

· 药理 ·

石斛合剂对2型糖尿病合并非酒精性脂肪肝大鼠 AMPK/TFEB 信号通路自噬蛋白的影响

庄舒婷, 张家林, 邹玉卿, 刘欣, 陈佳敏, 施红*
(福建中医药大学, 福州 350100)

[摘要] 目的:观察石斛合剂干预后,2型糖尿病(T2DM)合并非酒精性脂肪肝(NAFLD)大鼠腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)/转录因子EB(TFEB)自噬信号通路蛋白表达。方法:40只雄性SD大鼠,根据体质量随机选择10只作为正常组。其余30只大鼠高脂高糖饮食喂养6周,然后腹腔注射链脲佐菌素建立2型糖尿病合并非酒精性脂肪肝模型。分为正常组($10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),模型组($10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),二甲双胍组($100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),石斛合剂组($11.3\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),每组大鼠灌胃4周。灌胃结束后,对大鼠实施安乐死。取腹主动脉血、肝组织,检测各组大鼠空腹血糖(FBG),血清中糖化血清蛋白(GSP),胰岛素(INS),甘油三酯(TG),总胆固醇(TC),高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C),低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)含量;苏木素-伊红(HE)染色观察肝脏组织形态变化;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 AMPK/TFEB 信号通路相关蛋白的表达。结果:与模型组比较,石斛合剂组与二甲双胍组大鼠的FBG,GSP下降($P<0.05$),INS升高($P<0.05$);与模型组比较,石斛合剂组与二甲双胍组大鼠HDL升高($P<0.05$),TC,TG,LDL含量明显降低($P<0.05$)。石斛合剂与二甲双胍均能一定程度上改善T2DM合并NAFLD大鼠肝脏形态。石斛合剂与二甲双胍p-AMPK/AMPK升高($P<0.05$),TFEB,LC3 II表达升高($P<0.05$)。结论:石斛合剂可通过激活AMPK/TFEB自噬信号通路来改善糖脂代谢,改善肝脏病理形态。

[关键词] 石斛合剂;2型糖尿病(T2DM);非酒精性脂肪肝;自噬

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)24-0053-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202006

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200817.1612.004.html>

[网络出版日期] 2020-8-18 09:00

Effect of Shihu Mixture on Autophagy Protein of AMPK/TFEB Signaling Pathway in Rats with T2DM-NAFLD

ZHUANG Shu-ting, ZHANG Jia-lin, ZOU Yu-qing, LIU Xin, CHEN Jia-min, SHI Hong*
(Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350100, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the expression of adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK)/transcription factor EB (TFEB) autophagy signaling pathway protein in type 2 diabetes (T2DM) complicated with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) rats after intervention with Shihu mixture (SHM). **Method:** Among 40 male SD rats, 10 rats were randomly selected as normal group according to body weight. The remaining 30 rats were fed with high-fat and high-sugar diet for 6 weeks, and then intraperitoneally injected with streptozotocin (STZ) to establish a T2DM NAFLD model. They were divided into normal control group ($10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), model control group ($10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), metformin group ($100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), SHM group ($11.3\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$). The rats in each group were gavaged for 4 weeks. After gavage, the rats were euthanized. Abdominal aortic blood and liver tissue were collected to detect fasting blood glucose (FBS), glycated serum

[收稿日期] 20200513(002)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81973827);国家自然科学基金项目(81703909)

