

薯蓣皂苷元通过 mTOR/SREBP-1c/HSP60/MCAD/SCAD 信号通路缓解高脂饮食诱导的大鼠 NAFLD

陈素雯¹, 印国良¹, 宋超远², 孟德成¹, 于文飞¹, 张鑫¹, 冯亚男¹,
梁朋朋¹, 张风霞^{3*}

(1. 山东中医药大学, 山东 济南 250014; 2. 淄博市中心医院, 山东 淄博 255000;
3. 山东中医药大学附属医院, 山东 济南 250014)

[摘要] 研究薯蓣皂苷元对非酒精性脂肪肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)模型大鼠肝组织中雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)、甾醇调节元件结合蛋白-1c(sterol regulatory element-binding protein-1c, SREBP-1c)、热休克蛋白60(heat shock protein, HSP60)、中链酰基辅酶A脱氢酶(medium-chain acyl-CoA dehydrogenase, MCAD)、短链酰基辅酶A脱氢酶(short-chain acyl-CoA dehydrogenase, SCAD)表达的影响,探讨薯蓣皂苷元缓解NAFLD的作用机制。40只雄性SD大鼠,按照随机数表法分为5组:对照组、高脂饮食组、薯蓣皂苷元低剂量组(150 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、薯蓣皂苷元高剂量组(300 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、辛伐他汀组(4 mg·kg⁻¹·d⁻¹),每组8只,其中对照组大鼠给予普通饲料喂养,其余4组大鼠给予高脂饮食喂养,喂食8周后,高脂饮食喂养组大鼠的体质量显著增加,此后,每天以相应剂量薯蓣皂苷元或辛伐他汀连续灌胃给药8周。生化法检测血清中甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、谷丙转氨酶(alanine transaminase, ALT)及谷草转氨酶(aspartate transaminase, AST)水平;酶法检测肝脏中TG、TC水平;油红O染色检测肝脏脂质蓄积情况;苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色检测肝组织病理形态变化;实时荧光定量聚合酶链反应和蛋白免疫印迹法分别检测大鼠肝组织中mTOR、SREBP-1c、HSP60、MCAD、SCAD的mRNA和蛋白表达水平。结果显示,与对照组相比,高脂饮食组大鼠体质量、食物摄入量、肝指数以及血清TG、TC、ALT、AST水平和肝脏TG、TC水平显著升高,肝脏脂质蓄积显著增多,肝脏结构紊乱,脂肪变性明显,肝脏mTOR、SREBP-1c的mRNA和蛋白表达水平显著升高,而HSP60、MCAD、SCAD的mRNA和蛋白表达水平显著降低;与高脂饮食组比较,各治疗组大鼠体质量、食物摄入量、肝指数以及血清TG、TC、ALT、AST水平和肝脏TG、TC水平显著降低,肝脏脂质蓄积显著减少,肝脏脂肪变性明显改善,肝脏mTOR、SREBP-1c的mRNA和蛋白水平显著降低,HSP60、MCAD、SCAD mRNA和蛋白水平显著升高。薯蓣皂苷元高剂量组的治疗效果优于薯蓣皂苷元低剂量组和辛伐他汀组。薯蓣皂苷元可能通过抑制mTOR、SREBP-1c的表达,促进HSP60、MCAD、SCAD的表达,以减少肝脏脂质合成、改善线粒体功能、促进脂肪酸 β 氧化,发挥防治NAFLD的作用。

[关键词] 薯蓣皂苷元; 非酒精性脂肪肝病; 脂质合成; 线粒体功能; 脂肪酸 β 氧化

Diosgenin alleviates NAFLD induced by a high-fat diet in rats via mTOR/SREBP-1c/HSP60/MCAD/SCAD signaling pathway

CHEN Su-wen¹, YIN Guo-liang¹, SONG Chao-yuan², MENG De-cheng¹, YU Wen-fei¹, ZHANG Xin¹, FENG Ya-nan¹,
LIANG Peng-peng¹, ZHANG Feng-xia^{3*}

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250014, China;

2. Zibo Central Hospital, Zibo 255000, China;

3. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250014, China)

[收稿日期] 2023-04-16

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81573945);山东省自然科学基金面上项目(ZR2021MH054)

[通信作者] * 张风霞,主任医师,博士生导师,主要从事心脑血管及代谢疾病研究,E-mail:fxzhang0987@163.com

[作者简介] 陈素雯,硕士,主要从事心脑血管及代谢疾病研究,E-mail:chensuwen518@163.com

[Abstract] This study aims to observe the effects of diosgenin on the expression of mammalian target of rapamycin (mTOR), sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c), heat shock protein 60 (HSP60), medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD), and short-chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) in the liver tissue of the rat model of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and explore the mechanism of diosgenin in alleviating NAFLD. Forty male SD rats were randomized into five groups: a control group, a model group, low- ($150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) and high-dose ($300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) diosgenin groups, and a simvastatin ($4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) group. The rats in the control group were fed with a normal diet, while those in the other four groups were fed with a high-fat diet. After feeding for 8 weeks, the body weight of rats in the high-fat diet groups increased significantly. After that, the rats were administrated with the corresponding dose of diosgenin or simvastatin by gavage every day for 8 weeks. The levels of triglyceride (TG), total cholesterol (TC), alanine transaminase (ALT), and aspartate transaminase (AST) in the serum were determined by the biochemical method. The levels of TG and TC in the liver were measured by the enzyme method. Oil-red O staining was employed to detect the lipid accumulation, and hematoxylin-eosin (HE) staining to detect the pathological changes in the liver tissue. The mRNA and protein levels of mTOR, SREBP-1c, HSP60, MCAD, and SCAD in the liver tissue of rats were determined by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western blot, respectively. Compared with the control group, the model group showed increased body weight, food uptake, liver index, TG, TC, ALT, and AST levels in the serum, TG and TC levels in the liver, lipid deposition in the liver, obvious hepatic steatosis, up-regulated mRNA and protein expression levels of mTOR and SREBP-1c, and down-regulated mRNA and protein expression levels of HSP60, MCAD, and SCAD. Compared with the model group, the rats in each treatment group showed obviously decreased body weight, food uptake, liver index, TG, TC, ALT, and AST levels in the serum, TG and TC levels in the liver, lessened lipid deposition in the liver, ameliorated hepatic steatosis, down-regulated mRNA and protein levels of mTOR and SREBP-1c, and up-regulated mRNA and protein levels of HSP60, MCAD, and SCAD. The high-dose diosgenin outperformed the low-dose diosgenin and simvastatin. Diosgenin may prevent and treat NAFLD by inhibiting the expression of mTOR and SREBP-1c and promoting the expression of HSP60, MCAD, and SCAD to reduce lipid synthesis, improving mitochondrial function, and promoting fatty acid β oxidation in the liver.

