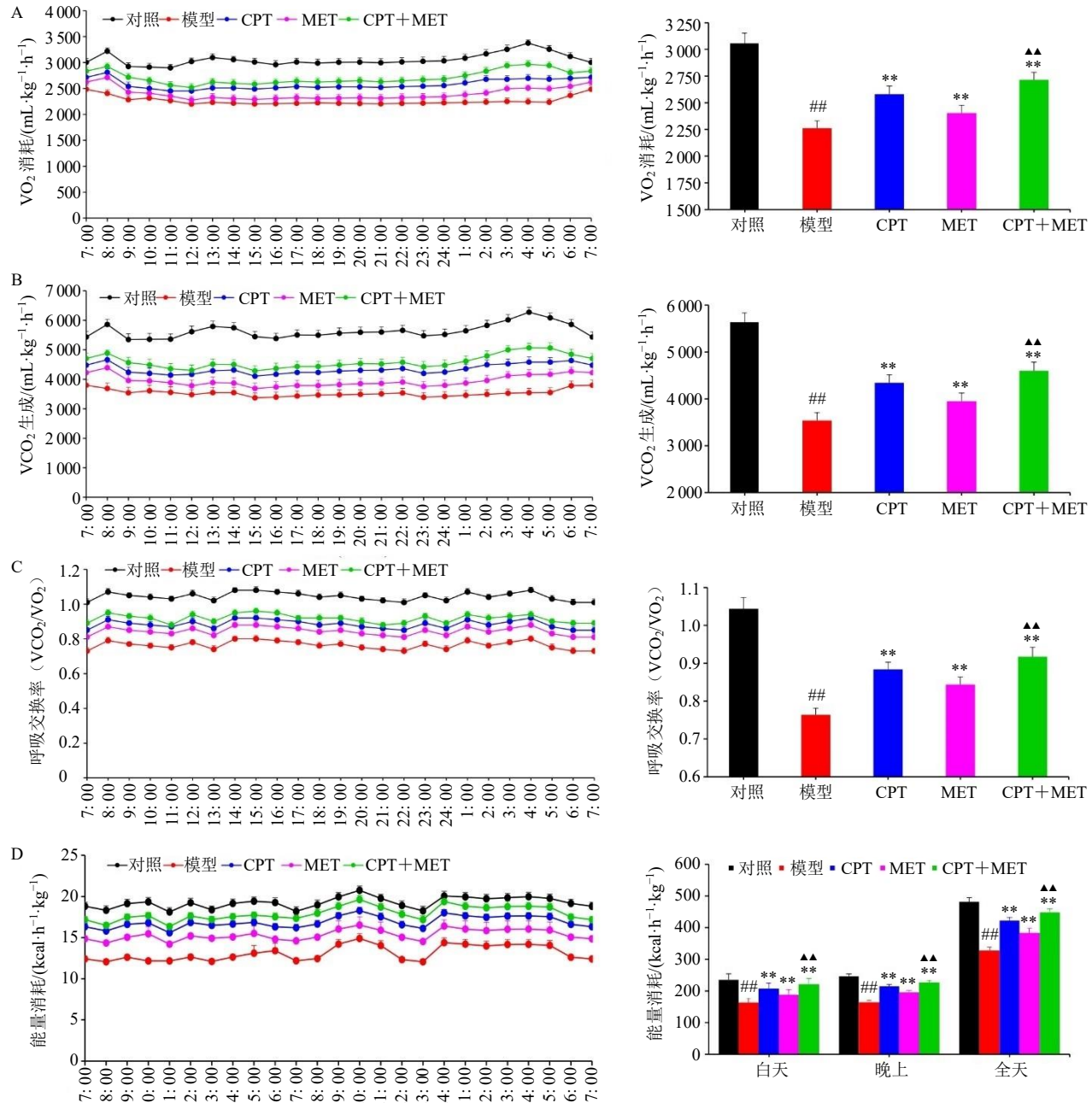
图 1 CPT 对高脂饮食诱导的 MAFLD 小鼠活动水平、体质量、摄食量、肝脏质量、肝脏指数和葡萄糖稳态的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 1 Effect of CPT on body weight, food intake, hepatic weight, hepatic index and glucose homeostasis in MAFLD mice induced by high-fat diet ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3.2 CPT 对高脂饮食诱导的 MAFLD 小鼠 O_2 消耗、 CO_2 生成和能量消耗的影响

利用小动物代谢监测系统进一步监测 MAFLD 小鼠的代谢率及能量消耗量,如图 2 所示,与对照组比较,模型组小鼠 VO_2 、 VCO_2 、呼吸交换率及白天、晚上能量消耗和总能量消耗量明显降低 ($P<0.01$);与模型组比较,给予 CPT、MET 和联用治

疗后,小鼠 VO_2 、 VCO_2 、呼吸交换率及白天、晚上能量消耗和总能量消耗量显著增加 ($P<0.01$);与 CPT 组比较,给予 CPT 和 MET 联用治疗后,小鼠 VO_2 、 VCO_2 、呼吸交换率及白天、晚上能量消耗和总能量消耗量显著增加 ($P<0.01$)。表明 CPT 可促进高脂饮食诱导的 MAFLD 小鼠能量代谢,其中 CPT 与 MET 联用较 CPT 单独使用效果更好。



A- O_2 消耗; B- CO_2 生成; C-呼吸交换率; D-昼夜循环平均能量消耗。

A- O_2 consumption; B- CO_2 production; C-respiratory exchange rate; D-average energy consumption during night cycle and day cycle.

图 2 CPT 对高脂饮食诱导的 MAFLD 小鼠 O_2 消耗、 CO_2 生成和能量消耗的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 2 Effect of CPT on O_2 consumption, CO_2 production and energy consumption in MAFLD mice induced by high-fat diet ($\bar{x} \pm s, n=10$)

3.3 CPT 对高脂饮食诱导的 MAFLD 小鼠肝功能及血清、肝脏和粪便脂质的影响

如图 3-A、B 所示,与对照组比较,模型组小鼠血清中 ALT、AST、ALP、 γ -GT、TC、TG、LDL-C、FINS、FBG 水平和 HOMA-IR 明显升高 ($P < 0.01$), HDL-C 水平显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,给予 CPT、MET 和联用治疗后,小鼠血清中 ALT、AST、ALP、 γ -GT、TC、TG、LDL-C、FINS、FBG 水平和 HOMA-IR 明显降低 ($P < 0.01$),血清中 HDL-C 水平显著升高 ($P < 0.01$);与 CPT 组比较,给予 CPT 和 MET 联用治疗后,小鼠血清中 ALT、AST、 γ -GT、TC、TG、LDL-C、FINS、FBG 水平和 HOMA-IR 明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), HDL-C 水平显著升高 ($P < 0.01$)。如图 3-C 所示,与对照组比较,模型组小鼠肝组织中 TC、TG 水平明显升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,给予 CPT、MET 和联用治疗后,小鼠肝组织中 TC、TG 水平显著降低 ($P < 0.01$);与 CPT 组比较,给予 CPT 和 MET 联用治疗后,小鼠肝组织中 TC、TG 水平显著降低 ($P < 0.01$)。如图 3-D 所示,与对照组比较,模型组小鼠粪便中 TC、TG 水平明显升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,给予 CPT、MET 和联用治疗后,小鼠粪便中 TC、TG 水平进一步升高 ($P < 0.01$);与 CPT

组比较,给予 CPT 和 MET 联用治疗后,小鼠粪便中 TC、TG 水平显著升高 ($P < 0.01$)。表明 CPT 可改善高脂饮食诱导的 MAFLD 小鼠肝功能,抑制血清和肝脏中脂质积累,促进脂质从粪便排泄,其中 CPT 与 MET 联用较 CPT 单独使用效果更好。

3.4 CPT 对高脂饮食诱导的 MAFLD 小鼠肝组织病理形态的影响

HE 染色结果(图 4-A)显示,对照组小鼠肝组织结构完整,肝细胞形态一致,未见脂滴积聚和脂肪变性;与对照组比较,模型组肝细胞排列紊乱、脂肪空泡和变性明显增多, NAS 显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,给予 CPT、MET 和联用治疗后,上述病理变化明显减轻, NAS 明显降低 ($P < 0.01$);与 CPT 组比较,给予 CPT 和 MET 联用治疗后,肝组织病理变化明显减轻, NAS 明显降低 ($P < 0.01$)。