[第一作者] 庄舒婷,博士,从事中西医结合防治糖尿病方向研究,E-mail:18344981481@163.com

[通信作者] *施红,教授,从事中西医结合防治糖尿病方向研究,E-mail:shihong3327@sina.com

protein (GSP), insulin (INS), triglyceride (TG), total cholesterol (TC), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) content. Htoxylin eosin (HE) staining was performed to observe changes in liver tissue morphology. Western blot was used to detect AMPK/TFEB signaling pathway-related protein expression. **Result:** Compared with the model control group, FBS and GSP of the SHM group and the DMBG group decreased ($P<0.05$), while INS increased ($P<0.05$). Compared with the model group, HDL increased in the SHM group and the DMBG group ($P<0.05$), whereas TC, TG and LDL contents decreased ($P<0.05$). Liver HE staining results showed that both SHM and Metformin could improve the liver morphology of T2DM and NAFLD rats to some extent. Western blot results showed that p-AMPK/AMPK of SHM and metformin increased ($P<0.05$), while the expressions of TFEB and LC3 II increased ($P<0.05$). **Conclusion:** SHM can improve glucose and lipid metabolism by activating AMPK/TFEB autophagy signaling pathway, so as to improve liver pathological morphology.

[Key words] Shihu mixture (SHM); type 2 diabetes; non-alcoholic fatty liver disease; autophagy

非酒精性脂肪肝病(NAFLD)是2型糖尿病(T2DM)的常见并发症之一^[1]。研究表明,糖尿病与非酒精脂肪肝或许是通过胰岛素抵抗(IR),高血糖而相互发展^[2]。自噬是自我消化过量或有缺陷的细胞器以维持体内平衡的细胞内过程^[3],其与糖尿病合并肝损伤发病机制密切相关,肝脂质蓄积会产生IR,自噬受损等不良结果,最终导致肝损伤的进展^[4]。研究表明,早期通过调控自噬改善IR,肝脏脂质蓄积等对于糖尿病合并肝损伤具有十分重要的意义。目前临床上尚无针对糖尿病合并肝损伤的有效方法。因此探寻有效的治疗方法并阐释其抗糖尿病合并肝损伤的分子机制尤为迫切。

糖尿病属于中医“消渴”范畴,中医认为热、瘀、毒等是糖尿病肝损伤的病因,因此可以通过清热、活血、祛毒等方法治疗糖尿病肝损伤。本课题组经临床-基础反复探索,形成了清热活血祛毒的石斛合剂(已获国家发明专利,专利号ZL201110408411.0)。石斛合剂经多中心临床研究表明,可降糖调脂,改善IR,临床疗效确切^[5]。经多批次基础研究均证实该方具有减轻高血糖鼠IR,降糖调脂,抗氧化应激,减轻炎症,抑制肝损伤,改善肝功能及肝组织形态等多种功效^[6-7]。

本实验通过动物实验建立T2DM合并NAFLD模型并探讨腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)/转录因子EB(TFEB)自噬信号通路与T2DM合并NAFLD的关系,不仅有助于揭示清热活血祛毒方石斛合剂靶向自噬、抗糖尿病合并肝损伤的分子机制,而且有助于进一步揭示糖尿病消渴“内热瘀毒”病机的微观科学内涵,对于阐明石斛合剂防治糖尿病合并肝损伤、重塑肝正常形态结构具有重要理论和实际应用价值。

1 材料

1.1 动物 40只健康清洁级雄性SD大鼠,合格证号SCXK(沪)2017-0002,5周龄,体质量(180 ± 10)g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,喂养于福建中医药大学动物实验中心(SPF级),动物实验已通过福建中医药大学动物伦理委员会审定[批准编号(2020)福中医动物伦理审字第(016)号]。

1.2 石斛合剂制备 所有药材均来自福建中医药大学科研耗材平台采购,石斛合剂由石斛15g,知母10g,黄芪20g,丹参15g,葛根10g,黄连6g,五味子10g,地龙9g,蒲公英15g,大黄3g药物组成。用水没过药材浸泡30min,煮开后持续30min,过滤药液,再次加水,煮开30min,滤出药液,将2次药液混合,用纱布过滤,最后浓缩为 $2\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,将药液按100mL分装,密封保存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱,临用解冻并水浴加热。

