

· 基础研究 ·

槲皮素通过调控内质网应激信号通路改善非酒精性脂肪肝大鼠肝脏损伤

罗瑞熙^{1,2*}, 王文佳¹, 王平¹, 田维毅¹

¹贵州中医药大学基础医学院, ²干细胞治疗研究中心, 贵州 贵阳 550025

[摘要] 目的: 基于内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)信号通路探讨槲皮素(querctin, Que)对高脂饲料诱导的非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)大鼠模型的干预作用及其机制。方法: 高脂饲料喂养SD大鼠8周建立NAFLD模型, 之后随机分为模型组、Que低剂量组(25 mg/kg)和Que高剂量组(50 mg/kg), 另设正常饮食大鼠作为正常对照组, 给药期间监测大鼠体重、进食量。继续饲养8周后, 检测各组大鼠血清中胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、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)、丙氨酸氨基转移酶(glutamic-pyruvic transaminase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(glutamic oxalacetic transaminase, AST)以及肝脏组织中TC、TG的含量变化; 苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色、油红O染色、马松(Masson)染色观察大鼠肝脏组织的病理学变化; 血糖仪检测大鼠血糖值并通过糖耐量试验评估大鼠糖耐量受损情况; 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒检测各组大鼠空腹胰岛素水平; 实时荧光定量PCR法(quantitative real-time PCR, RT-qPCR)检测各组大鼠肝脏组织ERS相关基因*Bip*、*Atf6*、*Atf4*、*Xbp-1s*和*Chop*的表达变化; Western blot法检测各组大鼠肝脏组织ERS相关蛋白BiP、CHOP、ATF4、ATF6、XBP-1s和XBP-1u的表达变化。结果: 实验期间, 各组大鼠体重、进食量差异无统计学意义; 与正常对照组比较, 模型组大鼠血清TG、TC、LDL-C、AST、ALT浓度升高, HDL-C浓度降低($P < 0.05$); 与模型组比较, Que低剂量组大鼠血清TG、TC、LDL-C、AST、ALT浓度降低($P < 0.05$), Que高剂量组大鼠血清TG、TC、AST、ALT浓度降低($P < 0.05$)。与正常对照组比较, 模型组大鼠肝脏体积增大, 重量增加, 肝细胞形态明显肿胀且呈空泡化, 脂质沉积明显增加, 且纤维化区域明显增加, 同时大鼠出现胰岛素抵抗和糖耐量受损情况; 与模型组比较, 以上病理改变在Que低、高剂量组大鼠中有明显改善。RT-qPCR和Western blot结果显示, 与正常对照组比较, 模型组大鼠肝脏组织中*Bip*、*Atf6*、*Atf4*、*Xbp-1s*和*Chop* mRNA表达显著升高, BiP、CHOP、ATF4、ATF6和XBP-1s蛋白表达显著升高; 与模型组比较, Que低、高剂量组大鼠肝脏组织*Bip*、*Atf6*、*Atf4*、*Xbp-1s*和*Chop* mRNA表达降低, BiP、CHOP、ATF4、ATF6和XBP-1s蛋白表达也显著降低。结论: Que可以改善高脂饲料诱导的NAFLD大鼠脂代谢异常、糖耐量受损、肝脏脂质沉积以及病理损伤, 其机制可能是通过调控ERS信号通路发挥作用。

[关键词] 非酒精性脂肪肝; 内质网应激; 槲皮素

[中图分类号] R575.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2024)04-445-10

doi: 10.7655/NYDXBNSN230684

Quercetin attenuates liver injury in rats with non-alcoholic fatty liver disease by modulating endoplasmic reticulum stress

LUO Ruixi^{1,2*}, WANG Wenjia¹, WANG Ping¹, TIAN Weiyi¹

¹School of Basic Medical Sciences, ²Stem Cell Therapy Research Center, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

[Abstract] **Objective:** This study aimed to investigate the potential of quercetin(Que) in ameliorating non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) induced by a high-fat diet (HFD) through the modulation of endoplasmic reticulum stress (ERS) in rats. **Methods:** Feeding SD rats with high-fat diet(HFD)for 8 weeks to establish the NAFLD model, then randomly divided into the HFD group, HFD + low-dose Que group (25 mg/kg), and HFD + high-dose Que group (50 mg/kg). Another group of rats fed normal diet served as the

[基金项目] 国家自然科学基金(82060824); 贵州省科学技术基金(ZK[2021]YB345); 贵州省卫生健康委员会科学技术基金(2021[92]); 贵州省教育厅高等学校科学研究项目(青年项目)(2022[203])

*通信作者(Corresponding author), E-mail: luoruixi058@gzy.edu.cn

control group. During the administration period, monitoring of rat body weight and food intake was conducted. After continuing feeding for 8 weeks, serum levels of total cholesterol (TC), triglycerides (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), as well as changes in TC and TG content in liver tissue of each group were detected. Histopathological changes in rat liver tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining, oil red O staining, and Masson's staining. Blood glucose levels were measured using a glucometer, and rat glucose tolerance was assessed by glucose tolerance test. Fasting insulin levels in each group of rats were detected using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits. Real-time fluorescent quantitative PCR was used to detect the expression changes of ERS-related genes *Bip*, *Atf6*, *Atf4*, *Xbp-1s*, and *Chop* in rat liver tissue of each group. Western blot was used to detect the expression changes of ERS-related proteins BiP, CHOP, ATF4, ATF6, XBP-1s, and XBP-1u in rat liver tissue of each group. **Results:** Throughout the experiment, no significant differences in food intake and body weight were observed among the four groups. Compared to the control group, the HFD group exhibited increased serum levels of triglycerides (TG), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-C), glutamic oxalacetic transaminase (AST), and glutamic-pyruvic transaminase (ALT), along with decreased high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) levels ($P < 0.05$). In the low-dose Que group, serum levels of TG, TC, LDL-C, AST, and ALT were significantly reduced compared to the HFD group ($P < 0.05$). Similarly, the high-dose Que group showed decreased serum levels of TG, TC, AST, and ALT compared to the HFD group ($P < 0.05$). In the HFD group, the liver exhibited enlargement and increased absolute weight, with prominently swollen hepatocytes, marked vacuolization, and accumulated lipid droplets. Additionally, increased collagen deposition, insulin resistance, and impaired glucose tolerance were observed in the HFD group. However, these alterations were reversed in both low- and high-dose Que groups. The results of RT-qPCR and Western blot showed that compared to the control group, the mRNA expression of *Bip*, *Atf6*, *Atf4*, *Xbp-1s*, and *Chop* in the liver tissue of rats in the HFD group significantly increased, and the protein expression of BiP, CHOP, ATF4, ATF6, and XBP-1s also significantly increased. Compared to the HFD group, the mRNA expression of *Bip*, *Atf6*, *Atf4*, *Xbp-1s*, and *Chop* in the liver tissue of rats in the low- and high-dose Que groups decreased, and the protein expression of BiP, CHOP, ATF4, ATF6, and XBP-1s also significantly decreased. **Conclusion:** Que treatment attenuates HFD-induced aberrant lipid metabolism, impaired glucose tolerance, and hepatic lipid deposition in NAFLD rats, with modulation of the ERS-related pathway potentially playing a critical role.