油红 O 染色(图 4-B)显示,对照组小鼠肝细胞中未见红色脂滴,模型组小鼠肝细胞中可见大量融合成片的红色脂滴聚集;给予 CPT、MET 和联用治疗后,红色脂滴明显减少。油红 O 染色阳性面积统计分析显示,与对照组比较,模型组小鼠肝组织中脂滴面积显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,给予 CPT、MET 和联用治疗后,脂滴面积明显降低 ($P < 0.01$);与 CPT 组比较,给予 CPT 和 MET 联

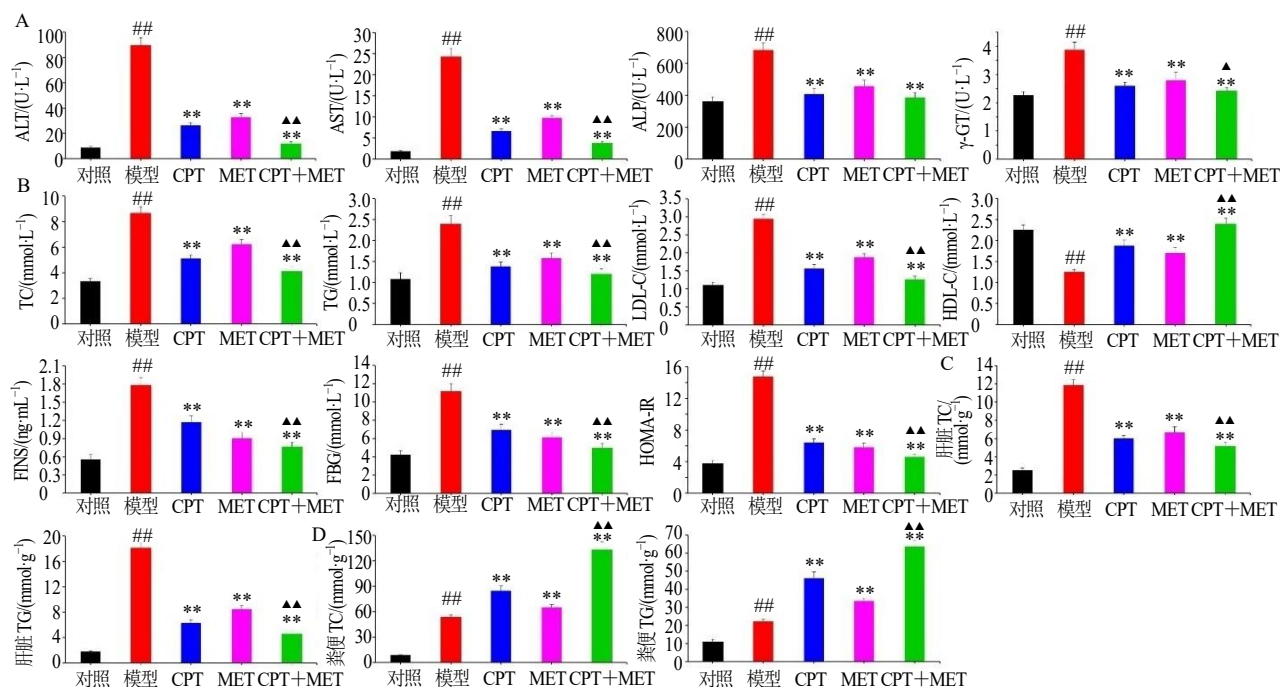


图 3 CPT 对高脂饮食诱导的 MAFLD 小鼠肝功能 (A) 及血清 (B)、肝脏 (C) 和粪便 (D) 脂质的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 3 Effect of CPT on liver function (A) and lipids in serum (B), liver tissue (C), fecal (D) of MAFLD mice induced by high-fat diet ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

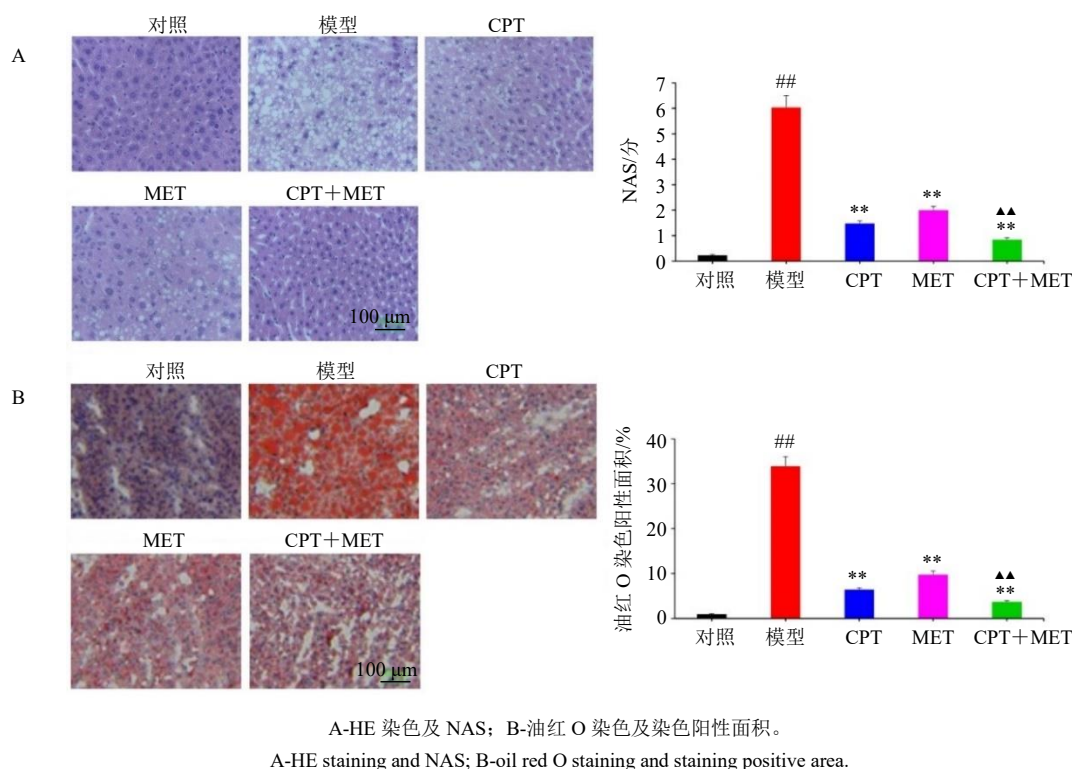


图 4 CPT 对高脂饮食诱导的 MAFLD 小鼠肝组织病理形态的影响 ($\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 4 Effect of CPT on pathological morphology of liver tissue in MAFLD mice induced by high-fat diet ($\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

用治疗后,脂滴面积明显降低($P < 0.01$)。表明 CPT 可改善高脂饮食诱导的 MAFLD 小鼠肝脏脂肪变性,抑制脂滴聚集,其中 CPT 与 MET 联用较 CPT 单独使用效果更好。

3.5 CPT 对高脂饮食诱导的 MAFLD 小鼠肝脏、血清和粪便 TBA 水平的影响

如图 5 所示,与对照组比较,模型组小鼠肝脏和血清 TBA 水平明显升高($P < 0.01$),粪便 TBA 水平显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,给予 CPT、MET 和联用治疗后,肝脏和粪便 TBA 水平明显升高($P < 0.01$),血清 TBA 水平显著降低($P < 0.01$);

与 CPT 组比较,给予 CPT 和 MET 联用治疗后,肝脏和粪便 TBA 水平明显升高($P < 0.01$),血清 TBA 水平显著降低($P < 0.01$)。表明 CPT 可通过促进 TBA 合成、肠肝循环和排泄来改善高脂饮食诱导的 MAFLD 小鼠 BAs 代谢,其中 CPT 与 MET 联用较 CPT 单独使用效果更好。

3.6 CPT 对高脂饮食诱导的 MAFLD 小鼠肝组织中 BAs 组成的影响

如图 6 所示,与对照组比较,模型组小鼠肝组织中非结合 BAs、初级 BAs、次级 BAs 含量和初级 BAs/次级 BAs 值显著升高($P < 0.01$),结合 BAs 含