1.3 试剂 链脲佐菌素(麦克林企业有限公司,货号18883-66-4);盐酸二甲双胍(格华止,中美上海施贵宝制药有限公司,批号1302094);总胆固醇(T-CHO)测试盒,低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)测试盒,高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)测试盒,糖化血清蛋白,甘油三酯(TG)测试盒(南京建成生物工程研究所,货号分别为A111-2, A113-2, A112-2, A037, A110-2);胰岛素放射免疫分析药盒(北京北方生物技术有限公司,批准文号国药准字S10930046); β -肌动蛋白(β -actin)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号66009-1-Ig);LC3B, p-AMPK抗体(美国Abcam公司,货号分别为ab48394, ab23875);AMPK抗体(美国Cell Signaling公司,货号#5562);TFEB抗体(美国Thermo Fisher公司,货

号PA5-75572);辣根过氧化物酶(HRP)-羊抗鼠免疫球蛋白(Ig)G,HRP-羊抗兔IgG(武汉三鹰生物技术有限公司,货号分别为BA1050,BA1055);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号G1120)。

1.4 仪器 ELx800型酶标仪(美国BioTek公司);551I型尼康生物显微镜(日本尼康公司);HM340 E型石蜡切片机(德国Microm GmbH公司);XRS型凝胶成像系统,1645050型电泳仪,165-8001型电泳槽(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 造模、分组及干预治疗 随机抽取10只大鼠作为正常组,予以普通饲料喂养,其余大鼠予以高脂高糖饲料(0.3%胆酸盐,4%胆固醇,10%蛋黄粉,10%猪油,15%蔗糖,60.7%基础饲料)喂养6周后,以腹腔注射2次链脲佐菌素 $25\text{ mg}\cdot(\text{kg}\cdot\text{m}^2)^{-1}$,间隔3 d加以诱导,注射后第4天,用血糖测定仪测量血糖,筛选随机血糖 $>16.7\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,为造模成功大鼠^[8-10]。将符合模型标准的大鼠,按照血糖及体重随机分组,每组10只。正常组与模型组均采用生理盐水进行灌胃,正常组($10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),模型组($10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),二甲双胍组($100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),石斛合剂组($11.3\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),所有组别用药剂量均按60 kg成人临床等效剂量进行干预,灌胃体积均为 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

2.2 血糖监测 大鼠禁食(不禁水)12 h后用一次性无菌采血针针刺大鼠尾端,待尾端血液流出后,用罗氏血糖仪检测各组大鼠空腹血糖。

2.3 比色法检测TG,TC,LDL,HDL,GSP指标 取96孔板,依据说明书设置标准品,标准品各孔均设置1个复孔。加样,每组样品均设置3个复孔,与工作液充分反应后,将96孔板置于酶标仪进行检测。根据吸光度 A ,计算标准曲线公式,将各组平均值带入公式后,计算各组样品的最终结果。

2.4 酶联免疫吸附测定(ELISA)检测INS指标 取96孔板,依据说明书设置空白孔、不同浓度标准品孔及样品孔。不同浓度标准品均设置1个复孔,样品设置3个复孔。在96孔板上先加样品稀释液,再加待测样品。尽量不触及孔壁,轻晃混匀,避免泡沫。封板膜封好后,置于37℃恒温箱中孵育30 min。甩去液体,洗涤液(1 min,5次)。酶标试剂加入后,37℃恒温箱中孵育。洗涤同前。加入A,B显色剂(先加A液50 μL ,再加B液50 μL)。将液体混匀后,37℃避光充分反应15 min。最后,各孔均