[Key words] diosgenin; non-alcoholic fatty liver disease; lipid synthesis; mitochondrial function; fatty acid β oxidation

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20230601.705

薯蓣皂苷元是一种天然存在的甾体皂苷元,是从薯蓣科植物野生山药、葫芦巴等多种传统中草药中提取的主要生物活性成分^[1]。研究表明,薯蓣皂苷元具有抗炎、抗氧化、改善肝脂代谢、神经保护、抗心血管疾病和抗癌等多种药理作用^[2]。前期实验研究证明薯蓣皂苷元表现出明显的保肝作用,包括防止氧化应激,改善肝脂代谢和改善脂肪肝损伤^[3]。但其治疗非酒精性脂肪肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)的潜在作用机制尚不明确。肝脂肪变性在NAFLD的发生和发展过程中起到关键作用^[4],肝脏中沉积的脂肪酸、甘油三酯和其他脂毒性物质可能通过诱导线粒体功能障碍导致肝细胞的破坏^[5],从而进展为肝硬化或癌症,因此,恢复脂质稳态和改善线粒体功能是NAFLD的有效预防和治疗策略。本研究以高脂饮食构建NAFLD大鼠模型,旨在观察薯蓣皂苷元对NAFLD模型大鼠脂质合成、线粒体功能和脂肪酸 β 氧化的调控作用及对大鼠肝脏中雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)、甾醇调节元件结合蛋白-1c

(sterol regulatory element-binding protein-1c, SREBP-1c)、热休克蛋白 60(heat shock protein, HSP60)、中链酰基辅酶 A 脱氢酶(medium-chain acyl-CoA dehydrogenase, MCAD)和短链酰基辅酶 A 脱氢酶(short-chain acyl-CoA dehydrogenase, SCAD)表达的影响,为薯蓣皂苷元治疗 NAFLD 的临床应用提供科学支持。

1 材料

1.1 动物 40 只 6 周龄 SPF 级健康雄性 SD 大鼠,体质量(200 ± 20)g,北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号 SCXK(京)2016-0011。所有动物均饲养在标准环境[温度(23 ± 2)℃,湿度 $50\% \pm 10\%$,昼夜循环每日 12 h/12 h 交替照明]中,自由获取食物和水。用于诱导 NAFLD 大鼠模型的高脂饲料购自小泰有泰(北京)生物科技有限公司,配方如下,猪油 10%、蛋黄粉 10%、胆固醇 1%,其余为基础饲料(蛋白质 20.8%、脂肪 34.9%、碳水化合物 44.3%)。用于诱导高胆固醇血症大鼠模型的高脂饲料购自北京科澳协力饲料有限公司,配方包括

猪油 4.5%、胆固醇 2%、胆酸盐 0.3%,其余为基础饲料(蛋白质 19.6%、脂肪 15%、碳水化合物 65.4%)。实验经山东中医药大学动物伦理委员会审查后批准,批准文号 2021-94。

1.2 药物及试剂 薯蓣皂苷元(质量分数 $\geq 98\%$,上海源叶生物科技有限公司,批号 S31698);辛伐他汀(北京默沙东制药有限公司,批号 35508);组织总胆固醇(total cholesterol, TC)酶法测定试剂盒、组织甘油三酯(triglyceride, TG)酶法测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 F002-1-1、F001-1-1);饱和油红 O 染色液、苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号 G1015、G1003);RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、荧光定量试剂盒、RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液($5\times$)、7.5% SDS-PAGE 彩色凝胶极速配制试剂盒、10% SDS-PAGE 彩色凝胶极速配制试剂盒、ECL 发光检测试剂(山东思科捷生物技术有限公司,批号分别为 AC0202、AG0304、AH0101、EA0002、EC0013、EC0001、EC0022、EC0023、ED0015);丝氨酸蛋白酶抑制剂、一抗稀释液、二抗稀释液(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为 ST505、P0023A、P0023D);电泳缓冲液、转膜缓冲液(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为 G2018、G2017);聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜(上海密理博贸易有限公司,批号 ISEQ00010);mTOR 兔多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号 bs-1992R);HSP60 兔多克隆抗体、MCAD 鼠单克隆抗体、SCAD 鼠单克隆抗体(英国 Abcam 公司,批号 ab46798、ab110296、ab110318);SREBF1 鼠单克隆抗体、 β -肌动蛋白(β -actin)鼠单克隆抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号 66875-1-Ig、66009-1-Ig);辣根过氧化物酶山羊抗兔免疫球蛋白二抗、山羊抗鼠免疫球蛋白二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为 ZB-2301、ZB-2305)。

1.3 仪器 Olympus AU 2700 分析仪(日本 Olympus 公司);RM2016 病理切片机(德国 Leica 公司);CRYOSTAR NX50 冰冻切片机、Multiskan Go1510 型酶标仪、Nanodrop2000 型微量分光光度计(美国 ThermoFisher Scientific 公司);Light Cycler 480 II/96 型实时定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司);Mini-PROTEAN Tetra WB System 型电泳和转膜仪(美国 Bio-5306

Rad 公司);Pannoramic MIDI 型数字切片扫描仪(匈牙利 3D HISTECH 公司)。

2 方法

2.1 造模、分组与给药 40 只 SD 大鼠普通饲料适应性喂养 1 周后,按照随机数字表法分为 5 组:对照组、高脂饮食组、薯蓣皂苷元低剂量组、薯蓣皂苷元高剂量组、辛伐他汀组,每组 8 只。对照组大鼠喂食普通饲料,其他组大鼠喂食高脂饲料,连续喂养 8 周,构建大鼠 NAFLD 模型。大鼠给药剂量参照《药理实验方法学》所示人与动物间按体表面积比率的等效剂量换算法计算得出,本研究组此前进行预实验,以验证薯蓣皂苷元给药的安全性和有效性。结果表明,当薯蓣皂苷元的剂量小于 $300\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 时,薯蓣皂苷元对血清指标和肝脏脂肪变性的影响呈剂量依赖性,且在 $300\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 时影响最显著。此外,与对照组相比,薯蓣皂苷元治疗组的 ALT、AST、血尿素氮(BUN)和肌酐(Cr)水平也没有显著变化,这表明 150 、 $300\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 剂量的薯蓣皂苷元对大鼠没有毒性^[3]。含有 0.5% 羧甲基纤维素钠的生理盐水制备不同浓度的薯蓣皂苷元,薯蓣皂苷元低、高剂量组分别灌胃给予 150 、 $300\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,辛伐他汀灌胃组给予 $4\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$;对照组与高脂饮食组均灌胃等体积含有 0.5% 羧甲基纤维素钠的生理盐水。灌胃体积 $5\text{ mL}\cdot\text{d}^{-1}$,每日 1 次,连续 8 周,隔 1 周对大鼠进行 1 次称重以调整给药量。灌胃期间对照组继续给予普通饲料喂养,其余各组继续给予高脂饲料喂养。

2.2 血清与组织样本收集 给药 8 周结束后,所有大鼠禁食不禁水 12 h,通过腹腔注射 3% 戊巴比妥钠麻醉大鼠,从腹主动脉抽取全血,室温静置 1 h,然后在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min 收集血清,将血清样品储存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。取血后迅速收集肝脏组织,用冷冻生理盐水冲洗,称重后,一部分储存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$,另一部分储存于 4% 多聚甲醛中,直到分析。

2.3 脂质含量和肝细胞代谢酶测定 取 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存的血清,根据制造商的说明,使用 Olympus AU 2700 分析仪测量血清中 TG、TC、ALT、AST 的含量。取保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的肝脏组织,各组精确称量 5 mg,各加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 裂解液,使用电动高速匀浆器破碎组织,室温静置 10 min,然后在 $2\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,取上层清液,根据南京建成生物工程研究所提供的专用试剂盒测定大鼠肝组织中 TG、TC 的含量。