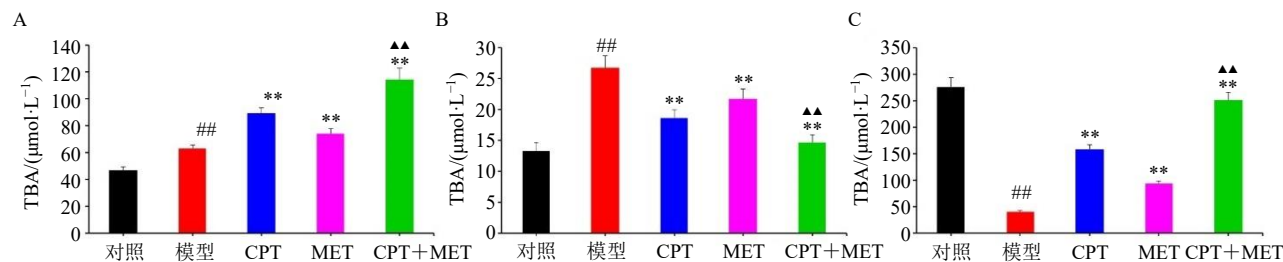
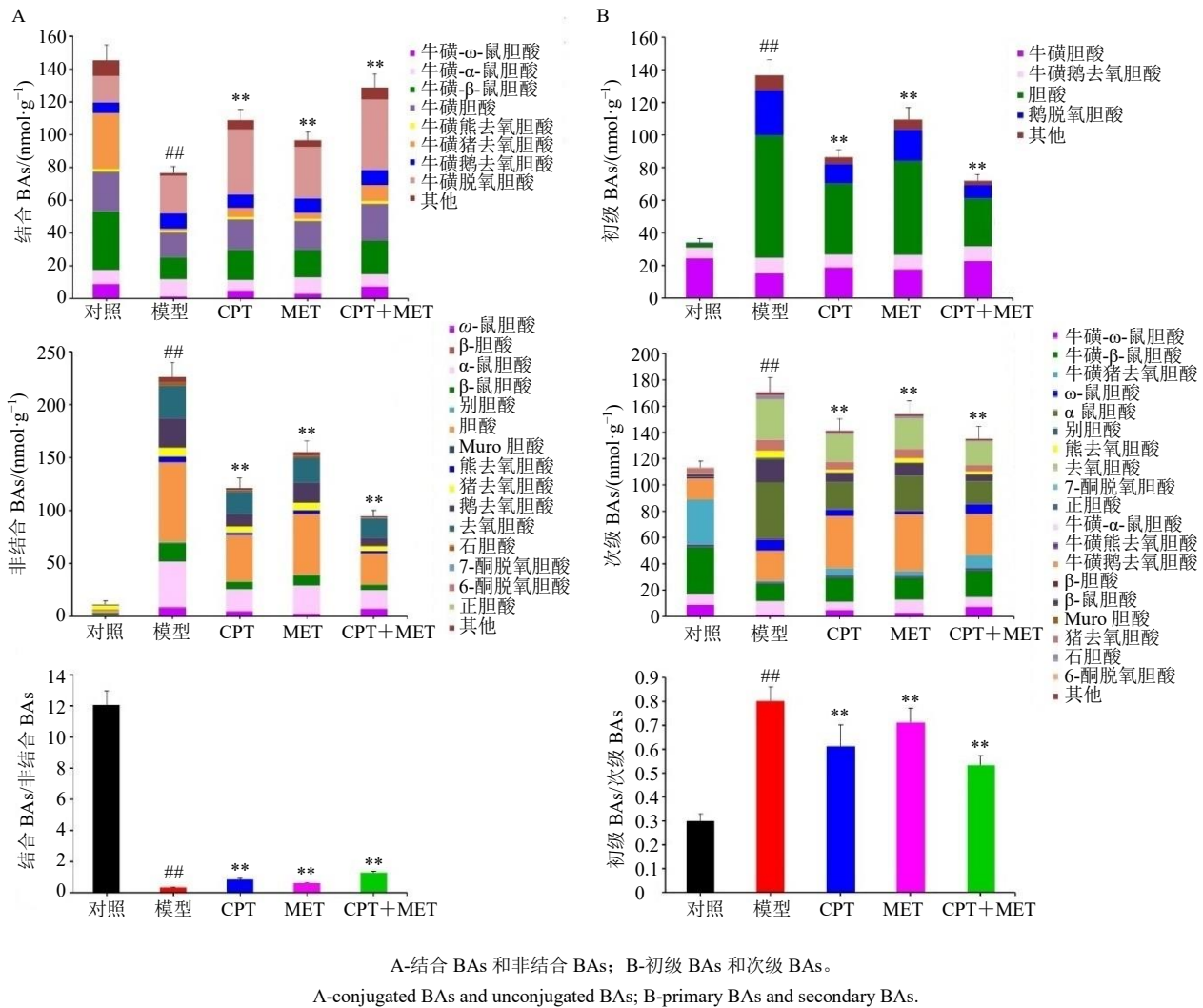


图 5 CPT 对高脂饮食诱导的 MAFLD 小鼠肝脏 (A)、血清 (B) 和粪便 (C) TBA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 5 Effect of CPT on TBA levels in liver tissue (A), serum (B) and fecal (C) of MAFLD mice induced by high-fat diet ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

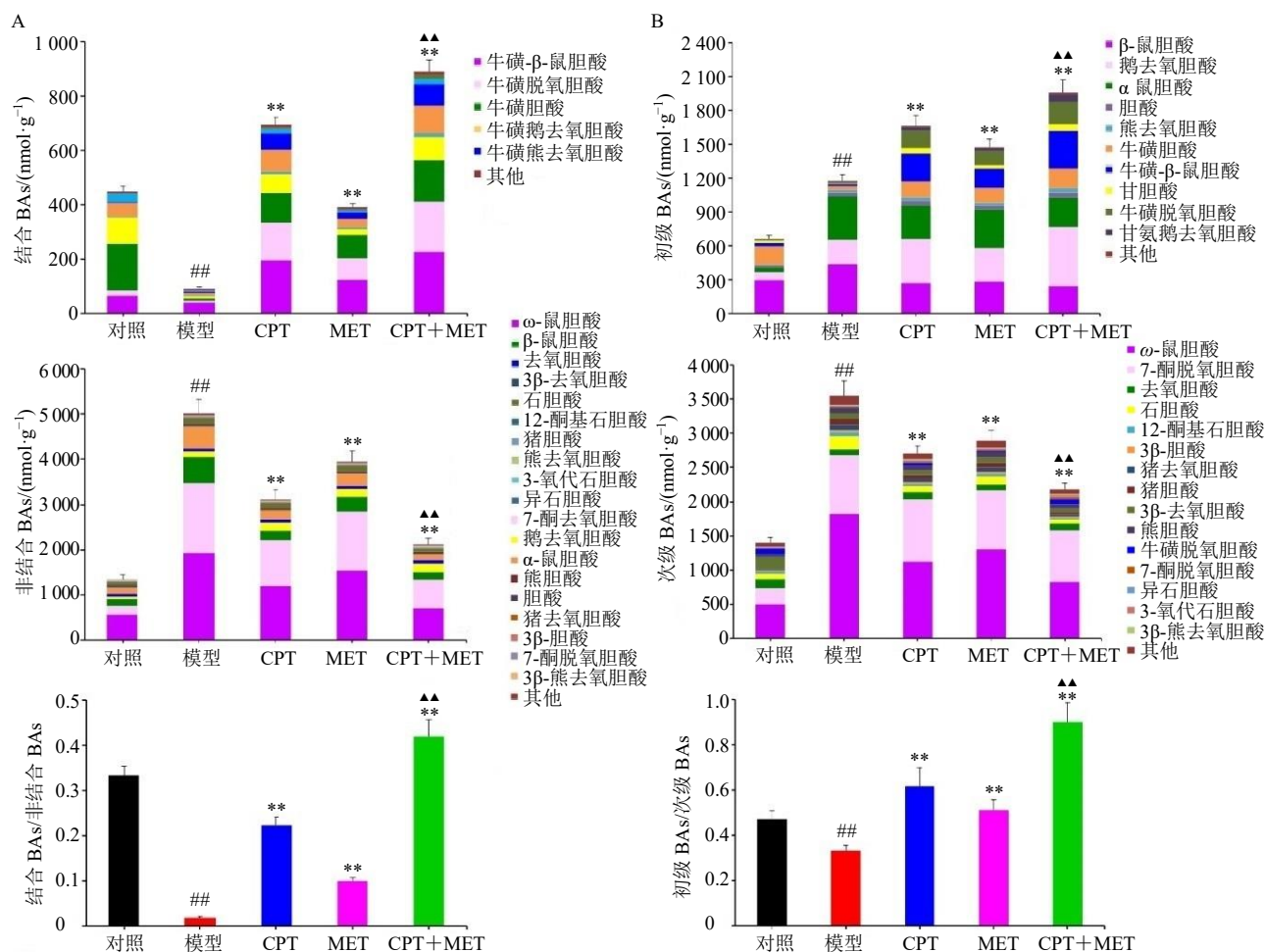
图 6 CPT 对高脂饮食诱导的 MAFLD 小鼠肝组织中 BAs 组成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)Fig. 6 Effect of CPT on BAs composition in liver tissue of MAFLD mice induced by high-fat diet ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