[Key words] non-alcoholic fatty liver disease; endoplasmic reticulum stress; quercetin

[J Nanjing Med Univ, 2024, 44(04): 445-454]

非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是指没有过多饮酒,但肝细胞出现以脂质沉积和脂肪变性为特征的一种临床病理综合征。目前我国NAFLD平均患病率高达29%,且患者通常伴随2型糖尿病、肥胖、心血管疾病等慢性相关疾病^[1]。目前认为NAFLD的发生取决于多种因素的综合作用,如脂代谢异常、内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)、氧化应激、线粒体失功能、炎症等。其中,ERS被认为是NAFLD发展过程中最重要的因素之一^[2]。

槲皮素(quercetin, Que)是一种天然黄酮类化合物,是众多中草药发挥生物学治疗效应的主要成分,如柴胡、桑叶和银杏等^[3]。Que对多种疾病具有预防和治疗作用,其机制体现为抗氧化、抗炎、抗癌和提高免疫力等^[4]。有研究表明,Que对NAFLD体内外模型具有明显的干预作用,涉及的机制主要包括抑制炎症、氧化应激、凋亡以及对自噬的调控^[5]。然而,Que对NAFLD模型下ERS相关通路的调控作

用目前少有报道,本课题组前期研究发现对ERS调控可明显改善NAFLD大鼠肝细胞脂毒性损伤^[6]。因此,本研究利用高脂饲料喂养(high fat diet, HFD)建立NAFLD大鼠模型,探讨Que是否可通过调控ERS信号通路从而改善NAFLD,为Que治疗NAFLD相关机制研究提供实验基础和理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物

SPF级健康雄性SD大鼠26只(180~200 g)购于成都达硕实验动物有限公司,经检验合格后饲养于贵州中医药大学实验动物中心,条件为:室温20~25℃,湿度70%,分笼饲养,自由饮食饮水,12 h明暗交替。实验所用大鼠专用高脂饲料购于成都达硕实验动物有限公司。本研究获得贵州中医药大学动物保护伦理委员会的批准(实验伦理号:20220058)。

1.1.2 细胞及试剂

人肝癌细胞系(HepG2, CL-0103, 武汉普诺赛生命科技有限公司); Que(abs47048075, 上海爱必信公司); 甘油三酯(triglyceride, TG)测定试剂盒(A110-1-1)、总胆固醇(total cholesterol, TC)测定试剂盒(A111-1-1)和油红O染液(D027-1-1)(南京建成生物工程研究所); 大鼠胰岛素酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA)试剂盒(ZC-37507, 上海茁彩生物科技有限公司); TRIzol™ 试剂(15596026, Ambion公司, 美国); 5×qRT SuperMix和2×SYBR Green qPCR Master Mix(Bimake公司, 美国); β-actin商业化荧光定量引物(B661202, 上海生工公司); RIPA裂解液(R0010, 北京索莱宝公司); BCA蛋白定量试剂盒、10% PAGE凝胶快速制备试剂盒、蛋白酶抑制剂混合液、蛋白上样缓冲液、三色预染蛋白标记蛋白、聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜(0.22 μm)和快速转膜缓冲液(上海雅酶生物公司); C/EBP同源蛋白(C/EBP homologous protein, CHOP)、激活转录因子4(activating transcription factor 4, ATF4)抗体(Bimake公司, 美国); 葡萄糖调节蛋白78(glucose regulation protein 78, BiP)、X-盒结合蛋白1s(X box-binding protein-1s, XBP-1s)和X-盒结合蛋白1u(X box-binding protein-1u, XBP-1u)抗体(武汉Proteintech公司); 激活转录因子6(activating transcription factor 6, ATF6)抗体(D262665, 上海生工公司); β-肌动蛋白(β-actin, bsm-33036M, 北京博奥森公司); 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(immunoglobulin G, IgG, AS014)和山羊抗小鼠IgG(AS003)(武汉ABclonal公司); 棕榈酸(palmitic acid, PA, P432956, 上海阿拉丁公司); 衣霉素(tunicamycin, TM, T7765, Sigma公司, 美国); CCK-8试剂盒(abs50003, 上海爱必信公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及模型建立

大鼠适应性饲养1周后, 遵循体重随机分配原则按实验设计分为以下4组: 正常对照组(Control, 8只, 普通饲料喂养); 模型组(HFD, 8只, 高脂饲料喂养); Que低剂量组[HFD+Que(L), 5只, 高脂饲料喂养, 25 mg/kg Que灌胃]; Que高剂量组[HFD+Que(H), 5只, 高脂饲料喂养, 50 mg/kg Que灌胃]。高脂饲料喂养8周后, 正常对照组和模型组各取3只大鼠麻醉处死检测模型建立情况, 其余继续喂养。各干预组于高脂饲养第8周建模成功后开始进行

Que每天灌胃1次, 共灌胃8周, 其余组予以蒸馏水灌胃作为对照处理。各组动物在高脂喂养前1 d、第4、8、12、16周进行体重、进食量检测。

1.2.2 血清生化指标检测

检测前1 d禁食16 h, 第2天通过鼠尾静脉采血, 检测空腹血糖; 收集外周血清全自动生化仪进行TG、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)、天冬氨酸氨基转移酶(glutamic oxalacetic transaminase, AST)、丙氨酸氨基转移酶(glutamic-pyruvic transaminase, ALT)水平检测。通过大鼠胰岛素ELISA试剂盒检测各组大鼠血清空腹胰岛素水平。

1.2.3 糖耐量试验

检测前1 d禁食16 h, 第2天腹腔注射50%高糖溶液(2.0 g/kg), 分别于注射后0、10、30、60、120 min通过尾静脉采血利用血糖测试仪检测血糖变化情况。

1.2.4 苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色

动物饲养16周后, 戊巴比妥钠进行麻醉取血处死后开腹完整取出大鼠肝脏进行形态学观察并拍照。之后对肝脏组织进行称重及体积测量(量筒法)。肝脏组织经石蜡包埋成块后, 在组织切片机上切片留存以备下一步组织学染色。切片分别在二甲苯I液、II液、III液中分别浸泡5 min进行脱蜡; 而后依次在100%、95%、90%、80%和70%乙醇中各浸泡5 min进行脱水并用蒸馏水冲洗; 加入苏木素染液染3~8 min, 蒸馏水冲洗后1%盐酸酒精分化5~10 s, 蒸馏水冲洗干净; 加入伊红染液染3 min后冲洗干净; 再依次加入70%、80%、90%、95%和100%乙醇浸泡5 min脱水; 之后分别在二甲苯I液、II液中浸泡5 min透明化; 最后盖玻片封片后显微镜下观察染色结果。

