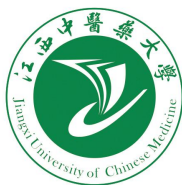


分类号:
密 级:

学校代码: 10412
学号: 202181706005



江西中醫藥大學

Jiangxi University of Chinese Medicine

硕士学位论文

基于 Nrf2/GPX4 通路探究木姜叶柯叶通过调控铁死亡
改善非酒精性脂肪性肝病的作用机制

Based on the Nrf2/GPX4 pathway to explore the
mechanism of *Lithocarpifolium* in
improving non-alcoholic fatty liver disease by
regulating ferroptosis

学 位 申 请 人

宋针珍

指 导 教 师 姓 名

章常华

专 业 名 称

药理学

申 请 学 位 类 型

学术型学位

论 文 答 辩 日 期

2024 年 5 月 31 日

中国·江西·南昌

2024 年 5 月

中文摘要

目的：基于 Nrf2/Gpx4 信号通路，经体内、体外实验探讨木姜叶柯叶通过抑制铁死亡，改善非酒精性脂肪性肝病的作用和机制。

方法：

1. 动物实验：（1）按照 NAFLD 经典造模方法结合实验室前期造模经验，采用长期连续投喂高脂饲料共 24 周来诱导 SD 大鼠 NAFLD 模型，将动物随机分组成正常组、模型组和木姜叶柯叶高、中、低剂量组和二甲双胍组，从第 23 周开始根据分组灌胃相关药物共两周直到实验结束。每周固定时间对各组大鼠进行称量，以确定它们的体重。（2）使用 HE 染色法来研究 SD 大鼠肝脏组织中脂肪的堆积情况和炎症病灶的变化。（3）采用生化试剂盒检测比较血清血脂、固醇水平：TCHO、TG、HDL、LDL；以及肝功能指标：ALT、AST 活性。（4）ELISA 法检测 SD 大鼠炎症因子：TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平。（5）生化试剂盒法检测各组大鼠肝脏组织氧化应激指标：MDA 和 GSH。（6）亚铁比色法检测各组大鼠肝脏组织的 Fe²⁺ 含量。（7）Western Blot 法测定各组大鼠肝脏 NRF2、xCT、GPX4 蛋白表达量。（8）qRT-PCR 法检测各组大鼠肝组织 NRF2、xCT、GPX4、HO-1、GSS 和 ACSL4 mRNA 的表达水平。

2. 细胞实验：（1）提取木姜叶柯叶和二甲双胍大鼠含药血清。采用 CCK8 检测梯度浓度的木姜叶柯叶和二甲双胍含药血清有无对 HepG2 细胞毒性作用。

（2）采用 1mM 游离脂肪酸（FFA）诱导 HepG2 细胞产生脂质堆积模拟 NAFLD 体外模型，并加入木姜叶柯叶和二甲双胍大鼠含药血清对造模细胞进行治疗。油红 O 染色检测每组细胞脂肪滴的堆积状态，并用试剂盒测定 TG、TCHO 的浓度。（3）采用细胞用试剂盒检测各组 HepG2 细胞 MDA、GSH 含量。

（4）采用细胞亚铁检测试剂盒测定各组细胞亚铁水平。（5）Western Blot 法检测每组细胞中 NRF2、xCT 和 GPX4 蛋白的表达状况。（6）qRT-PCR 法测定各组 HepG2 细胞 NRF2、xCT、GPX4、HO-1、GSS 和 ACSL4 mRNA 表现水平。

结果：

1. （1）喂饲高脂饲料的造模大鼠体重增长趋势高于喂饲正常饲料的大鼠，而木姜叶柯叶组和二甲双胍组体重增长趋势高于正常组但低于模型组。（2）HE 染色结果发现，和正常组相比，NAFLD 模型组大鼠肝脏出现了明显的病变情

况，肝细胞完整性受损且被明显的脂滴填充、空泡明显、出现炎症浸润现象，而给予木姜叶柯叶和二甲双胍干预后的大鼠肝脏病理状态得到显著改善。（3）对各组大鼠血清生化指标的测试发现，NAFLD 模型组大鼠发生明显的血脂、胆固醇升高、肝功能指标异常波动。给予木姜叶柯叶和二甲双胍干预后，各指标被显著逆转（ $P<0.05$ ）。（4）通过肝匀浆检测肝脏组织 Fe^{2+} 、MDA、GSH 发现，与空白组对比，模型组的 Fe^{2+} 、MDA 浓度大幅上升（ $P<0.05$ ），GSH 明显下降（ $P<0.01$ ）；而与模型组对比，木姜叶柯各剂量组和阳性药组均能大幅度下调 Fe^{2+} 和 MDA 浓度（ $P<0.05$ ），并显著地提高 GSH 水平（ $P<0.05$ ）。（5）Western Blot 发现，NAFLD 模型组大鼠肝脏中 NRF2、xCT、GPX4 蛋白的表达水平有显著的降低（ $P<0.05$ ）。而给予木姜叶柯叶和二甲双胍干预后，肝脏蛋白的表达含量都有了显著的提高（ $P<0.05$ ）。（6）经过 qRT-PCR 检测，发现在 NAFLD 模型肝脏组织中，ACSL4 mRNA 的表达显著升高（ $P<0.01$ ），NRF2、xCT、GPX4、HO-1 以及 GSS mRNA 的表达则显著下降（ $P<0.05$ ）。给予木姜叶柯叶和二甲双胍干预后，与模型组相比，木姜叶柯叶和二甲双胍显著下调 ACSL4 mRNA 的表达（ $P<0.01$ ），而明显升高了 NRF2、xCT、GPX4、HO-1 以及 GSS mRNA 的表达水平（ $P<0.05$ ）。

2.（1）CCK8 结果表明，木姜叶柯叶高、中、低剂量组和二甲双胍阳药组含药血清对 HepG2 细胞均无明显毒性作用。（2）HepG2 细胞模型组红色脂滴明显，且 TG 和 TCHO 的含量均有明显的升高（ $P<0.01$ ），而木姜叶柯叶各剂量组和二甲双胍阳药组显著减轻 HepG2 细胞的脂滴沉积，下调 HepG2 细胞高脂堆积模型 TG 和 TCHO 的高表达含量（ $P<0.01$ ）。（3）试剂盒比色法检测 HepG2 细胞 MDA、GSH 含量显示，模型组 MDA 含量明显升高（ $P<0.01$ ），GSH 水平显著下降（ $P<0.01$ ），与模型组比较，木姜叶柯叶含药血清逆转了模型组 MDA 和 GSH 的表达趋势（ $P<0.01$ ）。（4）HepG2 细胞高脂堆积模型相对于正常组细胞出现明显的亚铁含量增多现象（ $P<0.01$ ），而木姜叶柯叶和二甲双胍阳药组含药血清可以显著降低 HepG2 高脂堆积模型细胞内的亚铁高密度含量（ $P<0.01$ ）。（5）Western Blot 检测发现，与正常组相比，模型组 HepG2 细胞的 NRF2、xCT 和 GPX4 蛋白质表达水平均有所降低（ $P<0.05$ ）。木姜叶柯叶含药血清干预后，相比于模型组，木姜叶柯叶组 NRF2、xCT 和 GPX4 蛋白质表达水平都有所提高（ $P<0.05$ ）。（6）qRT-PCR 技术分析发现，与正常组

相比模型组的 HepG2 细胞中，ACSL4 mRNA 的含量有大幅的升高 ($P<0.01$)，NRF2、xCT、GPX4、GSS 和 HO-1 mRNA 的含量则有明显的降低 ($P<0.05$)。在使用木姜叶柯叶和阳性药物血清治疗后，木姜叶柯叶和二甲双胍阳药能够有效的逆转模型组 HepG2 细胞对上述基因 mRNA 表达的有害调控，具体表现为大幅度下调了 ACSL4 mRNA 水平 ($P<0.01$) 和显著上调了 HepG2 高脂堆积模型 NRF2、xCT、GPX4、GSS 和 HO-1 的 mRNA 表达水平 ($P<0.05$)。

结论：

1.木姜叶柯叶能够降低 NAFLD 大鼠的高血脂和改善 NAFLD 大鼠的肝功能和炎症情况，同时，还有抵抗氧化应激和减少 NAFLD 大鼠肝脏亚铁沉积的作用，并可能通过 Nrf2/xCT/Gpx4 信号通路缓解 NAFLD 大鼠肝脏的铁死亡来改善 NAFLD。

2.木姜叶柯叶可减少 FFA 诱导的 HepG2 细胞的脂质堆积情况，降低 HepG2 细胞脂质堆积模型的 Fe^{2+} 来改善细胞脂质过氧化，木姜叶柯叶可能能够通过 Nrf2/xCT/Gpx4 相关通路调控 NAFLD 体外模型的脂质代谢。

关键词：非酒精性脂肪性肝病；木姜叶柯；铁死亡；氧化应激；NRF2/GPX4 信号通路

Based on the Nrf2/GPX4 Pathway to Explore the Mechanism of *Lithocarpifolium* in Improving Non-alcoholic Fatty Liver Disease by Regulating Ferroptosis

[Author] Song Zhen Zhen (Pharmacology)

Directed by Zhang Changhua

[Abstract]

Objective: Based on Nrf2/Gpx4 signaling pathway, exploring the effects and mechanisms of *Lithocarpifolium* on improving nonalcoholic fatty liver disease by inhibiting iron death in vivo and in vitro experiments.

Method:

1. Animal experiments: (1) According to the classical modeling method of NAFLD combined with the previous laboratory modeling experience, the NAFLD model of SD rats were induced by long-term continuous feeding of high-fat diet for a total of 24 weeks, and randomly dividing animals into control, model group and high, medium and low groups of *Lithocarpifolium* and metformin groups according to the grouping from the 23rd week until the end of the experiment. Rats in each group are weighed at a fixed time each week to determine their body weight. (2) HE staining was used to study the accumulation of fat in the liver tissue of SD rats and the changes of inflammatory lesions. (3) Using biochemical kits to compare serum lipid and sterol levels: TCHO, TG, HDL, LDL; and liver function indicators: ALT, AST levels. (4) Inflammatory cytokines: TNF- α , IL-6 and IL-1 β , these inflammatory level of rats in each group was compared by ELISA. (5) The oxidative stress indexes of liver tissue were detected by biochemical kit method: MDA and GSH. (6) Ferrous colorimetric method was used to detect the Fe²⁺ content in liver tissue of rats in each group. (7) Western blot method was used to showed the protein expression levels of xCT, NRF2, and GPX4 in the liver of rats in each group. (8) The mRNA expression levels of xCT, NRF2, GPX4, HO-1, GSS and ACSL4 in liver tissues of rats were detected by qRT-PCR.

2. Cell experiments: (1) Extracting the medicated serum of *Lithocarpifolium* and metformin rats. CCK8 was used to detect the toxic effect of graded concentrations of *Lithocarpifolium* and metformin-containing serum on the activity of HepG2 cells. (2)

HepG2 cells were induced by 1mM free fatty acids to produce lipid accumulation to simulate NAFLD model in vitro, and the model cells were treated by adding the medicated serum of *Lithocarpus folium* and metformin rats. Oil red O staining was used to detect the accumulation state of fat droplets in each group, and the concentrations of TG and TCHO were determined by kit. (3) The contents of MDA and GSH in HepG2 cells in each group were detected by using a cell kit. (4) The cell ferrous detection kit was used to determine the level of ferrous cells in each group. (5) Western blot was used to detect the expression of NRF2, xCT and GPX4 proteins in each group. (6) The mRNA expression levels of NRF2, xCT, GPX4, HO-1, GSS and ACSL4 in HepG2 cells in each group were determined by qRT-PCR.

Result:

1. (1) The weight growth trend of the model rats fed with high-fat diet were significantly higher than that of the rats fed normal diet, while the weight increase trend of the *Lithocarpus folium* group and metformin group was higher than that of the normal group but lower than that of the model group. (2) Compared with the normal group, the liver of NAFLD model group showed obvious pathological changes, including impaired hepatocyte integrity, obvious lipid droplets filling, obvious vacuoles and inflammatory infiltration which were showed by HE staining. However, the pathological state of rat liver was significantly improved after the intervention of *Lithocarpus folium* and metformin. (3) The test of serum biochemical indexes in each group of rats showed that the rats in the NAFLD model group had obvious increases in blood lipids, cholesterol and abnormal fluctuations in liver function indicators. After the intervention of *Lithocarpus folium* and Metformin, the indexes were significantly reversed ($P<0.05$). (4) Detection of Fe^{2+} , MDA, and GSH in liver tissue by liver homogenate revealed that Fe^{2+} and MDA concentrations in the model group increased dramatically ($P<0.05$) and GSH decreased significantly ($P<0.01$) when compared with the blank group; whereas all dose groups of *Lithocarpus folium* and the positive drug group were able to down-regulate the concentrations of Fe^{2+} and MDA dramatically ($P<0.05$) and significantly increase the GSH levels ($P<0.05$). (5) Western Blot revealed that the expression levels of xCT, NRF2 and GPX4 proteins in the livers of rats in the NAFLD model group were significantly reduced ($P<0.05$). Whereas, after the intervention of administration of *Lithocarpus folium* and Metformin, there was a significant ($P<0.05$) increase in the expression levels of liver proteins in all the groups. (6) After qRT-PCR, the expression of ACSL4 mRNA was found to be significantly elevated ($P<0.01$), while the expression of N

NRF2, xCT, GPX4, HO-1, and GSS mRNA was significantly decreased ($P<0.05$) in the liver tissues of NAFLD model. After the intervention of administration of *Lithocarpifolium* and metformin, the expression of ACSL4 mRNA was significantly down-regulated by *Lithocarpifolium* and metformin ($P<0.01$), whereas the expression levels of NRF2, xCT, GPX4, HO-1, and GSS mRNA were significantly elevated, compared with that of the model group ($P<0.05$).

2. (1) The results of CCK8 showed that the medicated serum of *Lithocarpifolium* had no obvious toxic effect on HepG2 cells in the high, medium and low-dose group and metformin positive drug group. (2) The red lipid droplets in the HepG2 cell model group were obvious, the content of both TG and TCHO were markedly elevated ($P<0.01$), while the lipid droplet deposition and FFA content of HepG2 cells were significantly reduced in the HepG2 cell group and the metformin group ($P<0.01$). (3) Kit colorimetric detection of MDA and GSH content in HepG2 cells showed that MDA content was significantly higher ($P<0.01$) and GSH level was significantly lower ($P<0.01$) in the model group. The drug-containing serum of *Lithocarpifolium* reversed the trend of expression of MDA and GSH in the model group ($P<0.01$). (4) Compared with the normal cells, the high-fat accumulation model of HepG2 cells showed obvious ferrous content ($P<0.01$). while the drug-containing serum of the HepG2 high-lipid accumulation model could significantly reduce the intracellular high-density content of ferrous in the HepG2 high-lipid accumulation model ($P<0.01$). (5) Western Blot assay revealed that the protein expression levels of NRF2, xCT and GPX4 were reduced in HepG2 cells compared to the normal group ($P<0.05$). The NRF2, xCT and GPX4 protein expression levels were increased ($P<0.05$) in *Lithocarpifolium* groups after the intervention of drug-containing serum compared to the model group. (6) Analysis by qRT-PCR revealed a substantial increase ($P<0.01$) in ACSL4 mRNA and a significant decrease ($P<0.05$) in NRF2, xCT, GPX4, GSS and HO-1 mRNA in HepG2 cells of the model group compared to the normal group. After the treatment with *Lithocarpifolium* and positive drug serum, *Lithocarpifolium* and metformin positive drug were able to effectively reverse the deleterious regulation of mRNA expression of the above mentioned genes in HepG2 cells of the model group, which was demonstrated by the drastic down-regulation of the level of ACSL4 mRNA ($P<0.01$) and the significant up-regulation of the NRF2, xCT, GPX4, GSS and HO-1 mRNA expression levels in the HepG2 high fat accumulation model ($P<0.05$).

Conclusion:

1. *Lithocarpifolium* can reduce hyperlipidemia, improving liver function and inflammation in NAFLD rats, at the same time, resisting oxidative stress and reduce ferrous deposition in NAFLD rats' liver, and may alleviate iron death in NAFLD rats' liver through Nrf2/xCT/Gpx4 signaling pathway to improve NAFLD.
2. *Lithocarpifolium* could reduce the lipid accumulation of HepG2 cells induced by FA, reducing the Fe^{2+} of the lipid accumulation model of HepG2 cells to improve cellular lipid peroxidation, and the lipid metabolism of the in vitro model of NAFLD may be regulated by Nrf2/xCT/Gpx4-related pathway.

Key words:Non-alcoholic fatty liver disease;*Lithocarpifolium*;Ferroptosis;Oxidative stress;NRF2/GPX4 signaling pathway

目 录

前言	1
1 非酒精性脂肪性肝病现状	1
2 NAFLD 与铁死亡	2
3 铁死亡调控机制	3
4 木姜叶柯叶与 NAFLD 铁死亡	3
第一章 木姜叶柯叶改善高脂饮食诱导的大鼠非酒精性脂肪性肝病的 实验研究	5
引言	5
1 实验材料	5
1.1 实验动物	5
1.2 实验药物	5
1.3 实验所需主要试剂、仪器	6
2 实验方法	9
2.1 造模与给药	9
2.2 样本收集	9
2.3 肝脏组织病理学观察	9
2.4 血清生化指标检测	11
2.5 肝脏组织氧化应激指标检测	11
2.6 Western Blot 技术测定肝脏组织中 NRF2、xCT 和 GPX4 蛋白 的表达情况	11
2.7 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术检测肝脏组织 NRF2、xCT、 GPX4 等 mRNA 表达水平	13
2.8 统计学分析	16
3 实验结果	16
3.1 大鼠体质量的变化情况	16
3.2 木姜叶柯叶对大鼠肝脏组织病理学的影响	17
3.3 木姜叶柯叶对大鼠肝损伤指标的影响	18
3.4 木姜叶柯叶对大鼠炎症因子的影响	19
3.5 木姜叶柯叶对大鼠肝脏氧化应激表达物的调控作用	20
3.6 木姜叶柯叶对大鼠肝脏 Fe^{2+} 水平的影响	21
3.7 木姜叶柯叶对大鼠肝脏 Nrf2、xCT、Gpx4 蛋白表达量的影响	22
3.8 大鼠肝组织 NRF2、HO-1、xCT、GSS、GPX4 和 ACSL4 基 因 mRNA 表达量变化	23

4 讨论.....	24
5 小结.....	28
第二章 木姜叶柯叶含药血清改善 FFA 诱导的 HepG2 细胞脂肪变 性机制研究.....	29
引言.....	29
1 实验材料.....	29
1.1 实验细胞及动物.....	29
1.2 药物制备.....	29
1.3 实验试剂和仪器.....	29
2 实验方法.....	31
2.1 动物含药血清的提取和配置.....	31
2.2 溶液配制.....	31
2.3 细胞培养.....	32
2.4 木姜叶柯叶含药血清对 HepG2 细胞的影响.....	33
2.5 统计学分析.....	35
3 实验结果.....	36
3.1 木姜叶柯叶含药血清对 HepG2 细胞的毒性检测.....	36
3.2 木姜叶柯叶含药血清对 HepG2 细胞内脂质的沉积影响.....	36
3.3 木姜叶柯叶含药血清对 HepG2 细胞内 TG、T-CHO 含量的 影响.....	38
3.4 木姜叶柯叶含药血清对 HepG2 细胞内 GSH 含量变化的影 响.....	38
3.5 木姜叶柯叶含药血清对 HepG2 细胞内 MDA 含量变化的影 响.....	39
3.6 木姜叶柯叶含药血清对 HepG2 细胞内亚铁含量变化的影响	40
3.7 WB 检测木姜叶柯叶含药血清影响 HepG2 细胞内 NRF2、 xCT、GPX4 蛋白表达水平变化.....	40
3.8 qRT-PCR 检测木姜叶柯叶含药血清影响 HepG2 细胞内 NRF2、HO-1、xCT、GSS、GPX4 和 ACSL4 基因的 mRNA 相 对表达量测定.....	41
4 讨论.....	42
5 小结.....	44
总结.....	45
参考文献.....	47
文献综述 木姜叶柯药理作用的研究进展.....	54
参考文献.....	59

英文缩略词

英文缩写	英文全称	中文全称
HDL-C	High-density lipoprotein cholesterol	高密度脂蛋白胆固醇
TCHO	Cholesterol	胆固醇
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
LDL-C	Low-density lipoprotein cholesterol	低密度脂蛋白胆固醇
HFD	High-fat-diet	高脂饮食
TNF- α	Tumor Necrosis Factor α	肿瘤坏死因子
TritonX-100	T-Octylphenoxypolyethoxyethanol	曲拉通 X-100
NASH	Non-alcoholic steatohepatitis	非酒精性脂肪性肝炎
PBS	Phosphate buffer saline	磷酸盐缓冲液
qRT-PCR	Reverse transcription PCR	实时荧光定量 PCR
RIPA	Radio Immunoprecipitation Assay	高效裂解液
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
TBA	thiobarbituric acid	硫代巴比妥酸
TBST	Tris Buffered Saline with Tween20	Tris 盐缓冲液 (TBS) 和 Tween -20
TG	Triglyceride	甘油三酯
TC	<i>Lithocarpifolium</i>	木姜叶柯叶
IL-6	Interleukin-6	白介素-6
NF- κ B	Nuclear Factor kappa-B	核因子 κ B
IL-1 β	Interleukin-1 β	白细胞介素-1 β
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	杜氏改良 Eagle 培养基

前言

1 非酒精性脂肪性肝病现状

非酒精性脂肪性肝病（Nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD），一种全球性的慢性代谢性疾病，与酒精性肝病有着本质的不同，这种疾病可能源自多种原发性或继发性的肝脏感染，而不仅仅局限在肝脏。在导致肝损伤因素中，除了自身家族遗传因素外，通常 NAFLD 容易出现于膳食热量摄取过多导致的营养过剩人群当中，他们通常也是高脂血症、高血压、糖尿病等代谢疾病的易感人群^[1-2]。此外，值得注意的是，NAFLD 与胰岛素抵抗致肝损伤有着密不可分的联系^[3]，这也是为什么并不是只有“胖子”才会得 NAFLD，“瘦子”的 NAFLD 患病率也不小的原因。NAFLD 主要生化特征是脂肪酸代谢失调造成肝脏脂质的大量堆积，并经过一系列催化反应最终引发脂质变性。这种临床病理综合征的病理变化大致可以根据病程的发展分为三种类型，这三种类型的病理变化可以根据患者的病情和病史来判断，从而提供治疗方案和预防措施^[4]。其中，对 NAFLD 的研究主要集中在肝脏由单纯性肝病发展并恶化到肝炎的肝脏异常变化中^[5]，这已是 NAFLD 发展较为严重的阶段，当肝脏持续长时间暴露于促炎环境下时，最终将会发展为肝硬化甚至肝癌。近年来，由于肥胖和代谢综合征患病率与日俱增，NAFLD 已逐渐成为全球性的影响人类身体健康的问题^[6-8]。据相关调查数据荟萃分析，NAFLD 的全世界总患病率估计为 32.4%^[9]，而且这一数字还在不断增长。而我国 NAFLD 患病率也在 1999-2018 年期间从 23.8%增长到 29.2%^[10]。且在我国某些肥胖人群更为普遍的地区，NAFLD 的患病率可达 51%^[11-12]，且其相关肝病死亡率自 2016 到 2019 年间已经翻了一番，成为全球慢性肝病发病和死亡的重要病因^[13]。因此，控制 NAFLD 对全球人类肝脏的健康运作具有重大意义。