2.4 油红 O 染色观察肝脏脂质蓄积 储存在 4% 多聚甲醛中的肝组织用冰冻切片机在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下切取厚度为 $8\text{ }\mu\text{m}$ 的冷冻切片进行油红 O 染色。封片、切片后扫描仪下观察,图像采集分析。

2.5 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色观察肝组织病理学形态变化 储存在 4% 多聚甲醛中的肝组织用分级乙醇溶液脱水,然后包埋在石蜡中。通过病理切片机将石蜡块切成 $5\text{ }\mu\text{m}$ 厚的切片,然后根据 HE 染色的标准程序进行染色。封片、切片后扫描仪下观察,图像采集分析。

2.6 RNA 提取和实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 取 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存的肝脏组织,各组精确称量 5 mg ,各加入 $350\text{ }\mu\text{L}$ 裂解液,使用电动高速匀浆器破碎组织,用 RNA 试剂盒提取总 RNA,并使用 Nanodrop 2000 型微量分光光度计测定 RNA 纯度。然后用逆转录试剂盒将约 $1\text{ }\mu\text{g}$ 总 RNA 逆转录为 cDNA。qPCR 扩增反应条件: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min , $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s , $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s , 扩增 40 个循环。以 GAPDH 为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行定量分析。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
mTOR	上游: CAGTTCGCCAGTGGACTGAAG	149
	下游: TTGTAGCCAATAAAGGTGCCAT	
SREBP-1c	上游: CCTGCTTCTGGCTCCTCTC	134
	下游: GCACGGACGGTACATCTTTACAG	
HSP60	上游: CCGCCCCGAGAAATGCTTCGA	128
	下游: AGGCTCGAGCATCCGACCAA	
MCAD	上游: GTCGCGCCAGACTACGATAA	136
	下游: GCCAAGACCACCAACTCT	
SCAD	上游: TGCCCTATGTTTCGCACCTC	144
	下游: TTCAATGCCATCATCCCTT	
GAPDH	上游: TTTGAGGGTCAGCGAACTT	142
	下游: ACAGCAACAGGCTGGTGGAC	

2.7 蛋白质提取和蛋白免疫印迹 (Western blot) 法 取 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存的大鼠肝脏组织,各组精确称量 5 mg ,用 RIPA 裂解液和蛋白酶抑制剂快速匀浆,冰上裂解 30 min , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $15\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min 吸取总蛋白,使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。热变性蛋白质样品 ($40\sim 50\text{ }\mu\text{g}$) 通过 10% 或 7.5% SDS-PAGE

分离,然后电转至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h ,然后与抗体孵育 [mTOR ($1:1\text{ }000$)、SREBF1 ($1:2\text{ }000$)、HSP60 ($1:20\text{ }000$)、MCAD ($1:5\text{ }000$)、SCAD ($1:10\text{ }000$)、 β -actin ($1:5\text{ }000$)] ,在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下过夜。然后将膜与辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠/兔免疫球蛋白二抗 ($1:5\text{ }000$) 在室温下孵育 1 h 。最后,使用 ECL 化学发光试剂显影,结果通过 ImageJ 软件进行量化。

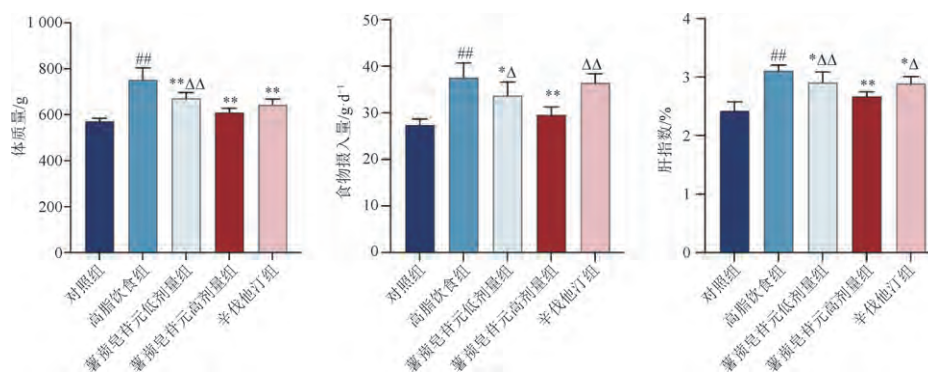
2.8 统计学分析 采用 SPSS 26.0 统计软件对数据进行处理,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析和 LSD- t 事后检验, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 薯蓣皂苷元对高脂饮食诱导的大鼠体质量、食物摄入量、肝指数的影响 与对照组相比,高脂饮食组大鼠体质量明显增加;与高脂饮食组相比,薯蓣皂苷元低、高剂量组和辛伐他汀组大鼠体质量显著降低;高剂量薯蓣皂苷元对大鼠体质量的降低作用优于低剂量薯蓣皂苷元,与辛伐他汀相似。与对照组相比,高脂饮食组大鼠食物摄入量明显增加;与高脂饮食组相比,薯蓣皂苷元低、高剂量组大鼠食物摄入量降低;高剂量薯蓣皂苷元对食物摄入量的降低作用优于低剂量薯蓣皂苷元和辛伐他汀。此外,在 NAFLD 研究中,肝指数 (肝脏湿重/体质量 $\times 100\%$) 是另一个需要考虑的关键因素。笔者观察到,与对照组大鼠相比,高脂饮食组大鼠的肝指数显著增加;然而,与高脂饮食组相比,薯蓣皂苷元低、高剂量组和辛伐他汀组大鼠肝指数降低;高剂量薯蓣皂苷元降低大鼠肝指数的作用优于低剂量薯蓣皂苷元和辛伐他汀,见图 1。结果表明薯蓣皂苷元显著抑制了高脂饮食诱导的大鼠体质量和肝指数的增加。

3.2 薯蓣皂苷元对高脂饮食诱导的大鼠肝脏脂质积累的影响 油红 O 染色显示,与对照组相比,高脂饮食组大鼠肝脏脂滴的积累明显增加;与高脂饮食组相比,薯蓣皂苷元低、高剂量组和辛伐他汀组显著减少大鼠肝脏脂滴积累,高剂量薯蓣皂苷元减少脂滴积累的作用比薯蓣皂苷元低剂量和辛伐他汀更强,见图 2。结果表明薯蓣皂苷元治疗显著减少了高脂饮食诱导的大鼠肝脏脂质积累。

3.3 薯蓣皂苷元对高脂饮食诱导的大鼠血清 TG、TC 水平的影响 与对照组相比,高脂饮食组大鼠血清 TG、TC 水平显著升高;与高脂饮食组相比,薯蓣



与对照组比较^{##} $P < 0.01$;与高脂饮食组比较^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与薯蓣皂苷元高剂量组比较^Δ $P < 0.05$,^{ΔΔ} $P < 0.01$ (图 2~7 同)。

图 1 薯蓣皂苷元对高脂饮食诱导的大鼠体质量、食物摄入量、肝指数的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Fig. 1 Effect of diosgenin on the body weight, food uptake, and liver index in the rats fed with a high-fat diet ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