1.2.5 马松(Masson)染色

脱水步骤与HE染色相同, 而后加入苏木素染色染核1~2 min, 蒸馏水冲洗后1%盐酸酒精分化3~5 min, 蒸馏水冲洗; 加入Masson丽春红染液染5~10 min, 1%磷酸铝溶液洗2~3 min, 1%苯胺蓝染液染5 min; 最后经95%、100%乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封固后镜下观察并拍照。

1.2.6 油红O染色

组织冰冻切片后中性甲醛固定5~10 min, 清洗后加入配制好的油红O工作液染色10 min; 清洗后加入苏木素染液染核1 min; 超纯水清洗后显微镜观察染色结果。

1.2.7 肝脏组织TC、TG检测

肝脏组织TC、TG表达水平根据检测试剂盒说明书进行操作。首先将组织加入无水乙醇匀浆后离心制备上清待检;96孔板依次加入空白、标准品、样本2.5 μL、工作液250 μL后37℃孵育10 min;酶标仪检测各孔510 nm吸光值后绘制标准曲线,结合蛋白浓度计算出结果。

1.2.8 实时荧光定量PCR法(quantitative real-time PCR, RT-qPCR)检测肝脏组织ERS相关基因表达

液氮研磨组织,加入TRIzol™试剂后提取组织总RNA,随后加入反转录试剂将RNA逆转录为cDNA。各组肝脏组织*Chop*、*Bip*、*Atf6*、*Atf4*、*Xbp-1s*基因表达通过实时荧光定量PCR仪进行扩增检测,扩增条件为95℃预变性5 min、95℃10 s、65℃1 min共39个循环;熔解曲线反应条件为65~95℃每隔0.5℃进行信号检测绘制;内参基因为β-actin,各组基因表达差异采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 相对定量法进行分析。本实验引物序列见表1。

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

Gene	Forward(5'→3')	Reverse(5'→3')
<i>Chop</i>	AAGCCTGGTATGAGGATCTGC	TTCCTGGGGATGAGATATAGGTG
<i>Bip</i>	GCATCACGCCGTCGTATGT	ATTCCAAGTGCGTCCGATGAG
<i>Atf6</i>	TGCCTTGGGAGTCAGACCTATGG	CTGTGGACCGAGGAGAGGAGATG
<i>Atf4</i>	AGTTTAGAGCTAGGCAGTGAAG	CATACAGATGCCACTGTCATTG
<i>Xbp-1s</i>	AGCTTTTACGGGAGAAAACCTCAC	CCTCTGGAACCTCGTCAGGA

1.2.9 蛋白印迹(western blot, WB)法检测ERS相关蛋白表达

肝脏组织及细胞加入RIPA裂解液后匀浆提取组织总蛋白,BCA试剂盒测定蛋白浓度后经高温变性后保存于-80℃备用。蛋白经凝胶电泳后,350 mA、40 min快速转移至PVDF膜,5%脱脂牛奶室温封闭1 h后加入相应一抗:BiP(1:1 000)、CHOP(1:1 000)、ATF4(1:1 000)、ATF6(1:1 000)、XBP-1s(1:500)、XBP-1u(1:500)和β-actin(1:3 000),4℃孵育过夜;次日PBST清洗3次后加入二抗(1:5 000)常温孵育1 h;PBS吐温缓冲液清洗3次后加入ECL显影液进行曝光,各组蛋白灰度值通过Image J软件进行灰度计算,经内参蛋白灰度值进行校正(即对照组蛋白表达值为1),得出各组蛋白相对表达量。

1.2.10 细胞培养及分组

人HepG2细胞系在37℃、5% CO₂条件下培养于DMEM高糖培养基中。通过加入400 μmol/L PA诱导24 h建立细胞脂毒性损伤模型(模型组),同时根据经前期实验结果设立Que(100 μmol/L)干预组,Que在模型组给药时随PA一起加入细胞培养基中。此外,通过ERS诱导剂TM(1 μg/mL)诱导HepG2细胞24 h建立细胞ERS模型,同时设立Que(100 μmol/L)干预组,干预方法为Que随TM一同加入细胞培养基中。

1.2.11 CCK-8细胞活性检测

通过CCK-8细胞活性试剂盒检测细胞活性。

细胞接种于96孔板,经PA或TM处理及药物干预后,向各组细胞培养基中加入1/10体积的CCK-8试剂,37℃孵育2~4 h后,采用酶标仪检测在450 nm波长下的吸光值,计算细胞相对活性。

1.3 统计学方法

通过SPSS 25.0软件进行数据分析,实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,对于符合正态分布的数据,采用*t*检验进行组间比较;对于多组数据先进行单因素方差分析,而后进行多组组间比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