NAFLD 的发生原因，目前“多重打击”得到了普遍承认，“第一重打击”指的是脂质的超负荷分泌，表现为肥胖症、高脂血症、胰岛素抵抗以及其他新陈代谢失调；“第二次打击”则指脂质的过量分解，其表现形式有炎症、内质网应激以及氧化应激^[14-15]。研究表明，氧化应激对于这一过程至关重要^[16]。通常情况下，脂肪酸（Fatty acid, FFA）在机体内的水平是保持一种动态平衡

的。但是，在 NAFLD 下，营养过剩使得机体 FFA 供大于求或 FFA 代谢通路异常使得 FFA 消耗转化下降，都能打破机体 FFA 动态平衡，导致 FFA 过载。当脂质含量超标时，会产生大量的毒性物质，从而加剧了肝脏氧化、内质网的压力，从而使得患者出现更为严重的肝功能障碍^[17-18]。此外，胰岛素抵抗也是加速脂质堆积的一大重要因素^[19]。胰岛素抵抗是指机体抵抗胰岛素降血糖能力而代偿性的刺激分泌出更多的胰岛素来维稳胰岛素水平。通常情况下，肝脏识别到葡萄糖合成的糖原足够使用时会将多余的葡萄糖转化成脂肪酸，储存在肝脏中，这称作脂肪的从头合成。而胰岛素抵抗能够增强脂肪的从头合成^[20-22]，加剧肝脏的脂肪堆积的同时，还能够促进脂肪组织脂肪分解成 FFA 进入血液成为外周 FFA，诱发并加重 NAFLD 的脂质代谢紊乱。氧化应激和抗氧化信号通路的紊乱对 NAFLD 的影响非常关键^[23]。长时间高水平的氧化应激不仅会抑制成熟肝细胞的增殖能力，损害肝脏的内源性修复能力^[24]，还能够通过有害脂质物活性氧（Reactive oxygen species, ROS）破坏抗氧化平衡^[25]。

2 NAFLD 与铁死亡

细胞死亡是一种不可逆的进程，它可以根据细胞的形状、生物学特性和功能调控机制来划分，其中三种最常见的形式是凋亡、自噬和坏死，而最近研究发现，铁依赖性死亡被认为是继凋亡、自噬和坏死后的第四种程序性死亡^[26]。当细胞发生铁死亡时，以细胞质膜残缺不全、胞浆肿胀、线粒体萎缩变形、线粒体膜破裂为主要形态特征^[27]，以胱氨酸缺乏、谷胱甘肽（glutathione, GSH）匮乏、谷胱甘肽过氧化物酶 4（Glutathione Peroxidase 4, GPX4）失活为生化特征^[28]，以氧化应激诱导脂质过氧化堆积和铁过载为发生机制。已有研究显示，铁死亡在驱动各种肝病的进展中起着关键作用^[29]。肝脏作为铁储存容器与脂质代谢重要场所，已有研究表明，肝铁死亡在触发 NASH 不断发展的进程中起着重要作用，过度的铁死亡与 NAFLD 有因果关系。有学者发现铁死亡抑制剂能够改善蛋氨酸/胆碱缺乏饮食诱导小鼠 NASH 模型的肝脏的脂肪变性和炎症情况，相反的，铁死亡诱导剂则有相反的作用^[30]。放血消耗机体铁储备量实验在临床试验中也被发现能够明显改善 NAFLD 肝脏病理状况^[31]。此外，研究显示，铁代谢失调引发患者的肥胖程度和代谢水平也不同，铁摄入量与肥胖患病率呈现正相关趋势^[32]。另一方面，在 NAFLD 患者中经常观察到血清铁蛋白水平的异常波动而调高肠道铁的吸收进而促进了铁的生物利用度^[33-34]。将铁死亡

的主要特征之一，即脂质过氧化的积累与 NAFLD 肝脏中脂质沉积异常的特征相联系，不难看出，抑制铁死亡可能能够改善 NAFLD 脂质异常沉积情况。当肝脏 Fe^{2+} 的浓度超过承受范围时，游离 Fe^{2+} 通过芬顿反应化身 ROS 催产素，大量 ROS 被催生并开始攻击宿主，宿主肝脏细胞受到氧化攻击进而受到损伤^[35-36]，这一结论与 NAFLD “二次打击” 的理论基本一致。铁代谢失衡还被证实与胰岛素抵抗相关^[37]，而胰岛素抵抗又是 NAFLD 发病的一大因素。以上研究显示，铁死亡可能是预防 NAFLD 发作的治疗靶点，抑制铁死亡可能对 NAFLD 起到改善效果^[38-40]。

3 铁死亡调控机制

铁死亡的本质除了铁沉积以外，通常以氧化应激诱导细胞膜和细胞器膜上脂质氢过氧化物的积累为主。研究显示，System xCT-GSH-GPX4 通路是保护细胞免受铁死亡影响的最重要的抗氧化系统之一^[41]。胱氨酸逆转运蛋白（system xCT）能够通过调节胱氨酸的转运，为 GSH 的生物合成“添砖加瓦”，进而间接的影响了 GPX4 将脂质氧化物从有毒物质转化成无毒产物的生物功能^[42]。核转录因子 2（Nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2）作为很关键的抗氧化蛋白，它能够促进许多其他的抗氧化酶作用的发挥，包括 xCT、Gpx4、血红素加氧酶 1（Heme oxygenase-1, HO-1）和转铁蛋白^[43-45]，同时也能够减低对机体有害的血清脂质过氧化物丙二醛（Malondialdehyde, MDA）的含量。值得注意的是，Nrf2 通常作为抗氧化蛋白被研究用于改善 NAFLD 氧化还原情况。随着研究的深入，其他抗氧化系统也与调节铁死亡有关，包括转硫途径^[46-47]和甲羟戊酸途径^[48-49]（通过介导胱氨酸或 GPX4 的合成进而影响 System xCT-GSH-GPX4 通路来调控铁死亡）、铁死亡抑制蛋白 1-辅酶 Q10 途径^[50-51]和二氢乳清酸脱氢酶-二氢泛醌通路^[52-53]（通过捕获亲脂性自由基抑制细胞的脂质过氧化水平来调控铁死亡）和 GTP 环水解酶 1-四氢生物蝶呤通路^[54]（抑制脂质过氧化来调控铁死亡）。

4 木姜叶柯叶与 NAFLD 铁死亡

NAFLD 是多因素长期作用的结果，目前现代医学尚缺乏理想的治疗药物。其中，某些传统中医药在防治 NAFLD 方面具有独特的优势。木姜叶柯属于壳斗科常绿植物 [*Lithocarpus litseifolius* (Hance) Chun]，木姜叶柯又常被称作甜

茶或多穗石柯，2017 年被列为“药食茶”三效合一植物。它不仅仅是一味古老的中药，还可以作为现代人的养颜补充剂，综合古代医书记录还有现代科学研究发现，木姜叶柯既能健胃消食、清热润肺、醒酒解毒，又能降三高、防流感、消炎抗敏、抗癌症^[55-59]。中医认为，NAFLD 为“肝癖”，证候以“邪实”为主，以“痰湿内停、气滞血瘀”为主要病机^[60-62]，则可用清热利湿法治疗。据《湖南药物志》《全国中草药汇编》记载，木姜叶柯可用于治疗“肺热咳嗽，湿热泻利，高血压”，并起到清热、解毒、化痰和祛风等作用^[63-65]。现代研究也证明，木姜叶柯含有丰富的生物活性成分且安全无毒，具有抗氧化、抗胰岛素抵抗、抗癌变和降压、降糖、降脂和固醇以及保肝等功效，故木姜叶柯也享有“长在树上的虫草”的美誉^[66-68]。研究结果显示，木姜叶柯叶中的多种活性物质可以显著降低肝脏损伤指标，如谷丙氨酸氨基转移酶（Alanine aminotransferase, ALT）、门冬氨酸氨基转移酶（Aspartate transaminase, AST）等，从而抑制四氯甲烷引发的脂质过氧化，维持肝肾的正常功能，减缓大鼠的肝纤维化现象^[69-70]。其中，肝脏既可以贮藏和运输大量的铁，又能够进行脂肪的合成与转化，其中一些关键的转运机制也正好脱离不了氧化应激^[71-72]。因此，从铁死亡途径探究木姜叶柯抗非酒精性脂肪性肝病的作用机制，可为中医药多靶点多途径防治 NAFLD 提供新的思路，这具有十分重要的意义。

因此，本研究基于文献调查，预测木姜叶柯叶有对 NAFLD 的降脂作用，并通过氧化应激改善 NAFLD 铁死亡。结合动物实验及细胞学实验，即选择合适的造模方法建立大鼠 NAFLD 模型和 HepG2 细胞脂肪堆积模型来模拟人体 NAFLD 环境，运用分子生物学技术基于 Nrf2/xCT/GPX4 信号通路，进一步分析木姜叶柯叶对 NAFLD 的影响，在体内实验和体外实验下双重证实木姜叶柯叶防治 NAFLD 的作用并且多角度的验证其中的作用机制，为木姜叶柯叶产业化及临床应用提供科学依据，丰富中医药防治 NAFLD 的理论依据和研究思路。

第一章 木姜叶柯叶改善高脂饮食诱导的大鼠非酒精性脂肪性肝病的实验研究

引言

由于实验室前期已有成熟且实用的造模方法，故本次实验依旧沿用实验室前期的建模步骤^[63-65]，通过喂饲高脂饲料建立 SD 大鼠 NAFLD 模型，并在模型建立成功后通过灌胃不同浓度木姜叶柯叶浓缩液进行药物干预，实验过程中仔细观察记录各组大鼠的形态学变化、肝脏病变特征及炎症发生情况，并运用试剂盒检测各组大鼠血清生化指标和大鼠肝组织铁死亡生化指标，分析 NAFLD 相关联的铁死亡信号通路相关蛋白及 mRNA 表达水平的变化，从而探究木姜叶柯叶对 NAFLD 大鼠的影响。

1 实验材料

1.1 实验动物

购入同一批培养的 SPF 级健康 SD（Sprague-Dawley）大鼠，共 48 只，每只体重介于 $150\pm 10\text{g}$ 之间，由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供，其许可证编号为 SCXK（湘）2019-0004。动物培养的条件为在恒定的 $22\pm 2^\circ\text{C}$ 环境中，保证动物生长环境光照交替规律。保证一定的通风和环境的清洁，保证动物生长过程有足够的生长空间，注意分笼数量和密度适中。充足提供干净的水和饲料，适应性喂饲至少一周的时间再开始实验。实验全程遵循动物实验伦理规则，动物伦理编号为 JZSYDWLL20200507。

1.2 实验药物

公司提供的成品木姜叶柯叶。将充分烘干的木姜叶柯叶经实验室以往的常规方法煎煮、过滤，再将得到的木姜叶柯叶水煎液，通过减压蒸发的方式进行浓缩，直至生药浓度为 $1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时停止浓缩。将得到的浓缩液于 -20°C 下保存并尽快使用完毕，尽可能避免水煎液反复冻融。阳性药采用盐酸二甲双胍片，临使用前使用消毒过的研钵将片剂碾碎成粉末至溶于蒸馏水无明显颗粒物为止。

表 1-1 实验药物

Table1-1 Experimental drugs

药物	公司	批号
----	----	----

木姜叶柯叶	井冈山市木姜叶柯农林开发有限公司	20211211
盐酸二甲双胍片	中美上海施贵宝医药公司	ABZ8809

基础饲料和高脂饲料均具有良好的清洁度和常温保存条件，具有相关许可证。从运输到使用前均严格确保包装密封无损破，并经过了紫外辐射等消毒处理。

表 1-2 实验饲料

Table1-2 Experimental feeds

饲料种类	生产商	生产许可
基础饲料	武汉市万千佳兴生物科技有限公司	SCXK（鄂）2021-0011
高脂饲料	湖南斯莱克景达实验动物有限公司	SCXK（湘）2020-0006

1.3 实验所需主要试剂、仪器

表 1-3 实验主要试剂

Table 1-3 The main reagents of the experiment

试剂	公司	批号
TG 测试盒	NJCBIO	20220303
T-CHO 测试盒	NJCBIO	20220304
ALT/GOT 测试盒	NJCBIO	20220307
AST/GPT 测试盒	NJCBIO	20220224
HDL-C 测试盒	NJCBIO	2020303
LDL-C 测试盒	NJCBIO	20220226
亚铁测试盒	Solarbio	BC5415
谷胱甘肽（GSH）测试盒	NJCBIO	20230322
丙二醛（MDA）测试盒	NJCBIO	20230324
大鼠肿瘤坏死因子（TNF- α ）Elisa 试剂盒	NJCBIO	20220408
大鼠白介素 1 β （IL-1 β ）Elisa 试剂盒	NJCBIO	20220408
大鼠白介素 6（IL-6）Elisa 试剂盒	NJCBIO	20220408

基于 Nrf2/Gpx4 通路探究木姜叶柯叶通过调控铁死亡改善非酒精性脂肪性肝病的作用机制

PBS	Solarbio	20221021
0.9%生理盐水	西陇科学	2110272
多聚甲醛	国药集团化学试剂有限公司	20210514
无水乙醇	西陇科学	2205119
二甲苯	恒兴试剂	33535
苏木精染液	南昌雨露实验器材有限公司	211206
伊红染液	南昌雨露实验器材有限公司	211206
石蜡	德国 Leica 公司	39601095
中性树胶	国药集团化学试剂有限公司	20200624
RIPA 组织/细胞裂解液	CWBIO	CW2333
PMSF (100mM)	Solarbio	20211208
BCA 蛋白定量试剂盒	CWBIO	13722
10%PAGE 彩色 (红色) 凝胶超快速 配制试剂盒	Servicebio	G2043-50T
12%PAGE 彩色 (红色) 凝胶超快速 配制试剂盒	Servicebio	G2044-50T
5×Protein Loading Buffer	Solarbio	20210417
双色预染蛋白 Marker (15-150 kDa)	雅酶	02691880
SDS-PAGE 电泳液	Beyotime	122120210506
Western 转模液	Beyotime	123120210420
甲醇	西陇科学	1901041
BioECL 超敏发光试剂盒	IOCHEM	B915EL
PVDF 膜	Millipore	0000268267
脱脂奶粉	德国 BD 公司	8032502
10*TBST	CWBIO	20220207
快速封闭液	Servicebio	G2052-500
β-actin antibody	ABClonal	AC026
GPX4 antibody	ZENBIO	R24461
NRF2 antibody	proteintech	16396-1-AP
xCT antibody	ZENBIO	R382036

Goat Anti-Rabbit HRP Conjugate	Abcom	12522
Goat Anti-Mouse IgG	Proteintech	SA00001-1
抗体稀释液	Solarbio	A1800
TRIzol Reagent	Ambion	343702
三氯甲烷	KESHI	2020103001
异丙醇	西陇科学	2109292
无菌无霉水	Solarbio	20211227
PrimeScript RT reagent kit	TaKaRa	AL61877A
TB Green Premix Ex Taq	TaKaRa	AL51421A
引物	金瑞丝科技有限公司	

表 1-4 实验仪器

Table 1-4 Experimental equipment

仪器	公司
分析天平	舜宇恒平
Neofuge13R 型台式低温高速离心机	Heal Force 公司
高通量组织研磨器	宁波新芝生物
F6/10 手持式高速匀浆机	上海净信实验设备科技部
ELX800 酶标仪	Bio Tek 仪器有限公司
Leica 不锈钢刀片	德国莱卡
Leica 石蜡切片机	德国莱卡
Leica 包埋机	德国莱卡
DMI3000B 烤片机	国华电器
DMI3000B 型倒置荧光显微镜	德国 Leica 公司
DZKW-D-2 电热恒温水浴锅	北京市永光明医疗仪器有限公司
VARIOSKAN FLASH 多功能酶标仪	Thermo Fisher
电泳仪	BIO-RAD 公司
数显翘板摇床	珂淮仪器
TS-100 ORBITAL SHAKER	海门市其林贝尔仪器制造有限公司
凝胶成像系统	BIO-RAD 公司
NanoDrop 型核酸浓度测定仪	Thermo 公司
Veriti 96- Well Thermal Cycler	Applied Biosystems

QuantStudio 5 荧光定量 PCR 仪

Thermo Fisher

高压蒸汽灭菌锅

宁波久兴医疗器械有限公司

2 实验方法

2.1 造模与给药

SD 大鼠经过 1 周的适应期之后,按照数字随机法的原则,从 48 只大鼠中随机分出 8 只大鼠作为正常组 (Control),喂饲普通饲料,余下 40 只大鼠开始喂饲高脂饲料进行造模处理。22 周结束当天,再次将造模处理的 40 只大鼠进行随机分组,分别为模型组 (Model)、木姜叶柯叶高、中、低剂量组 (TC-H、TC-M、TC-L) 和二甲双胍阳性药组 (Met),每组 8 只。其中,木姜叶柯叶高、中、低组按照 3 倍间隔剂量比例稀释成 2.5, 0.83, 0.28 g/kg·d 灌胃给药,阳性药组按 54 mg/kg·d 给予二甲双胍。空白组和模型组则按体重同时灌胃相应剂量的蒸馏水,总计 2 周。实验期间,每周固定时间对大鼠进行称重并记录大鼠的体质量变化。

2.2 样本收集

在第 24 周结束的最后一晚,所有的大鼠撤粮不撤水 12h,按分组灌胃一次相应药物结束 1h 后进行动物取材实验。使用戊巴比妥钠腹腔注射麻醉处理后从大鼠腹主动脉取血,将得到的血液置于离心管中静置于平面 2h。取分层清晰且无明显溶血的血液采取 3500 rpm/min 离心 15 min,将离心取出的血清分装处理, -80℃保存备用,随用随取。在冰盒上尽量完整的分离出大鼠的肝脏组织,随即用预冷的 0.9% NaCl 溶液清理冲洗肝脏组织表面,随机选取每只大鼠肝脏叶片的同一部位切除下来,置于提前配好的 4%多聚甲醛溶液中固定,进行后续的切片染色观察。剩余的组织同样方法清理干净后分装置于 -80℃备用。

2.3 肝脏组织病理学观察

肝组织石蜡切片的制作和 HE 染色方法根据实验室前期方法基础上依据现有条件进行相应调整^[73-75]。

2.3.1 石蜡切片的制备

(1) 固定:将取材实验中随机切除下来的肝脏样品清洗后采用 4%多聚甲醛溶液固定,保证溶液充分浸润整片脏器,至少四度过两夜后方可进行切片的制备。

(2) 过水：从每一组大鼠肝脏固定液中随机捞取一片肝脏样品，用手术刀修剪切割出大概 $0.5\text{cm} \times 0.5\text{cm} \times 0.3\text{cm}$ 的立方体肝脏块置于包埋盒中，置于流水下不间断的冲洗过夜。注意控制水流速度不宜太快太急以免对肝脏样品造成损害。

(3) 脱水：取出冲泡一夜的包埋盒于不同浓度梯度的酒精当中浸泡脱水。按 60%乙醇 2 h→75%乙醇 1h→85%乙醇 1h→95%乙醇 1h→95%乙醇 1h→无水乙醇 1h→无水乙醇 1h 依次脱水。

(4) 透明：将样品依次放入二甲苯一号和二甲苯二号溶液中，持续浸泡 10min。

(5) 包埋：提前往包埋机中加入足够的石蜡，调节包埋机温度，设置温度在 60°C 左右，待石蜡充分从固态溶解为液态后，将包埋盒及肝脏样品放入石蜡中浸泡至少 3h，随后进行包埋。注意包埋速度要尽量快速且保证将组织样品最大面平整的贴合包埋模具底面。包埋好的组织样品置于 4°C 定形。

(6) 切片：将包埋好的组织样品在切片前提前在 4°C 冰箱放置一夜。先将切片厚度设置成 $15\mu\text{m}$ 左右对组织样品进行粗切，待切面的石蜡切完开始露出隐约的组织面后再将切片机厚度调整为 $4\mu\text{m}$ 对组织样品进行细切。选择有完整组织面的蜡片置于提前设置好的恒温伸展器中摊开。

(7) 捞片、烤片：提前往恒温伸展器注满干净清洁的水，将恒温伸展器以及烤片机打开，将温度分别调节到 40°C 和 60°C ，待温度上升恒温时即可使用。当蜡片完全伸展开来没有明显的褶皱且没有裂片时，即可用载玻片捞起，甩干接触面的水分避免产生气泡，置于烤片机上烘干。

2.3.2 HE 染色

(1) 脱蜡：制备好的石蜡切片脱蜡前，应先在 60°C 烘箱中烘干 2h。随后，放入一号二甲苯和二号二甲苯各浸泡 30min。

(2) 至水：置于二甲苯：乙醇=1：1 下浸泡 5min，再从 100 %无水乙醇一号到无水乙醇二号中分别浸泡 5min，以去除切片当中的二甲苯。随后，按 95%乙醇一号 3min→95%乙醇二号 3min→75%乙醇 2min→70%乙醇 2min 复水处理。最后，用自来水冲洗 2min。

(3) 苏木素染色：在染色盒中用苏木素染色 3-10 min，具体时间以苏木素质量和使用次数而定。用自来水冲洗数秒直至观察到切片颜色转变为明显的蓝色为

止。随后，利用 1% 盐酸乙醇分化 2 秒并迅速于自来水下冲洗 1min，注意动作要快，避免分化过度。

(4) 伊红染色：在染色盒中用伊红染液浸泡 10s，随后用自来水稍加冲洗。

(5) 脱水、透明：按照本章“2.3.1”节步骤再次对切片进行脱水和透明处理，每一步脱水和透明时间分别调整为 1min 和 5min。

(6) 封片：透明后的切片常温自然晾干，随后滴加适量中性树脂并用盖玻片封片处理。注意避免气泡。使用倒置显微镜，于 200 倍镜下观察具体病理变化。

2.4 血清生化指标检测

使用 96 孔板，分成对照组、标准组和测定组，测定组分为正常组（C），模型组（M），木姜叶柯高剂量（TC-H）组，木姜叶柯中剂量（TC-M）组，木姜叶柯低剂量（TC-L）组，二甲双胍（Met）组。试剂盒法测试各组血清甘油三酯（TG）、胆固醇（TCHO）、高/低密度脂蛋白胆固醇（HDL、LDL）、谷丙/谷草转氨酶（ALT、AST），各组血清肿瘤坏死因子（TNF- α ）、白细胞介素 6（IL-6）、白细胞介素-1 β （IL-1 β ）水平由 ELISA 酶联免疫法检测。具体操作步骤参照试剂盒的使用说明进行操作测定。

2.5 肝脏组织氧化应激指标检测

从 -80℃ 冰箱迅速取出肝脏，于 4℃ 解冻备用。用预冷的生理盐水洗净血污，吸水纸擦去多余的水分进行称重。从肝组织中取出约 100 mg 的样本，将其精细剪碎放入研磨管内。以预冷的生理盐水悬浮剪碎的组织（按组织：生理盐水=1：9），加入两颗钢珠，在低温条件下匀浆。匀浆完成后按说明书方法将得到的肝脏匀浆低温离心后冰浴下保存备用。分组同本章“2.4”节，使用试剂盒按 TBA 法检测 MDA 含量，微板法检测 GSH 含量。

2.6 Western Blot 技术测定肝脏组织中 NRF2、xCT 和 GPX4 蛋白的表达情况

2.6.1 肝组织蛋白提取

从 -80℃ 冰箱迅速取出肝脏组织，于 4℃ 解冻备用。使用精密称量天平称取大概 60mg 的组织样品。按组织：裂解液=1mg：10 μ l 的比例加入预冷的包含 1% PMSF 的 RIPA 裂解液。尽量保证裂解液现配现用。将样品均匀研磨成组织匀浆，置于冰上裂解 30min，期间可以多次手动振荡摇晃以充分裂解。随后，使用低温高速离心机以 12000rpm/min，4℃ 离心 30min，吸弃沉淀，回收上清。将上清用 PBS 作适量倍数稀释后利用 BCA 蛋白定量试剂盒测出吸光度，