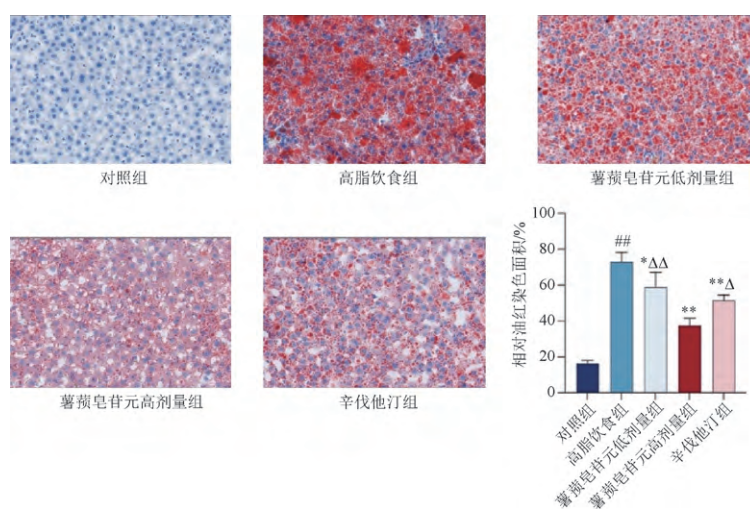


图 2 薯蓣皂苷元对高脂饮食诱导的大鼠肝脏脂质积累的影响(油红 O 染色, $\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 2 Effect of diosgenin on lipid accumulation in the liver of the rats fed with a high-fat diet (oil red O staining, $\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

皂苷元低、高剂量组和辛伐他汀组大鼠血清 TG、TC 水平显著降低;薯蓣皂苷元高剂量组大鼠血清 TG 水平低于薯蓣皂苷元低剂量组,与辛伐他汀组比较差异无统计学意义;薯蓣皂苷元高剂量组大鼠血清 TC 水平显著低于薯蓣皂苷元低剂量组和辛伐他汀组,见图 3。结果表明薯蓣皂苷元能够显著抑制高脂饮食诱导的大鼠血清 TG、TC 水平的升高。

3.4 薯蓣皂苷元对高脂饮食诱导的大鼠肝脏 TG、TC 水平的影响 与对照组相比,高脂饮食组大鼠肝脏 TG、TC 水平显著增加;与高脂饮食组相比,低、高剂量薯蓣皂苷元和辛伐他汀均显著逆转了高脂饮食诱导的肝脏 TG 和 TC 水平的增加;高剂量薯蓣皂苷元在降低肝脏 TG 和 TC 水平方面的效果优于低剂量薯蓣皂苷元和辛伐他汀,见图 4。结果表明薯蓣皂苷元治

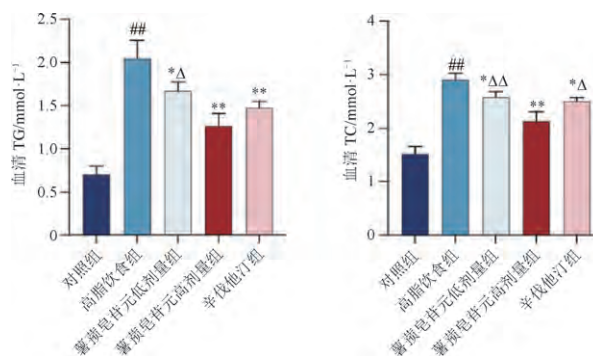


图 3 薯蓣皂苷元对高脂饮食诱导的大鼠血清 TG、TC 水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 3 Effect of diosgenin on the levels of TG and TC in the serum of rats fed with a high-fat diet ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

疗可以缓解高脂饮食诱导的大鼠肝脏脂质代谢紊乱。

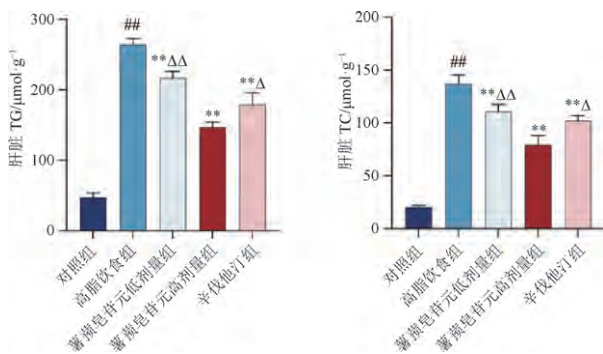


图4 薯蓣皂苷元对高脂饮食诱导的大鼠肝脏 TG、TC 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 4 Effect of diosgenin on the levels of TG and TC in the liver of the rats fed with a high-fat diet ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

3.5 薯蓣皂苷元对高脂饮食诱导的大鼠肝损伤的影响 HE 染色显示,与对照组相比,高脂饮食组大鼠肝脏纹理紊乱,肝小叶结构被破坏,出现大量细胞质空泡化;与高脂饮食组相比,薯蓣皂苷元低、高剂量组和辛伐他汀组大鼠肝脏显示出轻微的脂肪变性,肝小叶的结构被显著改善,以高剂量薯蓣皂苷元改善大鼠肝脏脂肪变性的效果最为明显,见图 5。肝脏特异性酶 ALT 和 AST 用于识别肝脏损伤,与对照组相比,高脂饮食组大鼠血清中的 ALT 和 AST 释放过量;然而,与高脂饮食组相比,薯蓣皂苷元低、高剂量组和辛伐他汀组大鼠血清中的 ALT 和 AST 水平显著降低;高剂量薯蓣皂苷元降低大鼠血清 ALT 水平的效果优于低剂量薯蓣皂苷元,与辛伐他汀比较差异无统计学意义;高剂量薯蓣皂苷元降低大鼠血清中 AST 水平的效果优于低剂量薯蓣皂苷元和辛伐他汀,见图 5。总之,这些发现表明,薯蓣皂苷元可以改善高脂饮食诱导的大鼠肝损伤。

3.6 薯蓣皂苷元对高脂饮食诱导的大鼠肝脏 mTOR、SREBP-1c、HSP60、MCAD、SCAD mRNA 表达的影响 与对照组相比,高脂饮食组大鼠肝脏 mTOR、SREBP-1c mRNA 表达水平显著升高, HSP60、MCAD、SCAD mRNA 表达水平显著降低;然而,薯蓣皂苷元低、高剂量组和辛伐他汀组大鼠肝脏 mTOR、SREBP-1c mRNA 表达水平显著低于高脂饮食组,薯蓣皂苷元低、高剂量组大鼠肝脏 HSP60、MCAD、SCAD mRNA 表达水平显著高于高脂饮食组,辛伐他汀组大鼠肝脏 HSP60、MCAD、SCAD mRNA 表达水平与高脂饮食组相比差异无统计学意义;高剂量薯蓣皂苷元抑制大鼠肝脏 mTOR、