量和结合 BAs/非结合 BAs 值明显降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 给予 CPT、MET 和联用治疗后, 小鼠肝组织中非结合 BAs、初级 BAs、次级 BAs 含量和初级 BAs/次级 BAs 值显著降低 ($P < 0.01$), 结合 BAs 含量和结合 BAs/非结合 BAs 值明显升高 ($P < 0.01$); 与 CPT 组比较, 给予 CPT 和 MET 联用治疗后, 小鼠肝组织中非结合 BAs、初级 BAs、次级 BAs 含量和初级 BAs/次级 BAs 值显著降低 ($P < 0.01$), 结合 BAs 含量和结合 BAs/非结合 BAs 值明显升高 ($P < 0.01$)。表明 CPT 可促进肝脏 BAs 合成, 进而降低肝脏中 TC 水平, 其中 CPT 与 MET 联用较 CPT 单独使用效果更好。

3.7 CPT 对高脂饮食诱导的 MAFLD 小鼠结肠内容物中 BAs 组成的影响

如图 7 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠结肠

内容物中非结合 BAs、初级 BAs 和次级 BAs 含量显著升高 ($P < 0.01$), 结合 BAs 含量、结合 BAs/非结合 BAs 值和初级 BAs/次级 BAs 值明显降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 给予 CPT、MET 和联用治疗后, 小鼠结肠内容物中非结合 BAs、次级 BAs 含量明显降低 ($P < 0.01$), 结合 BAs 含量、结合 BAs/非结合 BAs 值和初级 BAs/次级 BAs 值显著升高 ($P < 0.01$), 初级 BAs 含量进一步升高 ($P < 0.01$); 与 CPT 组比较, 给予 CPT 和 MET 联用治疗后, 小鼠结肠内容物中非结合 BAs、次级 BAs 含量明显降低 ($P < 0.01$), 结合 BAs 含量、初级 BAs 含量、结合 BAs/非结合 BAs 值和初级 BAs/次级 BAs 值显著升高 ($P < 0.01$)。表明 CPT 可改善高脂饮食诱导的 MAFLD 小鼠结肠中 BAs 代谢, 其中 CPT 与 MET 联用较 CPT 单独使用效果更好。



A-结合 BAs 和非结合 BAs; B-初级 BAs 和次级 BAs。

A-conjugated BAs and unconjugated BAs; B-primary BAs and secondary BAs.

图 7 CPT 对高脂饮食诱导的 MAFLD 小鼠结肠内容物中 BAs 组成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 7 Effect of CPT on BAs composition in colonic content of MAFLD mice by high-fat diet ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3.8 CPT 对高脂饮食诱导的 MAFLD 小鼠肝组织和回肠组织中调控 BAs 代谢相关基因和蛋白表达的影响

鉴于 CPT 对 BAs 代谢具有强大的调节作用, 采用 qRT 和 Western blotting 进一步证实肝脏和回肠中调控 BAs 代谢相关基因参与了此过程。如图 8-A、B 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肝组织中调控 BAs 合成的 *Cyp7a1*、*Cyp7b1*、*Cyp8b1*、*Bacs* mRNA 和 *Cyp7a1*、*Cyp7b1*、*Cyp8b1* 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$), *Cyp27a1*、*Baat* mRNA 和 *Cyp27a1* 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$); 参与 BAs 合成信号传导的 *FXR*、*SHP* mRNA 和蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$), *FGFR4* mRNA 和蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$); 参与调控 BAs 重吸收和转运的 *Bsep*、*Ntcp* mRNA 表达水平明显降低 ($P <$

0.01)。与模型组比较, 给予 CPT、MET 和联用治疗后, 小鼠肝组织中 *Cyp7a1*、*Cyp7b1*、*Bacs* mRNA 和 *Cyp7a1*、*Cyp7b1* 蛋白表达水平进一步升高 ($P < 0.01$), *Cyp27a1*、*Baat*、*FXR*、*SHP*、*Bsep*、*Ntcp* mRNA 和 *Cyp27a1*、*FXR*、*SHP* 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$), *Cyp8b1*、*FGFR4* mRNA 和蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$); 与 CPT 组比较, 给予 CPT 和 MET 联用治疗后, 小鼠肝组织中 *Cyp7a1*、*Cyp7b1*、*Bacs* mRNA 和 *Cyp7a1*、*Cyp7b1* 蛋白表达水平升高 ($P < 0.01$), *Cyp27a1*、*Baat*、*FXR*、*SHP*、*Bsep*、*Ntcp* mRNA 和 *Cyp27a1*、*FXR*、*SHP* 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$), *Cyp8b1*、*FGFR4* mRNA 和蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。

如图 8-C、D 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠回肠组织中参与 BAs 转运的 *Asbt*、*Ibabp*、*Ost-α*、