并代入标曲中得到各样品的蛋白浓度。将所有样品稀释成同一蛋白浓度后，按样品体积：5×缓冲液体积=1：4 混匀，投入水浴锅 100℃水浴 10min，水浴过程中配备漂浮板和防爆夹，避免因温度过高样品管盖爆开而有水蒸气进入样品管导致浓度不一致影响后续实验。待样品冷却后，分装样品，-80℃保存备用。

2.6.2 溶液配制

(1)分离胶和浓缩胶：二者均按照制胶试剂盒说明书上的方法将 A 液和 B 液等量混匀，并按比例和温度调节促凝剂添加量。

(2)1×TBST：10×TBST（内含 Tween20）需用蒸馏水稀释 10 倍方可使用。

(3)1×电泳液：按说明书指示，每一瓶 SDS-PAGE 电泳液粉末用蒸馏水溶解并定容至 1L。

(4)1×电转液：按说明书指示，每一瓶转膜液粉末加入无水乙醇 200ml，并用蒸馏水溶解并定容至 1L。

2.6.3 制胶

根据目标蛋白分子量的范围，选择 10%和 12%的分离胶。将胶架、玻璃板组装好后，将适量分离胶匀速注入槽内后，无水乙醇或蒸馏水进行压胶，在室温下静置 15~20min 直到胶凝（如果温度较低，需要等待更长时间），倾倒压胶的水分或乙醇，用吸水纸吸干剩余的液体。加入浓缩胶并插入配套的孔梳，注意手法，避免产生气泡。确保分离胶与浓缩胶交界线平整，避免漏液，保持静止 15~20min 直到胶凝。

2.6.4 电泳

将样品提前从-80℃拿出置于 4℃解冻，用涡旋仪涡旋以充分混匀样品。将提前配好的 1×电泳液倒进组装好的电泳槽，保证槽内无漏液现象后拔出梳子。上样时，尽量把中间泳道用作样品孔，两边加入 Marker 用作蛋白分子量标记孔。尽量赶走泳道上方气泡以免上样时带走样品。点样完毕，先用 90v 恒压将泳道的样品电泳在同一起跑线上直至样品跑完上层浓缩胶时，将电压调节至 120V 恒压下，继续电泳，直到溴酚蓝跑完全程，停止电泳。

2.6.5 电转

PVDF 膜提前用甲醇溶液激活。利用 Marker 确定目标蛋白的位置，并切割出目标蛋白凝胶置于滤纸上，活化好的 PVDF 膜平铺于凝胶之上，注意此过程不要产生气泡且时刻防止膜和胶干燥。随后小心加盖滤纸，滤纸的数量以三

明治夹紧实程度和滤纸厚薄情况而定。胶的方向按黑胶白膜的顺序放置。往转膜槽中加入足够的预冷的 1×电转液并辅以冰盒以降低转膜过程因电压过大而释放的高热量，转膜槽外亦使用冰水浴。调节电泳仪恒流 350mA 进行电转。

2.6.6 封闭, 洗膜

转膜完成后, 将含有目标蛋白的 PVDF 膜置于装有快速封闭液的抗体孵育盒中封闭 10-15min, 具体时间视后续曝光情况和快速封闭液使用次数而定。封闭全程于摇床上室温下进行。封闭结束后, 将 PVDF 膜放入装有 1×TBST 的抗体孵育盒中, 并在摇床上进行 3 次洗膜, 每次持续 8min。

2.6.7 孵育一抗

将一抗抗体溶液按照说明书预先设定的比例用抗体稀释液混合, 然后将其置于 4℃的摇床中, 孵育 12~16h。部分一抗可以回收利用。

2.6.8 洗膜, 孵二抗

在一抗孵化结束之后, 应该在摇床上进行 1×TBST 的洗涤, 共进行 3 次, 每次持续 8min 以洗去表面没有结合的一抗抗体。然后, 把膜放进预先配置好的二抗溶液中, 室温下摇床上孵育 1h, 对表达量较少的蛋白质, 应该适当增加二抗孵育的时间。二抗可酌情回收利用。

2.6.9 洗膜, 曝光

二抗孵育完成后, 应该在摇床上进行 1×TBST 的洗涤, 共进行 3 次, 每次持续 8min 以洗去表面没有结合的二抗抗体。避光均匀滴撒适量现拍现用的超敏发光显影混合液于含有蛋白面的膜上, 选择合适的曝光时间获取条带, 使用相关影像分析软件对条带结果进行分析。

2.7 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术检测肝脏组织 NRF2、xCT、GPX4 等 mRNA 表达水平

2.7.1 传统 Trizol 法提取组织总 RNA

(1) 从 -80℃冰箱迅速取出肝脏组织, 于 4℃解冻备用。使用精密称量天平称取大概 60mg 的组织样品。60mg 的组织样品中加入至少 1ml 的 Trizol, 使用手动匀浆机将样品置于冰上均匀研磨至无明显组织残渣块。注意研磨不同组别的样品时需要确保匀浆机干净无污染。

(2) 往每个样品中加入 0.2ml 冰氯仿, 手动上下摇晃混匀。室温下静置 3min 并能明显观察到样品呈上、中、下分层明显。随后使用低温高速离心机以

12000rpm/min，4℃离心 15min，小心吸取上层粉红色上清，切勿收集到中下层溶液以防造成最终提取的 RNA 纯度受到污染。

(3) 往提取的上清液中加入 0.5ml 异丙醇，室温静置 10min 使 RNA 得以充分分离，待 RNA 沉淀下来后低温 12000rpm 离心 10min，取管壁 RNA 沉淀。

(4) 往各组沉淀中加入 1ml 75%乙醇（根据分析纯级别无水乙醇：无菌无霉水=3：1 配置），以吹起但不吹散沉淀为宜对沉淀进行清洗，再次以 4℃，12000rpm 离心 10min，弃去上清液，倒扣样品管使管内乙醇溶液尽量挥发干燥，避免对 RNA 样品的纯度造成污染。

(5) 将提取的各组 RNA 样品彻底干燥后用适量无酶水充分溶解。取 1μl 溶解后的 RNA 样品于 NanoDrop 2000 仪器中进行 RNA 浓度与纯度的测定。

2.7.2 实时荧光定量 PCR 反应

(1) 去除 gDNA：提前按说明书的比例将去除 gDNA 溶液配齐。具体的试剂比例如表 1-5。RNA 样品可按照测出的浓度先稀释至统一浓度再进行后续的去掉 gDNA 反应。室温静置反应 10min。

(2) 反转录：提前按说明书的比例将反转录试剂配齐。具体的试剂比例如表 1-6。随后将反转录试剂加入到已去除 gDNA 的反应液中。瞬离后立即置于反转录仪中进行后续操作。

(3) 扩增反应：将设计购得的引物按说明书操作用无酶水稀释至特定浓度，充分混匀 4℃保存待用，引物序列如表 1-7。按说明书的比例将扩增反应试剂配齐（注意 TB Green Premix Ex Taq 染料尽量避光）。具体的试剂比例如表 1-8。在上机前用掌上离心机将管壁粘连的样品离心下来。后按表 1-9 设置程序。

以上所有流程均尽量在冰上操作，避免试剂发生降解失效。

表 1-5 去除基因组反应溶液

Table 1-5 Removal of genomic reaction solution

①去 gDNA 反应（10μl 体系）	
试剂	体积（μl）
5×gDNA Eraser Buffer	2.0
gDNA Eraser	1.0
RNA（最后加入）	1μg/C（C 为稀释后的 RNA 浓度）
RNase-Free dH ₂ O	补足至 10μl

总体积 10

(室温静置 5-10 min)

表 1-6 反转录体系

Table 1-6 Reverse transcription system

②反转录体系 (20μl 体系)

试剂	体积 (μl)
步骤①的反应液	10
Primer Script RT Enzyme Mix I	1.0
RT Primer Mix	1.0
5×Primer Script Buffer 2	4.0
RNase-Free dH ₂ O	4.0
总体积	20

(反应条件: 37°C 15min; 85°C 5s ; 4°C 1min)

表 1-7 基因引物序列

Table 1-7 Gene primer sequence

引物名称	序列
NRF2	FORWARD TCTGACTCCGGCATTTCAC
	REVERSE AGGCCAAGTAGTGTGTCTCC
xCT	FORWARD AACCGAAGGCCAGAGAATCA
	REVERSE AGGTCAGGACCTCGAATGG
GPX4	FORWARD ATACGCTGAGTGTGGTTTGC
	REVERSE CACGCAGATCTTGCTGAACA
HO-1	FORWARD AACTTTCAGAAGGGCCAGGT
	REVERSE GAAGACTGGGCTCTCCTTGT
GSS	FORWARD CAGCTGAAGGACAGTGAGGA
	REVERSE ACGTGCTTGTTTCATCACGAG
ACSL4	FORWARD ATTGGCTACTTGCCTTTGGC
	REVERSE CAGCCATAAGTGTGGGCTTC
β-actin	FORWARD TGTCACCAACTGGGACGATA
	REVERSE GGGGTGTTGAAGGTCTCAA

表 1-8 荧光定量 PCR 反应体系

Table 1-8 Fluorescence quantitative PCR reaction system

③ Applied Biosystems 7500 扩增反应体系（20μl 体系）	
试剂	体积（μl）
TB Green Premix Ex Taq（2×）	10
PCR Forward Primer（10μm）	0.4
PCR Reverse Primer（10μm）	0.4
ROX Reference Dye II（50X）	0.4
DNA 模板	2
RNase-Free dH ₂ O	6.8
总体积	20

表 1-9 荧光定量 PCR 反应条件

Table 1-9 Fluorescent quantitative PCR reaction conditions

PCR 扩增两步法标准程序：	
Stage 1：预变性	Reps：1
	95℃ 30 s
Stage 2：PCR 反应	Reps：40
	95℃ 5s；60℃ 34s
Dissociation stage	Reps：1
	95℃ 15s；60℃ 1min；95℃ 15s

导出数据，得到每一组样品的 CT 值，根据相应算法计算比较各组样本目标基因的 mRNA 相对表达量。

2.8 统计学分析

将得到的实验数据导入 GraphPad Prism 8.0 软件，组与组间比较采用 t 检验法。[#]*P*<0.05，^{##}*P*<0.01 表示与正常组相比，模型组差异有统计学意义；^{**}*P*<0.01，^{*}*P*<0.05 表示与模型组相比，给药组差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 大鼠体质量的变化情况

与正常组体重相比，模型组大鼠体重增加，肥胖明显，从第 3 周开始模型组大鼠体重的增长速度开始高于正常组，两组大鼠体重增长速率对比基本保持同步增长，一直持续到第 20 周开始逐渐拉大差异，并在第 22 周达到顶峰。而自第 23 周开始给予药物干预连续 2 周以来，与模型组相比，木姜叶柯叶组和二甲基胍组大鼠的体重有减小趋势，以木姜叶柯叶高剂量组体重下降最为明显，

甚至有接近于正常组的趋势。木姜叶柯叶组大鼠体重均低于二甲双胍组。如图 1-1。

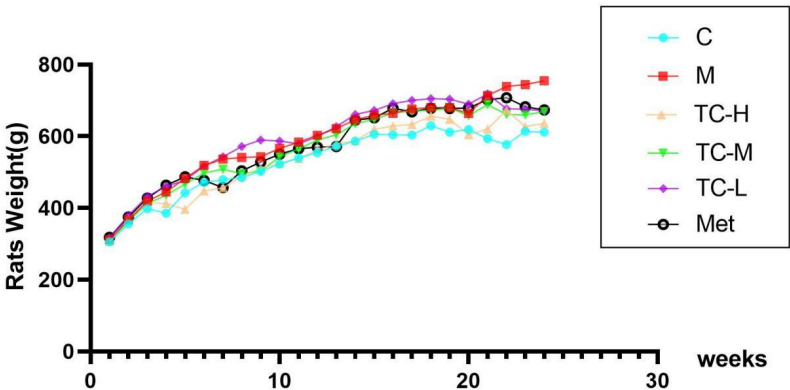


图 1-1 实验期间大鼠体质量监测情况 ($\bar{X} \pm S$, $n=8$)

Figure 1-1 Body mass monitoring in rats during the experiment ($\bar{X} \pm S, n=8$)

注：正常对照组简称“C”；模型组简称“M”；木姜叶柯叶（甜茶）高剂量组简称“TC-H”；木姜叶柯叶（甜茶）中剂量组简称“TC-M”；木姜叶柯叶（甜茶）低剂量组简称“TC-L”；“Met”为二甲双胍阳性药组。

3.2 木姜叶柯叶对大鼠肝脏组织病理学的影响

肝脏病理切片结果显示，正常组肝组织细胞排列次序分明，细胞间边界明显，形态一致有规则，细胞核明显而圆润，组织着色均匀，且无明显的脂质堆积和脂肪变性，也没有炎性细胞的浸润。而模型组较正常组肝组织相比，肝细胞无秩序性分布，细胞的正常形态和完整性明显区别于正常细胞，还有明显的脂肪空泡、气球样变、脂肪变性和大量炎性因子浸润。而与模型组相较，木姜叶柯叶高、中、低剂量的介导和二甲双胍阳药治疗后的大鼠肝细胞结构和形态较为完整和正常，表现为脂肪空泡的大幅度减少、气球样变得到好转，炎症性损伤也有减轻。以上结果表明，木姜叶柯叶对高脂诱导 NAFLD 大鼠肝脏脂质代谢困难引起的脂肪变性和炎性中性粒细胞堆积病灶都有明显的改善作用。具体见图 1-2。

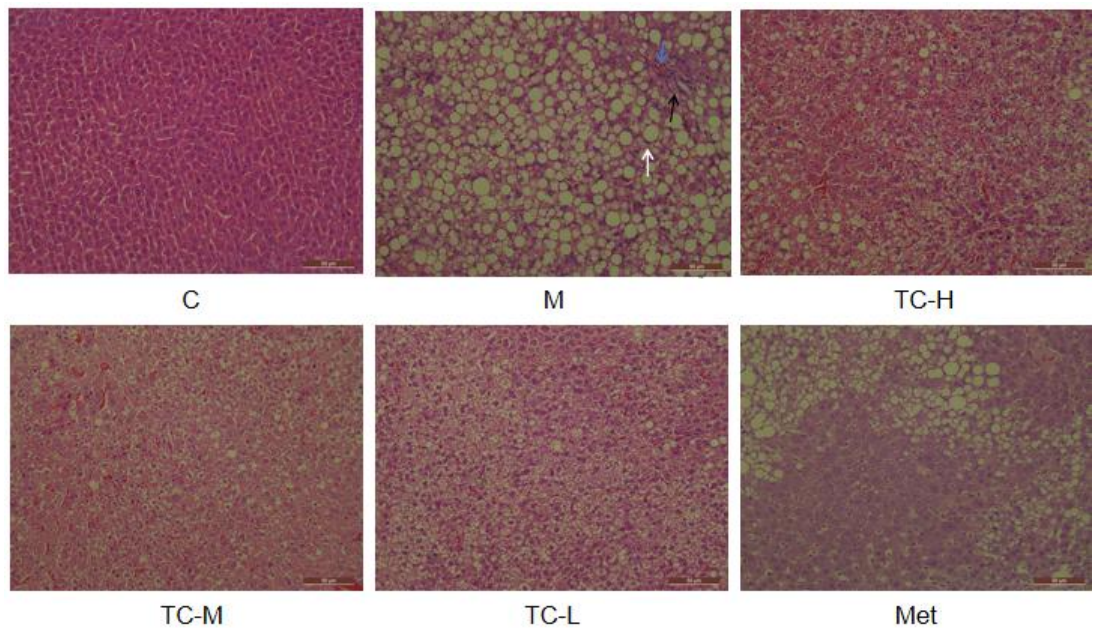


图 1-2 大鼠肝组织病理学观察（×200，n=3）

Figure 1-2 Histopathological observation of rat liver (×200,n=3)

注：正常对照组简称“C”；模型组简称“M”；木姜叶柯叶（甜茶）高剂量组简称“TC-H”；木姜叶柯叶（甜茶）中剂量组简称“TC-M”；木姜叶柯叶（甜茶）低剂量组简称“TC-L”；“Met”为二甲双胍阳性药组。蓝色指示：炎性粒细胞浸润；黑色指示：气球状变形；白色指示：脂肪空泡。

3.3 木姜叶柯叶对大鼠肝损伤指标的影响

TG、TCHO、LDL、HDL 是直接反应血脂水平和血胆固醇含量的指标，ALT 和 AST 能够反应肝功能好坏程度。通过实验 1-3 证明，SD 大鼠经过高脂造模后，与正常对照组相比，模型组 TG、TCHO、LDL 含量和 ALT、AST 活性显著升高（ $P<0.01$ ），HDL 含量显著降低（ $P<0.01$ ）。这初步表明 NAFLD 模型大鼠成功的建立。在给予木姜叶柯叶干预后，与模型组相比，木姜叶柯叶各剂量组均能够显著的降低 TG、TCHO、ALT、AST 和 LDL 的水平（ $P<0.05$ ），同时有效地升高血液中的 HDL 含量（ $P<0.05$ ）。二甲双胍组同样能够显著下调 NAFLD 大鼠模型的 TG、TCHO、LDL、ALT、AST 含量（ $P<0.01$ ），同时上调 NAFLD 大鼠模型 HDL 的水平（ $P<0.01$ ）。以上结果表明，木姜叶柯叶和二甲双胍能够逆转 NAFLD 大鼠模型的高血脂和高胆固醇，改善 NAFLD 大鼠模型肝功能指数。见图 1-3。

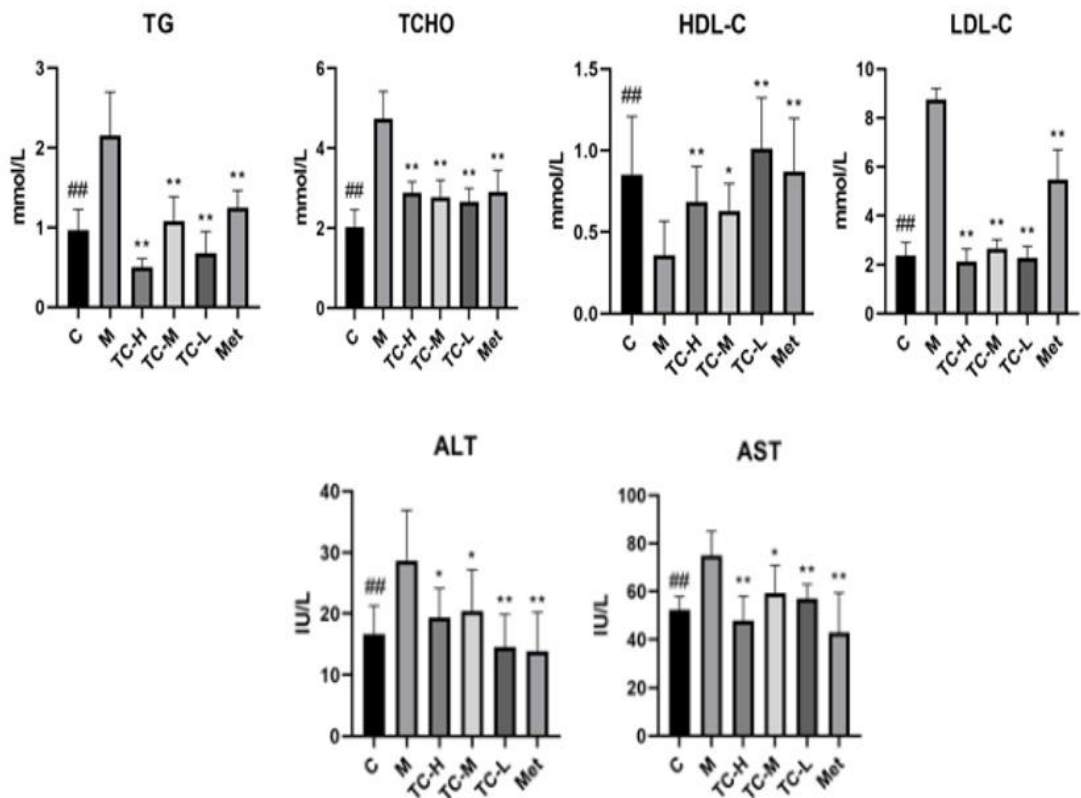


图 1-3 大鼠血清肝损伤和肝功能生化指标水平 ($\bar{X} \pm S$, $n=8$)

Figure 1-3 Levels of serum liver injury and biochemical indices of liver function in rats($\bar{X} \pm S, n=8$)

注：正常对照组简称“C”；模型组简称“M”；木姜叶柯叶（甜茶）高剂量组简称“TC-H”；木姜叶柯叶（甜茶）中剂量组简称“TC-M”；木姜叶柯叶（甜茶）低剂量组简称“TC-L”；“Met”为二甲双胍阳性药组。与正常对照组比， $^{\#}P<0.05$ ， $^{##}P<0.01$ ；与模型组比， $^{*}P<0.05$ ， $^{**}P<0.01$ 。

3.4 木姜叶柯叶对大鼠炎症因子的影响

TNF- α 、IL-6、IL-1 β 作为经典的炎症因子，能够直观的反应机体的炎症情况。由图 1-4 表明，经过高脂饮食后，模型组大鼠血清中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的含量较正常组显著升高 ($P<0.01$)，通过木姜叶柯叶和二甲双胍干预后，木姜叶柯叶高剂量组和中剂量组均能明显降低 NAFLD 大鼠的 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 含量 ($P<0.05$)；木姜叶柯叶低剂量组能够明显降低 NAFLD 大鼠血清中的 TNF- α 和 IL-6 水平 ($P<0.05$)；二甲双胍组也能够显著降低 IL-6 水平 ($P<0.01$)。以上结果表明，高脂饮食不仅能够诱发 NAFLD 大鼠模型高血脂水平，

还能够激发严重的炎症反应。木姜叶柯叶和二甲双胍在降脂的同时，还能够减轻 NAFLD 模型大鼠机体的炎症反应。

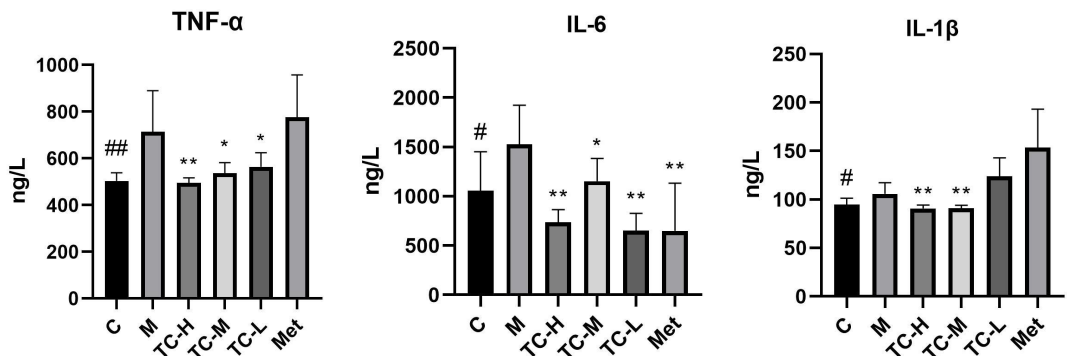


图 1-4 大鼠血清炎症水平比较 ($\bar{X} \pm S$, $n=8$)