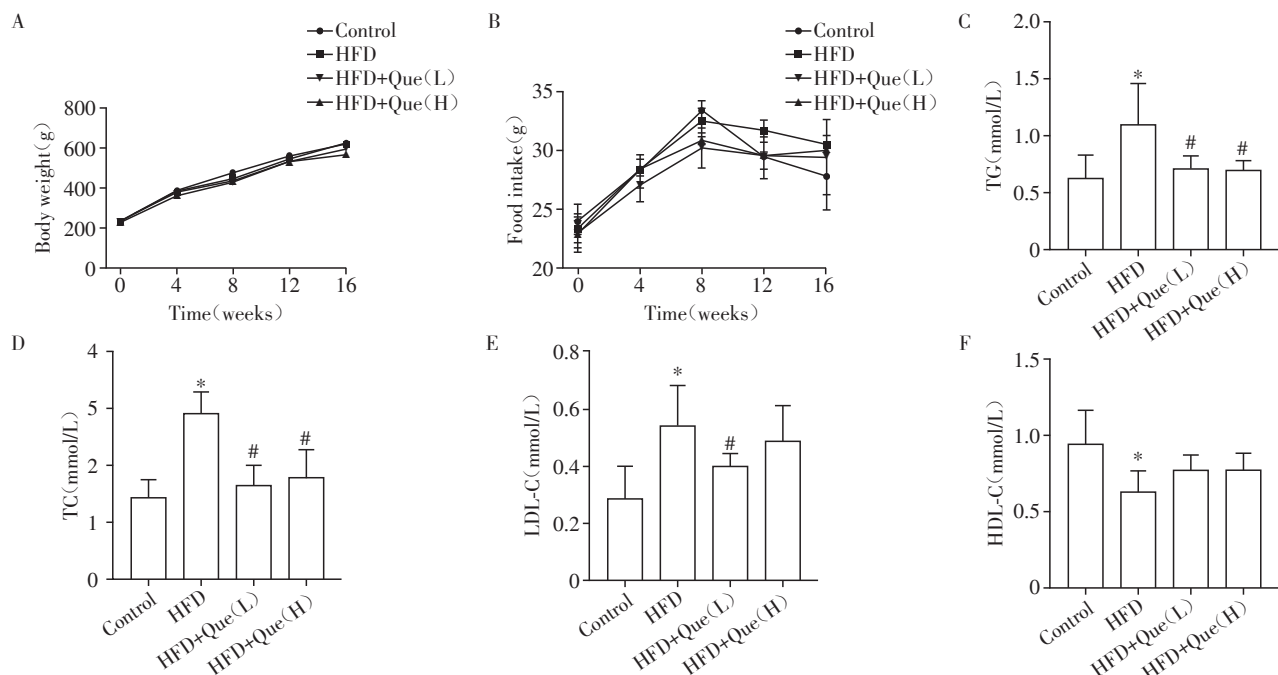
2 结果

2.1 Que对NAFLD大鼠生理指标、血脂代谢的影响

体重监测结果显示各组大鼠在饲养期间体重、进食量差异无统计学意义(图1A、B)。与Control组比较,HFD组大鼠血清TG、TC、LDL-C浓度增加($P < 0.05$),HDL-C浓度降低($P < 0.05$);与HFD组比较,HFD+Que(L)组大鼠血清TG、TC、LDL-C浓度降低($P < 0.05$),HDL-C浓度升高但差异无统计学意义($P > 0.05$);与HFD组比较,HFD+Que(H)组大鼠血清TG、TC浓度降低($P < 0.05$),LDL-C浓度稍降,差异无统计学意义($P > 0.05$),HDL-C浓度升高,差异无统计学意义($P > 0.05$,图1C~F)。

2.2 Que对NAFLD大鼠肝脏形态和功能的影响

与Control组比较,HFD组大鼠血清肝脏功能指标AST和ALT浓度升高,与HFD组比较,HFD+Que



A, B: Changes in body weight (A) and food intake (B) in different groups. C-F: Changes in serum TG (C), TC (D), LDL-C (E), HDL-C (F) levels in different groups. Compared with the control group, * $P < 0.05$; compared with the HFD group, # $P < 0.05$ ($n=5$).

图1 Que对NAFLD大鼠生理指标、血脂代谢的影响

Figure 1 Effects of Que on physiological indicators and blood lipid metabolism in NAFLD rats

(L)、HFD+Que(H)组AST和ALT浓度降低($P < 0.05$, 图2A、B)。解剖大鼠完整分离其肝脏发现,与Control组比较,HFD组大鼠肝脏形态明显脂肪化,颜色偏白且体积增加($P < 0.01$)、重量增加($P < 0.05$);与HFD组比较,HFD+Que(L)、HFD+Que(H)组肝脏体积、重量均减少($P < 0.05$,图2C~E)。Masson染色结果提示,与Control组比较,HFD组肝脏组织胶原沉积增加较为明显,提示肝脏纤维化区域增加;与HFD组比较,HFD+Que(L)、HFD+Que(H)组肝脏组织纤维化区域有所减少(图2F)。

2.3 Que对NAFLD大鼠肝脏脂质沉积的影响

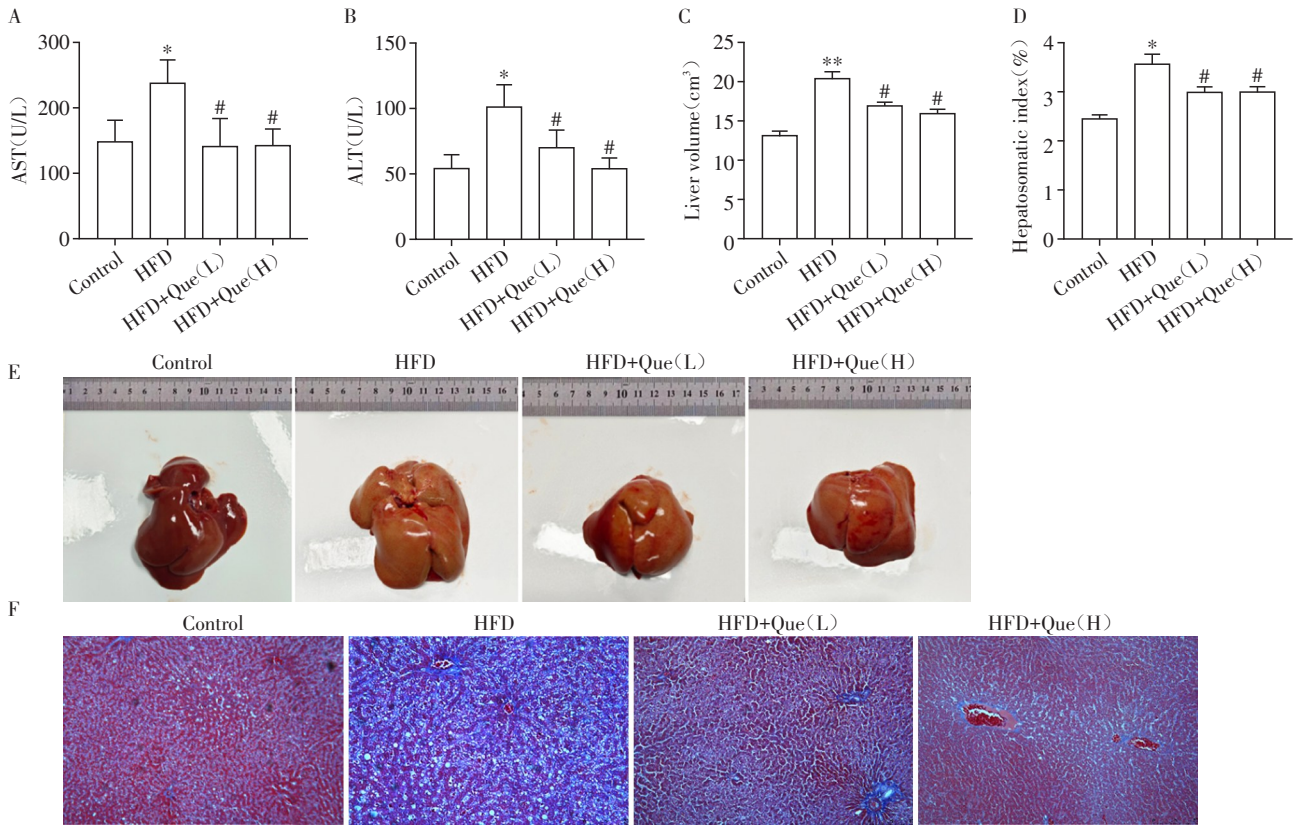
HE染色结果显示,与Control组比较,HFD组肝脏肝细胞脂肪变性明显,形态明显肿胀且呈气球样变及呈空泡化,而HFD+Que(L)、HFD+Que(H)组肝细胞脂肪变性程度有所改善(图3A)。油红O染色结果显示,与Control组比较,HFD组肝脏组织细胞脂质沉积明显增加,表现为大量脂滴聚集于肝细胞,而HFD+Que(L)、HFD+Que(H)组大鼠肝细胞脂质沉积有所减少(图3B)。此外,本研究检测了大鼠肝脏组织TG与TC的含量,结果显示与Control组比较,HFD组肝脏组织内TG与TC含量增加;HFD+Que(H)组肝组织TG与TC相比HFD组减少($P < 0.05$);而HFD+Que(L)组肝组织TG相比HFD组减