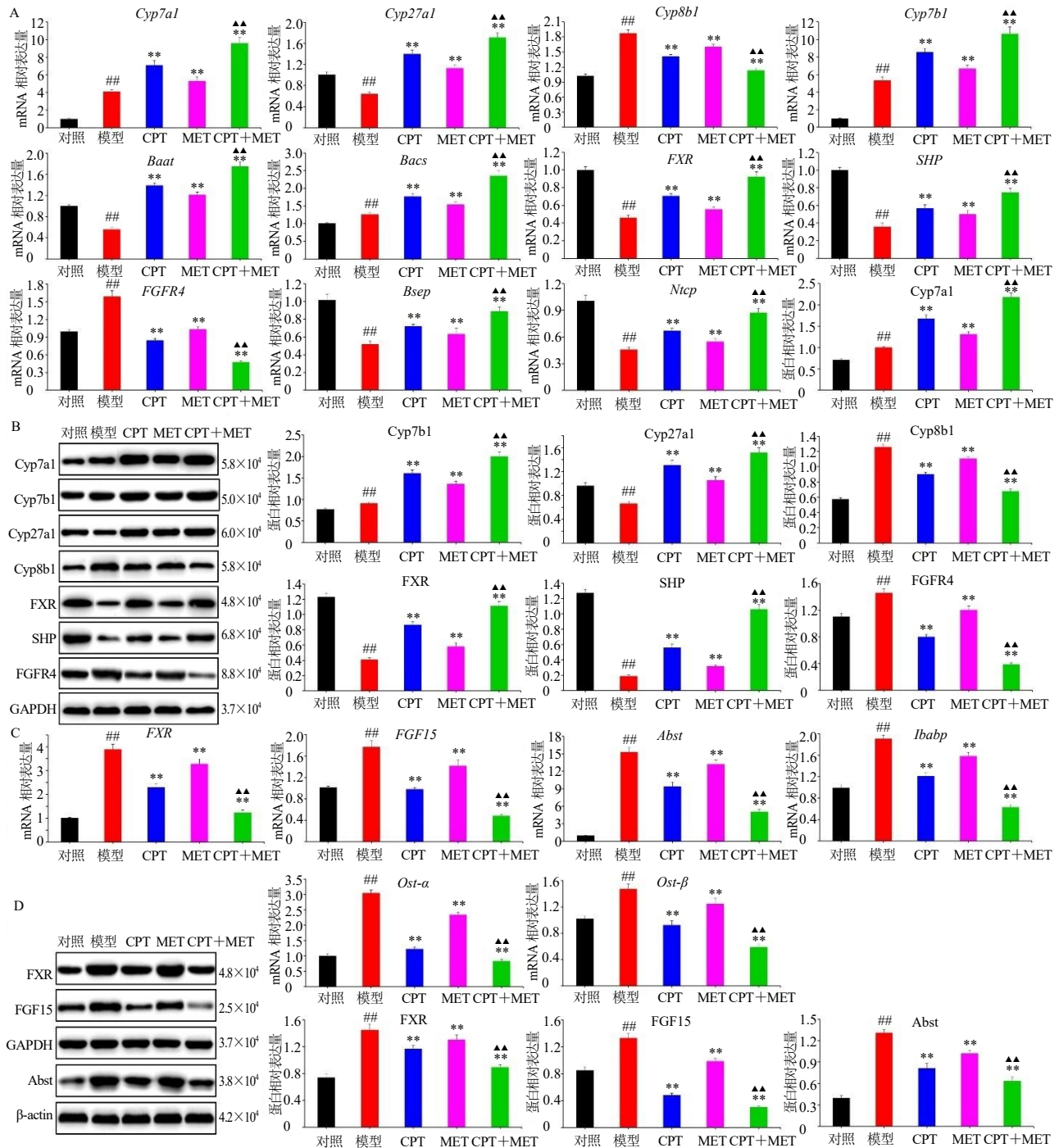


图8 CPT对高脂饮食诱导的MAFLD小鼠肝组织(A、B)和回肠组织(C、D)中调控BAs代谢相关基因和蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 8 Effect of CPT on expressions of regulating BAs metabolism related genes and proteins in hepatic tissues (A, B) and ileum tissues (C, D) of MAFLD mice by high-fat diet ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Ost- β mRNA 和 *Asbt* 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$), 参与 BAs 合成信号传导的 *FXR*、*FGF15* mRNA 和蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 给予 CPT、MET 和联用治疗后, 小鼠回肠组织中 *FXR*、*FGF15*、*Asbt*、*Ibabp*、*Ost- α* 、*Ost- β* mRNA 和 *FXR*、*FGF15*、*Asbt* 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。表明 CPT 可通

Asbt mRNA 和 *FXR*、*FGF15*、*Asbt* 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$); 与 CPT 组比较, 给予 CPT 和 MET 联用治疗后, 小鼠回肠组织中 *FXR*、*FGF15*、*Asbt*、*Ibabp*、*Ost- α* 、*Ost- β* mRNA 和 *FXR*、*FGF15*、*Asbt* 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。表明 CPT 可通

过增强肝脏中 BAs 的合成和促进其结合, 减弱 BAs 回肠再吸收, 进而促进其从肠道中排出来调节 BAs 代谢, 其中 CPT 与 MET 联用较 CPT 单独使用效果更好。此结果与“3.5”项下给予 CPT 治疗后小鼠肝组织和粪便中 TBA 水平显著升高、血清 TBA 水平明显降低一致。

3.9 CPT 对高脂饮食诱导的 MAFLD 小鼠肝组织中调控脂质代谢相关基因和蛋白表达的影响

脂质代谢功能障碍在 MAFLD 进展中起着关键作用, 专注于促进肝脏和脂肪组织脂质代谢策略已被认为是治疗 MAFLD 重要途径之一^[25]。如图 9 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肝组织中参与调控脂质合成的 SREBP-1c、SCD1、FASN mRNA 和蛋白表达水平明显升高 ($P<0.01$), 参与促进脂质氧

化和分解的 PPAR α 、CPT1 和 LPL、MTTP mRNA 和蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 给予 CPT、MET 和联用治疗后, 小鼠肝组织中 SREBP-1c、SCD1、FASN mRNA 和蛋白表达水平明显降低 ($P<0.01$), PPAR α 、CPT1、LPL 和 MTTP mRNA 和蛋白表达显著升高 ($P<0.01$); 与 CPT 组比较, 给予 CPT 和 MET 联用治疗后, 小鼠肝组织中 SREBP-1c、SCD1、FASN mRNA 和蛋白表达水平明显降低 ($P<0.01$), PPAR α 、CPT1、LPL 和 MTTP mRNA 和蛋白表达水平显著升高 ($P<0.01$)。表明 CPT 可通过抑制肝脏中脂质合成、促进其脂质氧化和分解, 减少脂质在肝脏的沉积, 进而发挥对高脂饮食诱导的小鼠 MAFLD 的治疗作用, 其中 CPT 与 MET 联用较 CPT 单独使用效果更好。

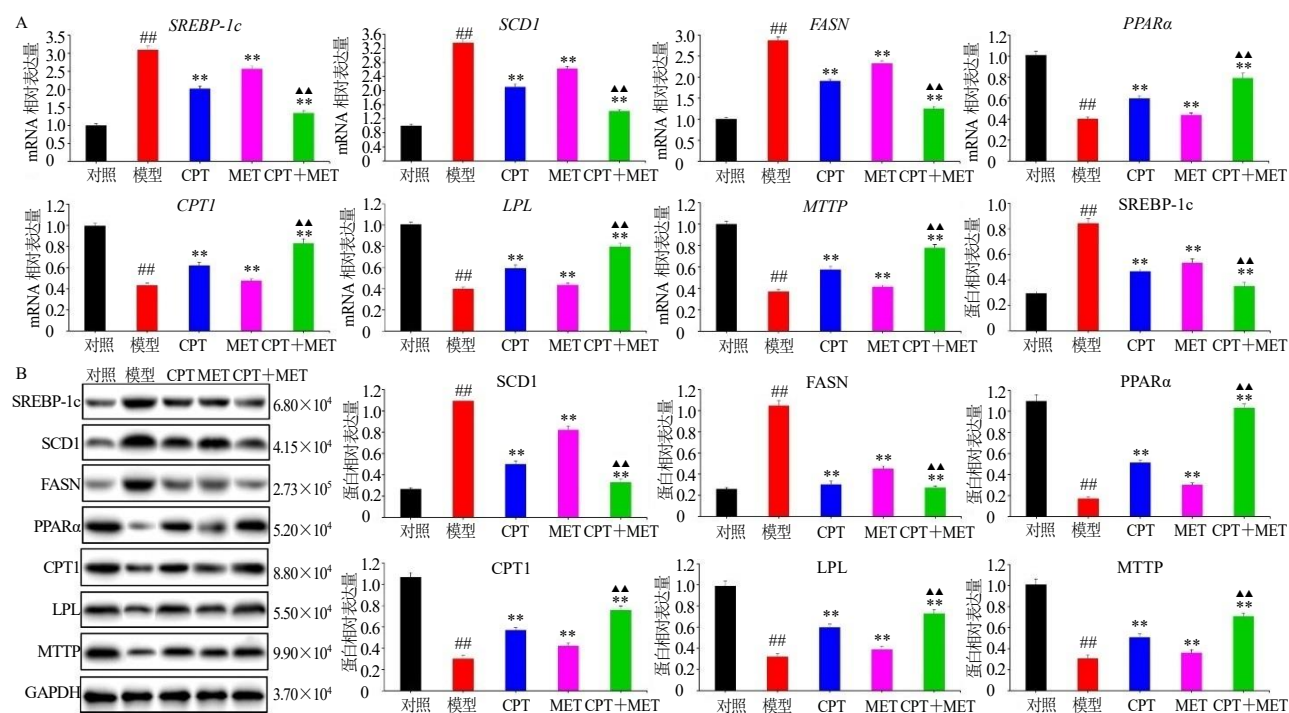


图 9 CPT 对高脂饮食诱导的 MAFLD 小鼠肝组织中调控脂质代谢相关基因 (A) 和蛋白 (B) 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 9 Effect of CPT on expressions of regulating lipid metabolism related genes (A) and proteins (B) in liver tissues of MAFLD mice induced by high-fat diet ($\bar{x} \pm s, n=5$)

4 讨论

MAFLD 是一种慢性肝病, 影响全球约 24% 的成年人^[26]。脂肪变性或肝内 TG 积聚增加是 MAFLD 的典型特征^[27]。研究发现 MAFLD 患者血浆和肝组织中 BAs 水平升高^[8-9]; 而 BAs 仅在肝细胞中合成, 对脂质代谢至关重要^[28]; BAs 是 TC 代谢的最终产物^[29]; TC 在进入肠道后, 初级胆汁酸促进脂质消化, 并被肠道细菌转化为次级胆汁酸。大约 95%

的肠道 BAs 被肠壁吸收, 然后通过门静脉返回肝脏。从肝细胞中, 吸收的 BAs 和新形成的结合 BAs 通过胆管排入肠道, 这一过程称为 BAs 的肠肝循环^[30]。BAs 稳态对于维持正常的脂质代谢至关重要^[31-32]。越来越多的证据表明, BAs 代谢异常会导致脂质代谢失调, 从而促进 MAFLD 的发生和发展^[33-35]。Lu 等^[36]研究发现 MAFLD 患者 BAs 谱发生了变化, 血清 TBA 水平升高。在 MAFLD 中,