Figure 1-4 Comparison of serum inflammatory levels in rats ($\bar{X} \pm S$, $n=8$)

注：正常对照组简称“C”；模型组简称“M”；木姜叶柯叶（甜茶）高剂量组简称“TC-H”；木姜叶柯叶（甜茶）中剂量组简称“TC-M”；木姜叶柯叶（甜茶）低剂量组简称“TC-L”；“Met”为二甲双胍阳性药组。与正常对照组比， $\#P<0.05$ ， $\#\#P<0.01$ ；与模型组比， $*P<0.05$ ， $**P<0.01$ 。

3.5 木姜叶柯叶对大鼠肝脏氧化应激表达物的调控作用

MDA 和 GSH 分别作为脂质过氧化物和铁死亡生物学特征分子常被用来作为评估机体的氧化应激和铁死亡水平的指标。实验发现，相对于正常组，模型组大鼠肝组织中 MDA 的浓度明显有所升高 ($P<0.05$)，GSH 的浓度显著有所下降 ($P<0.01$)。在给予木姜叶柯叶和二甲双胍干预后，与模型组相比，木姜叶柯叶各剂量组和二甲双胍组均能够显著降低 NAFLD 大鼠的 MDA ($P<0.05$)，升高 GSH 含量 ($P<0.05$)。以上结果表明，NAFLD 大鼠模型肝脏有受到潜在的氧化应激攻击和出现铁死亡现象，而木姜叶柯叶和二甲双胍可以保护 NAFLD 大鼠肝脏，减轻氧化应激损伤程度，降低铁死亡程度。见图 1-5。

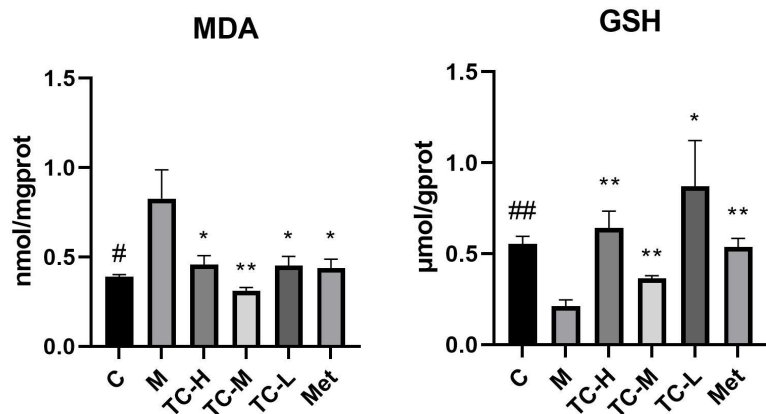


图 1-5 大鼠肝组织 MDA 水平以及 GSH 含量变化 ($\bar{X} \pm S$, n=8)

Figure 1-5 Changes of MDA level and GSH content in liver tissue of rats in each group ($\bar{X} \pm S$, n=8)

注：正常对照组简称“C”；模型组简称“M”；木姜叶柯叶（甜茶）高剂量组简称“TC-H”；木姜叶柯叶（甜茶）中剂量组简称“TC-M”；木姜叶柯叶（甜茶）低剂量组简称“TC-L”；“Met”为二甲双胍阳性药组。与正常对照组比，[#] $P < 0.05$ ，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ 。

3.6 木姜叶柯叶对大鼠肝脏 Fe^{2+} 水平的影响

组织细胞中亚铁沉积是铁死亡的典型标志之一。如图 1-6 所示，模型组 Fe^{2+} 含量相较于正常组有明显的升高趋势 ($P < 0.01$)。这表明 NAFLD 大鼠肝脏存在明显的亚铁沉积。而给予木姜叶柯叶和二甲双胍干预后，木姜叶柯叶各剂量组和二甲双胍组与模型组相比，明显降低了 NAFLD 大鼠肝脏 Fe^{2+} 含量 ($P < 0.01$)。木姜叶柯叶和二甲双胍能够逆转 NAFLD 大鼠模型的亚铁沉积，缓解 NAFLD 大鼠的铁死亡现象。

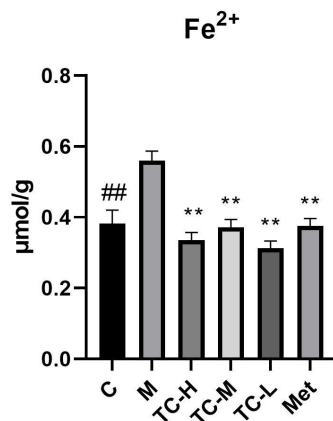


图 1-6 大鼠肝组织亚铁含量比较 ($\bar{X} \pm S$, n=8)

Figure 1-6 Comparison of ferrous content in rat liver tissue ($\bar{X} \pm S$, n=8)

注：正常对照组简称“C”；模型组简称“M”；木姜叶柯叶（甜茶）高剂量组简称“TC-H”；木姜叶柯叶（甜茶）中剂量组简称“TC-M”；木姜叶柯叶（甜茶）低剂量组简称“TC-L”；“Met”为二甲双胍阳性药组。与正常对照组比， $^{\#}P<0.05$ ， $^{##}P<0.01$ ；与模型组比， $^{*}P<0.05$ ， $^{**}P<0.01$ 。

3.7 木姜叶柯叶对大鼠肝脏 Nrf2、xCT、Gpx4 蛋白表达量的影响

xCT/GSH/Gpx4 轴是铁死亡最为重要的一条铁依赖性的抗铁死亡通路，Nrf2 作为上游靶点能够参与调控该通路的基因表达。如图 1-7，与正常组相比，模型组的大鼠肝脏组织中 Nrf2、xCT 和 Gpx4 蛋白的表达水平有所降低（ $P<0.05$ ）。相反，木姜叶柯叶组和二甲双胍组均显著的提高了 NAFLD 大鼠肝脏 Nrf2、xCT 和 Gpx4 蛋白表达量（ $P<0.05$ ）。高脂饮食诱导的 NAFLD 大鼠在发生亚铁沉积的同时，其抗铁死亡系统作用也遭到不断的削弱，而木姜叶柯叶和二甲双胍反向逆转这种趋势，正向调控 xCT/GSH/Gpx4 轴的蛋白表达，增强了其抗铁死亡的作用的同时，升高了 Nrf2 表达，增强其下游通路信号靶点的蛋白表达。

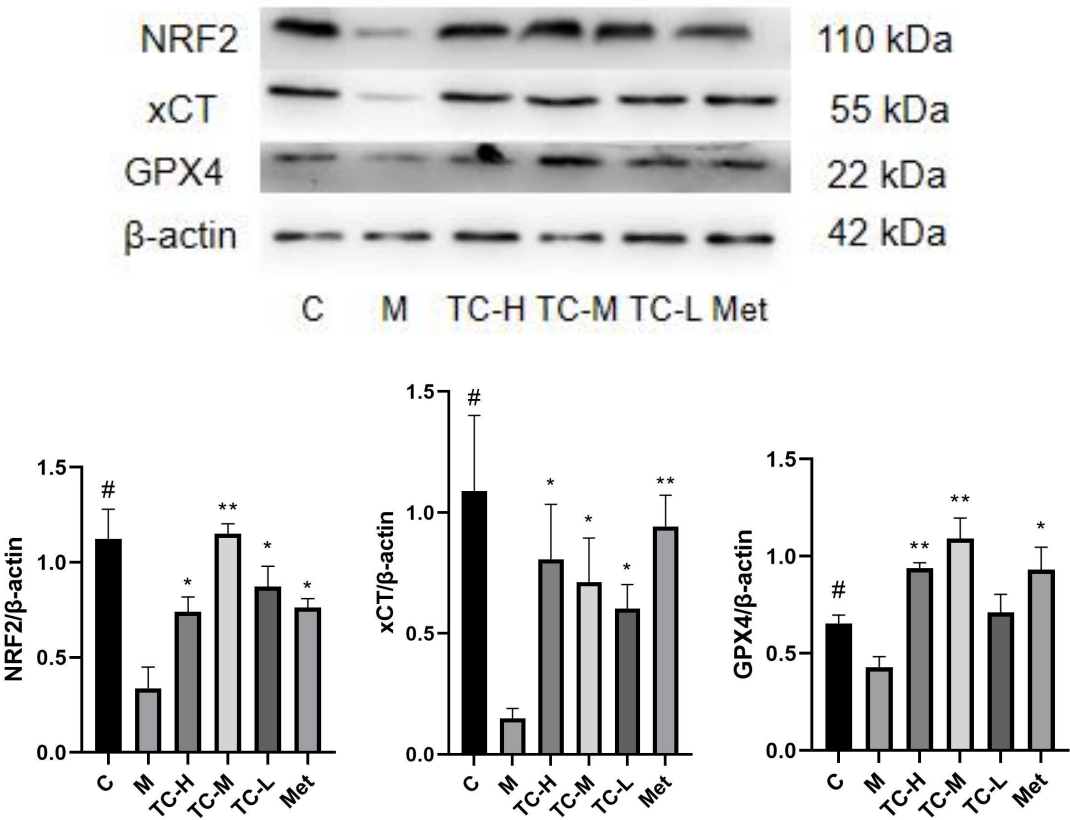


图 1-7 各组大鼠肝组织 Nrf2、xCT、Gpx4 蛋白表达水平（ $\bar{X}\pm S$, $n=3$ ）

Figure 1-7 Expression levels of Nrf2、xCT and Gpx4 protein in liver tissue of rats in each group ($\bar{X} \pm S, n=3$)

注：正常对照组简称“C”；模型组简称“M”；木姜叶柯叶（甜茶）高剂量组简称“TC-H”；木姜叶柯叶（甜茶）中剂量组简称“TC-M”；木姜叶柯叶（甜茶）低剂量组简称“TC-L”；“Met”为二甲双胍阳性药组。与正常对照组比， $^{\#}P<0.05$ ， $^{##}P<0.01$ ；与模型组比， $^{*}P<0.05$ ， $^{**}P<0.01$ 。

3.8 大鼠肝组织 NRF2、HO-1、xCT、GSS、GPX4 和 ACSL4 基因 mRNA 表达量变化

ACSL4 作为铁死亡的标志物之一，能够促进铁死亡的发生。模型组 ACSL4 的 mRNA 表达水平相对正常对照组显著升高（ $P<0.01$ ）。与模型组相比，木姜叶柯叶各剂量组和二甲双胍组 ACSL4 的 mRNA 表达含量均有显著下调趋势（ $P<0.01$ ）；与正常组相比，模型组 Nrf2 的 mRNA 表达水平显著降低（ $P<0.01$ ）。与模型组相比，木姜叶柯叶中、低剂量组和二甲双胍组 Nrf2 的 mRNA 表达得到显著上调（ $P<0.01$ ）。Nrf2 mRNA 的表达进一步影响下游 HO-1 和 xCT/GSH/Gpx4 轴的转录。与空白组相比，模型组 HO-1、xCT、GSS 和 GPX4 的 mRNA 表达含量出现显著下调趋势（ $P<0.05$ ）。与模型组相比，木姜叶柯叶高、中剂量组和二甲双胍组 HO-1、xCT、GSS 和 GPX4 的 mRNA 表达显著上升（ $P<0.05$ ），木姜叶柯叶低剂量组的 HO-1 和 GPX4 mRNA 表达水平显著上调（ $P<0.05$ ），xCT 的 mRNA 表达水平也有明显的升高趋势。由此可得，高脂饮食诱导的 NAFLD 大鼠相较于正常大鼠，其 ACSL4 mRNA 表达呈倍数增长，这表明 NAFLD 大鼠模型体内含有丰富的铁死亡合成原料，有充足的酶促反应条件促进铁死亡，且能削弱 NAFLD 大鼠体内抗氧化反应体系抑制铁死亡的能力。而木姜叶柯叶和二甲双胍能明显正向调控这些靶点 mRNA 的转录表达，改善铁死亡。见图 1-8。

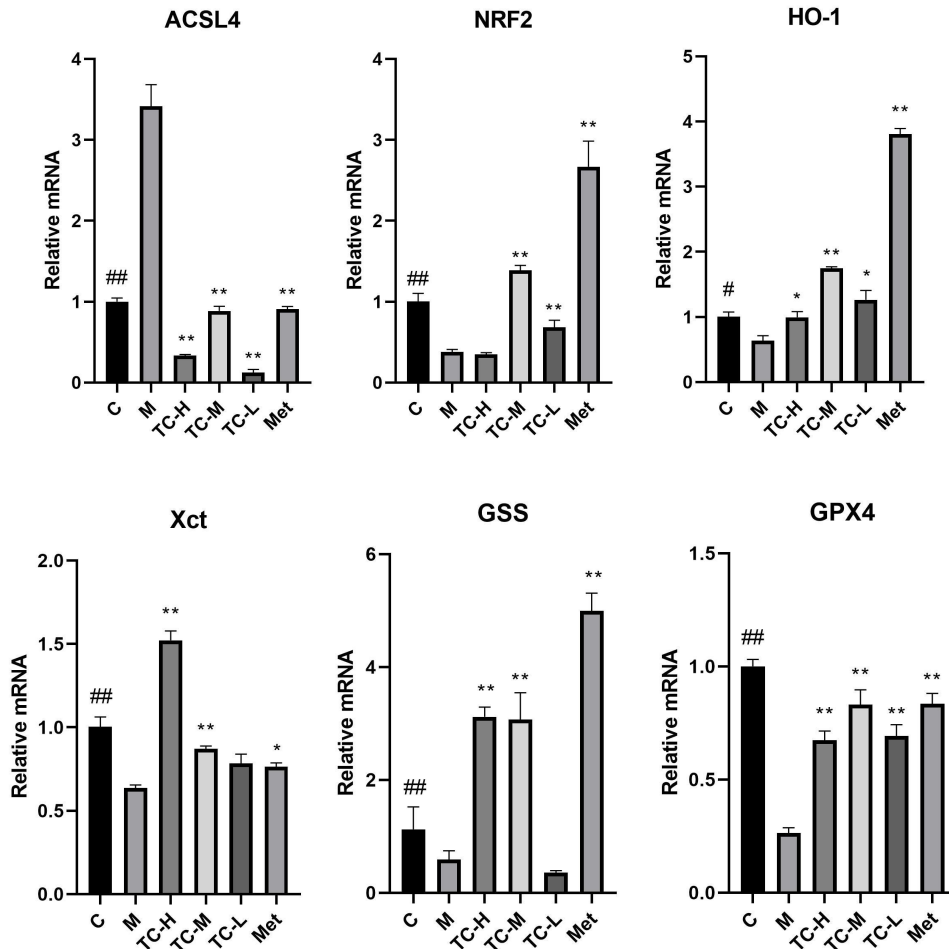


图 1-8 各组大鼠肝组织 NRF2、HO-1、xCT、GSS、GPX4 和 ACSL4 mRNA 表达水平 ($\bar{X} \pm S$, $n=3$)

Figure 1-8 NRF2, HO-1, xCT, GSS, GPX4 and ACSL4 mRNA expression levels in liver tissues of rats in each group ($\bar{X} \pm S, n=3$)

注：正常对照组简称“C”；模型组简称“M”；木姜叶柯叶（甜茶）高剂量组简称“TC-H”；木姜叶柯叶（甜茶）中剂量组简称“TC-M”；木姜叶柯叶（甜茶）低剂量组简称“TC-L”；“Met”为二甲双胍阳性药组。与正常对照组比，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ ；与模型组比，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

4 讨论

NAFLD 最主要的生化特征是，机体内脂肪酸代谢失调导致肝脏脂肪的过度积累。而人们普遍接受的 NAFLD “多重打击”发病机制认为，肝脏细胞脂质过度积累被认为是“第一重打击”。因此，肝脏脂质堆积是满足 NAFLD 发病的第一要素。目前 NAFLD 常用的造模方法主要分为四类^[76]，分别为高脂、高糖诱导的饮食诱发类模型，向动物体内注射链脲佐菌素或脂多糖等药物诱发模

型, 还有通过敲除特定基因改善基因表达来调节代谢的代谢特殊模型, 以及自发型。研究显示, NAFLD 的发病率与地方饮食习惯有很大的相关性, 且肥胖人群的 NAFLD 发病率明显高于正常饮食人群^[13]。基于这一规律, 本文采用长期稳定的给 SD 大鼠投喂高脂饲料的方法诱导 NAFLD 大鼠模型。除了操作简单, 能够最大程度的避免对大鼠造成伤害和刺激而致死亡的同时, 也更符合 NAFLD 作为一种慢性代谢性疾病发展的特点。二甲双胍作为治疗二型糖尿病的一线药物的同时, 有研究表明, 二甲双胍能够通过多种途径改善 NAFLD 肝损伤情况^[77]。二甲双胍能够强化组织细胞对胰岛素的敏感性降低机体的胰岛素抵抗和升高抗氧化转录因子来改善氧化应激水平而减少 NAFLD 肝损伤状况^[78]。此外, 研究显示, 二甲双胍能够通过调控铁死亡来改善 NAFLD^[79-81]。因此, 本实验基于以上改善铁死亡和 NAFLD 的证据采用二甲双胍作为阳性药。NAFLD 作为全球性慢性疾病的控制手段, 除了通过临床外科手术外, NAFLD 患者主要通过调整饮食限制热量和血糖的高摄入模式, 以及改善其它不良生活习性和根据代谢综合征情况服用降血糖药物、降脂抗炎药或抗氧化药物进行干预。然而, 让现代人改变多年以来的生活习性和习惯对于大部分人来说无疑是痛苦且难以持续坚持下去的, 而规范的药物虽然能够带来一定的治疗效果, 但持续长期的摄入可能会带来治疗效果以外的其它的严重的副作用。传统天然产物以其多年的应用历史和无数经典案例的应用经验而颇具优势, 因此, 开发应用天然产物在预防 NAFLD 方面迫在眉睫。

通过长期稳定的投喂高脂饲料诱导 SD 大鼠 NAFLD 模型, 模型组大鼠体重增长速度自第 3 周开始明显高于正常组。体重差异在第 22 周达到顶峰。而木姜叶柯叶和二甲双胍的治疗能够降低 NAFLD 大鼠的体重增长速度, 且木姜叶柯叶减重作用甚至优于二甲双胍。对肝脏进行病理观察发现, NAFLD 大鼠模型组肝细胞排列松散无秩序, 呈气球样变, 肝脏中充斥了大量的红色脂肪伴有严重的炎性因子浸润。同时测定各组大鼠 TG 和 TCHO 水平, 发现模型组大鼠 TG 和 TCHO 含量相对于正常组有显著上升, TG 和 TCHO 作为评估血脂水平的重要指标, 和肝组织病理变化一同证明 NAFLD 大鼠模型的成功构建^[82-83]。而给药组在显著降低模型组血脂水平的同时, 其病理切片气球样变和脂肪堆积以及炎症浸润的现象相较于模型组有着明显的改善。HDL 作为好胆固醇, 能够增强血脂的代谢能力, LDL 作用与之完全相反^[84]。本次实验中, NAFLD 模型组相

较于正常组 HDL 显著下降, LDL 显著上升, 木姜叶柯叶与二甲双胍显著逆转了这种趋势, 这说明木姜叶柯叶能够增强血脂的代谢能力。ALT 与 AST 一起作为常见的表征肝脏肝功能正常的指标, 当肝细胞受到外界损伤因素而发生坏死破裂时, ALT 和 AST 则会被大量释放入血^[85]。因此, NAFLD 模型组大鼠肝脏受到长期脂肪填充而导致 ALT 和 AST 两者在血清中活性显著高于正常组, 这表明 NAFLD 肝脏受到严重损坏, 而木姜叶柯叶组和二甲双胍组 ALT 和 AST 的活性下降则说明木姜叶柯叶和二甲双胍能够保护肝脏。此外, 模型组炎症水平明显高于正常组, 表现为模型组血清中典型炎性细胞因子 TNF- α , IL-6 和 IL-1 β 含量出现显著上升, 而经木姜叶柯叶和二甲双胍给药后有所下降, 这与病理切片中给药组明显减少了肝脏炎性粒细胞相吻合, 这表明木姜叶柯叶可能能够改善 NAFLD 炎症水平。

越来越多的研究表明, NAFLD 与铁死亡密切相关。研究结果表明, GPX4^[86]是一种常见的铁死亡指标, 而且高脂肪摄入也会导致这种情况的发生。铁死亡是一种新型的区别于传统细胞死亡形式的铁依赖性细胞死亡方式, 由 Dixon 等在 2012 年首次发现并提出^[25]。现代研究表明, 铁死亡机制主要以铁过载和氧化应激诱导脂质氢过氧化物为主^[87]。

通常机体的铁维持着一种相对的平衡。当铁离子穿过细胞膜时, 与相应受体蛋白相结合, 从而进入细胞。此时, 三价铁被还原为二价铁并以结合铁蛋白的形式储存在细胞内的“铁池”当中^[25]。但是, 当机体内铁平衡被打破, 进入细胞内的二价铁过多时, 此时二价铁以游离二价铁的形式存在于细胞中, 并且催化生成更多的自由基, 这些自由基被当做活性氧的原料最终促进活性氧的合成, 活性氧攻击细胞膜磷脂分子^[88], 最终细胞破裂, 导致细胞死亡。本次研究发现, 经过高脂饮食造模处理后, 模型组大鼠肝脏亚铁离子含量明显比正常组升高, 这说明 NAFLD 肝脏容易出现铁过载, 而木姜叶柯叶能够降低 NAFLD 肝脏亚铁含量, 减少 NAFLD 肝脏铁蓄积, 减少因铁过载引发的肝脏铁死亡。

除了铁过载, 其引发的脂质过氧化造成的肝脏细胞和细胞器膜氧化损伤可能是非酒精性脂肪肝病发病的重要因素^[89]。脂类过氧化是一种由多不饱和脂肪酸 (Polyunsaturated fatty acid, PUFA) 引起的反应, 酯化的 PUFA 作为脂类过氧化的底物能够通过一系列酶促和非酶促反应生成脂质氢过氧化物, 从而对细胞和细胞器膜造成破坏。脂质氧化的主要产物包括过氧化氢和多种醛类,

包括 MDA 和 4-羟基壬烯醛。MDA 和 4-羟基壬烯醛被广泛用作铁死亡标志物^[90-91]。通过对肝脏 MDA 的检测发现, NAFLD 模型组 MDA 含量较正常组显著升高, MDA 作为衡量机体氧化受损程度的常用指标, MDA 水平越高, 机体受到的氧化攻击就越多。而木姜叶柯叶降低了 NAFLD 大鼠 MDA 升高的含量, 这说明木姜叶柯叶可能能够通过减少 NAFLD 肝脏受到的氧化损伤, 从而达到保护肝脏的作用。酰基辅酶 A 合成酶 4 (acyl-co A synthetase 4, ACSL4) 与溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶具有相似的功能, 它们可以协助脂肪酸的代谢, 从而促进其中的脂类物质的过氧化反应^[92]。抑制 ACSL4 含量能够抑制脂质过氧化进而抑制癌细胞中的铁死亡^[93]。本研究发现, NAFLD 模型组大鼠肝脏 ACSL4 mRNA 显著升高, 而木姜叶柯叶能够明显降低 ACSL4 mRNA 表达含量, 这说明 NAFLD 模型大鼠脂质过氧化反应明显比正常组和给药组严重, 木姜叶柯叶能够降低 NAFLD 模型大鼠脂质过氧化。