少($P < 0.05$),肝组织TC平均值减少但差异无统计学意义($P > 0.05$,图3C、D)。

2.4 Que对NAFLD大鼠糖代谢的影响

NAFLD是一种代谢性疾病,其发生发展与糖代谢密切相关,因此本研究评估了Que对NAFLD大鼠糖代谢的影响。各组大鼠空腹血糖结果显示,与Control组比较,HFD组大鼠空腹血糖值稍有升高,而HFD+Que(L)、HFD+Que(H)组大鼠空腹血糖值与HFD组比较稍有降低,但各组血糖值差异均无统计学意义($P > 0.05$,图4A)。空腹胰岛素检测结果显示,与Control组比较,HFD组大鼠空腹胰岛素明显升高($P < 0.01$),结合血糖轻微升高情况,提示HFD组大鼠出现了胰岛素抵抗;与HFD组比较,HFD+Que(L)、HFD+Que(H)组大鼠空腹胰岛素水平明显降低($P < 0.05$),提示胰岛素抵抗减轻(图4B)。

糖耐量试验发现,30 min时,与Control组比较,HFD组血糖值升高($P < 0.05$),HFD+Que(L)组血糖值相比HFD组降低($P < 0.05$),HFD+Que(H)组与HFD组血糖值差异无统计学意义;60 min后,与Control组比较,HFD组血糖值升高($P < 0.05$),而HFD+Que(L)、HFD+Que(H)组血糖值相比HFD组降低($P < 0.05$);120 min后各组大鼠血糖水平差异无统计学意义(图4C)。以上糖耐量实验显示HFD组大



A, B: Changes in serum AST(A) and ALT(B) levels in the different groups. C, D: Liver volume(C) and hepatosomatic index(D) in the different groups. E: Representative images of liver morphology in the different groups. F: Representative Masson staining images of liver tissues in the different groups($\times 200$). Scale bar: 20 μm . Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with the HFD group, # $P < 0.05$ ($n=5$).

图2 Que对NAFLD大鼠肝脏形态和功能的影响

Figure 2 Effects of Que on hepatic function and morphology in NAFLD rats

鼠存在糖耐量受损情况,而Que低、高剂量灌胃可改善高脂饲料诱导的大鼠糖耐量受损。

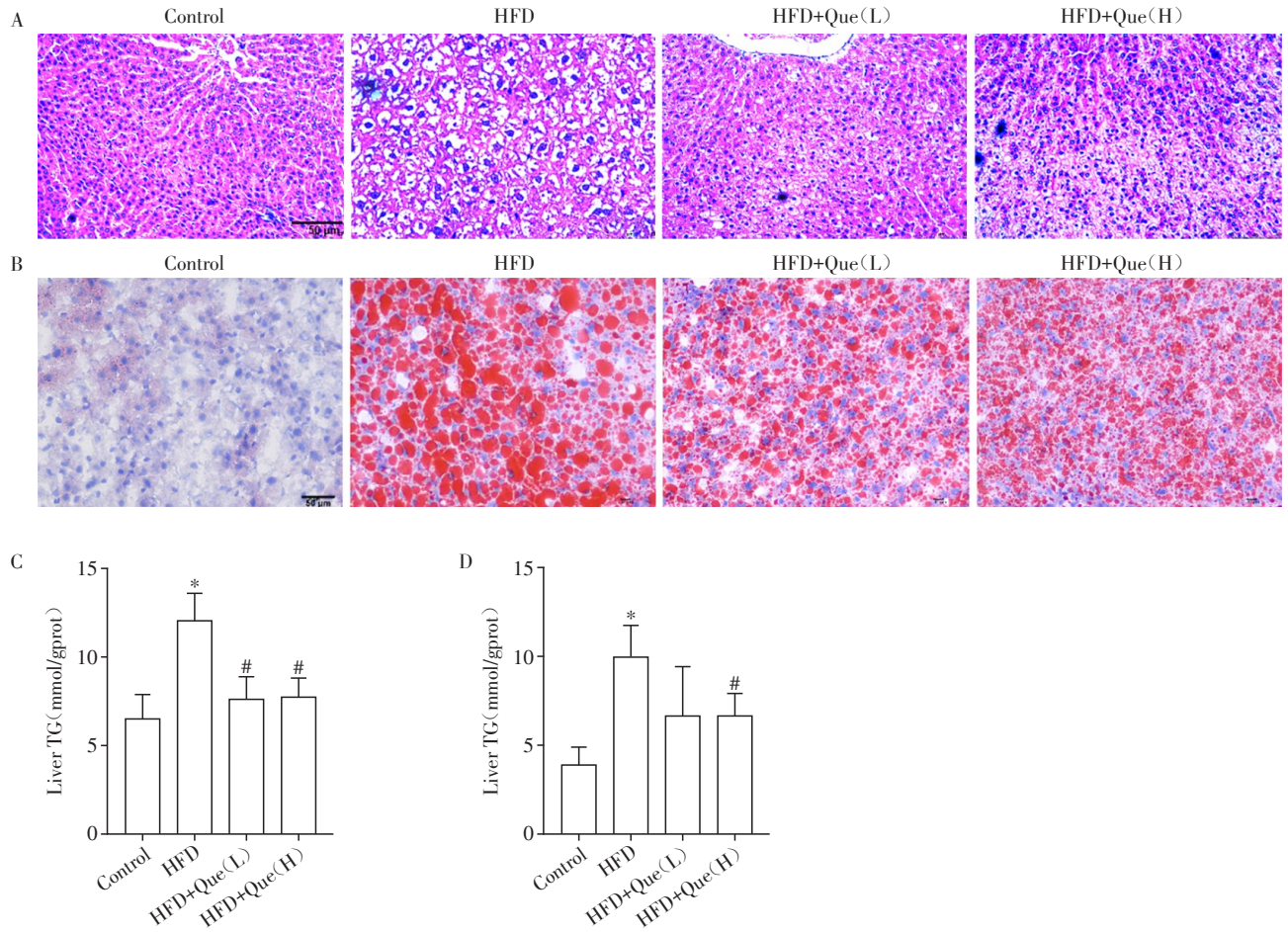
2.5 Que减轻NAFLD大鼠肝脏组织ERS水平

ERS在NAFLD发生发展过程中扮演关键作用,为了探讨Que是否可通过调控ERS相关通路从而改善NAFLD,本研究检测了ERS相关通路重要分子的表达变化。RT-qPCR结果显示,与Control组比较,HFD组大鼠肝脏组织ERS通路重要基因*Bip*、*Atf6*、*Atf4*、*Xbp-1s*和*Chop*表达显著增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),Que低、高剂量灌胃处理可降低以上基因在肝脏组织表达水平($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$,图5A~E)。蛋白检测结果显示,在NAFLD模型大鼠肝脏组织中,ERS信号通路关键蛋白BiP和CHOP表达均升高,ERS发展过程中涉及的3条主要通路关键蛋白ATF4、ATF6以及XBP-1剪切体XBP-1s表达也均有升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与HFD组相比,Que低、高剂量干预可显著降低大鼠肝脏组织中ERS通路相关蛋白表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$,图5F)。以上结果提示Que低、高剂量干预可减轻NAFLD大鼠肝脏组织ERS,这