BA_s 可以通过调节 FXR 和 SHP 的表达及其下游信号通路来改善糖脂代谢^[4,33]。因此, BA_s 及其受体对于维持正常的全身能量代谢和肝脏脂质代谢至关重要^[37]。青钱柳是我国特有的中药资源, 其叶被用作治疗肥胖和高脂血症的重要药物^[14]。CPT 是青钱柳叶中的重要成分, 其防治 MAFLD 作用主要归功于减轻肝脂肪变性和改善肠道屏障, 特别是通过抑制体质量增加、降低肝脏 TC 和 TG 水平、改善脂质紊乱和 IR 降低肠道通透性和血清促炎因子水平, 其作用机制与调节 Sirt1/AMPK 和 TLR4/NF- κ B/NLRP3 有关^[15-18]。然而, 很少有将肠道和肝脏的 BA_s 代谢与肝脏脂质代谢作为 CPT 抗 MAFLD 作用的潜在靶点开展研究。本研究旨在探索 CPT 对高脂饮食诱导 MAFLD 小鼠 BA_s 和脂质代谢的影响, 以进一步探索其对 MAFLD 的改善作用及可能机制, 以期为 CPT 防治 MAFLD 提供理论依据。

本研究结果显示, 与模型组比较, CPT 组小鼠结肠内容物中 BA_s 水平升高, 肝脏和粪便中 TBA 水平, 血液 TBA 水平下降, 表明 CPT 干预后 TBA 合成和排泄均有所增强。BA_s 通过 2 种途径合成并维持 TC 稳态, 包括经典途径和替代途径。通过限速酶 (Cyp7a1 和 Cyp8b1) 产生胆酸会激活经典途径, 而通过限速酶类 (Cyp27a1 和 Cyp7b1) 产生鹅脱氧胆酸会激活替代途径, 然后立即进入胆囊储存^[38]。Wei 等^[39]研究证实 BA_s 替代途径的激活被认为对葡萄糖和脂质代谢有有益的影响, 因为经典途径衍生的 12 α -羟化胆汁酸 (胆酸、脱氧胆酸、7 α -羟基胆固醇) 减少, 替代途径衍生的非 12 α -羟化胆汁酸 (鹅脱氧胆酸、27-羟基胆固醇、熊脱氧胆酸及其结合物) 增加。Jiao 等^[9]和 Lake 等^[40]研究发现, 在 MAFLD 患者血清中初级 BA_s 和次级 BA_s 水平较健康患者均出现明显的升高, 结合 BA_s 水平出现显著的降低, 并证实升高结合 BA_s 水平可减轻 MAFLD 发生发展中内源性 BA_s 毒性。本研究发现 CPT 增加了结肠内容物中结合 BA_s 水平、结合 BA_s/非结合 BA_s 值和初级/次级 BA_s 值及肝脏中结合 BA_s 水平和结合 BA_s/非结合 BA_s 值。Bertaggia 等^[41]研究发现 Cyp7b1 和 Cyp8b1 是 BA_s 合成中的关键酶, 决定了非 12 α -羟化胆汁酸与 12 α -羟化胆汁酸的比例; Jia 等^[42]在 MAFLD 患者中观察到肝脏 Cyp7b1 表达显著降低, 这为 BA_s 产生的替代途径与代谢平衡之间的密切关联提供了强有力的证据。因此, Cyp8b1 的缺失或下调以及 Cyp7b1 的上调会导致非

12 α -羟化胆汁酸的增加和 12 α -羟化胆汁酸/12 α -羟化胆汁酸值的降低, 从而对机体的代谢状态产生积极影响。本研究发现 CPT 显著增加了肝组织中 Cyp7a1、Cyp7b1 和 Cyp27a1 mRNA 和蛋白表达水平, 降低了 Cyp8b1 mRNA 和蛋白表达水平, 表明 CPT 可通过替代途径激活 BA_s 合成并改变结肠内容物中 BA_s 组成; 同时, CPT 促进了肝组织中 Bacs 和 Baat mRNA 表达, Bacs 和 Baat 与甘氨酸或牛磺酸结合中发挥作用, 导致结合 BA_s 水平明显升高。研究发现 BA_s 对脂质的调节取决于 BA_s 的亲水性, 共轭反应增强了游离 BA_s 的亲水性^[22-23,43]。本研究发现给予 CPT 治疗后, 结肠内容物中初级 BA_s 和结合 BA_s 水平升高, BA_s 池的亲水性增加, 从而减少了肠道对 TC 和脂肪的吸收, 其中 CPT 与 MET 联用较 CPT 单独使用效果更好, 此结果与 CPT 治疗后肝脏中和粪便 TBA 水平升高一致。

越来越多的研究证实 FXR 在 BA_s、脂质和葡萄糖代谢中发挥重要作用, FXR 肠道特异性缺失对 HFD 诱导的小鼠肝脂肪变性和肥胖具有改善作用^[44-45]。Sayin 等^[46]研究发现抗氧化剂 tempol 处理的小鼠表现出 BA_s 成分的改变、肠道 FXR 特异性破坏以及高脂饮食诱导的小鼠肝脏 TG 积累的减少。Sun 等^[47]发现, MET 可以通过诱导结合的甘氨酸去氧胆酸的积累来调节人体血糖水平, 导致回肠中 FXR 信号传导减少, 表明结合 BA_s 在代谢性疾病中抑制 FXR 表达起着重要作用。本研究发现 CPT 可显著增加 MAFLD 小鼠回肠中结合 BA_s 水平, 而其中增加的牛磺- β -鼠胆酸是一种天然存在的 FXR 拮抗剂, 这为增强回肠中的 FXR 抑制来促进肝脏中的 BA_s 合成为了可能^[48]。BA_s 代谢受肠道 FXR/FGF15 和肝脏 FGFR4/FXR/SHP 信号通路调节, 它们可用于改善高脂饮食诱导的脂肪变性和肥胖的状况^[22-23]。本研究发现, CPT 干预后回肠中 FXR、FGF15 mRNA 和蛋白表达水平降低, 肝脏中 FGFR4 mRNA 和蛋白表达水平降低, FXR 和 SHP mRNA 和蛋白表达水平升高, 表明 CPT 可以以此特定的方式影响肠肝循环, 其中 CPT 与 MET 联用较 CPT 单独使用效果更好。这些结果与 Huang 等^[22]和 Sun 等^[23,47]发现结合 BA_s 在结肠中的大量积累是抑制肠道 FXR、FGF15 的主要原因一致。

BA_s 池主要由来自血清、肝脏和肠道组织的 BA_s 组成。在体内 BA_s 代谢过程中, 大约 95% 的 BA_s 通过 Asbt 被肝脏重新吸收, 以维持 BA_s 池的

大小^[22]。CPT 对 MAFLD 小鼠肝脂肪变性的治疗作用可以通过降低回肠中 Asbt mRNA 和蛋白表达来解释,这导致了血液中 BAs 水平降低。此外,再吸收减少与粪便 BAs 排泄增加有关。CPT 显著抑制了回肠中 *Ibabp*、*Ost-α* 和 *Ost-β* mRNA 表达,从而直接促进肠道 BAs 吸收和粪便排泄。此外,肠肝循环的驱动因素依赖于 CPT 干预后 *Bsep* 和 *Ntcp* 表达的增加,以减轻肝脏 TC 积聚。CPT 可通过调节 BAs 合成、肠肝循环、再吸收和排泄,可以减少肝脂肪变性和积聚,其作用机制与肝脏/FGFR4/FXR/SHP 和肠道 FXR/FGF15 信号通路的协同调节有关。

越来越多的研究证实 FXR 在调节脂质代谢中起着重要作用^[4,49]。在肝脏中,FXR 被激活后,主要通过以下途径调节脂质代谢并维持 BAs 稳态:首先,上调 SHP 表达和抑制 SREBP-1c 表达^[49-50]。SREBP-1c 是脂肪生成的关键调节因子,其下调可以显著降低脂肪生成相关基因如 *FASN* 和 *SCD1* 的