System Xc/GSH/GPX4 通路是铁死亡的主要防御系统。System Xc 是一类复杂的胱氨酸-谷氨酸反转运基因, 它的结构包括轻链亚基和重链亚基^[94], 其中, 轻链亚基起着至关重要的功能。xCT 可以有效地分离和吸收细胞内的谷氨酸, 同时也可以通过谷胱甘肽合成酶 (Glutathione Synthetase, GSS) 的催化, 使细胞产生大量的胱氨酸, 这些胱氨酸可以被分解成半胱氨酸, 从而促进细胞的生长发育^[95]。谷胱甘肽 (Glutathione, GSH) 由多种氨基酸构成, 其中包括胱氨酸、谷氨酸和半胱氨酸。它还能与 GPX4 相互协同, 共同起到抵御氧自由基的作用。当 xCT 被某些分子, 如肿瘤抑制基因 (tumor suppressor gene, p53) 识别并调控表达, p53 抑制 xCT 表达并且限制胱氨酸的转入^[96], 使得 GSS 活性下降, GSH 蛋白合成缺乏底物而被耗竭, 导致 GPX4 因缺乏辅助因子而无法发挥其抗氧化活性, 最终导致铁死亡主要防御通路抗氧化能力丧失, 细胞发生铁死亡。相反的, 某些分子能够促进 System Xc-GSH-GPX4 通路发挥抗铁死亡活性。Nrf2 作为核因子的一个重要组成部分, 对于维持和改善氧化应激系统、调控铁代谢具有至关重要的作用^[97]。Nrf2 可以在正常的生物学环境中与类似的 ECH 相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, keap1) 形成稳态的组合, 随着溶酶体的进一步降解, Nrf2 也会随之降解, 然而, 一旦受到特殊的抗氧化物刺激, 它就会从 keap1 中分离出来, 进入抗氧化反应的细胞膜, 与其他细胞膜上的细胞进行交互作用, 最终引发下一个抗氧化物信号传导途径的发挥^[98]。

Nrf2 是一种重要的氧化应激蛋白，其转录靶点包含 xCT、GPX4、血红素加氧酶 1（Heme Oxygenase-1，HO-1）。由于活化这些酶，Nrf2 能够有效地控制氧化应激，进一步减少 ROS 的形成，并有效防止氧化应激导致的细胞凋亡。

本次实验结果显示，与正常组相比，NAFLD 大鼠模型组肝脏 GSH 含量降低，说明高脂饲料喂养的 NAFLD 大鼠发生了严重的 GSH 耗竭。此外，NAFLD 模型组的 xCT、GSS、GPX4、HO-1 mRNA 表达量显著降低，故可以推测 NAFLD 能够通过破坏铁死亡的主要防御系统导致肝细胞铁死亡加剧。对 NAFLD 给予灌胃木姜叶柯叶后，xCT、GSS、GPX4、HO-1 的 mRNA 表达量显著增加，xCT、GPX4 蛋白表达明显上升，木姜叶柯叶逆转了 NAFLD 对铁死亡主要防御系统靶点的下调作用，升高了他们的表达含量，增强了铁死亡主要防御系统的作用。此外，木姜叶柯叶同时也逆转了 NAFLD 对 NRF2 的调低作用，增强了 NRF2 的转录和蛋白表达，激活 NRF2 相关信号通路下游，改善了 NAFLD 的抗氧化能力。

5 小结

（1）采用高脂饲料喂食 SD 大鼠 24w 后，通过分析 HE 染色和血清生化试剂盒数据，成功诱导出 NAFLD 模型。木姜叶柯叶有隐约降低 SD 大鼠 NAFLD 模型体重的趋势和改善 NAFLD 肝脏病理情况的作用。此外，木姜叶柯叶还能调节血清血脂和胆固醇（TG、TCHO、HDL、LDL），改善肝功能指数（ALT、AST），降低炎症因子含量（TNF- α 、IL-1 β 、IL-6），说明木姜叶柯叶能够改善 SD 大鼠的 NAFLD。

（2）木姜叶柯叶能够正向调节氧化应激指标（MDA、GSH），通过减少肝脏亚铁蓄积和降低 ACSL4 mRNA 水平减轻肝组织铁依赖性脂质过氧化。木姜叶柯叶还能够上调铁死亡重要抗氧化轴的 NRF2、HO-1、xCT、GSS、GPX4 mRNA 水平，增加 NRF2、xCT、GPX4 蛋白表达，推测其可能通过影响铁死亡抗氧化系统来改善 NAFLD。

第二章 木姜叶柯叶含药血清改善 FFA 诱导的 HepG2 细胞脂肪变性 机制研究

引言

前面我们已经通过对 SD 大鼠投喂高脂饲料的方式获得 NAFLD 体外实验模型，并通过灌胃不同浓度梯度的木姜叶柯叶水提物，得出木姜叶柯叶能够改善 NAFLD 的血脂蓄积和肝脏的脂质堆积情况，初步判断出木姜叶柯叶能够通过增强肝脏介导的脂肪酸氧化分解能力和激活肝脏抗氧化通路，降低肝脏铁死亡水平。

下一步，我们继续采取对大鼠灌胃木姜叶柯叶水提物的方式获得木姜叶柯叶含药血清，并将其应用于人源细胞当中。HepG2 细胞作为模拟肝病体外模型培养的首选，有着不可替代的优势。对 HepG2 细胞进行 FFA 处理，模拟 NAFLD 的体外模型，并给予不同浓度的木姜叶柯叶含药血清，探究木姜叶柯叶含药血清对 NAFLD 体外模型的作用和机制。

1 实验材料

1.1 实验细胞及动物

HepG2 细胞由美仑生物技术公司提供并通过传代稳定细胞培养体系。货号
为 PWE-HU004。

SPF 级健康 SD 大鼠共有 30 只，每只的重量在 $200\pm 20\text{g}$ 之间，均由湖南斯莱克有限公司供应，并获得了 SCXK（湘）2019-0004 号许可证。正常进食进水，保证生存环境恒温 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

1.2 药物制备

木姜叶柯叶水煎液的制备方法同第一章“1.2”节。

1.3 实验试剂和仪器

表 2-1 主要试剂

Table 2-1 Main reagents

试剂	公司	批号
DMEM 培养基	MeilunBio	MA0212-2
胎牛血清（FBS）	MeilunBio	PWL001-1

PBS 缓冲液 (PH 7.3)	Solarbio	20211210
胰蛋白酶消化液 (含 EDTA)	Solarbio	20220826
油酸 (OA)	Macklin	C10375483
棕榈酸 (PA)	Solarbio	1125S022
Triton X-100	Solarbio	829I0211
RIPA buffer	Solarbio	20211118
PMSF (100mM)	Solarbio	B915PF
4%多聚甲醛溶液	雷根生物	0911A18
油红 O 粉末	Solarbio	331K054
商品化快速冻存液	Solarbio	710N0318
TG 测试盒	NJCBIO	20220531
T-CHO 测试盒	NJCBIO	20220606
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	Solarbio	PC0020
脂质过氧化 MDA 检测试剂盒	NJCBIO	A003-1-2
无菌无霉水	Solarbio	20211227
Cell Counting Kit-8	DOJINDO	TL616
青链霉素混合液 (100×)	Solarbio	20220912
β -actin antibody	ABClonal	AC026
GPX4 antibody	ZENBIO	R24461
NRF2 antibody	proteintech	16396-1-AP
xCT antibody	ZENBIO	R382036
Goat Anti-Rabbit HRP Conjugate	Abcom	12522
Goat Anti-Mouse IgG	Proteintech	SA00001-1
PrimeScript RT reagent kit	TaKaRa	AL61877A
TB Green Premix Ex Taq	TaKaRa	AL51421A
β -actin 等引物	上海生工生物有限公司	

表 2-2 实验仪器

Table 2-2 Experimental equipment

仪器	公司
0.22 μ m 微孔滤膜	SORFA
水浴锅	永光明 XMTD-7000

-80℃冰箱	MELING 美菱
超净工作台	苏州净化设备厂
倒置显微镜	德国 Leica 公司
细胞恒温培养箱	上海博讯
0.22μm 微孔滤膜	SORFA
电泳仪	BIO-RAD 公司
凝胶成像系统	BIO-RAD 公司
NanoDrop 型核酸浓度测定仪	Thermo 公司
Veriti 96- Well Thermal Cycler	Applied Biosystems
QuantStudio 5 荧光定量 PCR 仪	Thermo Fisher

2 实验方法

2.1 动物含药血清的提取和配置

SD 大鼠自购入后动物房中正常进食饮水 1 周后，将 30 只大鼠随机分为正常组，木姜叶柯叶和二甲双胍组，每组各 10 只。根据大鼠和人类药物给药换算剂量后，木姜叶柯叶组大鼠按照前面实验方法按 2.5g/kg 的生药量灌胃，二甲双胍组则将二甲双胍片碾碎蒸馏水溶解，最终浓度为 2.1mg/ml，连续灌胃一个星期，当晚撤粮不撤水，第二天取血前 1h 再次灌食相应的药液。取血步骤按第一章“2.2”节操作后，将处理后的血清于 56℃ 水浴下灭活 30 分钟，灭活后转移至无菌超净台内并经 0.22μm 微孔滤膜过滤，分装后-80℃保存，临用时 4℃解冻。含药血清中、低剂量组则参照表 2-3 方法用相应剂量的空白血清稀释而成。

2.2 溶液配制

(1) 完全培养基：按高糖 DMEM：FBI：双抗（100×）=89%：10%：1%的比例于无菌环境下混合，然后将其封口置于 4℃下进行储藏，以便使用。

(2) FFA 造模液（1mM）：使用万分之一天平精密称取混合油酸（OA）和棕榈酸（PA）0.3756g 和 0.1718g，而后将上述混合物与预热的异丙醇混匀并不断搅拌直至无肉眼可见的白色颗粒物为止，继续加入异丙醇定容至 10ml。随后于无菌环境下 0.22μm 微孔滤膜过滤除菌，得到 FFA 母液，并将其储藏于 4℃冰箱内待用。使用时，应用与细胞培养相同的高糖 DMEM 稀释至目标浓度。

(3) 油红 O 溶液: 采取合适的溶剂将适量油红 O 粉末进行溶解, 溶剂推荐用异丙醇, 最终得到 5mg/ml 的油红 O 储备液, 随后用双层滤纸过滤一遍以防止储备液析出不溶物。滤过的储备液注意低温避光保存。临用时用双蒸水稀释, 比例 2: 3, 并经 0.22 μ m 的微孔滤膜过滤。

(4) 1%曲拉通 X-100 裂解液: 使用无菌 PBS 溶液将 TritonX-100 按 99: 1 的比例稀释为 1% 曲拉通 X-100 裂解液, 并在临用前按同等比例加入 PMSF, 混匀, 用于细胞裂解。

2.3 细胞培养

2.3.1 细胞复苏

提前设置水浴锅至 37 $^{\circ}$ C 恒温, 将装有细胞的冻存管隔水水浴加热, 解冻过程不断快速摇晃直到观察到冻存管内仅剩微小冰块后迅速放入离心机以 1200rpm/s 速度离心 3min。用酒精表面消毒后将冻存管放置在超净台上, 移液器小心吸弃上清液, 加入 1ml 完培小心吹散沉淀, 反复重悬, 随后转移至适当的细胞培养容器中, 补足完培, 摇匀细胞使细胞在容器底部均匀分散开。5%CO₂、37 $^{\circ}$ C 恒温静置培养。

2.3.2 细胞传代

待细胞密度大于 80% 时, 即可将细胞传代。弃去培养瓶中的废液, 加入适量无菌 1 $\times$ PBS 浸泡洗涤细胞 2 次, 注意动作轻柔, 清洗充分。弃去 PBS。适量胰蛋白酶静置数秒到 1min, 吸弃胰酶, 迅速加入适量完培轻摇培养瓶终止消化。移液器吹打吸取细胞悬液, 吹打培养瓶底部数次, 吹打动作轻柔, 避免产生气泡。观察底部细胞吹落情况, 待大部分细胞都吹打下来后收集细胞悬液以 1200rpm 速度离心 3min, 吸弃上清并用 1ml 完培重悬, 以 1: 3~1: 4 的比例分瓶培养。

2.3.3 细胞计数

细胞按本章第“2.3.2”节操作, 消化离心重悬过后, 在分瓶培养前取少量细胞悬液作适量倍数稀释, 采用细胞计数板对细胞进行计数。观察计量计数池四个方格细胞总和, 按照计数板计数公式计算细胞密度。

2.3.4 细胞冻存

使用商品化快速冻存液, 细胞按本章第“2.3.2”节操作, 消化离心后, 应用快速冻存液重悬细胞后将细胞悬液转移至冻存管内, 注意拧紧管盖防止后续

污染或液氮进入管内。 -80℃ 短期保存，长期保存应转移至液氮中。

2.4 木姜叶柯叶含药血清对 HepG2 细胞的影响

2.4.1 造模与给药

在实验室前期工作中，发现 1mmol/L FFA 对 HepG2 细胞无明显损害作用，且能够成功的将 HepG2 细胞造成脂质堆积模型^[63]。因此，本次实验沿用实验室前期造模技术对 HepG2 细胞进行造模。为避免 HepG2 细胞复苏时活性存在不稳定性，故细胞自复苏后传代培养至少两代方可进行后续实验。细胞经计数后，不同实验采用不同孔板，根据孔板确定细胞铺板密度。细胞培养箱过夜贴壁后，吸弃孔板内废液，按表 2-3 往孔板内加入相应试剂。

表 2-3 细胞给药情况

Table 2-3 Grouping of cell administration

组别	含药血清	FFA
正常组（C）	20%空白血清	无
模型组（M）	20%空白血清	1mmol/L FFA
木姜叶柯叶高剂量组（TC-H）	20%木姜叶柯叶含药血清	1mmol/L FFA
木姜叶柯叶中剂量组（TC-M）	10%木姜叶柯叶含药血清+10%空白血清	1mmol/L FFA
木姜叶柯叶低剂量组（TC-L）	5%木姜叶柯叶含药血清+15%空白血清	1mmol/L FFA
二甲双胍组（Met）	10%二甲双胍含药血清+10%空白血清	1mmol/L FFA

2.4.2 木姜叶柯叶含药血清对 HepG2 细胞活力的影响检测

细胞计数后接种于 96 孔板中，过夜贴壁后，将细胞按表 2-3 分成 6 组，并外加一组对照组（有基础培养基但无细胞），每一组均有若干复孔。给药造模按照表 2-3 进行，24h 过后。吸弃孔板内废液，使用 1×PBS 动作轻柔的洗去残余培养基等物质，重复 2 次。随后加入完培和 CCK-8 试剂，孔板避光置于细胞培养箱内培养，具体时间以孔板颜色变化为准，若观察到孔板有明显的变色反应时，即可在 450nm 的波长下测定吸光度。

2.4.3 油红 O 染色检测木姜叶柯叶含药血清对 HepG2 细胞中脂质堆积的影响

根据本章“2.4.1”节对 HepG2 细胞造模给药处理 24h 后，吸弃废液，并用

1×PBS 动作缓慢的洗去残余培养基等物质。加入 4%多聚甲醛固定液固定 30min（具体时间以后续细胞固定情况作相应调整），吸弃固定液，加入适量 60%异丙醇覆盖细胞后弃去，加入油红 O 染色液，用量以刚好能覆盖细胞为准。染色 10min，去除油红 O 染色液，再次进行 60% 异丙醇的浸洗。随后用 1×PBS 洗涤完毕后，于显微镜下观察拍照。拍照记录结束后，即可对每一组的脂滴进行定量分析。往孔板中加入异丙醇提取细胞内的脂滴，室温下摇床上等待 15min，混匀并吸取适当溶液于 96 孔板中，在 490nm 的波长下测吸光度值。

2.4.4 木姜叶柯叶含药血清对 HepG2 细胞中甘油三酯含量的影响

根据本章“2.4.1”节对 HepG2 细胞造模给药处理 24h 后，吸弃废液，并用 1×PBS 动作轻柔的洗去残余培养基等物质。接着用提前配好的 1% 曲拉通 X-100 裂解细胞，收集细胞裂解液冰上裂解 30min，过程中可以不断摇晃样品以充分裂解细胞。使用 TG 测定试剂盒，按说明书操作方法进行后续的测量。

2.4.5 木姜叶柯叶含药血清对 HepG2 细胞中胆固醇含量的影响

处理方法同本章“2.4.3”节。具体操作步骤参考使用说明。

2.4.6 木姜叶柯叶含药血清对 HepG2 细胞中谷胱甘肽含量的影响

细胞裂解液制备方法同本章“2.4.3”节。取细胞裂解液 100μl 与 GSH 测定试剂盒中试剂一等量混合，混匀后 3500rpm 离心 10min，取上清液按说明书操作，于 405nm 处记录各孔吸光度值。另取少量细胞裂解液作适当稀释后，进行 BCA 蛋白浓度定量。代入 GSH 计算公式中，计算 GSH 浓度。

2.4.7 木姜叶柯叶含药血清对 HepG2 细胞中丙二醛含量的影响

细胞裂解液制备方法同本章“2.4.3”节。使用 MDA 检测试剂盒，按说明书中的微量操作法进行 HepG2 细胞 MDA 含量的检测。

2.4.8 木姜叶柯叶含药血清对 HepG2 细胞中 Fe²⁺含量的影响

根据本章“2.4.1”节对 HepG2 细胞造模给药处理 24h 后，吸弃废液，并用 1×PBS 动作轻柔的洗去残余培养基等物质。使用胰酶消化细胞并计数，按每 1×10⁶ 个细胞加入细胞亚铁测试盒中 200μl 的试剂一，混匀后置于冰上裂解 10min，再以 4000rpm 离心 10min。后续实验按照试剂盒方法进行测定。

2.4.9 WB 检测木姜叶柯叶含药血清对 HepG2 细胞内 Nrf2、xCT 和 Gpx4 蛋白表达水平的影响。

根据本章“2.4.1”节对 HepG2 细胞造模给药处理 24h 后，吸弃废液，

1×PBS 动作轻柔的洗涤两遍后，使用适量的 RIPA 裂解液（内含 1%PMSF 且现配现用）裂解孔板细胞，将细胞裂解液冰上裂解 30min，时常晃动细胞以充分裂解。后续操作同第一章“2.6”。

2.4.10 qRT-PCR 检测木姜叶柯叶含药血清对 HepG2 细胞内 NRF2、HO-1、xCT、GSS、GPX4 和 ACSL4 基因 mRNA 表达水平的影响

根据本章“2.4.1”节对 HepG2 细胞造模给药处理 24h 后，吸弃废液，1×PBS 动作轻柔的洗涤两遍后，在每个孔中添加 600μl Trizol 裂解液，收集裂解液于无酶离心管内，后续操作同第一章“2.7”节。

表 2-4 基因引物序列

Table 2-4 Gene primer sequence

引物名称		序列
NRF2	FORWARD	CCTCTGCTGCCATTAGTCAGT
	REVERSE	CTTCAGTGTGCTTCTGGTTGA
xCT	FORWARD	GCATGCCACCACTTAGGAAG
	REVERSE	TCAGGGAGCTGAACGACATT
GPX4	FORWARD	TCTGTGTAAATGGGGACGATGCC
	REVERSE	GTCCTTCTCTATCACCTGGGGCT
HO-1	FORWARD	GAGCGAAACAAGCAGAACCC
	REVERSE	ACCTCGTGGAGACGCTTTAC
GSS	FORWARD	GGGAGGGAGCTTGTCTCTTT
	REVERSE	AGGAGCTTCCATTCCCCTC
ACSL4	FORWARD	AGACAAACCCGGAAGTCCAT
	REVERSE	AGGCTGTCCTTCTTCCCAA
β-actin	FORWARD	TGGGCATGGGTCAGAAGGAT
	REVERSE	CGTCCCAGTTGGTGACGATG

2.5 统计学分析

实验数据运用 GraphPad Prism 8.0 软件对实验结果进行分析并作图。组与组间比较采用 t 检验法。 $^{\#}P<0.05$ ， $^{\#\#}P<0.01$ 表示与正常组相比，模型组差异有统计学意义； $^{**}P<0.01$ ， $^{*}P<0.05$ 表示与模型组相比，给药组差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 木姜叶柯叶含药血清对 HepG2 细胞的毒性检测

结果如图 2-1 所示，与正常组细胞活力比较，木姜叶柯叶高、中、低三个剂量组均无细胞毒性作用甚至能够提高细胞活力，二甲双胍细胞活力相较于正常组有下降趋势，但差异无统计学意义。由此可见，木姜叶柯叶高、中、低浓度含药血清与二甲双胍含药血清对 HepG2 细胞的活力均无负向调控影响，木姜叶柯叶含药血清甚至能够升高 HepG2 细胞的代谢活力。

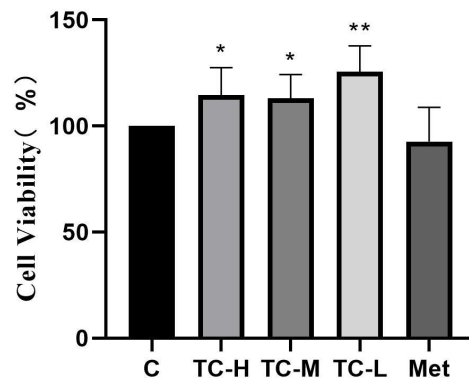


图 2-1 各组 HepG2 细胞的细胞活力 ($\bar{X} \pm S$, $n=6$)

Figure 2-1 HepG2 cell viability in each group ($\bar{X} \pm S$, $n=6$)

注：正常对照组简称“C”；模型组简称“M”；木姜叶柯叶（甜茶）高剂量组简称“TC-H”；木姜叶柯叶（甜茶）中剂量组简称“TC-M”；木姜叶柯叶（甜茶）低剂量组简称“TC-L”；“Met”为二甲双胍阳性药组。与正常对照组比，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

3.2 木姜叶柯叶含药血清对 HepG2 细胞内脂质的沉积影响

油红 O 染色结果发现，与正常组相比，模型组细胞出现大面积的红色脂滴堆积现象。而木姜叶柯叶各给药组和二甲双胍组相较于模型组，其视野范围内的红色脂滴沉积现象得到明显的改善。通过对各组细胞 FFA 定量分析发现，模型组相较于正常组细胞内 FFA 显著升高 ($P<0.01$)，木姜叶柯叶各给药组和二甲双胍组相较于模型组，FFA 含量显著下调 ($P<0.01$)。以上结果表明，利用 1mmol/L FFA 成功造出 HepG2 细胞脂质堆积模型，而木姜叶柯叶组和二甲双胍组能够显著降低 HepG2 细胞脂质堆积模型的 FFA，改善 HepG2 细胞的脂质堆积情况。