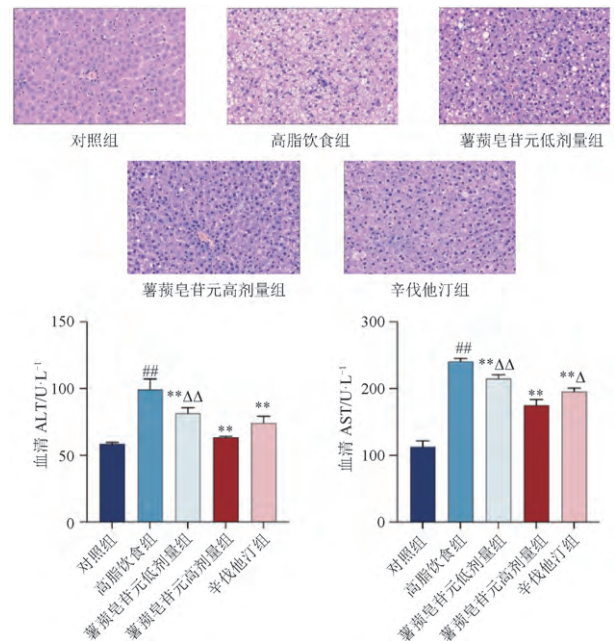


图5 薯蓣皂苷元对高脂饮食诱导的大鼠肝损伤的影响 (HE 染色, $\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 5 Effect of diosgenin on liver damage in the rats fed with a high-fat diet (HE staining, $\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

SREBP-1c mRNA 表达的能力较低剂量薯蓣皂苷元和辛伐他汀显著;高剂量薯蓣皂苷元促进大鼠肝脏 HSP60、MCAD、SCAD mRNA 表达的能力优于低剂量薯蓣皂苷元和辛伐他汀,见图 6。结果表明,薯蓣皂苷元能够显著抑制高脂饮食诱导的大鼠肝脏 mTOR、SREBP-1c 的 mRNA 表达并促进 HSP60、MCAD、SCAD 的 mRNA 表达。

3.7 薯蓣皂苷元对高脂饮食诱导的大鼠肝脏 mTOR、SREBP-1c、HSP60、MCAD、SCAD 蛋白表达的影响 与对照组相比,高脂饮食组大鼠肝脏 mTOR、SREBP-1c 蛋白表达水平显著升高, HSP60、MCAD、SCAD 蛋白表达水平显著降低;然而,与高脂饮食组相比,薯蓣皂苷元低、高剂量组和辛伐他汀组大鼠肝脏 mTOR 蛋白表达水平显著降低;薯蓣皂苷元高剂量组和辛伐他汀组大鼠肝脏 SREBP-1c 蛋白表达水平显著降低,薯蓣皂苷元低、高剂量组大鼠肝脏 HSP60、MCAD 蛋白表达水平升高,薯蓣皂苷元高剂量组大鼠肝脏 SCAD 蛋白表达水平显著升高;薯蓣皂苷元高剂量组大鼠肝脏 mTOR 蛋白表达水平显著低于薯蓣皂苷元低剂量组和辛伐他汀组,薯蓣皂苷元高剂量组大鼠肝脏 SREBP-1c 蛋白表达水平低

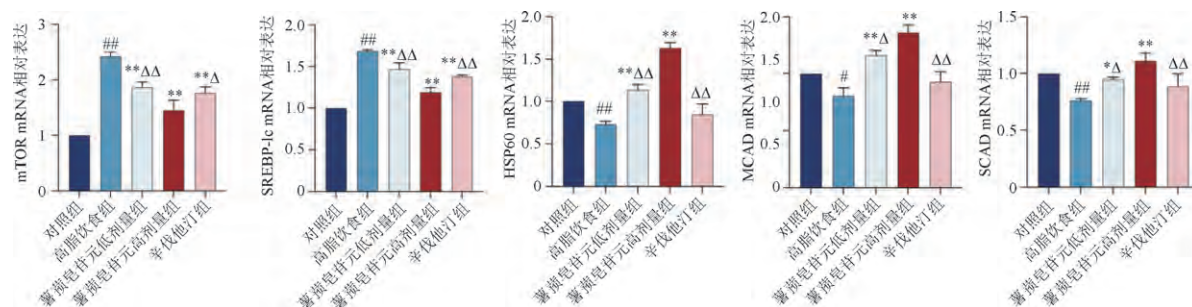


图 6 薯蓣皂苷元对高脂饮食诱导的大鼠肝脏 mTOR、SREBP-1c、HSP60、MCAD、SCAD mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 6 Effect of diosgenin on the mRNA levels of mTOR, SREBP-1c, HSP60, MCAD, and SCAD in the liver of the rats fed with a high-fat diet ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

于薯蓣皂苷元低剂量组,与辛伐他汀组相比差异无统计学意义;薯蓣皂苷元高剂量组大鼠肝脏 HSP60、

MCAD、SCAD 蛋白表达水平显著高于薯蓣皂苷元低剂量组和辛伐他汀组,见图 7。

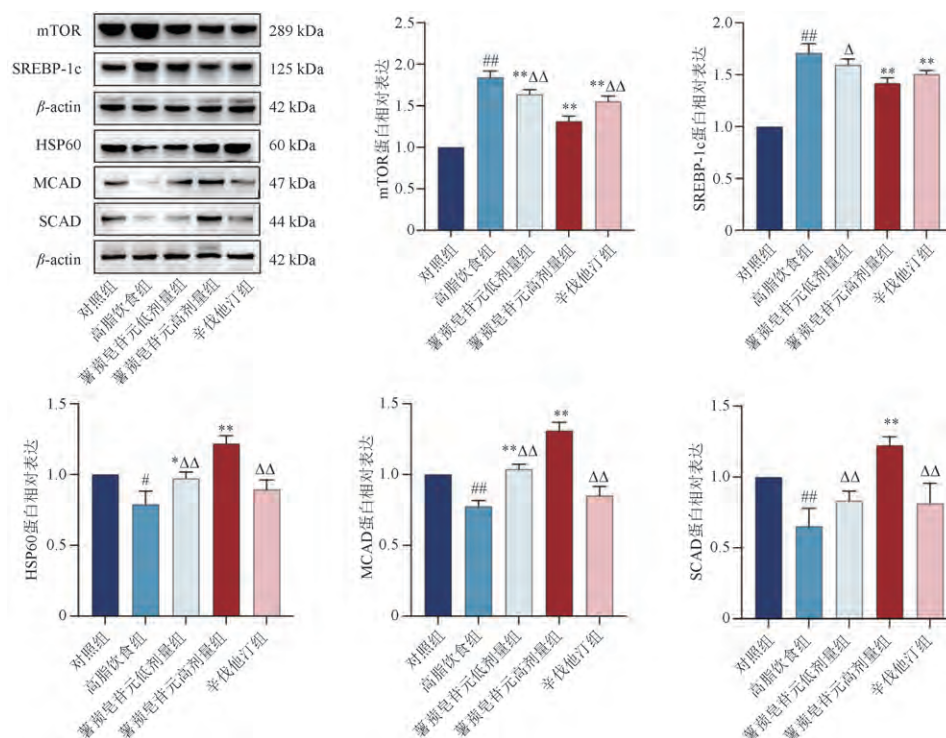


图 7 薯蓣皂苷元对高脂饮食诱导的大鼠肝脏 mTOR、SREBP-1c、HSP60、MCAD、SCAD 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 7 Effect of diosgenin on the protein levels of mTOR, SREBP-1c, HSP60, MCAD, and SCAD in the liver of the rats fed with a high-fat diet ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

4 讨论

NAFLD 以肝脏脂肪浸润为特征,已成为最常见的慢性肝病^[6]。NAFLD 已经构成了一个重大的公共卫生问题,在过去的 20 年里,其在慢性肝病中的比例从 47% 上升到 75%,在肥胖人群中,NAFLD 的患病率甚至在 57% ~ 98%^[7-8]。多项研究表明