表达,从而抑制脂质沉积^[51]。其次,激活 PPARα,上调 CPT-1 表达,促进脂肪酸氧化^[50,52]。最后,通过诱导载脂蛋白 CII 的表达和抑制载脂蛋白 CIII 表达,从而激活 LPL,促进 TG 的分解,上调 MTTP 和极低密度脂蛋白受体表达上调,从而促进 TG 从肝脏的运输和清除^[53-54]。本研究结果表明 CPT 显著增加 MAFLD 小鼠肝组织中 FXR、SHP mRNA 和蛋白表达,下调肝组织中 SREBP1、SCD1、*FASN* mRNA 和蛋白表达,进而抑制脂质合成;上调肝组织中 PPARα、CPT1 mRNA 和蛋白表达,从而增强脂肪酸氧化;CPT 还上调了肝组织中 LPL 和 MTTP 的表达,从而促进脂质分解。此结果与其对 MAFLD 小鼠葡萄糖紊乱、能量代谢、血脂,肝脏脂肪变性、脂滴聚集的改善一致(图 10)。上述结果表明 CPT 可通过上调 FXR 表达来调节脂质代谢通路来发挥对 MAFLD 小鼠的治疗作用,其中 CPT 与 MET 联用较 CPT 单独使用效果更好。

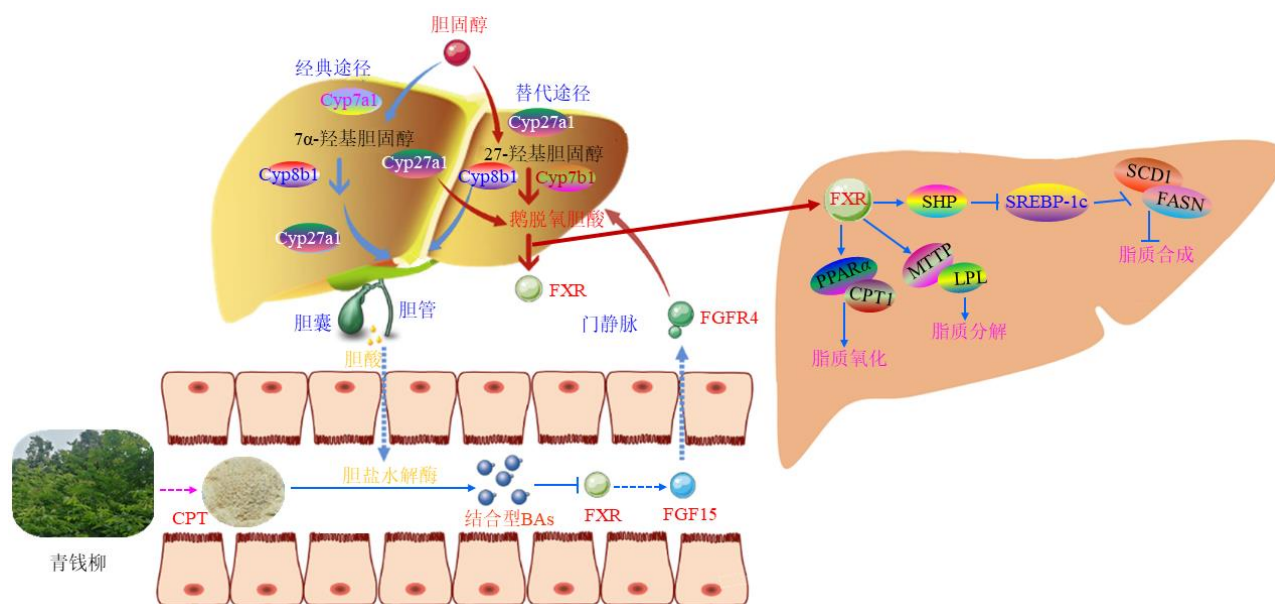


图 10 CPT 治疗 MAFLD 的作用机制

Fig. 10 Mechanism of CPT in treatment of MAFLD

综上,CPT 对高脂饮食诱导的小鼠 MAFLD 具有较好的治疗作用,其作用机制与抑制肠道 FXR/FGF15 信号传导,进而激活肝脏 FXR/SHP 通路,促进肝肠循环中 BAs 合成,抑制其回肠再吸收、促进 BAs 随粪便排泄;激活的肝脏 FXR/SHP 通路通过抑制 SREBP1/SCD1/FASN 信号轴来抑制脂质合成,激活的肝脏 FXR 通过激活 PPARα/CPT1 和 LPL/MTTP 信号轴来促进脂质氧化和脂质分解密切相关。本研究为阐明 CPT 治疗 MAFLD 机制提供了

新视角,有望成为治疗 MAFLD 的新型候选药物。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Shen S W, Liu Y, Wang N Y, *et al.* The role of microbiota in nonalcoholic fatty liver disease: Mechanism of action and treatment strategy [J]. *Front Microbiol*, 2025, 16: 1621583.
- [2] Li M X, Jia H R, Zhang L, *et al.* Palmitoylation-dependent modulation of CD36 trafficking and signaling integrates lipid uptake with metabolic disease pathogenesis [J].

- Pharmacol Res*, 2025, 220: 107935.
- [3] Liu H C, Sun Y L, Nie C X, *et al.* Highland barley β -glucan alleviated western diet-induced non-alcoholic fatty liver disease via increasing energy expenditure and regulating bile acid metabolism in mice [J]. *Food Funct*, 2022, 13(22): 11664-11675.
 - [4] Li H S, Xi Y F, Xin X, *et al.* Gypenosides regulate farnesoid X receptor-mediated bile acid and lipid metabolism in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis [J]. *Nutr Metab*, 2020, 17: 34.
 - [5] 胥玉珍, 曲珍妮, 吕佳, 等. 基于肠道菌群、胆汁酸代谢的中医药预防和治疗肥胖作用机制研究进展 [J]. *中草药*, 2025, 56(16): 6073-6084.
 - [6] Wu Y, Xu Y, Cai H, *et al.* Overexpression of SULT1E1 alleviates salt-processed *Psoraleae Fructus*-induced cholestatic liver damage [J]. *Chin Herb Med*, 2025, 17(2): 392-403.
 - [7] Zhuang T X, Wang X J, Wang Z X, *et al.* Biological functions and pharmacological behaviors of bile acids in metabolic diseases [J]. *J Adv Res*, 2025, 75: 779-792.
 - [8] Smirnova E, Muthiah M D, Narayan N, *et al.* Metabolic reprogramming of the intestinal microbiome with functional bile acid changes underlie the development of NAFLD [J]. *Hepatology*, 2022, 76(6): 1811-1824.
 - [9] Jiao N, Baker S S, Chapa-Rodriguez A, *et al.* Suppressed hepatic bile acid signalling despite elevated production of primary and secondary bile acids in NAFLD [J]. *Gut*, 2018, 67(10): 1881-1891.
 - [10] Lopez-Pascual A, Russo-Cabrera J S, Ardaiz N, *et al.* Non-mitogenic FGF19 mRNA-based therapy for the treatment of experimental metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) [J]. *Clin Sci*, 2024, 138(20): 1265-1284.
 - [11] Feng Y, Liu C H, Yang J T, *et al.* Integrative analysis of non12-hydroxylated bile acid revealed the suppressed molecular map of alternative pathway in nonalcoholic steatohepatitis mice [J]. *FASEB J*, 2024, 38(22): e70167.
 - [12] 王凯平, 李文蕊, 宋梦姿, 等. 青钱柳的化学成分、药理作用及产品开发研究进展 [J]. *中国医院药学杂志*, 2023, 43(18): 2100-2104.
 - [13] 黄璐琦. 中国中药资源大典-天津卷 [M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2020: 183-185.
 - [14] Zhao M G, Sheng X P, Huang Y P, *et al.* Triterpenic acids-enriched fraction from *Cyclocarya paliurus* attenuates non-alcoholic fatty liver disease via improving oxidative stress and mitochondrial dysfunction [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 104: 229-239.
 - [15] Zheng X, Zhang X G, Liu Y, *et al.* Arjunolic acid from *Cyclocarya paliurus* ameliorates nonalcoholic fatty liver disease in mice via activating Sirt1/AMPK, triggering autophagy and improving gut barrier function [J]. *J Funct Foods*, 2021, 86: 104686.
 - [16] 赵梦鸽, 杨慧敏, 蒋翠花, 等. 青钱柳三萜化合物对游离脂肪酸诱导的脂肪变性的干预作用 [J]. *中国药科大学学报*, 2018, 49(3): 333-340.
 - [17] Li J, He J Y, He H B, *et al.* Sweet triterpenoid glycoside from *Cyclocarya paliurus* ameliorates obesity-induced insulin resistance through inhibiting the TLR4/NF- κ B/NLRP3 inflammatory pathway [J]. *Curr Res Food Sci*, 2024, 8: 100677.
 - [18] Chen J, Zhou Y B, Liu Z H, *et al.* Hepatic glycogenesis antagonizes lipogenesis by blocking S1P via UDPG [J]. *Science*, 2024, 383(6684): eadi3332.
 - [19] 高艳艳, 薛茹云, 徐芳莹, 等. 茵陈蒿汤成分配伍对高脂诱导小鼠代谢相关脂肪性肝病的治疗作用 [J/OL]. *浙江大学学报: 医学版*, (2025-11-19) [2026-01-12]. <https://link.cnki.net/urlid/33.1248.R.20251118.1738.002>.
 - [20] Yang Z H, Hao Y M, Wang Z Y, *et al.* 5-Heptadecylresorcinol ameliorates high-fat diet induced non-alcoholic fatty liver disease through modulating bile acid profile and suppressing inflammation [J]. *J Sci Food Agric*, 2025, 105(14): 7944-7954.
 - [21] Yang S M, Duan Z G, Zhang S, *et al.* Ginsenoside Rh4 improves hepatic lipid metabolism and inflammation in a model of NAFLD by targeting the gut liver axis and modulating the FXR signaling pathway [J]. *Foods*, 2023, 12(13): 2492.
 - [22] Huang Y Z, Chen H, Chen J L, *et al.* Yellow tea polysaccharides protect against non-alcoholic fatty liver disease via regulation of gut microbiota and bile acid metabolism in mice [J]. *Phytomedicine*, 2024, 133: 155919.
 - [23] Sun J Y, Fan J M, Li T T, *et al.* Nuciferine protects against high-fat diet-induced hepatic steatosis via modulation of gut microbiota and bile acid metabolism in rats [J]. *J Agric Food Chem*, 2022, 70(38): 12014-12028.
 - [24] 房姝含, 许彦哲, 罗益, 等. 石斛碱对非酒精性脂肪性肝病小鼠肝脏脂肪酸代谢的影响及机制 [J]. *遵义医科大学学报*, 2025, 48(8): 775-782.
 - [25] Liu Y W, Luo R Y, Liu A Q, *et al.* Identification of chikusetsusaponin IVa as a novel lysine-specific demethylase 1 inhibitor that ameliorates high fat diet-induced MASLD in mice [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2025, 46(3): 632-652.
 - [26] Araújo A R, Rosso N, Bedogni G, *et al.* Global epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: What we need in the future [J]. *Liver Int*, 2018, 38(Suppl 1): 47-51.
 - [27] Fabbrini E, Sullivan S, Klein S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: Biochemical, metabolic, and clinical