可能是Que改善大鼠NAFLD的重要机制之一。

2.6 Que通过抑制ERS通路减轻肝细胞脂毒性损伤

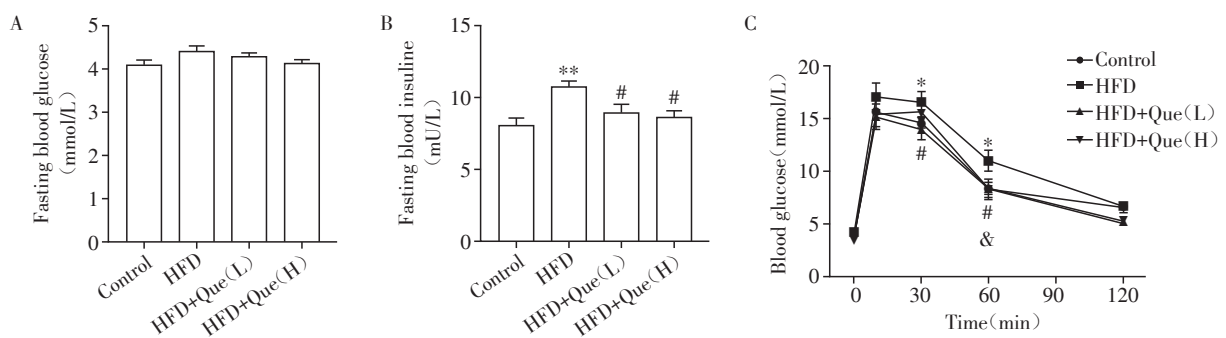
为了进一步验证体内实验结果,同时探索Que改善NAFLD的分子机制,利用PA(400 $\mu\text{mol/L}$)诱导HepG2细胞建立脂毒性损伤模型,并观察Que(100 $\mu\text{mol/L}$)的干预效果。CCK-8结果显示,PA诱导24h后,HepG2细胞活性降低至60%,而Que干预后细胞活性恢复至81%,提示Que可改善PA对HepG2细胞的活性抑制(图6A)。WB结果显示,PA可诱导ERS信号通路关键蛋白BiP和CHOP表达升高,而Que可以降低其表达(图6B),提示Que可抑制PA引起的HepG2细胞ERS。本研究进一步使用ERS诱导剂TM(1 $\mu\text{g/mL}$)建立ERS细胞模型,观察Que对ERS激动剂引起HepG2细胞的损伤是否同样具有干预作用。CCK-8结果显示,TM诱导24h后,HepG2细胞活性降低至63%,而Que干预后细胞活性恢复至84%,提示Que可改善TM对HepG2细胞的活性抑制(图6C)。WB结果显示,TM可诱导ERS信号通路关键蛋白BiP和CHOP表达升高,而



A, B: Representative HE(A) and oil red O staining(B) images of liver tissues($\times 200$). Scale bar: 50 μm . C, D: Total TG and TC contents of liver tissues. Compared with the control group, * $P < 0.05$; compared with the HFD group, # $P < 0.05$ ($n=5$).

图3 Que对NAFLD大鼠肝脏脂质沉积的影响

Figure 3 Effects of Que on hepatic lipid deposition in NAFLD rats



A: The fasting blood glucose level in the different groups. B: The fasting serum insulin level in the different groups. C: Blood glucose levels in the glucose tolerance test. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with the HFD group, # $P < 0.05$ ($n=5$).