匀加入终止液50 μL ,终止反应。将96孔板置于酶标仪进行测定(450 nm波长)测量各孔的吸光度 A ,终止液加入后15 min之内需测定完毕。

2.5 HE染色观察肝脏组织病理学变化 大鼠取血后,取出肝脏,放入4%中性多聚甲醛溶液。固定24 h后,更换新的多聚甲醛溶液。24 h后,进行流水冲洗。各梯度乙醇脱水完成后,将组织块放入二甲苯溶液进行组织透明。依次将透明的肝组织块包埋,以5 μm 厚度进行连续切片。将玻片放入二甲苯溶液进行脱蜡,再依次放入各梯度乙醇溶液中。苏木素染色时间为15 s,自来水返蓝,时间为15 min;伊红染色时间为1 min,流水冲洗,脱水风干,滴加适量中性树脂,封片,晾干保存。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测自噬相关蛋白表达 用RIPA缓冲液裂解肝组织制备总细胞裂解物,用BCA法测蛋白质含量。将各组等量的蛋白质提取物在5×样品缓冲液中热变性,在10%聚丙烯酰胺凝胶上分离后转移到PVDF膜上。封闭后,一抗[AMPK(1:1 000), β -actin(1:1 万),p-AMPK(1:1 000),TFEB(1:1 000),LC3B(1:1 000)]孵育,4℃摇床孵育过夜。TBST清洗孵育后的膜,进行二抗[p-AMPK(1:500),其余指标二抗稀释比例均为1:1 000]孵育。TBST清洗后滴加显影,结果分析保存。用化学发光剂进行显影。以 β -actin为内参。使用软件对蛋白条带进行定量分析,计算目的蛋白条带与 β -actin条带的灰度比值,作为各目的蛋白的相对表达水平。

2.7 统计学分析 采用SPSS 25.0进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,首先进行正态性检验,符合正态性分布的数据以单因素方差分析进行多组间比较,组间两两比较用LSD法;不符合正态性分布的数据以非参数检验法进行组间比较, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对T2DM合并NAFLD大鼠糖代谢的影响 与正常组比较,模型组大鼠FBG,GSP明显上升($P<0.05$),INS含量明显降低($P<0.05$);与模型组比较,石斛合剂组与二甲双胍组大鼠的FBS,GSP含量明显下降($P<0.05$),INS含量明显升高($P<0.05$)。见表1。

3.2 对T2DM合并NAFLD大鼠脂代谢的影响 与正常组比较,模型组TG,TC,LDL-C明显升高,HDL-C含量明显下降($P<0.05$);与模型组比较,二甲双胍组与石斛合剂组TG,TC,LDL-C明显降低,HDL-C含量明显升高($P<0.05$)。见表2。

表 1 石斛合剂对 T2DM-NAFLD 大鼠 FBS, GSP, INS 的影响
($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Effect of Shihu mixture (SHM) on FBS, GSP and INS in T2DM-NAFLD rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	FBS /mmol·L ⁻¹	GSP /mmol·L ⁻¹	INS /mU·L ⁻¹
正常	—	4.47±0.45	1.44±0.14	54.81±10.81
模型	—	20.64±5.86 ¹⁾	2.88±0.23 ¹⁾	20.89±2.28 ¹⁾
二甲双胍	0.1	12.73±4.33 ²⁾	2.23±0.23 ²⁾	37.56±11.32 ²⁾
石斛合剂	11.3	10.60±4.28 ²⁾	2.19±0.47 ²⁾	37.26±10.88 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$ (表 2,3 同)。

3.3 对 T2DM 合并 NAFLD 大鼠肝脏病理形态的影响 正常组肝组织结构完整,肝细胞排列整齐,大小均匀、无脂肪变性。模型组大鼠肝组织的中央静脉区和汇管区正常结构破坏,肝细胞排列紊乱,肝细胞脂肪变性较严重,有大量脂肪空泡,肝血窦扩大,汇管区结缔组织增生、形态异常;二甲双胍组肝索结构不够整齐,肝窦略扩张,部分汇管区结缔组织增生;石斛合剂组脂肪变性、结构破坏与模型组相比较明显改善。见图 1。