- implications [J]. *Hepatology*, 2010, 51(2): 679-689.
- [28] Staels B, Fonseca V A. Bile acids and metabolic regulation: Mechanisms and clinical responses to bile acid sequestration [J]. *Diabetes Care*, 2009, 32(Suppl 2): S237-S245.
- [29] Yu Q W, Jiang Z Z, Zhang L Y. Bile acid regulation: A novel therapeutic strategy in non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 190: 81-90.
- [30] Dawson P A. Hepatic bile acid uptake in humans and mice: Multiple pathways and expanding potential role for gut-liver signaling [J]. *Hepatology*, 2017, 66(5): 1384-1386.
- [31] Sun R B, Yang N, Kong B, *et al.* Orally administered berberine modulates hepatic lipid metabolism by altering microbial bile acid metabolism and the intestinal FXR signaling pathway [J]. *Mol Pharmacol*, 2017, 91(2): 110-122.
- [32] Do H J, Lee Y S, Ha M J, *et al.* Beneficial effects of voglibose administration on body weight and lipid metabolism via gastrointestinal bile acid modification [J]. *Endocr J*, 2016, 63(8): 691-702.
- [33] Chávez-Talavera O, Tailleux A, Lefebvre P, *et al.* Bile acid control of metabolism and inflammation in obesity, type 2 diabetes, dyslipidemia, and nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(7): 1679-1694.
- [34] Li Y Y, Jadhav K, Zhang Y Q. Bile acid receptors in non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 86(11): 1517-1524.
- [35] Yuan L Y, Bambha K. Bile acid receptors and nonalcoholic fatty liver disease [J]. *World J Hepatol*, 2015, 7(28): 2811-2818.
- [36] Lu L P, Wan Y P, Xun P C, *et al.* Serum bile acid level and fatty acid composition in Chinese children with non-alcoholic fatty liver disease [J]. *J Dig Dis*, 2017, 18(8): 461-471.
- [37] Rao A, Kusters A, Mells J E, *et al.* Inhibition of ileal bile acid uptake protects against nonalcoholic fatty liver disease in high-fat diet-fed mice [J]. *Sci Transl Med*, 2016, 8(357): 357ra122.
- [38] Wahlström A, Sayin S I, Marschall H U, *et al.* Intestinal crosstalk between bile acids and microbiota and its impact on host metabolism [J]. *Cell Metab*, 2016, 24(1): 41-50.
- [39] Wei M L, Huang F J, Zhao L, *et al.* A dysregulated bile acid-gut microbiota axis contributes to obesity susceptibility [J]. *EBioMedicine*, 2020, 55: 102766.
- [40] Lake A D, Novak P, Shipkova P, *et al.* Decreased hepatotoxic bile acid composition and altered synthesis in progressive human nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 268(2): 132-140.
- [41] Bertaggia E, Jensen K K, Castro-Perez J, *et al.* Cyp8b1 ablation prevents Western diet-induced weight gain and hepatic steatosis because of impaired fat absorption [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2017, 313(2): E121-E133.
- [42] Jia W, Wei M L, Rajani C, *et al.* Targeting the alternative bile acid synthetic pathway for metabolic diseases [J]. *Protein Cell*, 2021, 12(5): 411-425.
- [43] Ridlon J M, Kang D J, Hylemon P B. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria [J]. *J Lipid Res*, 2006, 47(2): 241-259.
- [44] Qi Y C, Ma Y G, Duan G Z. Pharmacological mechanisms of bile acids targeting the farnesoid X receptor [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(24): 13656.
- [45] Zhang L, Chen J B, Yang X Y, *et al.* Hepatic Zbtb18 (zinc finger and BTB domain containing 18) alleviates hepatic steatohepatitis via FXR (farnesoid X receptor) [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 20.
- [46] Sayin S I, Wahlström A, Felin J, *et al.* Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist [J]. *Cell Metab*, 2013, 17(2): 225-235.
- [47] Sun L L, Xie C, Wang G, *et al.* Gut microbiota and intestinal FXR mediate the clinical benefits of metformin [J]. *Nat Med*, 2018, 24(12): 1919-1929.
- [48] Huang F J, Zheng X J, Ma X H, *et al.* Theabrownin from Pu-erh tea attenuates hypercholesterolemia via modulation of gut microbiota and bile acid metabolism [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 4971.
- [49] Arab J P, Karpen S J, Dawson P A, *et al.* Bile acids and nonalcoholic fatty liver disease: Molecular insights and therapeutic perspectives [J]. *Hepatology*, 2017, 65(1): 350-362.
- [50] Duan X P, Meng Q, Wang C Y, *et al.* Calycosin attenuates triglyceride accumulation and hepatic fibrosis in murine model of non-alcoholic steatohepatitis via activating farnesoid X receptor [J]. *Phytomedicine*, 2017, 25: 83-92.
- [51] Zhang Y Y, Meng T, Zuo L, *et al.* Xylometal B attenuates fatty acid-induced lipid accumulation via the SREBP-1c pathway in NAFLD models [J]. *Mar Drugs*, 2017, 15(6): 163.
- [52] 邓昕雨, 吴和霏, 李煜兵, 等. 基于胆汁酸代谢组学探讨芍药苷改善 α -萘异硫氰酸酯诱导胆汁淤积的作用机制 [J]. *中草药*, 2024, 55(1): 148-158.
- [53] Mazuy C, Helleboid A, Staels B, *et al.* Nuclear bile acid signaling through the farnesoid X receptor [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(9): 1631-1650.
- [54] Fuchs C D, Traussnigg S A, Trauner M. Nuclear receptor modulation for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Semin Liver Dis*, 2016, 36(1): 69-86.

[责任编辑 李亚楠]