NAFLD 是一种系统代谢性疾病,其危害不仅局限于肝脏疾病相关的发病率和病死率,更会导致肝外合并症发病率增高,如肥胖、糖尿病、血脂异常、高血压病、心血管问题和慢性肾脏疾病等^[9]。运动和减肥是目前唯一有效的治疗方法,但患者的依从性和个体差异性仍然是个问题,关于 NAFLD 治疗的一线用

药和临床治疗策略始终没有达成共识,许多药物治疗法,如维生素 E^[10]、二甲双胍^[11]、降脂药物^[12]和胰岛素增敏剂^[13-14],已被用于治疗 NAFLD,遗憾的是,动物试验和细胞研究都未能证明这些疗法有显著有效性或长期安全性。

近几十年来,中医药治疗 NAFLD 的研究引起了广泛关注,并取得了很大进展^[15]。传统中医理论认为 NAFLD 病位主要在肝脏,与脾、胃和肾功能密切相关^[16]。其病理生理主要表现为肝气郁结、疏泄不畅、肝气逆于胃、气病涉血、气血运行不畅,最终导致痰湿、瘀血等实邪积聚于肝^[17]。临床实践表明健脾利湿化浊法是治疗血脂异常和 NAFLD 的有效方法^[18]。山药是一种常用的健脾化痰除浊的草药,具有降低脂质合成、调节肠道菌群、治疗高脂血症的作用,在临床实践中,它被广泛用于治疗与痰浊有关的肥胖和脂质代谢异常^[19]。薯蓣皂苷元是从薯蓣属植物野生山药、葫芦巴种子等植物中提取的天然甾体皂苷元,具有调节血脂、抗炎、抗肿瘤等多种药理活性^[20-21],其对脾虚痰湿型 NAFLD 具有良好的治疗作用,然而,其机制有待进一步阐明。

在之前的实验中通过喂食大鼠高脂饲料建立高胆固醇血症大鼠模型,发现薯蓣皂苷元对高胆固醇血症模型大鼠具有很好的治疗作用,它能够通过抑制大鼠肠道胆固醇的吸收和增加肝脏和肠道中胆固醇的转化、排泄缓解高胆固醇血症^[3,22],这表明,薯蓣皂苷元对治疗脂质代谢紊乱性疾病具有很大的临床应用潜力。NAFLD 是代谢综合征在肝脏的表现,它的发病与血清和肝脏中脂质代谢紊乱密切相关,因此,为了进一步研究薯蓣皂苷元对 NAFLD 的影响,笔者通过喂食大鼠脂肪含量更高的高脂饲料重新诱导 NAFLD 大鼠模型^[23],以探讨薯蓣皂苷元缓解 NAFLD 的机制。本研究发现高脂饮食组大鼠的体质量、食物摄入量、肝指数增加,肝脏中脂质沉积严重,此外,高脂饮食组大鼠还表现出肝功能异常和典型的肝脏病变,这包括肝细胞气球化、脂肪变性和肝肿大,油红 O 染色也显示高脂饮食组大鼠肝脏脂滴积累严重,这些发现证实高脂饮食喂养成功诱导了 NAFLD 大鼠模型。目前的研究发现薯蓣皂苷元对高脂饮食诱导的 NAFLD 大鼠体质量、肝重、血清 TG、TC、AST、ALT 水平和肝脏 TG、TC 水平的影响与之前的实验结果相似,这进一步证实了薯蓣皂苷元在缓解脂质代谢紊乱方面确有疗效,此外,本实验从

分子层面进一步证实薯蓣皂苷元可能通过靶向与脂肪酸代谢相关的多个基因来改善脂肪生成、线粒体功能、脂肪酸 β 氧化从而缓解大鼠 NAFLD,这为薯蓣皂苷元抗 NAFLD 的临床应用提供了科学证明和理论支持。

到目前为止,“双重打击假说”是一个被广泛接受的观点,描述了 NAFLD 的病因和发展^[24]。脂质代谢紊乱引起的肝脏脂肪变性是第一次打击。过量的脂质沉积是 NAFLD 的主要起始因素,脂肪酸积累过多的肝细胞会产生更多的脂毒性物质,最终导致氧化应激和慢性肝损伤。随着 NAFLD 的进展,与线粒体功能障碍相关的脂质改变经常出现,第二次打击导致细胞脂质过量,从而增加线粒体活性氧(mtROS)的产生,这会导致线粒体 DNA 的氧化损伤,从而损害线粒体功能。因此,针对减轻脂肪酸合成和改善线粒体功能障碍似乎是一个有效的治疗方案。

合成三酰甘油的脂肪酸的主要来源是从头脂肪生成^[25],在健康人中,新生脂肪生成提供的甘油三酯水平不到肝脏的 5%,但在 NAFLD 患者中,它提供的甘油三酯含量超过 26%^[26]。最近的研究表明,肝脏 mTOR-SREBP1 信号传导显著影响全身肝脏脂质代谢的调节^[27-28]。在 NAFLD 中,脂肪酸在肝细胞中显著积累,这与甾醇调节元件结合蛋白 1c (SREBP-1c) 的表达增加有关,这是一种调节肝脏脂肪酸从头合成的关键转录因子,对从头脂肪合成有显著贡献,SREBP-1c 和 SREBP-1a 是 SREBP-1 的 2 种亚型,SREBP-1a 在肝脏中含量较低,因此,肝细胞中 SREBP-1 蛋白的改变可能代表 SREBP-1c 蛋白的改变^[29]。mTOR 是调节生物能量代谢与生物合成中的关键分子,在脂质代谢过程中发挥重要作用。mTOR 以 mTOR 复合物 1 (mTOR complex 1, mTORC1) 和 mTOR 复合物 2 (mTOR complex 2, mTORC2) 2 种复合物形式存在,mTOR 严格调控 SREBP-1c 的表达,除了控制 SREBP-1c 基因的转录外,mTOR 还促进原始 SREBP (p-SREBP) 转化为功能成熟的 SREBP (m-SREBP),通过控制 SREBP-1c 的表达,mTOR 能够显著促进脂肪酸合成^[30-31]。既往研究表明,在高脂饮食喂养的大鼠中,抑制 mTOR 的表达可以显著减轻肝脏脂质蓄积^[32-33]。高脂饮食喂养的 SREBP-1c 基因敲除小鼠表现出轻微的肝脂肪变性^[34]。本实验研究结果表明,薯蓣皂苷元能

够显著抑制高脂饮食喂养的大鼠肝脏 mTOR 和 SREBP-1c 的 mRNA 和蛋白表达,薯蓣皂苷元可能通过抑制 mTOR 和 SREBP-1c 的转录和蛋白表达抑制肝脏脂质合成,从而缓解大鼠 NAFLD。