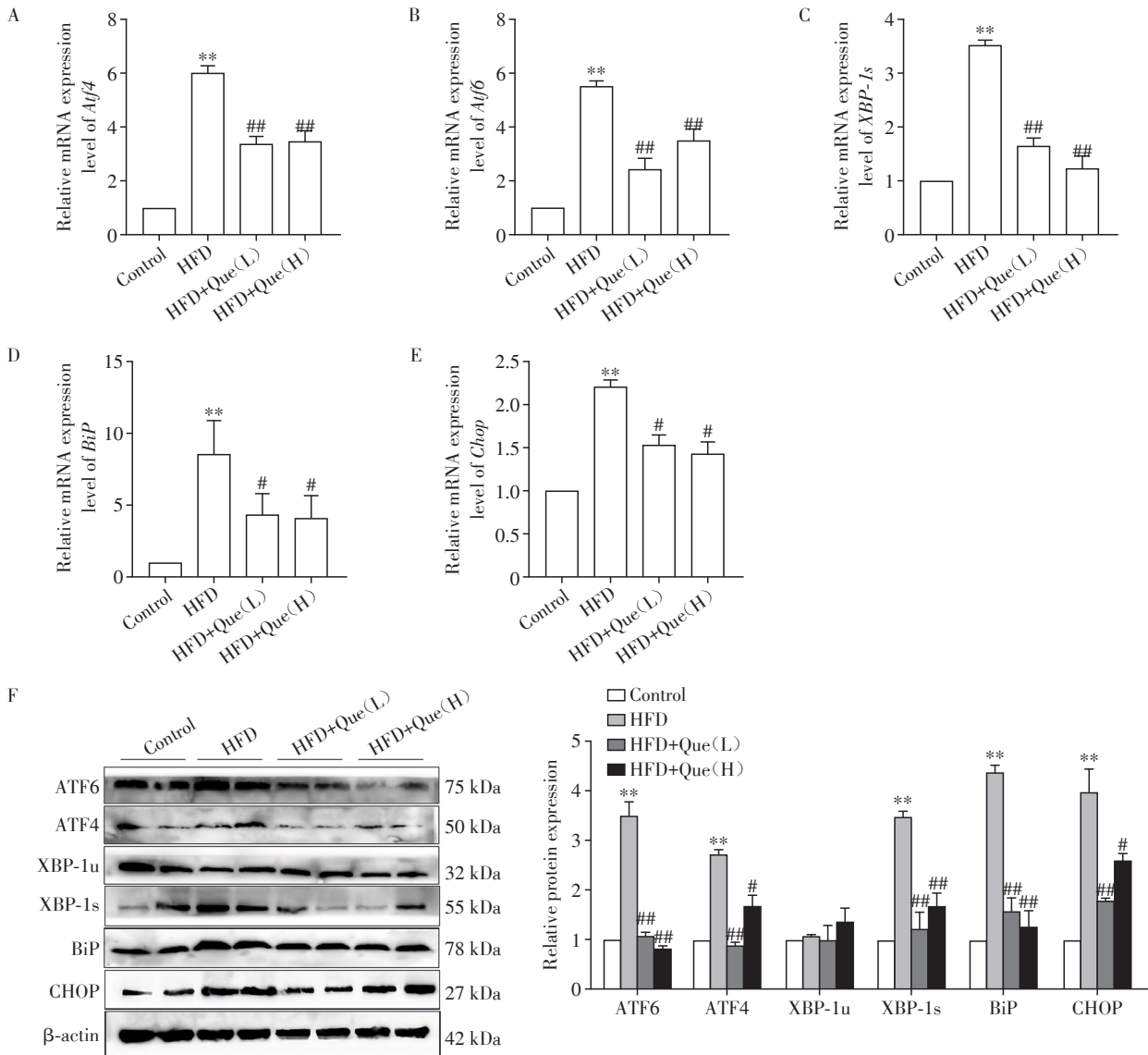
图4 Que对NAFLD大鼠糖代谢的影响

Figure 4 Effects of Que on glucose metabolism in NAFLD rats

Que可以明显抑制其表达,提示Que可通过抑制ERS通路减轻ERS激动剂引起的细胞损伤(图6D)。以上结果提示Que可通过抑制ERS通路减轻肝细胞脂毒性损伤。

3 讨论

NAFLD作为一种代谢性疾病,其发病机制十分复杂。目前认为过量代谢底物如脂肪酸积聚于肝

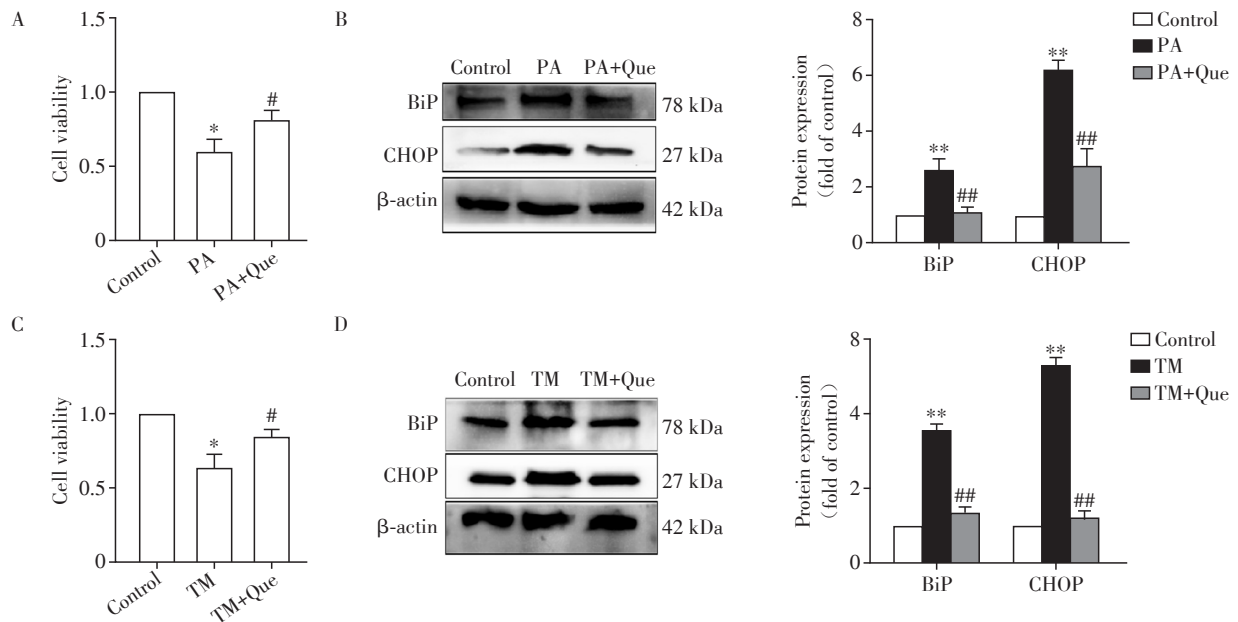


A-E: The relative mRNA expression levels of *Atf4*(A), *Atf6*(B), *Xbp-1s*(C), *Bip*(D) and *Chop*(E) in liver tissues were measured by RT-qPCR. F: Representative Western blots of ATF6, ATF4, XBP-1u, XBP-1s, BiP and CHOP in liver tissues. Compared with the control group, ** $P < 0.01$; compared with the HFD group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ ($n=5$).

图5 Que减轻NAFLD大鼠肝脏组织ERS水平
Figure 5 Que decreased ERS level in NAFLD rats

细胞内导致的肝细胞功能损伤是NAFLD发生发展的最关键因素^[7]。内质网作为细胞内负责蛋白质、脂类、糖类合成,折叠,包装,修饰和转运的重要细胞器,对细胞整体代谢和功能稳态的维持起到了非常重要的作用^[8]。当肝细胞内代谢底物(如脂肪酸、蛋白质等)过量积聚时,未折叠蛋白及脂质水平失调,内质网“工作”压力负荷增大,此时内质网便会启动未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)来帮助内质网降低压力负荷从而使细胞功能恢复稳态^[9]。如果UPR长期进行仍无法使细胞功能恢复稳态,ERS便会发生^[10]。持续的ERS可诱发炎

症、氧化应激并与之相交联,共同促进NAFLD的发生发展。有文献表明,NAFLD患者肝脏组织ERS水平明显增加^[11],并且ERS在NAFLD发生的早期过程中起关键作用^[12]。ERS激活主要涉及IRE1/XBP1、ATF6以及PERK/ATF4 3条信号通路,本研究利用高脂饲料喂养大鼠从而模拟人NAFLD自然发生过程,结果发现高脂饲养16周后,模型组大鼠肝脏组织ERS 3条信号通路关键基因及蛋白XBP-1s、ATF4和ATF6表达均有不同程度增高,提示ERS通路在模型组大鼠持续激活。其中转录因子XBP1由相关酶从未剪切体XBP-1u剪切为具有活性的XBP-1s,



A: CCK-8 assay was used to measure the cell viability in different groups of HepG2 cells in the PA-induced lipotoxicity injury model. B: Representative Western blots and quantitative analysis of BiP and CHOP in liver tissues in different groups in the TM-induced lipotoxicity injury model. C: CCK-8 assay was used to measure the cell viability in different groups of HepG2 cells in the TM-induced lipotoxicity injury model. D: Representative Western blots and quantitative analysis of BiP and CHOP in liver tissues in different groups in the TM-induced lipotoxicity injury model. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with the PA group or TM group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ ($n=3$).

图6 Que通过抑制ERS通路减轻肝细胞脂毒性损伤

Figure 6 Que alleviates hepatocyte lipotoxicity by inhibiting the ER stress

观察到XBP-1s升高的同时,XBP-1u未有明显升高,提示ERS的高度激活。同时本研究也检测了ERS早期关键蛋白BiP以及晚期凋亡诱导蛋白CHOP的变化,结果显示二者均有升高,提示本研究中大鼠肝脏组织在持续的ERS影响下,肝细胞通过CHOP转录因子启动凋亡程序^[13],而肝细胞凋亡将直接影响肝脏功能。