3.4 对 T2DM 合并 NAFLD 大鼠 AMPK-TFEB 自噬

表 2 石斛合剂对 T2DM-NAFLD 大鼠 TG, TC, HDL, LDL 影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of SHM on TG, TC, HDL and LDL in T2DM-NAFLD rat ($\bar{x}\pm s, n=10$) mmol·L⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TG	TC	HDL	LDL
正常	—	0.39±0.10	2.96±0.25	0.36±0.05	0.29±0.07
模型	—	2.14±0.40 ¹⁾	4.21±0.14 ¹⁾	0.23±0.03 ¹⁾	2.48±0.23 ¹⁾
二甲双胍	0.1	0.98±0.35 ²⁾	3.62±0.37 ²⁾	0.36±0.10 ²⁾	0.54±0.15 ²⁾
石斛合剂	11.3	0.75±0.16 ²⁾	2.95±0.10 ²⁾	0.32±0.08 ²⁾	0.51±0.13 ²⁾

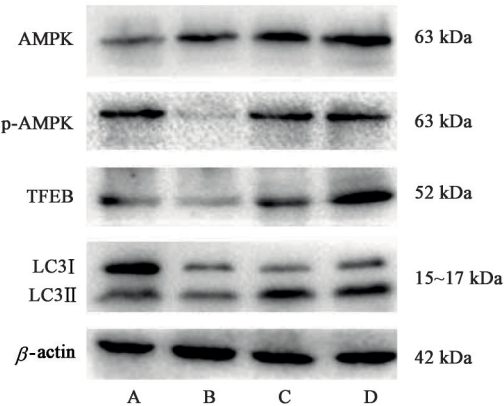
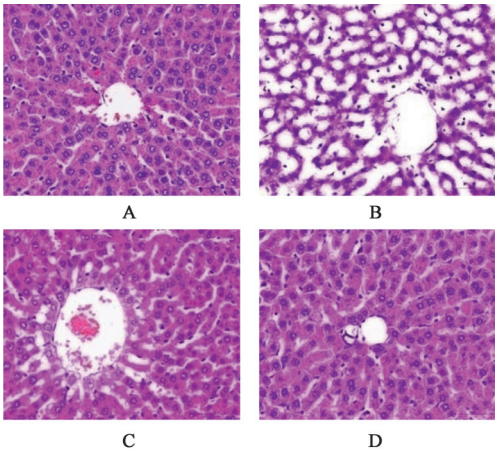


图 2 各组 T2DM-NAFLD 大鼠 AMPK, p-AMPK, TFEB, LC3 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of AMPK, p-AMPK, TFEB and LC3 protein expression in T2DM-NAFLD rats of each groups

4 讨论

糖尿病属于中医“消渴”范畴,而糖尿病合并肝



A. 正常组;B. 模型组;C. 二甲双胍组;D. 石斛合剂组(图 2 同)

图 1 石斛合剂对 T2DM-NAFLD 大鼠肝脏病理形态影响 (HE, × 400)

Fig. 1 Effect of SHM on pathological morphology of liver in T2DM-NAFLD rats(HE, × 400)

蛋白表达影响 与正常组比较,模型组中 p-AMPK/AMPK 值,TFEB, LC3B- II 蛋白明显下降($P<0.05$);与模型组比较,石斛合剂组、二甲双胍组中 p-AMPK/AMPK, TFEB, LC3B- II 蛋白明显上升($P<0.05$)。见图 2,表 3。

损伤则归属于“胁痛”“肝痞”“痰浊”“积聚”等病证。认为热、瘀、毒等是糖尿病肝损伤的病因,以滋阴清热,化瘀解毒为治疗原则,通过清热活血祛毒方石斛合剂治疗糖尿病肝损伤。方以石斛、知母、黄芪、丹参、葛根、黄连、五味子、地龙、蒲公英等药物组成。以石斛、知母为君,石斛中润胃阴,下滋肾阴,滋而不膩,滋阴清热;知母滋阴润燥,壮水制火;二者共奏滋阴清热之功;臣以黄芪托毒又大补脾肺之气;丹参活血凉血,祛瘀生新,一物而具“四物”之用;黄连清热利湿除烦,三药合而助君药,以期内热得去,瘀毒得清;葛根生发脾胃之清阳,清热生津;五味子敛肺滋肾生津,宁心涩精;一散一收,化而能守,佐助君药滋阴清热;地龙通经活络,解血脉瘀滞之毒;蒲公英清热利湿解毒,使热毒从小便去;大黄泻热逐瘀,使浊毒从大便去,共为佐使。全方紧扣滋阴清热,化瘀解毒,二便通利,使瘀毒浊物得消,