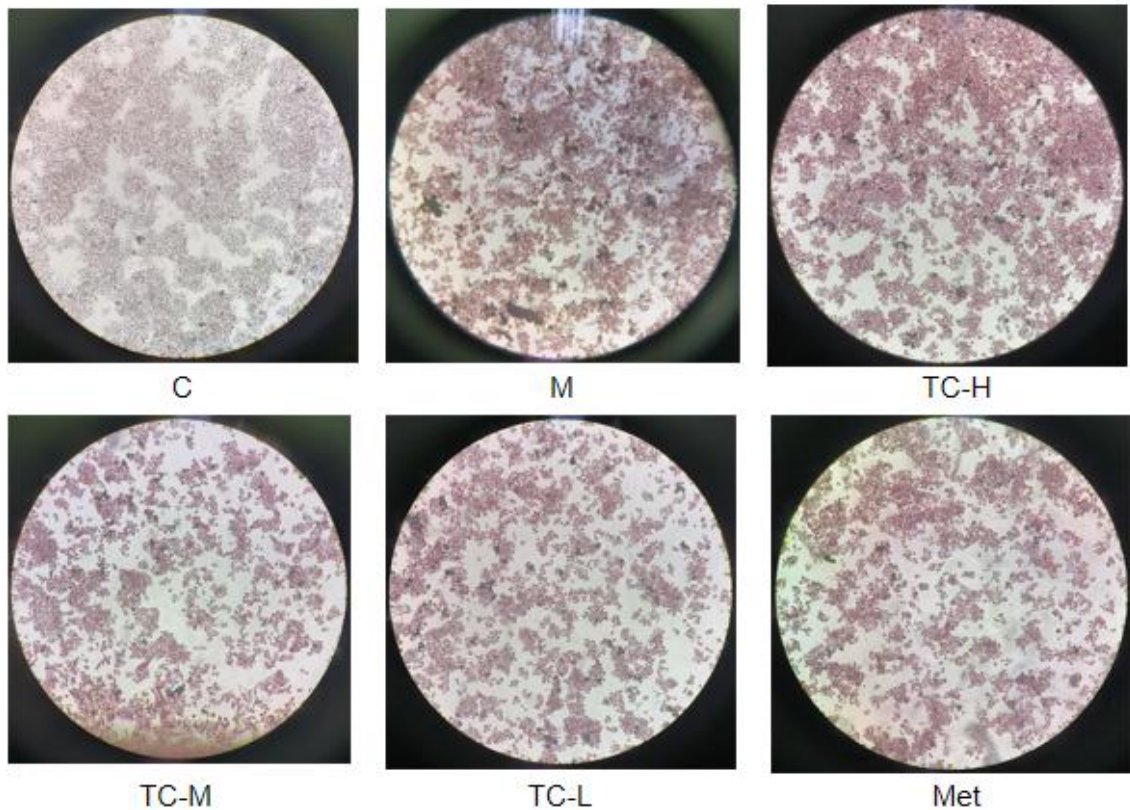


图 2-2 各组 HepG2 细胞油红 O 染色(×100)

Figure 2-2 HepG2 cell oil Red O staining in each group (×100)

注：正常对照组简称“C”；模型组简称“M”；木姜叶柯叶（甜茶）高剂量组简称“TC-H”；木姜叶柯叶（甜茶）中剂量组简称“TC-M”；木姜叶柯叶（甜茶）低剂量组简称“TC-L”；“Met”为二甲双胍阳性药组。

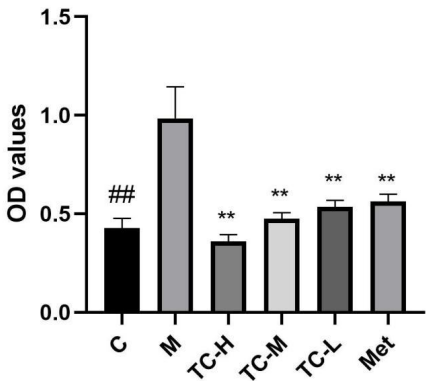


图 2-3 HepG2 细胞油红 O 定量比较($\bar{X} \pm S$, n=8)

Figure 2-3 Comparison of oil red O quantification in HepG2 cells ($\bar{X} \pm S$, n=8)

注：正常对照组简称“C”；模型组简称“M”；木姜叶柯叶（甜茶）高剂量组简称“TC-H”；木姜叶柯叶（甜茶）中剂量组简称“TC-M”；木姜叶柯叶（甜茶）低剂量组简称“TC-L”；“Met”为二甲双胍阳性药组。与正常对照组比， $^{\#}P<0.05$ ， $^{##}P<0.01$ ；与模型组比， $^{*}P<0.05$ ， $^{**}P<0.01$ 。

3.3 木姜叶柯叶含药血清对 HepG2 细胞内 TG、T-CHO 含量的影响

如图 2-4，相对于正常组，模型组 TG 和 T-CHO 含量出现明显的提升（ $P<0.01$ ），而给予木姜叶柯叶以及二甲双胍含药血清的干预后，木姜叶柯叶各给药组和二甲双胍组均显著的降低了模型组的 TG 和 T-CHO 含量（ $P<0.01$ ）。实验表明，木姜叶柯叶含药血清可以显著降低 HepG2 细胞脂堆模型的 TG 和 T-CHO 的水平，正向调节 HepG2 细胞的脂质代谢情况。

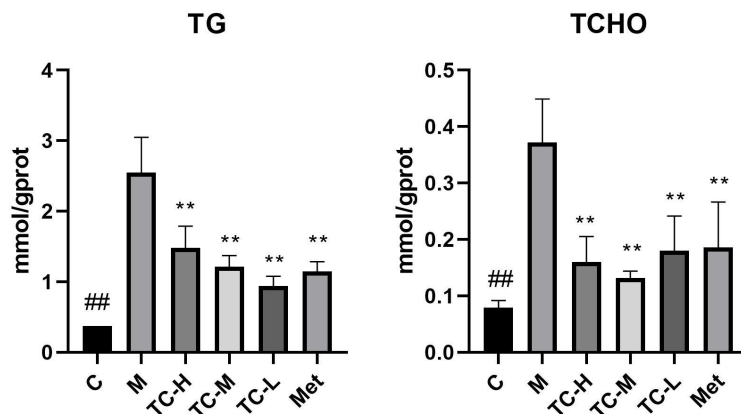


图 2-4 各组 HepG2 细胞内 TG、T-CHO 含量水平变化（ $\bar{X} \pm S$, $n=8$ ）

Figure 2-4 Changes of TG and T-CHO content in HepG2 cells in each group($\bar{X} \pm S$, $n=8$)

注：正常对照组简称“C”；模型组简称“M”；木姜叶柯叶（甜茶）高剂量组简称“TC-H”；木姜叶柯叶（甜茶）中剂量组简称“TC-M”；木姜叶柯叶（甜茶）低剂量组简称“TC-L”；“Met”为二甲双胍阳性药组。与正常对照组比， $^{\#}P<0.05$ ， $^{##}P<0.01$ ；与模型组比， $^{*}P<0.05$ ， $^{**}P<0.01$ 。

3.4 木姜叶柯叶含药血清对 HepG2 细胞内 GSH 含量变化的影响

根据图 2-5 可得，与正常组相比，模型组 GSH 含量显著降低（ $P<0.01$ ）。而与模型组相比，木姜叶柯叶高、中剂量和二甲双胍组均能够显著升高 HepG2 细胞 GSH 的含量（ $P<0.01$ ），木姜叶柯叶低剂量组有升高细胞 GSH 的趋势。结果表明，木姜叶柯叶含药血清能够显著提升 HepG2 细胞脂质堆积模型的抗氧化能力。

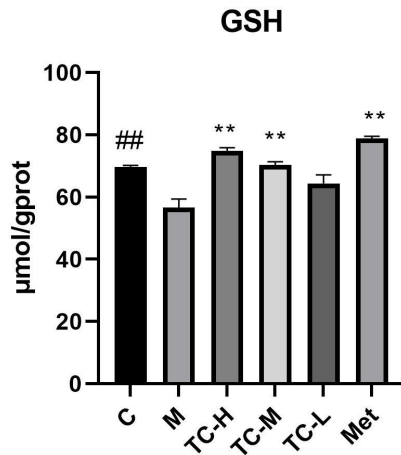


图 2-5 各组 HepG2 细胞内 GSH 含量水平变化 ($\bar{X} \pm S$, $n=3$)

Figures 2-5 Changes of GSH content in HepG2 cells in each group($\bar{X} \pm S$, $n=3$)

注：正常对照组简称“C”；模型组简称“M”；木姜叶柯叶（甜茶）高剂量组简称“TC-H”；木姜叶柯叶（甜茶）中剂量组简称“TC-M”；木姜叶柯叶（甜茶）低剂量组简称“TC-L”；“Met”为二甲双胍阳性药组。与正常对照组比， $^{\#}P<0.05$ ， $^{##}P<0.01$ ；与模型组比， $^{*}P<0.05$ ， $^{**}P<0.01$ 。

3.5 木姜叶柯叶含药血清对 HepG2 细胞内 MDA 含量变化的影响

结果如图 2-6，与正常组比较，模型组 HepG2 细胞经造模后 MDA 含量显著得到上升 ($P<0.01$)。与模型组比较，经过木姜叶柯叶各剂量含药血清给药后细胞内 MDA 含量得到显著下调 ($P<0.01$)。结果表明，木姜叶柯叶含药血清能够降低 HepG2 细胞脂质堆积模型的被氧化损伤作用。

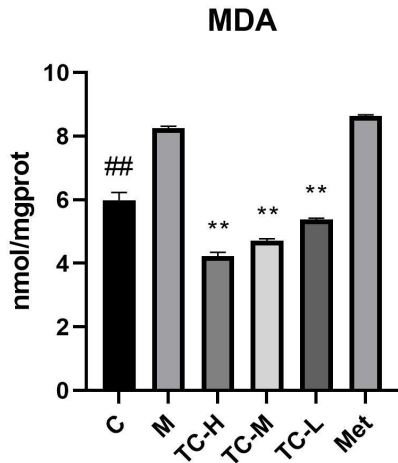


图 2-6 各组 HepG2 细胞内 MDA 含量水平变化 ($\bar{X} \pm S$, $n=3$)

Figures 2-6 Changes of MDA content in HepG2 cells in each group($\bar{X} \pm S$, $n=3$)

注：正常对照组简称“C”；模型组简称“M”；木姜叶柯叶（甜茶）高剂量组简称“TC-H”；木姜叶柯叶（甜茶）中剂量组简称“TC-M”；木姜叶柯叶（甜茶）低剂量组简称“TC-L”；“Met”为二甲双胍阳性药组。与正常对照组比， $^{\#}P<0.05$ ， $^{##}P<0.01$ ；与模型组比， $^{*}P<0.05$ ， $^{**}P<0.01$ 。

3.6 木姜叶柯叶含药血清对 HepG2 细胞内亚铁含量变化的影响

根据图 2-7 的结果显示，与正常组相比，模型组的 Fe^{2+} 含量显著的增加（ $P<0.01$ ）。而在木姜叶柯叶和二甲双胍含药血清的干预下，与模型组相比，木姜叶柯叶各剂量组以及二甲双胍组中， Fe^{2+} 的含量有显著的下降（ $P<0.01$ ）。这表明，木姜叶柯叶含药血清能够显著降低 HepG2 细胞脂质堆积模型中的 Fe^{2+} 沉积。

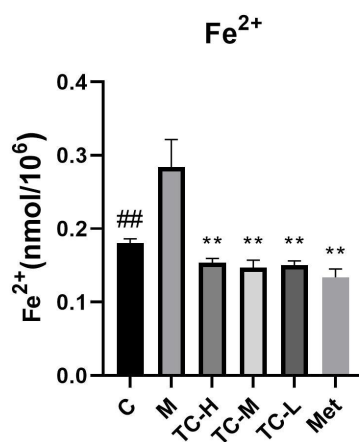


图 2-7 各组 HepG2 细胞内亚铁含量水平变化（ $\bar{X} \pm S$, $n=3$ ）

Figures 2-7 Changes of Fe^{2+} content in HepG2 cells in each group($\bar{X} \pm S$, $n=3$)

注：正常对照组简称“C”；模型组简称“M”；木姜叶柯叶（甜茶）高剂量组简称“TC-H”；木姜叶柯叶（甜茶）中剂量组简称“TC-M”；木姜叶柯叶（甜茶）低剂量组简称“TC-L”；“Met”为二甲双胍阳性药组。与正常对照组比， $^{\#}P<0.05$ ， $^{##}P<0.01$ ；与模型组比， $^{*}P<0.05$ ， $^{**}P<0.01$ 。

3.7 WB 检测木姜叶柯叶含药血清影响 HepG2 细胞内 NRF2、xCT、GPX4 蛋白表达水平变化

结果如图 2-8 所示，与正常组相比，模型组 HepG2 细胞内 NRF2、xCT 和 GPX4 蛋白表达含量均显著减少（ $P<0.05$ ）。给予木姜叶柯叶和二甲双胍含药血清干预后，与模型组相比，木姜叶柯叶高剂量组能够显著上调 NRF2、xCT 和 GPX4 蛋白表达含量（ $P<0.05$ ），木姜叶柯叶中剂量组能够显著升高 NRF2 蛋白表达水平（ $P<0.01$ ），木姜叶柯叶低剂量组能够显著升高 xCT 和 GPX4 蛋

白表达水平 ($P<0.05$)。由此表明, 木姜叶柯叶含药血清具有正向调控 HepG2 细胞脂质堆积模型内 NRF2 和 xCT、GPX4 蛋白表达的作用。

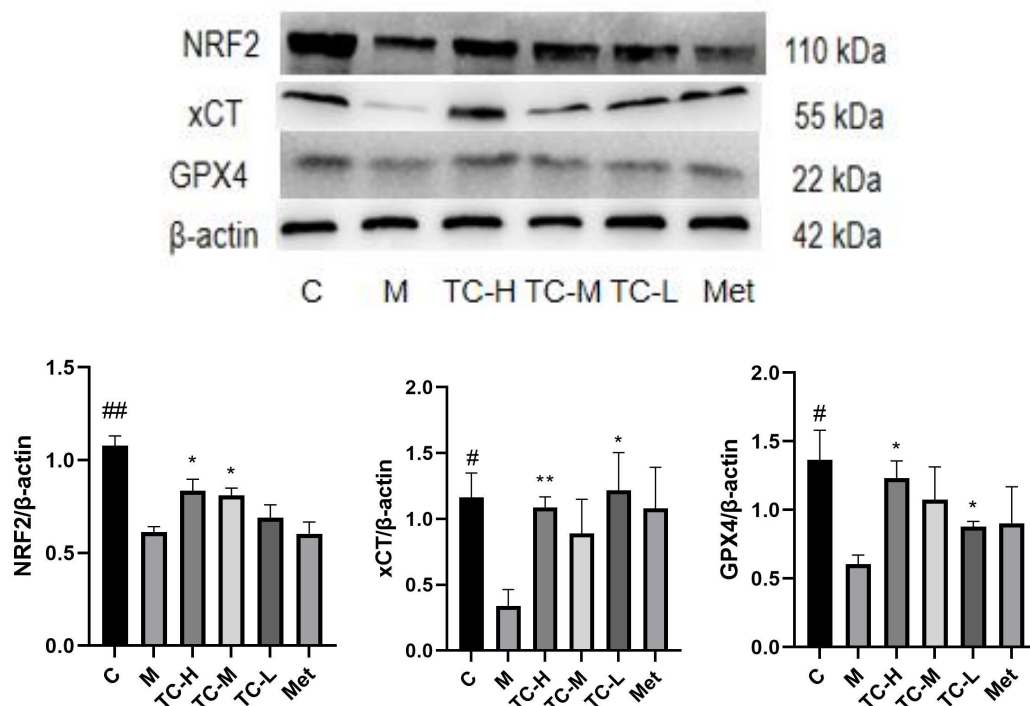


图 2-8 各组 HepG2 细胞内 NRF2、xCT、GPX4 蛋白表达水平 ($\bar{X} \pm S$, $n=3$)

Figure 2-8 The protein expression levels of NRF2, xCT and GPX4 in HepG2 cells in each group($\bar{X} \pm S$, $n=3$)

注: 正常对照组简称“C”; 模型组简称“M”; 木姜叶柯叶(甜茶)高剂量组简称“TC-H”; 木姜叶柯叶(甜茶)中剂量组简称“TC-M”; 木姜叶柯叶(甜茶)低剂量组简称“TC-L”; “Met”为二甲双胍阳性药组。与正常对照组比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$; 与模型组比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

3.8 qRT-PCR 检测木姜叶柯叶含药血清影响 HepG2 细胞内 NRF2、HO-1、xCT、GSS、GPX4 和 ACSL4 基因的 mRNA 相对表达量测定

结果见图 2-9, 与正常组比较, 模型组 HepG2 细胞中 NRF2、HO-1、xCT、GSS 和 GPX4 mRNA 表达得到显著抑制 ($P<0.05$), ACSL4 mRNA 表达得到显著上调 ($P<0.01$)。与模型组相比, 木姜叶柯叶高、低剂量组和二甲双胍阳性药组 NRF2、HO-1、xCT、GSS 和 GPX4 mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.05$), ACSL4 mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.05$); 木姜叶柯叶中剂量组 NRF2、HO-1、xCT 和 GSS mRNA 表达水平显著上调 ($P<0.05$), GPX4 的 mRNA 表达水平有升高的趋势但 $P>0.05$, ACSL4 mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.05$)。

5)。以上结果表明,木姜叶柯叶含药血清有逆转 HepG2 细胞脂质堆积模型内 NRF2、HO-1、xCT、GSS、GPX4 和 ACSL4 基因 mRNA 异常表达的作用。

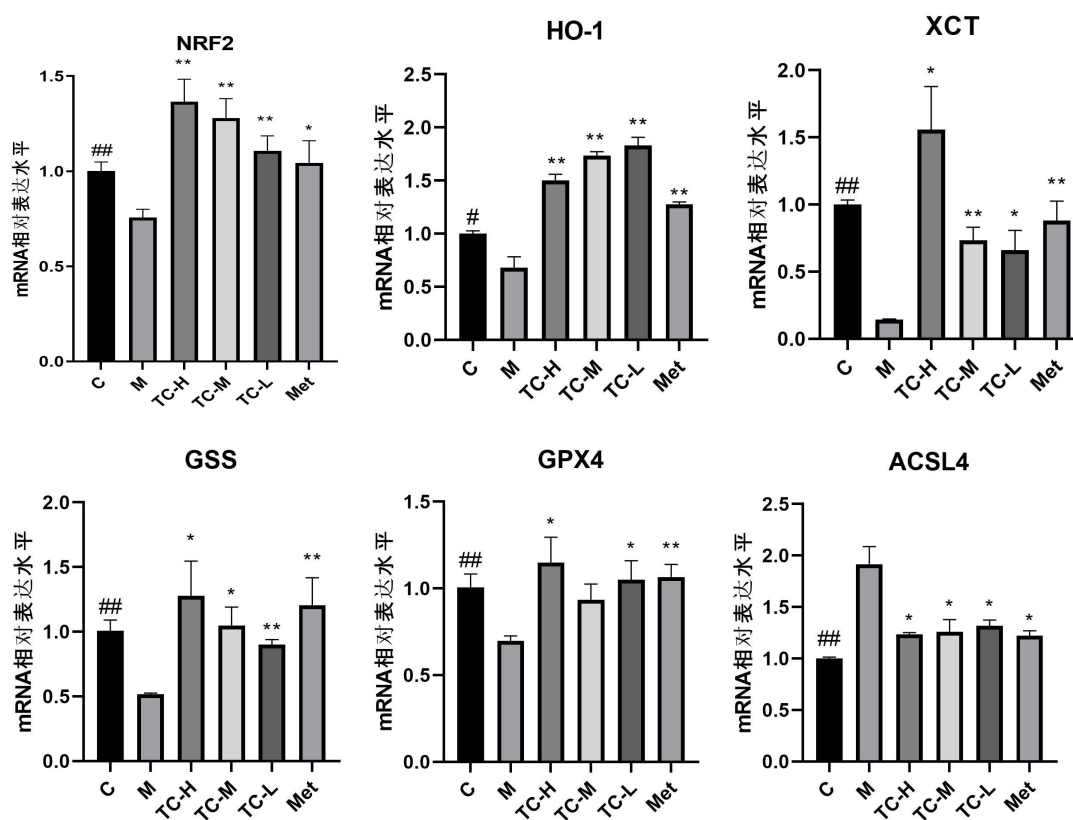


图 2-9 各组 HepG2 细胞内 NRF2、HO-1、xCT、GSS、GPX4 和 ACSL4 表达水平 ($\bar{X} \pm S$, $n=3$)

Figure 2-9 NRF2、HO-1、xCT、GSS、GPX4 and ACSL4 mRNA expression levels in HepG2 cells of each group ($\bar{X} \pm S$, $n=3$)

注: 正常对照组简称“C”; 模型组简称“M”; 木姜叶柯叶(甜茶)高剂量组简称“TC-H”; 木姜叶柯叶(甜茶)中剂量组简称“TC-M”; 木姜叶柯叶(甜茶)低剂量组简称“TC-L”; “Met”为二甲双胍阳性药组。与正常对照组比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$; 与模型组比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

4 讨论

在上一节讨论中,通过观察 NAFLD 模型 SD 大鼠的血脂水平和肝功能以及肝脏脂质沉积情况,发现这些变化与细胞铁死亡以及肝脏氧化损伤有关。因此,采取有效的措施来阻止高脂肪饮食导致的细胞铁损伤,可能是预防和控制 NAFLD 的关键。

NAFLD 作为一种慢性肝病，其特征是肝细胞三酰基甘油蓄积（脂肪变性），即 FFA 的沉积。其中 PA 和 OA 是最常见的长链脂肪酸，高浓度的饱和脂肪酸会引起肝脏中大量脂肪堆积，导致脂肪酸代谢不完全，从而产生脂毒性代谢物，增强肝脏的氧化应激反应^[99]。根据人体脂肪酸的成分含量，用棕榈酸（PA）：油酸（OA）=1：2 的配比对 HepG2 细胞进行造模处理^[100]。前期实验室实验得出，该浓度的造模药情况下，能够清楚的在显微镜中肉眼观察到 HepG2 细胞较一般正常 HepG2 胞质肿胀、细胞质中空样，细胞核不清晰，最明显的特征就是，细胞充斥了大量的脂滴，呈小颗粒样堆叠。使用 CCK8 试剂盒测试细胞造模后的活性，能发现 1mmol/L 的 FFA 溶液对细胞活性影响在可接受的范围里。HepG2 细胞具有培养方法简便、能够不断生长分裂，对血清等营养物质的需求不高，生长较为稳定，不太容易分化的优点，常被用来充当肝疾病体外模型的构建^[101]。因此，本研究采用 HepG2 细胞作为载体，利用 1mmol/L 的 FFA 作诱导剂模拟 NAFLD 的体外脂质沉积模型。通过含药血清的方式给细胞药物治疗，减少了化合物单体对细胞的直接毒副作用。

经 CCK8 实验证实，木姜叶柯叶含药血清对 HepG2 细胞无毒性影响甚至还能够提高 HepG2 细胞的代谢活力。此外，TCHO 实验也发现，与给予普通大鼠血清的正常组相比，模型组 HepG2 细胞经过 FFA 诱导后胞内会产生更多的红色脂滴，并且其中 TG、TCHO 含量也会急剧上升。HepG2 细胞可以通过摄入 FFA 来释放出丰富的脂质，这一过程与肝脏对脂质的摄取与代谢相似。这说明 NAFLD 的体外脂质沉积模型成功建立。而在给予木姜叶柯叶含药血清干预后，细胞内红色脂滴明显减少，定量分析发现木姜叶柯叶和二甲双胍组脂质含量远低于模型组。TG、TCHO 含量也相应的有比较明显的降低，说明木姜叶柯叶可能具有减少 NAFLD 肝细胞脂质摄取，并改善 NAFLD 肝细胞脂质堆积。

细胞经过造模处理后给予木姜叶柯叶和二甲双胍含药血清，经检测其亚铁水平发现，造模组亚铁与正常组相比明显增多。研究显示，细胞内游离铁是导致细胞死亡的重要原因^[102]。通常情况下，细胞内的铁以铁蛋白形式储存在细胞中，但当亚铁含量过多时，从铁蛋白释放出来，成为游离铁的形式。其中，亚铁可直接催化 H_2O_2 通过 Fenton 反应分解成羟基自由基，这些自由基成为促进细胞内 ROS 聚集和发生脂质过氧化的底物^[103]。因此，降低细胞亚铁含量对细胞发生脂质过氧化有着正向作用。木姜叶柯叶含药血清干预后亚铁含量明显减