Que是众多中草药发挥生物学治疗效应的主要成分,如柴胡、桑叶、赶黄草和银杏等。其中保肝降酶中成药肝苏颗粒便是由赶黄草成分加工而成,文献表明Que是肝苏颗粒发挥其对肝脏疾病治疗作用的主要成分^[14]。目前,已有较多研究表明Que对NAFLD具有明显的干预作用。有研究利用高脂饲料喂养建立SD大鼠NAFLD模型并利用Que低剂量(75 mg/kg)、高剂量(300 mg/kg)灌胃12周后发现Que能阻止大鼠血清抗炎因子IL-10浓度降低及促炎因子IL-18浓度升高,提示Que改善NAFLD的作用与其调控炎症作用有关^[15]。另有研究在大鼠高脂饲料喂养并给药10周后发现Que低、高剂量组(40 mg/kg、80 mg/kg)大鼠肝脏脂质沉积降低,炎性细胞浸润减少,同时肝脏纤维化病程度减轻,并且这种作用可能是通过PI3K/AKT/NF- κ B信号通路实

现的^[16]。此外,Que还可以改善NAFLD大鼠胰岛素抵抗^[17]和肝脏氧化应激损伤^[18]。然而,ERS作为NAFLD发展过程中最关键的因素之一,Que对其是否具有干预作用报道很少。本研究观察了Que低、高剂量给药对NAFLD大鼠肝脏组织ERS水平的影响,发现与模型组相比较,Que明显降低了ERS 3条通路中关键蛋白XBP-1s、ATF4和ATF6的表达水平,同时也降低了ERS-凋亡通路关键蛋白CHOP的表达水平,提示Que对ERS的干预是多靶点的,并且可能减轻ERS诱导的肝细胞凋亡。值得注意的是,不同研究中Que大鼠灌胃给药用量差别非常大,在30~500 mg/kg之间,造成这种差异的主要原因可能是不同实验采用了不同来源的Que以及灌胃溶液制备方法,从而导致Que的制作工艺、纯度以及稀释方法均有所差异,造成了大鼠的吸收利用度不同。本研究根据前期研究结果,采用了低剂量(25 mg/kg)和高剂量(50 mg/kg)两种浓度以观察不同剂量Que对NAFLD大鼠是否具有不同的干预效果。结果提示,综合各项指标研究结果,发现Que高、低两种浓度都有效减轻了NAFLD大鼠肝脏损伤以及ERS程度,但两组干预效果差异无统计学意义。此外,本研究予大鼠8周高脂饲料喂养建模成功后再进行给药

而不是从建模初期给药,目的是更好地模拟临床实际情况,即大部分患者服药时已发展为NAFLD。因此,本研究重点观察Que的治疗作用而不是预防作用。本研究同时观察到Que在减轻NAFLD大鼠肝脏病理变化的同时,还可以改善大鼠糖耐量受损和胰岛素抵抗现象。NAFLD与代谢综合征常常联系紧密,NAFLD患者往往伴随胰岛素抵抗、脂代谢异常以及高尿酸血症^[19]。因此,本研究提示Que在抑制NAFLD发生发展过程的同时,还可以改善大鼠脂代谢异常以及胰岛素抵抗,提示Que的治疗作用是多靶点的,同时也是Que相比其他单体药物在发挥治疗效应时的一大优点。由于ERS是NAFLD发生发展早期过程中最关键的因素^[20],因此,对Que调控ERS信号通路及关键靶点进行更深入地研究有助于揭示Que以及以Que为主要成分的中药药物防治NAFLD的机制。

综上所述,本研究发现Que可以改善NAFLD大鼠脂代谢异常、糖耐量受损、肝脏脂质沉积以及病理学改变,同时首次发现其机制可能与调控ERS相关通路有关。本研究为进一步深入阐明Que改善NAFLD的作用机制研究提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] ZHOU F, ZHOU J H, WANG W X, et al. Unexpected rapid increase in the burden of NAFLD in China from 2008 to 2018: a systematic review and meta-analysis[J]. *Hepatology*, 2019, 70(4): 1119-1133
- [2] 霍兆炯, 吴斐华. 内质网应激与非酒精性脂肪肝研究进展[J]. *海峡药学*, 2020, 32(5): 1-4
- [3] 冯亚莉, 李浩, 刘娟, 等. Que研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(20): 5185-5193
- [4] YANG D Y, WANG T C, LONG M A, et al. Quercetin: its main pharmacological activity and potential application in clinical medicine[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 1-13
- [5] ZHAO X T, WANG J, DENG Y, et al. Quercetin as a protective agent for liver diseases: a comprehensive descriptive review of the molecular mechanism [J]. *Phytother Res*, 2021, 35(9): 4727-4747
- [6] LI L Z, ZENG X, LIU Z Z, et al. Mesenchymal stromal cells protect hepatocytes from lipotoxicity through alleviation of endoplasmic reticulum stress by restoring SERCA activity [J]. *J Cellular Molecular Medi*, 2021, 25(6): 2976-2993
- [7] 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
- [8] 林丽, 唐朝枢, 袁文俊. 内质网应激[J]. *生理科学进展*, 2003, 34(4): 333-335
- [9] RON D, WALTER P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(7): 519-529
- [10] KAUFMAN R J. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls[J]. *Genes Dev*, 1999, 13(10): 1211-1233
- [11] FLESSA C M, KYROU I, NASIRI-ANSARI N, et al. Endoplasmic reticulum stress and autophagy in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): current evidence and perspectives[J]. *Curr Obes Rep*, 2021, 10(2): 134-161
- [12] FLESSA C M, KYROU I, NASIRI-ANSARI N, et al. Endoplasmic reticulum stress in nonalcoholic (metabolic associated) fatty liver disease (NAFLD/MAFLD)[J]. *J Cell Biochem*, 2022, 123(10): 1585-1606
- [13] ZINSZNER H, KURODA M, WANG X, et al. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum [J]. *Genes Dev*, 1998, 12(7): 982-995
- [14] 吕云龙, 殷强, 罗沿源, 等. 赶黄草活性成分Que和没食子酸对CCl4所致小鼠急性肝损伤的保护作用及机制[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2022, 32(4): 352-356
- [15] 梁志清, 白纪红, 秦青, 等. Que对非酒精性脂肪肝大鼠血清白介素18和白介素10比值的影响[J]. *时珍国医国药*, 2013, 24(5): 1112-1114
- [16] ZHU M L, ZHOU X F, ZHAO J P. Quercetin prevents alcohol-induced liver injury through targeting of PI3K/Akt/nuclear factor- κ B and STAT3 signaling pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(6): 6169-6175
- [17] 白纪红, 梁志清, 赵日红, 等. Que对非酒精性脂肪肝大鼠抵抗素和胰岛素抵抗的影响[J]. *中药药理与临床*, 2014, 30(3): 33-35
- [18] CHEN L, LIU J J, MEI G B, et al. Quercetin and non-alcoholic fatty liver disease: a review based on experimental data and bioinformatic analysis [J]. *Food Chem Toxicol*, 2021, 154: 112314
- [19] THOMAS J A, ACHARYA S, SHUKLA S, et al. Non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in metabolic syndrome (MetS) - a case control study [J]. *Med Sci*, 2020, 24(103): 1490-1499
- [20] SONG M J. Nonalcoholic fatty liver disease and endoplasmic reticulum stress [J]. *Korean J Med*, 2021, 96(2): 92-100

[收稿日期] 2023-07-16

(本文编辑:戴王娟)