表 3 石斛合剂对 T2DM-NAFLD 大鼠 p-AMPK/AMPK, TFEB, LC3B-Ⅱ 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of SHM on expression of p-AMPK/AMPK, TFEB, LC3B-Ⅱ protein of SHHJ on T2DM-NAFLD rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	p-AMPK/AMPK	TFEB	LC3B-Ⅱ
正常	—	0.88±0.09	2.29±0.22	0.22±0.01
模型	—	0.39±0.08 ¹⁾	1.09±0.20 ¹⁾	0.12±0.05 ¹⁾
二甲双胍	0.1	1.28±0.24 ²⁾	2.64±0.64 ²⁾	0.25±0.02
石斛合剂	11.3	0.98±0.20 ²⁾	2.58±0.39 ²⁾	0.22±0.00

阴液得复,阳气得起,阴阳平和,病气乃去。

作为脂肪生成和脂质氧化的主要部位,肝脏在脂质代谢中起重要作用^[11],脂肪肝会过量产生代谢综合症的 2 个关键成分,即葡萄糖和 TG。当体内提供的葡萄糖超过心脏和骨骼肌功能所需的量时,其会以 TG 或“脂肪”的形式存储在脂肪细胞中。多余脂肪积聚使心脏和骨骼肌对胰岛素作用的抵抗而出现升高的胰岛素水平。尽管 NAFLD 的发病机制尚未完全了解,但最被接受的理论是“多发理论”,其中 IR 被认为是 NAFLD 最常见的发病因素。而 IR 是也是导致 T2DM 的主要致病因素。高脂高糖喂养后进行链脲佐菌素注射的大鼠模型是目前关于糖尿病研究中认可程度较高、技术相对成熟的 T2DM 大鼠模型^[8-10, 12-13]。通过高脂高糖饲料喂养,造成大鼠全身性肥胖,包括肝脏 TG 增高及脂肪变性,是 IR 的基础。因此本实验采用该技术形成 T2DM 合并 NAFLD 大鼠模型作为研究对象。肝脏受损后的脂质代谢与肥胖以及糖尿病密切相关。因此,本研究以 FBS, INS, TG, TC, HDL, LDL 等糖脂代谢的关键指标为研究对象。本研究结果表明,与正常组比较,各模型组大鼠血糖上升明显型组大鼠血脂 TG, TC, LDL 增加, HDL 降低,说明该造模方法较为稳定成功,大鼠不存在自愈的可能性。经治疗,石斛合剂组与二甲双胍组大鼠的空腹血糖、糖化血清蛋白、胰岛素分泌不足情况均有显著改善, HDL 升高, TC, TG, LDL 下降极显著。证明石斛合剂与二甲双胍均可以改善 T2DM 合并 NAFLD 大鼠糖脂代谢紊乱的情况,且中药治疗组对于脂代谢改善的效果更为显著。从病理切片结果来看,正常组表现出肝组织整体结构完整清晰,细胞排列有序,大小均匀整齐,未见明显脂肪空泡,无变性、坏死细胞;模型组中细胞排列不整,可见大量脂肪空泡,细胞间隙扩大,肝小叶结构破坏明显,汇管区结缔组织增生,肝血窦扩大;二甲双胍组与石斛合剂组肝组织结构较为完整,未见明显结缔组织增生,肝血窦扩大不明显,脂肪变性情况减少。本研究从