少, 这表明木姜叶柯叶能够降低 NAFLD 肝细胞亚铁含量。

前面的工作发现, NAFLD 肝脏与铁死亡有着密切的关系。铁死亡是铁驱动的一系列氧化应激级联反应。其生化特征是胱氨酸缺乏、GSH 耗竭和 GPX4 失活^[26]。通过对 GSH、MDA 的检测发现, NAFLD 模型组 HepG2 细胞 GSH 含量明显下降, MDA 含量显著上调, 这说明 NAFLD 模型组 HepG2 细胞发生铁死亡现象。MDA 是氧化应激反应的产物, 对细胞具有脂毒性。NAFLD 模型组 HepG2 细胞 MDA 含量显著升高, 说明细胞发生了严重的氧化应激反应。系统性 Xc-/GSH/GPX4 轴在介导铁死亡氧化应激方面起着很重要的作用。Xc-, 也称为 xCT, 在 GSS 酶的促进下, 会与细胞内的半胱氨酸结合形成 GSH, 这种物质可以与 GPX4 一起发挥抗氧化作用, 将脂质过氧化物转化为无毒脂醇, 有效地保护细胞膜和细胞器膜免受脂质过氧化物的损伤^[97]。因此, 在细胞受到严重的损害时, xCT 摄入胱氨酸受阻, GSH 合成减少并不断的被消耗分解, GPX4 缺乏 GSH 而活性下降, 最终导致细胞诱发铁死亡。通过蛋白水平和转录水平检测发现, HepG2 细胞经 FFA 诱导后 NRF2、HO-1、xCT、GSS 和 GPX4 基因 mRNA 表达量明显下调, NRF2、xCT 和 GPX4 蛋白表达减少, ACSL4 mRNA 表达量明显上调, 而木姜叶柯叶含药血清干预后, 能够明显逆转模型组对这些靶点的表达水平, 这与动物体内实验结果一致。这说明木姜叶柯叶含药血清可能能够通过激活 Xc-/GSH/GPX4 轴和 NRF2 的表达来调控 HepG2 细胞减少脂质过氧化和铁死亡, 进而改善 NAFLD。

5 小结

(1) CCK8 实验检测各浓度木姜叶柯叶含药血清对 HepG2 细胞活性没有抑制作用, 相反, 还能够促进代谢活力。

(2) HepG2 细胞经过 FFA 诱导后脂滴明显, TG 和 TCHO 含量显著上调, 经过木姜叶柯叶含药血清干预后, 脂滴现象减少, 脂质水平显著下降。

(3) FFA 诱导后 HepG2 细胞的氧化应激指标和亚铁沉积能够被木姜叶柯叶含药血清逆转。

(4) 木姜叶柯叶含药血清可显著上调 FFA 诱导的 HepG2 细胞的 NRF2、HO-1、xCT、GSS 和 GPX4 基因 mRNA 的转录表达, 上调 NRF2、xCT 和 GPX4 蛋白表达, 下调 ACSL4 mRNA 基因表达, 通过改善铁死亡抗氧化系统进而改善 NAFLD。

总 结

1.通过采用高脂饮食诱导 SD 大鼠 24w，能够成功地构建出一个 NAFLD 体内模型，木姜叶柯叶可以显著降低大鼠的体重，改善肝脏脂肪变性和空泡，减少炎症浸润，并且还能够调节血脂胆固醇的异常水平。通过改善铁沉积现象，减轻肝脏的脂质过氧化水平。并通过介导铁死亡预防体系来抵抗铁死亡，进而改善 NAFLD。

2.1mM FFA 成功诱导 HepG2 细胞建立高脂模型，模拟 NAFLD 体外模型。测定木姜叶柯叶含药血清可减少 HepG2 细胞脂质摄取和脂质堆积，降低胞内 FFA 诱导所致的 TG 和 TCHO 升高现象，减少 FFA 诱导产生的亚铁沉积，显著提升铁死亡抗氧化系统中被 FFA 诱导的 HepG2 细胞 NRF2、HO-1、xCT、GSS 和 GPX4 基因 mRNA 的转录表达，上调 NRF2、xCT 和 GPX4 蛋白表达，下调 ACSL4 mRNA 基因表达，通过改善铁死亡抗氧化系统进而改善 NAFLD。

3.综上所述，NAFLD 的体内、体外实验共同证明，木姜叶柯叶能够通过调控 NRF2/xCT/GPX4 相关通路改善肝细胞铁沉积和铁依赖性脂质过氧化，从而改善 NAFLD。

本研究创新性:

本次研究从铁死亡出发,首次基于 NRF2/xCT/GPX4 相关通路探讨木姜叶柯叶改善 NAFLD 铁死亡作用,从动物整体的药效分析,再到体外细胞模型的平行实验,双重验证木姜叶柯叶对 NAFLD 的改善作用和调控机制。

不足及尚待深入探讨之处:

本研究仅仅算为基础研究,并没有深入探讨木姜叶柯叶在铁死亡脂质氧化应激相关通路对疾病的改善机制,本课题后期将会进一步在肝脏脂质代谢等方面探究木姜叶柯叶对 NAFLD 的改善作用和调控机制。

参考文献

- [1] Fotbolcu H, Zorlu E. Nonalcoholic fatty liver disease as a multi-systemic disease[J]. World J Gastroenterol. 2016;22(16):4079-4090.
- [2] Uchil D, Pipalia D, Chawla M, et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)--the hepatic component of metabolic syndrome[J]. J Assoc Physicians India. 2009;57:201-204.
- [3] Tanase DM, Gosav EM, Costea CF, et al. The Intricate Relationship between Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM), Insulin Resistance (IR), and Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) [J]. J Diabetes Res. 2020;2020:3920196.
- [4] Anstee QM, Reeves HL, Kotsiliti E, et al. From NASH to HCC: current concepts and future challenges[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2019;16(7):411-428.
- [5] Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies[J]. Nat Med. 2018;24(7):908-922.
- [6] Meroni M, Longo M, Dongiovanni P. The Role of Probiotics in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A New Insight into Therapeutic Strategies[J]. Nutrients. 2019;11(11):2642.
- [7] Sayiner M, Koenig A, Henry L, et al. Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis in the United States and the Rest of the World[J]. Clin Liver Dis. 2016;20(2):205-214.
- [8] Lazaridis N, Tsochatzis E. Current and future treatment options in non-alcoholic steatohepatitis (NASH)[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol. 2017;11(4):357-369.
- [9] Riazi K, Azhari H, Charette JH, et al. The prevalence and incidence of NAFLD worldwide: a systematic review and meta-analysis[J]. Lancet Gastroenterol Hepatol. 2022;7(9):851-861.
- [10] Zhou J, Zhou F, Wang W, et al. Epidemiological Features of NAFLD From 1999 to 2018 in China[J]. Hepatology. 2020;71(5):1851-1864.
- [11] Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes[J]. Hepatology. 2016;64(1):73-84.
- [12] Sayiner M, Koenig A, Henry L, et al. Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis in the United States and the Rest of the World[J]. Clin Liver Dis. 2016;20(2):205-214.
- [13] Whalley S, Puvanachandra P, Desai A, et al. Hepatology outpatient service provision in secondary care: a study of liver disease incidence and resource costs[J]. Clin Med (Lond). 2007;7(2):119-124.
- [14] Byrne CD, Targher G. NAFLD: a multisystem disease[J]. J Hepatol. 2015;62(1 Suppl):S47-S64.
- [15] Lebeaupin C, Vallée D, Hazari Y, et al. Endoplasmic reticulum stress signalling and the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease[J]. J Hepatol. 2018; 69: 927-947.

- [16] Feldstein AE, Bailey SM. Emerging role of redox dysregulation in alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(2):421-424.
- [17] Huang TD, Behary J, Zekry A. Non-alcoholic fatty liver disease: a review of epidemiology, risk factors, diagnosis and management[J]. *Intern Med J*. 2020;50(9):1038-1047.
- [18] Zhang CH, Zhou BG, Sheng JQ, et al. Molecular mechanisms of hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease and potential treatment strategies[J]. *Pharmacol Res*. 2020;159:104984.
- [19] Firneisz G. Non-alcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes mellitus: the liver disease of our age?[J]. *World J Gastroenterol*. 2014;20(27):9072-9089.
- [20] Tanase DM, Gosav EM, Costea CF, et al. The Intricate Relationship between Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM), Insulin Resistance (IR), and Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) [J]. *J Diabetes Res*. 2020;2020:3920196.
- [21] Lallukka S, Yki-Järvinen H. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of type 2 diabetes[J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2016;30(3):385-395.
- [22] Roy JR, Janaki CS, Jayaraman S, et al. Hypoglycemic Potential of Carica papaya in Liver Is Mediated through IRS-2/PI3K/SREBP-1c/GLUT2 Signaling in High-Fat-Diet-Induced Type-2 Diabetic Male Rats[J]. *Toxics*. 2023;11(3):240.
- [23] Liu B, Deng X, Jiang Q, et al. Scoparone improves hepatic inflammation and autophagy in mice with nonalcoholic steatohepatitis by regulating the ROS/P38/Nrf2 axis and PI3K/AKT/mTOR pathway in macrophages[J]. *Biomed Pharmacother*. 2020;125:109895.
- [24] Li J, Wang T, Liu P, et al. Hesperetin ameliorates hepatic oxidative stress and inflammation via the PI3K/AKT-Nrf2-ARE pathway in oleic acid-induced HepG2 cells and a rat model of high-fat diet-induced NAFLD[J]. *Food Funct*. 2021;12(9):3898-3918.
- [25] Farzanegi P, Dana A, Ebrahimipoor Z, et al. Mechanisms of beneficial effects of exercise training on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): Roles of oxidative stress and inflammation[J]. *Eur J Sport Sci*. 2019;19(7):994-1003.
- [26] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. *Cell*. 2012;149(5):1060-1072.
- [27] He Z, Liao W, Song Q, et al. Role of ferroptosis induced by a high concentration of calcium oxalate in the formation and development of urolithiasis[J]. *Int J Mol Med*. 2021;47(1):289-301.
- [28] Targher G, Tilg H, Byrne CD. Non-alcoholic fatty liver disease: a multisystem disease requiring a multidisciplinary and holistic approach[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2021;6(7):578-588.
- [29] Chen J, Li X, Ge C, et al. The multifaceted role of ferroptosis in liver disease[J]. *Cell Death Differ*. 2022 Mar;29(3):467-480.
- [30] Qi J, Kim JW, Zhou Z, et al. Ferroptosis Affects the Progression of Nonalcoholic Steatohepatitis via the Modulation of Lipid Peroxidation-Mediated Cell Death in Mice[J]. *Am J Pathol*. 2022 Mar;130(3):467-480.

020;190(1):68-81.

- [31] Beaton MD, Chakrabarti S, Levstik M, et al. Phase II clinical trial of phlebotomy for non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Aliment Pharmacol Ther.* 2013;37(7):720-729.
- [32] Cempaka AR, Tseng SH, Yuan KC, et al. Dysregulated Iron Metabolism-Associated Dietary Pattern Predicts an Altered Body Composition and Metabolic Syndrome[J]. *Nutrients.* 2019;11(11):2733.
- [33] Ji J, Wu L, Wei J, Wu J, Guo C. The Gut Microbiome and Ferroptosis in MAFLD[J]. *J Clin Transl Hepatol.* 2023;11(1):174-187.
- [34] Liu S, Gao Z, He W, et al. The gut microbiota metabolite glycochenodeoxycholate activates TFR-ACSL4-mediated ferroptosis to promote the development of environmental toxin-linked MAFLD[J]. *Free Radic Biol Med.* 2022;193(Pt 1):213-226.
- [35] Yan HF, Zou T, Tuo QZ, et al. Ferroptosis: mechanisms and links with diseases[J]. *Signal transduction and targeted therapy.* 2021;6(1):49.
- [36] He Z, Liao W, Song Q, et al. Role of ferroptosis induced by a high concentration of calcium oxalate in the formation and development of urolithiasis[J]. *Int J Mol Med.* 2021;47(1):289-301.
- [37] Folgueras AR, Freitas-Rodríguez S, Ramsay AJ, et al. Matriptase-2 deficiency protects from obesity by modulating iron homeostasis[J]. *Nat Commun.* 2018;9(1):1350.
- [38] Zhang H, Zhang E, Hu H. Role of Ferroptosis in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Its Implications for Therapeutic Strategies[J]. *Biomedicines.* 2021, 9(11):1660.
- [39] Kim KM, Cho SS, Ki SH. Emerging roles of ferroptosis in liver pathophysiology[J]. *Arch Pharm Res.* 2020;43(10):985-996.
- [40] Tsurusaki S, Tsuchiya Y, Koumura T, et al. Hepatic ferroptosis plays an important role as the trigger for initiating inflammation in nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Cell Death Dis.* 2019;10(6):449-462.
- [41] Ye Y, Chen A, Li L, et al. Repression of the antiporter SLC7A11/glutathione/glutathione peroxidase 4 axis drives ferroptosis of vascular smooth muscle cells to facilitate vascular calcification[J]. *Kidney Int.* 2022;102(6):1259-1275.
- [42] Ursini F, Maiorino M. Lipid peroxidation and ferroptosis: The role of GSH and GPx4[J]. *Free Radic Biol Med.* 2020;152:175-185.
- [43] Kim HY, Kwon WY, Park JB, et al. Hepatic STAMP2 mediates recombinant FGF21-induced improvement of hepatic iron overload in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *FASEB J.* 2020, 34(9):12354-12366.
- [44] Kerins MJ, Ooi A. The roles of NRF2 in modulating cellular iron homeostasis[J]. *Antioxid Redox Signal.* 2018;29(17):1756-1773.
- [45] Zhang J, Liu L, Li F, et al. Treatment with catalpol protects against cisplatin-induced renal injury through Nrf2 and NF-κB signaling pathways[J]. *Exp Ther Med.* 2020;20(4):3025-3032.
- [46] Cao J, Chen X, Jiang L, et al. DJ-1 suppresses ferroptosis through preserving the activity of S

- adenosyl homocysteine hydrolase[J]. Nat Commun. 2020;11(1):1251.
- [47] Liao T, Xu X, Ye X, et al. DJ-1 upregulates the Nrf2/GPX4 signal pathway to inhibit trophoblast ferroptosis in the pathogenesis of preeclampsia[J]. Sci Rep. 2022;12(1):2934.
- [48] Ingold I, Berndt C, Schmitt S, et al. Selenium Utilization by GPX4 Is Required to Prevent Hydroperoxide-Induced Ferroptosis. Cell[J]. 2018;172(3):409-422.e21.
- [49] Friesen JA, Rodwell VW. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) reductases[J]. Genome Biol. 2004;5(11):248.
- [50] Bersuker K, Hendricks JM, Li Z, et al. The CoQ oxidoreductase FSP1 acts parallel to GPX4 to inhibit ferroptosis[J]. Nature. 2019;575:688-92.
- [51] Shimada K, Hayano M, Pagano NC, et al. Cell-line selectivity improves the predictive power of pharmacogenomic analyses and helps identify NADPH as biomarker for ferroptosis sensitivity[J]. Cell Chem Biol. 2016;23:225-35.
- [52] Mao C, Liu X, Zhang Y, et al. DHODH-mediated ferroptosis defence is a targetable vulnerability in cancer[J]. Nature. 2021;593(7860):586-590.
- [53] Mishima E, Nakamura T, Zheng J, et al. DHODH inhibitors sensitize to ferroptosis by FSP1 inhibition[J]. Nature. 2023;619(7968):E9-E18.
- [54] Kraft VAN, Bezjian CT, Pfeiffer S, et al. GTP Cyclohydrolase 1/Tetrahydrobiopterin Counteract Ferroptosis through Lipid Remodeling[J]. ACS Cent Sci. 2020;6(1):41-53.
- [55] 贺又舜,杜方麓.湖南药物志第三卷[M].长沙:湖南科学技术出版社,1993.
- [56] 《全国中草药汇编》编写组.全国中草药汇编(下册)[M].北京:人民卫生出版社,1987.
- [57] 吴东蓉,郝梓敏,付继珍,等.木姜叶柯研究进展[J].贵州农机化,2018(4):39-40.
- [58] 何春年,彭勇,肖伟,等.多穗柯甜茶的研究进展[J].时珍国医国药,2012,23(5):1253-1255.
- [59] Shang A, Liu H Y, Luo M, et al. Sweet tea (*Lithocarpus polystachyus* Rehd.) as a new natural source of bioactive dihydrochalcones with multiple health benefits[J]. Crit Rev Food Sci, 2020(5): 1-18.
- [60] 郑颖,孙华胜,毛乾国.中医防治非酒精性脂肪性肝病研究进展[J].医学信息,2018,31(15):25-28.
- [61] 陈旭.非酒精性脂肪性肝病中医治疗思路探讨[J].中医临床研究,2018,10(23):42-43.
- [62] 赵文霞,张丽慧.非酒精性脂肪性肝病应归属“肝癖”论[J].河南中医,2015,35(08):1820-1822.
- [63] 《全国中草药汇编》编写组.全国中草药汇编(下册)[M].北京:人民卫生出版社,1987.
- [64] Chen XM, Yang WQ, Wang X, et al. Effects of natural dihydrochalcones in sweet tea (*Lithocarpus polystachyus*) on diabetes: a systematical review and meta-analysis of animal studies[J]. Food Funct. 2022;13(11):5899-5913.
- [65] Zuo AR, Yu YY, Shu QL, et al. Hepatoprotective effects and antioxidant, antityrosinase activities of phloretin and phloretin isonicotinyl hydrazone[J]. J Chin Med Assoc. 2014;77(6):290-301.
- [66] 吴东蓉,郝梓敏,付继珍,等.木姜叶柯研究进展[J].贵州农机化,2018(4):39-40.

- [67] 何维维,黄傲,唐雪阳,等.木姜叶柯化学成分与药理作用及质量评价研究进展[J].中南药学, 2022,20(11):2648-2657.
- [68] Wang YK, Hu SY, Xiao FY, et al. Dihydrochalcones in Sweet Tea: Biosynthesis, Distribution and Neuroprotection Function[J]. Molecules. 2022;27(24):8794.
- [69] Zhao J, Shi S, Zhang X, et al. Confusoside, a dihydrochalcone glucoside, prevents acetaminophen-induced liver injury by modulating the Nrf2/NF- κ B/caspase signaling pathway[J]. Food Funct. 2023;14(5):2432-2443.
- [70] Deng G, Wang J, Zhang Q, et al. Hepatoprotective effects of phloridzin on hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride against oxidative stress-triggered damage and fibrosis in rats[J]. Biol Pharm Bull. 2012;35(7):1118-1125.
- [71] Wang YL, Wu J, Li RX, et al. A double-edged sword: The Kelch-like ECH-associated protein 1-nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 2-antioxidant response element pathway targeted pharmacological modulation in nonalcoholic fatty liver disease[J]. Curr Opin Pharmacol. 2021;60:281-290.
- [72] Chen J, Li X, Ge C, et al. The multifaceted role of ferroptosis in liver disease[J]. Cell Death Differ. 2022,Mar;29(3):467-480.
- [73] 肖琴.基于脂质代谢及炎症探讨葛根芩连汤改善非酒精性脂肪性肝炎的作用机制[D].江西中医药大学,2020.
- [74] 薛亚楠.基于 FXR/CYP7A1 通路探究黄芩黄连药对改善非酒精性脂肪性肝病的作用机制[D].江西中医药大学,2021.
- [75] 程子文.基于 FXR 通路探究当飞利肝宁片改善非酒精性脂肪性肝病的作用机制[D].江西中医药大学,2023.
- [76] 宋丽,熊伟,胡宇,等.非酒精性脂肪肝动物模型和疾病表型的研究进展[J].中华中医药学刊, 2024,42(01):153-160.
- [77] Zhou J, Massey S, Story D, et al. Metformin: An Old Drug with New Applications[J]. Int J Mol Sci. 2018;19(10):2863.
- [78] 王玉莹,刘蕴玲.二甲双胍治疗非酒精性脂肪性肝病的研究进展[J].临床内科杂志,2021,38(5):355-357.
- [79] 岳亚光,檀薇薇,王文川,等.二甲双胍经 Nrf2-Gpx4 通路抑制铁死亡并减轻非酒精性脂肪性肝病大鼠的肝损伤[J].中国病理生理杂志,2021,37(10):1848-1857.
- [80] Yue F, Shi Y, Wu S, et al. Metformin alleviates hepatic iron overload and ferroptosis through AMPK-ferroportin pathway in HFD-induced NAFLD[J]. iScience. 2023;26(12):108560.
- [81] 岳芳芝.基于铁死亡探讨二甲双胍改善 NAFLD 的机制[D].中南大学,2023.
- [82] 李军祥,陈諲,王允亮.非酒精性脂肪性肝病中西医结合诊疗共识意见(2017 年)[J].中国中西医结合消化杂志,2017,25(11):805-811.
- [83] 王敬军.血清 TG、TC、ALT 及 AST 检测诊断脂肪肝的临床价值分析[J].吉林医学,2020,41

(05):1090-1091.

- [84] Deprince A, Haas JT, Staels B. Dysregulated lipid metabolism links NAFLD to cardiovascular disease[J]. *Mol Metab.* 2020;42:101092.
- [85] 陈阿红,周小安,花睿.肝功能四项检验在肝硬化诊断中的应用价值[J].*医疗装备*,2022,35(2):48-50.
- [86] Forcina GC, Dixon SJ. GPX4 at the Crossroads of Lipid Homeostasis and Ferroptosis[J]. *Proteomics.* 2019;19(18):e1800311.
- [87] Rochette L, Dogon G, Rigal E, et al. Lipid Peroxidation and Iron Metabolism: Two Corner Stones in the Homeostasis Control of Ferroptosis[J]. *Int J Mol Sci.* 2022;24(1):449.
- [88] Cheng Z, Chu H, Zhu Q, et al. Ferroptosis in non-alcoholic liver disease: Molecular mechanisms and therapeutic implications[J]. *Front Nutr.* 2023;10:1090338.
- [89] Chen J, Li X, Ge C, et al. The multifaceted role of ferroptosis in liver disease[J]. *Cell Death Differ.* 2022;29(3):467-480.
- [90] Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury[J]. *Free Radic Biol Med.* 1990;9(6):515-540.
- [91] Liu L, Pang J, Qin D, et al. Deubiquitinase OTUD5 as a Novel Protector against 4-HNE-Triggered Ferroptosis in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury[J]. *Adv Sci (Weinh).* 2023;10(28):e2301852.
- [92] Shindou H, Shimizu T. Acyl-CoA:lysophospholipid acyltransferases[J]. *J Biol Chem* 2009;284:1-5.
- [93] Chen J, Ding C, Chen Y, et al. ACSL4 reprograms fatty acid metabolism in hepatocellular carcinoma via c-Myc/SREBP1 pathway[J]. *Cancer Lett.* 2021;502:154-165.
- [90] Chen X, Kang R, Kroemer G, et al. Broadening horizons: the role of ferroptosis in cancer[J]. *Nat Rev Clin Oncol* 2021;18:280-96.
- [91] Dixon SJ, Winter GE, Musavi LS, et al. Human Haploid Cell Genetics Reveals Roles for Lipid Metabolism Genes in Nonapoptotic Cell Death[J]. *ACS Chem Biol* 2015;10:1604-9.
- [94] Martis RM, Knight LJ, Donaldson PJ, et al. Identification, Expression, and Roles of the Cystine/Glutamate Antiporter in Ocular Tissues[J]. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020:4594606.
- [95] Bayır H, Anthonymuthu TS, Tyurina YY, et al. Achieving Life through Death: Redox Biology of Lipid Peroxidation in Ferroptosis[J]. *Cell Chem Biol.* 2020;27(4):387-408.
- [96] Kang R, Kroemer G, Tang D. The tumor suppressor protein p53 and the ferroptosis network [J]. *Free Radic Biol Med.* 2019;133:162-168.
- [97] Dodson M, de la Vega MR, Cholanians AB, et al. Modulating NRF2 in Disease: Timing Is Everything[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2019;59:555-575.
- [98] Fan Z, Wirth AK, Chen D, et al. Nrf2-Keap1 pathway promotes cell proliferation and diminishes ferroptosis[J]. *Oncogenesis.* 2017;6(8):e371.
- [99] Gómez-Lechón MJ, Donato MT, Martínez-Romero A, et al. A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis[J]. *Chem Biol Interact.* 2007;165(2):106-116.