线粒体功能障碍已被确定为由富含脂肪的饮食引起肝细胞损伤的主要分子原因^[35],其特征是能量产生能力降低和氧化还原平衡受损。具体而言,过量的脂肪酸会促进肝脏对脂肪酸的氧化,从而导致过多的超氧化物,损害线粒体功能,导致膜结构的氧化,并产生最复杂的氧化蛋白副产物。因此,受损的线粒体无法产生足够的 ATP 来维持正常的肝细胞功能,从而导致脂质代谢、血糖稳态以及蛋白质合成和生产的控制异常。线粒体功能障碍会下调肝脏脂质稳态并增加活性氧(ROS)的形成,进而导致肝脏组织中脂质过氧化、炎症细胞因子释放、细胞凋亡和纤维化,这会加速 NAFLD 的发展^[36-37]。HSP60 是维持线粒体蛋白稳定的主要线粒体伴侣,通常在线粒体内运作,通过调节线粒体蛋白、伴侣蛋白和蛋白酶的生成,以控制线粒体蛋白稳定。代谢性疾病与线粒体质量控制失调有关,研究表明,缺乏 HSP60 的人体会过早死亡,并显著改变脂肪酸代谢^[38]。在小鼠中,糖尿病和高脂肪饮食诱导的肥胖(DIO)与 HSP60 的损失有关^[39]。特别地,已经证明 HSP60 干扰导致胰岛素抵抗和线粒体功能障碍^[40]。因此,HSP60 的减少会导致体外和体内的线粒体功能障碍。

此外,线粒体中 HSP60 表达水平的失调改变了脂肪酸的氧化和能量供应,从而使这些类型的蛋白质折叠面临风险^[41-42]。小蛋白质的初级氨基酸序列将决定它们最终的天然构象,然而,对于较大的蛋白质,细胞需要分子伴侣来帮助其实现天然构象。为了使大多数蛋白质具有功能,它们需要折叠成某些三维结构,在合成蛋白质的折叠过程中,新肽可能会暂时产生最终成熟蛋白质中不存在的结构,这可能导致无功能分子,甚至分子聚集和沉淀^[43]。因此,分子伴侣的作用是识别在新肽的折叠过程中瞬间暴露的不正确结构,并将其与之结合以产生复合物,促进蛋白质向正确方向折叠。HSP60 可以改善酰基辅酶 A 脱氢酶的折叠^[44],这种酶可以氧化脂肪酸,许多脂质代谢途径依赖于酰基辅酶 A 脱氢酶,包括 MCAD 和 SCAD^[45],在病理条件下,线粒体功能障碍导致脂肪不完全氧化,引起甘油三酯的积累,

从而导致肝脏脂肪变性^[46-47]。本实验研究结果表明,在高脂饮食诱导下,大鼠肝脏 HSP60 的 mRNA 和蛋白表达显著降低,这表明高脂饮食可能诱导了线粒体功能障碍。此外,还发现 MCAD 和 SCAD 的 mRNA 和蛋白表达也明显降低,这表明在 NAFLD 的病理状态下,脂肪酸的 β 氧化可能也受损。然而,薯蓣皂苷元治疗显著促进了 HSP60、MCAD 和 SCAD 的 mRNA 和蛋白表达,这表明薯蓣皂苷元可能通过改善线粒体功能和脂肪酸 β 氧化以缓解 NAFLD。

在本实验中,薯蓣皂苷元治疗对大鼠肝脏脂肪变性具有明显改善作用,推测其可能通过下调大鼠肝脏 mTOR、SREBP-1c 的表达,上调 HSP60、MCAD 和 SCAD 的表达以减少脂质合成、改善线粒体功能障碍和促进脂肪酸 β 氧化来缓解 NAFLD。然而,薯蓣皂苷元已被证明可以通过抑制脂肪细胞分化、抑制炎症反应、调节胆固醇代谢并促进脂质分解、转化和排泄来减轻体质量^[48-49],这在一定程度上可以改善继发于肥胖的 NAFLD,这些结果表明调节肝脏脂质代谢可能不是薯蓣皂苷元改善 NAFLD 的唯一途径,薯蓣皂苷元可能还有更多的代谢益处有待发掘,这也体现出薯蓣皂苷元具有多靶点、多层次干预的优势和特色。然而,本实验存在一些局限性,薯蓣皂苷元对肝脏脂质代谢的影响是直接作用还是继发于对肥胖的改善仍有待进一步的实验验证,今后实验将继续开展体外实验证实薯蓣皂苷元对肝脏脂质代谢是否通过直接作用并进一步探讨薯蓣皂苷元的其他代谢益处。

[参考文献]

- [1] PARAMA D, BORUAH M, KUMARI Y, et al. Diosgenin, a steroidal saponin, and its analogs: effective therapies against different chronic diseases[J]. Life Sci, 2020, 260:118182.
- [2] CHEN C T, WANG Z H, CHENG-CHIN H, et al. *In vivo* protective effects of diosgenin against doxorubicin-induced cardiotoxicity[J]. Nutrients, 2015, 7(6):4938.
- [3] LI R, LIU Y, SHI J, et al. Diosgenin regulates cholesterol metabolism in hypercholesterolemic rats by inhibiting NPC1L1 and enhancing ABCG5 and ABCG8[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2019, 1864(8):1124.
- [4] 李靖杰,王薏. 中医药治疗非酒精性脂肪肝病的作用机制研究进展[J]. 广西中医药, 2019, 42(6):3.
- [5] 魏苏宁,苏雪莹,徐国恒. 肝细胞甘油三酯代谢途径异常与脂肪肝[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2016, 32(2):10.
- [6] 陈星宇,张利莉. 非酒精性脂肪性肝病的治疗进展[J]. 西南医科大学学报, 2023, 46(1):5.