肝脏糖脂代谢功能及结构上相互验证,充分证明了石斛合剂对于降低 T2DM 合并 NAFLD 大鼠血糖血脂,改善代谢水平,恢复肝脏部分功能,改善甚至逆转肝脏病理结构方面的优势作用。

T2DM 合并 NAFLD 不仅具有肝脏脂质超载的特征,并包含 IR,炎症反应,纤维化和最终肝功能障碍的过程^[14]。自噬是细胞内主要的再循环系统。在基础条件下,自噬控制细胞器和蛋白质质量,以维持细胞稳态。在压力条件下,自噬是一种生存机制,通过再生代谢前体并清除亚细胞碎片来维持细胞完整性,调节疾病发展过程^[15]。自噬是靶组织(例如骨骼肌,肝脏和脂肪组织)对胰岛素反应的重要调节剂,是抵抗肥胖细胞有害作用的关键保护机制^[16]。T2DM 合并 NAFLD 与自噬功能之间的关联可能是相互的^[17]。一方面,自噬障碍增加了 T2DM 合并 NAFLD 的风险。另一方面, T2DM 合并 NAFLD 可能促进自噬受损。T2DM 合并 NAFLD 引起的代谢功能异常,尤其是内质网和 IR,被认为是自噬停滞的决定性原因。因此,自噬缺陷或许是肥胖患者肝胰岛素敏感性和葡萄糖稳态下降的原因。

AMPK 是一种普遍表达的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,可被细胞的饥饿状态激活。一旦激活, AMPK 会启动催化反应过程从而生成 ATP,同时抑制消耗 ATP 的合成代谢过程,以试图恢复细胞能量的稳态^[18-19]。NAFLD 是来自非脂质碳源(从头产生脂肪)和无法氧化或清除沉积在肝脏中的脂质过量生产的累积结果。通过多种机制激活 AMPK 可抵消这些影响。除了在信号水平上 AMPK 介导的自噬调控之外, TFEB 还进行了自噬的长期转录调控。AMPK 激活后磷酸化,作用于 TFEB。TFEB 是溶酶体生物发生的主要调控因子, TFEB 调节对于维持脂质稳态是至关重要的,脂质稳态需要功能性溶酶体的有效协同,正常自噬和有效的细胞清除^[16]。在自噬发生的过程中,自噬体将会吞噬一些细胞质成分,这其中包括胞质蛋白以及细胞器。LC3 是自噬体膜的结构蛋白,广泛用作自噬的生物标记,这 3 种

LC3蛋白在自噬中是否具有相似的生物学作用仍不清楚。但目前的数据表明,LC3A和LC3B均可作为自噬体标记。LC3首先合成为前体蛋白(proLC3),proLC3的C末端肽前体通过哺乳动物ATG4B同源物裂解形成具有暴露C-末端甘氨酸LC3-I,继而转化为膜结合蛋白LC3-II,这一过程是通过LC3-I与磷脂酰乙醇胺(PE)相互结合形成,此后自噬体募集吞噬元件(LC3-II),因此,可以说自噬体的表达与LC3-II呈正相关^[20]。当自噬体与溶酶体融合形成自噬体时,溶酶体中的许多酶会降解自噬体的内膜和源自细胞质的大分子,成为自噬体的氨基酸或多肽,以供细胞再利用^[21]。

本研究结果表明,石斛合剂与二甲双胍均能激活T2DM合并NAFLD大鼠肝脏中的AMPK,促进TFEB表达,从而改善T2DM合并NAFLD大鼠糖脂代谢及肝脏形态。因此,石斛合剂可能是T2DM合并NAFLD以及肥胖,IR相关的代谢性疾病有前途的中药复方制剂,但仍需临床的进一步验证。

[参考文献]

- [1] ARAB J P, ARRESE M, TRAUNER M. Recent insights into the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Annu Rev Pathol*, 2018, 13:321-350.
- [2] RANJBAR G, MIKHAILIDIS D P, SAHEBKAR A. Effects of newer antidiabetic drugs on nonalcoholic fatty liver and steatohe patitis: think out of the box! [J]. *Metab Clin Exp*, 2019, doi: 10.1016/j.metabol. 2019. 154001.
- [3] RAVANAN P, SRIKUMAR I F, TALWAR P. AutoPhagy: the spotlight for cellular stress responses [J]. *Life Sci*, 2017, 188:53-67.
- [4] KHAMBU B, YAN S, HUDA N, et al. Autophagy in non-alcoholic fatty liver disease and alcoholic liver disease[J]. *Liver Res*, 2018, 2(3):112-119.
- [5] 苏晓燕,施红,吴建珊,等. 石斛合剂序贯方不同剂型治疗2型糖尿病临床疗效比较[J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(6):2233-2235.
- [6] 周勇,施红,林心君,等. 石斛合剂序贯法对糖尿病合并肝纤维化大鼠的影响[J]. *福建中医药*, 2018, 49(1):43-45.
- [7] 陈勇,张捷平,余文珍,等. 石斛合剂对糖尿病肾病小鼠TNF- α 及IL-6表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(18):107-112.
- [8] 张哲滔,车念聪,郑亚琳,等. 菖蒲郁金汤化裁方对2型糖尿病合并非酒精性脂肪肝大鼠SREBP-1c表达和胰岛素抵抗的影响[J]. *北京中医药*, 2019, 38(1):

19-22,99.

- [9] 黄琦,廖鑫,吴芹,等. 金钗石斛总生物碱对糖尿病合并非酒精性脂肪肝大鼠胰岛素抵抗的影响[J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(8):75-78,98.
- [10] QIN H, CHEN H, ZOU Y, et al. Systematic investigation of mechanism of cichorium glandulosum on type 2 diabetes mellitus accompanied with nonalcoholic fatty liver rats[J]. *Food Funct*, 2019, doi: 10.1039/C8FO02284D.
- [11] HAMMOUTENE A, BIQUARD L, LASSELIN J, et al. A defect in endothelial autophagy occurs in patients with non-alcoholic steatohepatitis and promotes inflammation and fibrosis[J]. *J Hepatol*, 2020, 72(3):528-538.
- [12] 侯志涛,韩玉生,刘翼天,等. 孔圣枕中丹对2型糖尿病大鼠认知功能的影响[J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(22):4506-4512.
- [13] 刘睿颖,张思远,任彬,等. 从SCAP/SREBP-1c通路探究味连及雅连对2型糖尿病大鼠的降脂作用[J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(10):2129-2133.
- [14] FRIEDMAN S L, NEUSCHWANDER-TETRI B A, RINELLA M, et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies[J]. *Nat Med*, 2018, 24(7):908-922.
- [15] CHOI A M K, RYTER S W, LEVINE B. Autophagy in human health and disease[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(7):651-662.
- [16] PATEL S S, MEHTA V, CHANGOTRA H, et al. Depression mediates impaired glucose tolerance and cognitive dysfunction: a neuromodulatory role of rosiglitazone[J]. *Horm Behav*, 2016, 78:200-210.
- [17] YU S, WANG Z, DING L, et al. The regulation of TFEB in lipid homeostasis of non-alcoholic fatty liver disease: molecular mechanism and promising therapeutic targets[J]. *Life Sci*, 2020, doi: 10.1016/j.lfs. 2020. 117418.
- [18] KIM J, YANG G, KIM Y, et al. AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities[J]. *Exp Mol Med*, 2016, 48:e224.
- [19] CARLING D. AMPK signalling in health and disease [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2017, 45:31-37.
- [20] LI X, HE S, MA B. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer[J]. *Mol Cancer*, 2020, doi: 10.1186/s12943-020-1138-4.
- [21] KUMA A, KOMATSU M, MIZUSHIMA N. Autophagy-monitoring and autophagy-deficient mice [J]. *Autophagy*, 2017, 13(10):1619-1628.

[责任编辑 周冰冰]