- [7] YOUNOSSI Z, ANSTEE Q M, MARIETTI M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2018, 15(1): 11.
- [8] ALBHAISI S, ISSA D, ALKHOURI N. Non-alcoholic fatty liver disease; a pandemic disease with multisystem burden[J]. Hepatobiliary Surg Nutr, 2018, 7(5): 389.
- [9] FRIEDMAN S L, NEUSCHWANDER-TETRI B A, MARY R, et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies [J]. Nat Med, 2018, 24(7): 908.
- [10] WATT M J, MIOTTO P M, NARDO W D, et al. The liver as an endocrine organ-linking NAFLD and insulin resistance[J]. Endocr Rev, 2019, 40(5): 1367.
- [11] 王超越, 黄晓巍, 王雨辰, 等. 中药治疗非酒精性脂肪性肝病研究进展[J]. 人参研究, 2022, 34(5): 44.
- [12] 黄勃, 苏连杰, 冯杰, 等. 中药单体调控 AMPK 通路防治 NAFLD 的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(4): 11.
- [13] ZHANG Q, KONG X, YUAN H, et al. Mangiferin improved palmitate-induced-insulin resistance by promoting free fatty acid metabolism in HepG2 and C2C12 cells via PPAR α ; mangiferin improved insulin resistance[J]. J Diabetes Res, 2019, 2019: 1.
- [14] IPSEN D H, LYKKESFELDT J, TVEDENNYBORG P. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease[J]. Cell Mol Life Sci, 2018, 75(18): 3313.
- [15] 胡义扬. 中医药治疗非酒精性脂肪性肝病的优势与展望[J]. 世界中医药, 2015, 10(2): 149.
- [16] 潘雨亭, 许方圆, 于希忠, 等. 中药活性成分治疗非酒精性脂肪肝病作用靶点的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(6): 1109.
- [17] 桑婷婷, 郭铨洁, 郭丹丹, 等. 中医药通过调节肠道菌群抑制肥胖和炎症相关疾病的进展研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(16): 3235.
- [18] 孙建光. 健脾化浊饮对非酒精性脂肪性肝病胰岛素抵抗及肿瘤坏死因子的影响[J]. 中医研究, 2012, 25(11): 11.
- [19] 张凤霞, 王新陆, 高聆, 等. 双藜调脂汤治疗高脂血症 118 例[J]. 山东中医杂志, 2013, 32(2): 2.
- [20] KIASALARI Z, RAHMANI T, MAHMOUDI N, et al. Diosgenin ameliorates development of neuropathic pain in diabetic rats; involvement of oxidative stress and inflammation[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 86: 654.
- [21] CHENG S, LIANG S, LIU Q, et al. Diosgenin prevents high-fat diet-induced rat non-alcoholic fatty liver disease through the AMPK and LXR signaling pathways[J]. Int J Mol Med, 2018, 41(2): 1089.
- [22] YU L, LU H, YANG X, et al. Diosgenin alleviates hypercholesterolemia via SRB1/CES-1/CYP7A1/FXR pathway in high-fat diet-fed rats[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2020, 412: 115388.
- [23] THELWALL P E, SMITH F E, LEAVITT M C, et al. Hepatic cholesteryl ester accumulation in lysosomal acid lipase deficiency; non-invasive identification and treatment monitoring by magnetic resonance [J]. J Hepatol, 2013, 59(3): 543.
- [24] 瞿玉兰, 韩泽广. 脂代谢紊乱在非酒精性脂肪肝病中的作用[J]. 中国科学: 生命科学, 2017, 47(5): 40.
- [25] BERLANGA A, GUIU-JURADO E, PORRAS J A, et al. Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease[J]. Clin Exp Gastroenterol, 2014, 7(1): 221.
- [26] SOFTIC S, COHEN D E, KAHN C R. Role of dietary fructose and hepatic *de novo* lipogenesis in fatty liver disease[J]. Dig Dis Sci, 2016, 61(5): 1282.
- [27] JEONGJUN K, HAERIM L, JONGHOON L, et al. The angiogenesis inhibitor ALS-L1023 from lemon-balm leaves attenuates high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease through regulating the visceral adipose-tissue function [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(4): 846.
- [28] LI T, WENG J, ZHANG Y, et al. mTOR direct crosstalk with STAT5 promotes *de novo* lipid synthesis and induces hepatocellular carcinoma[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(8): 619.
- [29] 刘晓瑜, 徐煜凌, 程赛博, 等. 定心方Ⅲ号方通过抑制 Akt/mTOR/SREBP-1C 通路改善 ApoE^{-/-}小鼠非酒精性脂肪肝的实验研究[J]. 中药药理与临床, 2020, 36(5): 149.
- [30] TANG K, DENG Y, ZHENG C, et al. Prevention of nonalcoholic hepatic steatosis by shenling baizhu powder; involvement of adiponectin-induced inhibition of hepatic SREBP-1c [J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 9701285.
- [31] YAO Q, LI S, CHENG X, et al. Yin Zhi Huang, a traditional Chinese herbal formula, ameliorates diet-induced obesity and hepatic steatosis by activating the AMPK/SREBP-1 and the AMPK/ACC/CPT1A pathways[J]. Ann Transl Med, 2020, 8(5): 231.
- [32] ZHANG Y Y, MENG T, ZUO L, et al. Xylitol B attenuates fatty acid-induced lipid accumulation via the SREBP-1c pathway in NAFLD models[J]. Mar Drugs, 2017, 15(6): 163.
- [33] CARON A, RICHARD D, LAPLANTE M. The roles of mTOR complexes in lipid metabolism[J]. Annu Rev Nutr, 2015, 35(1): 321.
- [34] QUAN H Y, KIM D Y, KIM S J, et al. Betulinic acid alleviates non-alcoholic fatty liver by inhibiting SREBP1 activity via the AMPK-mTOR-SREBP signaling pathway[J]. Biochem Pharmacol, 2013, 85(9): 1330.
- [35] 马琼, 石安华, 赵茜, 等. 中医药调控线粒体功能防治非酒精性脂肪肝病的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(19): 5113.
- [36] RAFIEI H, OMIDIAN K, BANDY B. Dietary polyphenols protect against oleic acid-induced steatosis in an *in vitro* model of NAFLD by modulating lipid metabolism and improving mitochondrial function[J]. Nutrients, 2019, 11(3): 541.
- [37] 雷蕾, 彭宗根. 非酒精性脂肪肝病中线粒体功能紊乱及其治疗策略[J]. 中国新药杂志, 2021, 30(24): 8.
- [38] LI R B, XIN T, LI D D, et al. Therapeutic effect of sirtuin 3 on

- ameliorating nonalcoholic fatty liver disease; the role of the ERK-CREB pathway and Bnip3-mediated mitophagy[J]. *Redox Biol*, 2018, 18:229.
- [39] MORALES M D C, CHANG C Y, LE V L, et al. High-fructose/high-fat diet downregulates the hepatic mitochondrial oxidative phosphorylation pathway in mice compared with high-fat diet alone[J]. *Cells*, 2022, 11(21):3425.
- [40] ZHANG Y P, DENG Y J, TANG K R, et al. Berberine ameliorates high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in rats via activation of SIRT3/AMPK/ACC pathway[J]. *Curr Med Sci*, 2019, 39(1):7.
- [41] ZENG X, YANG J, HU O, et al. Dihydromyricetin ameliorates nonalcoholic fatty liver disease by improving mitochondrial respiratory capacity and redox homeostasis through modulation of SIRT3 signaling[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2018, 30(2):163.
- [42] HAUFFE R, RATH M, SCHELL M, et al. HSP60 reduction protects against diet-induced obesity by modulating energy metabolism in adipose tissue[J]. *Mol Metab*, 2021, 53:101276.
- [43] ZHANG Y P, DENG Y J, TANG K R, et al. Berberine ameliorates high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in rats via activation of SIRT3/AMPK/ACC pathway[J]. *Curr Med Sci*, 2019, 39(1):7.
- [44] WU L W, MO W H, FENG J. Astaxanthin attenuates hepatic damages and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease by regulating the FGF21/PGC-1 α pathway[J]. *Br J Pharmacol*, 2021, 23:193.
- [45] 刘云, 郭洁, 张曼玲, 等. 葱白提取物改善非酒精性脂肪性肝病大鼠糖脂代谢的机制[J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(10):5.
- [46] WARDELMANN K, RATH M, SCHELL M, et al. Central acting Hsp10 regulates mitochondrial function, fatty acid metabolism, and insulin sensitivity in the hypothalamus[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(5):711.
- [47] HAN H, GUO Y, LI X, et al. Plant sterol ester of α -linolenic acid attenuates nonalcoholic fatty liver disease by rescuing the adaption to endoplasmic reticulum stress and enhancing mitochondrial biogenesis[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019:8294141.
- [48] LIU M, XU L, YIN L, et al. Potent effects of dioscin against obesity in mice[J]. *Sci Rep*, 2015, 5:7973.
- [49] XIN W A, JI B, ZI L C, et al. Effect of diosgenin on metabolic dysfunction: role of ER β in the regulation of PPAR γ [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2015, 289(2):286.

[责任编辑 陈玲]