- [100] Ricchi M, Odoardi MR, Carulli L, et al. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes[J]. J Gastroenterol Hepatol. 2009;24(5):830-840.
- [101] 马晓月,李钦钦,陆华贞,等.非酒精性脂肪肝动物模型及细胞模型研究进展[J]. 中国比较医学杂志,2023,33(06):120-127.
- [102] Fisher AL, Srole DN, Palaskas NJ, et al. Iron loading induces cholesterol synthesis and sensitizes endothelial cells to TNF α -mediated apoptosis[J]. J Biol Chem. 2021;297(4):101156.
- [103] Wardman P, Candeias LP. Fenton chemistry: an introduction[J]. Radiat Res. 1996;145(5):523-531.

文献综述

木姜叶柯药理作用的研究进展

摘要:

木姜叶柯,在我国南方地区常采其嫩芽作茶饮,于2017年被纳入新食品原料目录,作为一种具有药用价值和保健作用的药材具有悠久的历史。木姜叶柯拉丁名[*Lithocarpus litseifolius* (Hance) Chun],所属壳斗科石柯属植物,该植物的根、叶及果实均可入药,经中药鉴定和化学分析发现其主要的化学成分包括黄酮类、三萜类、多酚类等化合物。其味甘性平,民间应用以其清热解毒、祛风化痰、稳定血压,滋阴补肾的功效,主用于肺气受损所致咳嗽、湿热所致肠胃失常、皮肤瘙痒、邪毒入侵等。现代研究表明,木姜叶柯具有降血脂、抗氧化、抗高压、降血糖、保肝、抗过敏、抗菌、抗炎等作用。由于木姜叶柯具有悠久的民间使用基础及丰富的药理作用,加之味道甘甜,故具有巨大的开发价值。但目前能够系统而全面的探讨木姜叶柯作用的研究却并不太多。为了更好的开发及利用木姜叶柯,本文将结合现代已有的文献对木姜叶柯的药理作用方面进行综述。

关键词:木姜叶柯;药理作用;黄酮类成分

Progress research on the pharmacological effects of *Lithocarpus litseifolius* (Hance) Chun.

Abstracts:

Lithocarpus litseifolius, whose young shoots are often harvested for tea in the southern region of China, was included in the catalog of new food ingredients in 2017, and has a long history of application as a medicinal herb with medicinal value and health effects. *Lithocarpus litseifolius*'s Latin name is *Lithocarpus litseifolius*(Hance) Chun, and it belongs to the Quercus plant of Fagaceae, the roots, leaves and fruits can be used as medicine, the identification and chemical analysis of traditional Chinese medicine show that its main chemical components include flavonoids, triterpenoids, polyphenols and other compounds. Its taste is sweet and flat, and its folk application is mainly used to treat lung-heat cough, damp-heat diarrhea, skin itching, carbuncle and ulcer with its effects of clearing away heat and toxic materials, dispelling wind and resolving phlegm, lowering blood pressure and tonifying kidney. Modern research

shows that *Lithocarpus litseifolius* has the functions of reducing blood lipid, antioxidation, anti-hypertension, lowering blood sugar, protecting liver, resisting allergy, resisting bacteria and inflammation. Because of its long-standing folk use foundation, rich pharmacological effects and sweet taste, *Lithocarpus litseifolius* has great development value. However, at present, there are not many studies that can systematically and comprehensively explore the function of *Lithocarpus litseifolius*. In order to better develop and utilize *Lithocarpus litseifolius*, this paper will review the pharmacological effects of *Lithocarpus litseifolius* in combination with modern literature.

Key words: *Lithocarpus litseifolius* (Hance) Chun; pharmacological effects; flavonoids

木姜叶柯为壳斗科 (Fagaceae) 柯属 (*Lithocarpus*) 植物, 其嫩叶具有甜味, 南方乡野居民将其嫩叶加工作茶叶代品, 通称甜茶, 曾名多穗石柯、多穗柯, 云南习称甜叶子树, 广东习称胖桐。多产于秦岭南坡以南各省区, 是一种常绿的山地常见树种^[1]。其自然资源量大, 仅我国年产量即可达数万吨, 在我国已有上千年的食用历史, 是一种兼食用和药用并重的传统植物之一^[2]。木姜叶柯味道甘甜微涩, 富含多种黄酮类成分、氨基酸及人体必需微量元素^[3-4], 在中国南方民间医学中常将其用于预防或治疗高血压、糖尿病、肥胖症和低脂血症^[5-6]。现代研究认为甜茶具有多种生物活性, 包括抗高血压、抗动脉粥样硬化、扩张血管、脑血管、心血管、降血糖和抗肥胖活性^[7-8]。鉴于我国史书对木姜叶柯的相关记载以及其药理作用和千百年来民间实践对其安全性的证明^[9-11], 木姜叶柯于 2017 年被批准为新食品原料。同时, 伴随着人民生活水平的改善和茶文化日渐兴盛, 木姜叶柯作为一种新兴茶品, 其“药、糖、茶”三效合一的特性满足了大众希望“一种天然产物, 多种应用作用”的愿望^[12-13]。因此木姜叶柯的开发潜力巨大, 目前需要更多研究来支持木姜叶柯的利用与开发。下文将对木姜叶柯药理作用作一个系统的综述。

1 抗氧化活性

木姜叶柯黄酮类和多酚类物质能起到抗氧化作用。黄酮类成分根皮苷能够清除机体日常代谢产生的自由基, 起到延缓衰老的作用^[14]。此外, 在“三高”及某些不良生活习惯之下, 机体的血管内皮细胞将产生大量的 ROS 并容易受到

ROS 的损伤, 谷胱甘肽过氧化物酶、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和过氧化氢酶作为内源性抗氧化系统最重要的抗氧化酶参与 ROS 的调节, 一旦抗氧化系统与氧化作用之间的平衡被打破, 过量的 ROS 攻击细胞膜上的多不饱和脂肪酸, 引起脂质过氧化, 进而上调 MDA 含量^[15-17]。因此, 血浆 SOD 和 MDA 水平反映了 ROS 水平。有研究表明, 木姜叶柯黄酮类化合物能够明显减少血浆中的 MDA, 这说明木姜叶柯具有较高的抗氧化活性^[18]。研究显示, 木姜叶柯提取物对羟基自由基和 DPPH 自由基均有较强的清除能力, 木姜叶柯精提物清除这些自由基的半抑制浓度比维生素 C 还低, 还原铁离子的作用在一定浓度下也略优于维生素 C^[19-20], 说明其抗氧化效果较好, 活性较高。此外, 有研究显示, 木姜叶柯能够减少 H₂O₂ 诱导的秀丽隐杆线虫的氧化应激水平, 延长线虫的平均寿命, 延长其衰老进程^[21]。这说明木姜叶柯能够作为抗氧化剂有待更大的开发应用前景。

2 降高血压

现代研究发现木姜叶柯黄酮类成分能够显著降低大鼠自发性高血压的血压, 但对正常大鼠却没有明显的降压作用。研究证明, 木姜叶柯黄酮类成分能够降低血浆肾素、血管紧张素水平^[22]。作为肾素-血管紧张素-醛固酮(RAAS)系统的主要物质, 肾素和血管紧张素能够通过收缩血管、增加外周阻力、引起醛固酮分泌并调节肾脏重吸收水分和钠, 导致血压持续升高^[23]。这表明 RAAS 系统可能参与了木姜叶柯黄酮类成分降压过程。值得注意的是, 内皮素作为能最有效的收缩血管的物质^[24], 在甜茶黄酮类成分降压实验中却没有什么明显的改变。同样的, 内皮依赖性血管舒张因子水平也没有什么影响, 这提示内皮系统可能不介导甜茶黄酮类成分的降压作用^[22]。此外, 甜茶黄酮类成分能显著下调血浆 MDA 水平, 这表明其具有抗氧化活性。结合抗氧化系统作用失衡作为高血压并发症之一来看, 木姜叶柯黄酮类成分降低血压可能与氧化应激有关^[22]。另外, 大量实验证明长期摄入木姜叶柯黄酮类成分可引起血钾水平升高、血钠水平的下降, 据相关研究表明, 钠/钾比值下降有利于心血管系统^[22,25]。研究发现, 甜茶黄酮类成分降压作用虽然没有经典降压药依那普利降压速度快、效果好, 但其没有依那普利明显的戒断反应, 降压作用温和且能够改善皮肤微循环流量^[22]。这说明木姜叶柯作为一种天然降压药在预防高血压方面具有广阔的市场。

3 降血糖

研究发现,木姜叶柯提取物可明显降低三种糖尿病模型的血糖水平:无论是自发性的遗传性高血糖还是、四氧嘧啶或链脲菌素等化学药物诱导的高血糖小鼠模型,木姜叶柯提取物均可以显著降低这些动物模型的血糖水平,还能提高 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型的葡萄糖代谢量,改善 HepG2 细胞的胰岛素抵抗^[26-28]。研究表明,植物类黄酮可以预防或者治疗糖尿病,其作用机制可能通过保护和诱导胰岛 β 细胞的增殖并且激活相关信号通路,回调分泌胰岛素,降低血糖有关^[28]。此外,研究显示,木姜叶柯三叶苷对 β -淀粉酶的抑制活性中等,但能高度抑制 α -葡萄糖苷酶活性,其抑制作用甚至优于参照物阿卡波糖,且副作用较小^[29]。木姜叶柯根皮苷在动物实验中也证明可以抑制葡萄糖在肠道和肾脏中的吸收,进而降低血糖浓度^[30]。越来越多的证据表明,木姜叶柯是一种潜在的抗糖尿病药物。

4 降血脂、抗肥胖

木姜叶柯提取物能够有效的降低血清胆固醇、甘油含量,同时具有降低血清 LDL-C、升高 HDL-C 的作用^[31]。其中, HDL-C 能够将胆固醇从外周转运到肝脏,在降低血脂水平上发挥重要作用^[32]。此外,木姜叶柯提取物还能够降低循环瘦素含量,提高血清脂联素水平,改善瘦素抵抗,显著抵抗饮食性诱导大鼠的肥胖和减轻肥胖大鼠体重增长^[33]。研究显示,木姜叶柯提取物能够下调成脂转录因子在附睾脂肪组织的表达^[34]。这些成脂转录因子与瘦素、脂联素以及抵抗素含量密切相关,能够促进脂肪的合成^[34]。最新研究显示,木姜叶柯抗肥胖作用可能还与其影响高脂诱导肥胖模型的肠道微生物种群有关^[35]。综上所述,木姜叶柯作为一种降血脂天然药物,将其用于预防高脂血症和饮食性肥胖方面具有很大前景。

5 保肝作用

木姜叶柯黄酮类成分根皮素及根皮苷已被证明具有保肝特效。根皮素能够改善四氯化碳诱导大鼠肝损伤模型的肝脏病变程度和逆转肝功能指标增强肝功能^[36],还能够减小高胆碱饮食和琥珀酸钠饮食诱导小鼠的氧化应激指标,减少肝脏细胞脂肪变性,降低肝纤维化程度^[37-38]。此外,研究显示根皮素能够预防乙酰氨基酚对肝细胞的毒性作用^[39-40]。通过分子对接和体内实验发现,根皮素

能够调节改善肝细胞癌肝功能指标, 调控葡萄糖转运相关蛋白和激酶, 介导糖酵解和糖异生过程来治疗肝细胞癌^[41-42]。根皮苷同样可以降低四氯化碳诱导大鼠的脂质过氧化, 保护肝细胞膜结构完整性, 降低大鼠肝纤维化水平^[43]。

6 抗过敏

木姜叶柯还能够有效的抵抗过敏。体外抑制实验发现, 透明质酸酶活性明显被木姜叶柯提取物所抑制, 其机制可能与木姜叶柯提取物抑制肥大细胞分泌组胺, 而透明质酸活性抑制与组胺分泌抑制相关联有关^[44]。且研究还发现木姜叶柯加工方式不同, 抗过敏活性也不同。同时, 在一定范围内浓度越高, 抗过敏作用就越强^[45]。

7 抑菌

体外抑菌试验中木姜叶柯根皮苷提取物能够有效的抑制革兰氏阳性菌中的金黄色葡萄球菌和革兰氏阴性菌中的大肠杆菌^[46]。此外, 有相关研究对粪肠球菌等供试菌种进行抑菌实验, 结果表明木姜叶柯对革兰阳性菌的抑制效果强于革兰阴性菌^[47]。

8 抗炎

木姜叶柯三叶苷能够改善通过脂多糖诱导的小鼠炎症反应, 它能够显著减少炎症小鼠血清中促炎介质的含量^[48]。有证据表达木姜叶柯三叶苷对脂多糖诱导小鼠炎症的抑制作用可能与抑制 NF- κ B 信号通路表达有关^[49]。

9 其他

现代研究表明, 木姜叶柯还有组织保护和修复功能。能够有效修复和保护糖尿病小鼠的胰腺组织、肝脏、肾脏^[31,50]。此外, 有研究发现, 木姜叶柯成分根皮素在胃癌、结直肠癌、宫颈癌等多种癌症中能够起到一定的预防和治疗作用, 并且能降低机体对抗癌药物的耐药性^[51], 其还有抑制人类相关白血病细胞生长的功效^[52]。

展望

木姜叶柯作为我国应用千年的天然作物, 拥有丰富的药理作用及悠久的传承历史, 在降压、降糖、抗氧化、降脂、抗肥胖、抗过敏、抑菌、抗炎方面均有较好的表现。木姜叶柯能够降低自发性高血压而对正常血压没有明显影响, 且对心血管系统有一定的保护作用, 这表明木姜叶柯可能能够作为一种降压保

健产品甚至是上市药品来开发利用。此外，木姜叶柯还有降低血糖含量和改善胰岛素抵抗的作用，胰岛素抵抗作为 NAFLD 的一重大诱因，能够通过促进肝脏脂肪过度积累而形成和加重 NAFLD，这是否暗示着，木姜叶柯还能对 NAFLD 有一定的预防和改善作用。另外，结合木姜叶柯还能够降脂并且抗肥胖的作用，是否也可以说明木姜叶柯不仅能够用于预防和治疗疾病，同时它的受众群体还能够扩大到普通男女老少。

总之，木姜叶柯基于其丰富的药理作用及高度的安全性，可以以其作为原料开发临床疗效好、毒副作用小的抗高血压、糖尿病、高血脂、抗过敏、抑菌等方面的新产品，以满足人民日益增长的美好生活需要与疗效好、毒副作用小的中药产品供应不足之间的矛盾。我们也应当进一步了解和研究木姜叶柯，以发挥其更大的价值。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志(第 22 卷)[M].北京:科学出版社,1977:201-202.
- [2] 伍贤进,李胜华,曾军英,等.药食兼用多穗柯甜茶规范化栽培技术规程[J].农学学报,2014,4(9):68-71.
- [3] Chen ZH, Zhang RJ, Wu J, Zhao WM. New dihydrochalcone glycosides from *Lithocarpus litseifolius* and the phenomenon of C-H $\rightarrow$ C-D exchange observed in NMR spectra of phenolic components[J]. J Asian Nat Prod Res. 2009;11(6):508-513.
- [4] 姚佳,陈开琴,何志云,等.野生甜茶中氨基酸成分分析及营养评价[J].生物化工,2021,7(04):78-81.
- [5] 黄开勇,黄应钦,黄大勇.木本植物营养繁殖实用技术[M].广西科学技术出版社,2012.01,第 150-151 页.
- [6] Li X, Zhao Y, Hou S, et al. Identification of the bioactive components of orally administered *Lithocarpus polystachyus* Rehd and their metabolites in rats by liquid chromatography coupled to LTQ Orbitrap mass spectrometry[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2014;962:37-43.
- [7] 杨勇,彭炳华,马庭升,等.保健甜茶-多穗柯的研究与开发[J].时珍国医国药,2007(04):1014-1015.
- [8] 雷鸣,徐应淑,徐凡,等.多穗石柯化学成分及药理作用研究进展[J].中药药理与临床,2017,33(06):176-180.
- [9] 邱小燕,肖深根,王依清,等.木姜叶柯新型天然甜味剂植物开发的研究进展与展望[J].农产

- 品加工,2022(22):72-76.
- [10] 林协全,汪其双,覃兴化,等.甜茶“木姜叶柯”本草考证[J].福建农林大学学报(自然科学版),2023,52(06):785-792.
- [11] 陆武弟,杨仕婷,赵志文,等.多穗石柯叶提取物的急性毒性实验研究[J].右江医学,2017,45(05):535-538.
- [12] 唐健民,朱成豪,高丽梅,等.响应面法优化多穗石柯总黄酮提取工艺及抗氧化活性研究[J].安徽农业科学,2020,48(01):181-185.
- [13] 李胜华,伍贤进,牛友芽.HPLC 测定多穗柯中二氢查耳酮含量研究[J].食品科技,2010,35((6):281-283.
- [14] 夏雪芬.国内外天然食品抗氧化剂的应用研究[J].现代食品,2019(22):26-28.
- [15] UAsmat U, Abad K, Ismail K. Diabetes mellitus and oxidative stress-A concise review[J]. Saudi Pharm J. 2016;24(5):547-553.
- [16] 宋小彪,陈彦旭,胥雨成,等.中医药改善糖尿病血管病变内皮损伤进展[J].河南中医,2021,41(09):1432-1437.
- [17] Weber KT. Oxidative stress and cardiovascular injury: a symposium presented at the Southern Society for Clinical Investigation[J]. Am J Med Sci. 2011;342(2):111-113.
- [18] 申婷婷,马娜,李成龙,等.根皮苷对高脂膳食喂饲仓鼠氧化损伤保护机制的研究[J].食品科学,2014,35(15):221-225.
- [19] 滕昭玉,崔紫姣,杜莹,等.甜茶总多酚的纯化及其抗氧化活性[J].贵州农业科学,2016,44(01):36-39.
- [20] 罗颖,黄帅,杨雪彬,等.木姜叶柯老叶根皮苷的抗氧化及抑菌活性研究[J].中国食品添加剂,2021,32(02):51-57.
- [21] 张慧康,马佳波,司奇,等.基于线虫模型的木姜叶柯抗氧化应激及抗衰老作用[J].食品工业科技,2023,44(12):363-370.
- [22] Hou SZ, Xu SJ, Jiang DX, et al. Effect of the flavonoid fraction of *Lithocarpus polystachyus* Rehd. on spontaneously hypertensive and normotensive rats[J]. J Ethnopharmacol. 2012;143(2):441-447.
- [23] 吴红珍,王钱虎,夏钟意.原发性高血压病患者血浆肾素血管紧张素 II 醛固酮含量及诊断价值分析[J].中国药物与临床,2017,17(08):1228-1229.
- [24] 方正旭.ET-1、eNOS 基因多态性与江西汉族人群原发性高血压及硝苯地平降压疗效的相关性研究[D].南昌大学,2016.
- [25] Liang J, Chen SX, Huang S, et al. Evaluation of toxicity studies of flavonoid fraction of *Lithocarpus polystachyus* Rehd in rodents[J]. Regul Toxicol Pharmacol. 2017 Aug;88:283-290.
- [26] 谢仁康,罗蒙裕,周福才,等.珍稀药食同源植物—木姜叶柯生物学特性及应用价值[J].特种经济动植物,2021,24(06):35-37.
- [27] 潘慧敏,何春年,姜保平,等.多穗柯乙醇提取物不同萃取部位及 5 个主要成分对 HepG2 细

- 胞胰岛素抵抗改善作用的研究[J].中南药学,2015,13(06):570-574.
- [28] Dinda B, Dinda M, Roy A, et al. Dietary plant flavonoids in prevention of obesity and diabetes[J]. Adv Protein Chem Struct Biol. 2020;120:159-235.
- [29] 吴婕,宫江宁.大孔树脂纯化甜茶多酚及其对 α -葡萄糖苷酶抑制活性和 DPPH·抗氧化性的研究[J].中国农业科技导报,2021,23(06):113-119.
- [30] Shi YL, Zhang YP, Luo H, et al. Trilobatin, a Natural Food Additive, Exerts Anti-Type 2 Diabetes Effect Mediated by Nrf2/ARE and IRS-1/GLUT2 Signaling Pathways[J]. Front Pharmacol. 2022;13:828473.
- [31] 刘韞滔,黄伟民,李诚,等.木姜叶柯全发酵茶的活性成分及其降血糖活性研究[J].食品与发酵工业,2020,46(20):53-60.
- [32] Wang L, Zhang Y, Xu M, et al. Anti-diabetic activity of Vaccinium bracteatum Thunb. leaves' polysaccharide in STZ-induced diabetic mice[J]. Int J Biol Macromol. 2013;61:317-321.
- [33] Sun SY, Huang J, Meng MJ, et al. Improvement of lipid profile and reduction of body weight by shan he jian fei granules in high fat diet-induced obese rats[J]. Clin Lab. 2012;58(1-2):81-7.
- [34] Zhou CJ, Huang S, Liu JQ, et al. Sweet tea leaves extract improves leptin resistance in diet-induced obese rats[J]. J Ethnopharmacol. 2013;145(1):386-392.
- [35] Shen H, Huang L, Dou H, et al. Effect of Trilobatin from Lithocarpus polystachyus Rehd on Gut Microbiota of Obese Rats Induced by a High-Fat Diet[J]. Nutrients. 2021;13(3):891.
- [36] Zuo AR, Yu YY, Shu QL, et al. Hepatoprotective effects and antioxidant, antityrosinase activities of phloretin and phloretin isonicotinyl hydrazone[J]. J Chin Med Assoc. 2014;77(6):290-301.
- [37] Ren D, Liu Y, Zhao Y, et al. Hepatotoxicity and endothelial dysfunction induced by high choline diet and the protective effects of phloretin in mice[J]. Food Chem Toxicol. 2016;94:203-212.
- [38] Le CT, Nguyen G, Park SY, et al. Phloretin Ameliorates Succinate-Induced Liver Fibrosis by Regulating Hepatic Stellate Cells[J]. Endocrinol Metab (Seoul). 2023;38(4):395-405.
- [39] Geohagen BC, Korsharsky B, Vydyanatha A, et al. Phloretin cytoprotection and toxicity[J]. Chem Biol Interact. 2018;296:117-123.
- [40] Geohagen BC, Vydyanathan A, Kosharsky B, et al. Enolate-Forming Phloretin Pharmacophores: Hepatoprotection in an Experimental Model of Drug-Induced Toxicity[J]. J Pharmacol Exp Ther. 2016;357(3):476-486.
- [41] Choi BY. Biochemical Basis of Anti-Cancer-Effects of Phloretin-A Natural Dihydrochalcone [J]. Molecules. 2019;24(2):278.
- [42] Elmetwalli A, Kamosh NH, El Safty R, et al. Novel phloretin-based combinations targeting glucose metabolism in hepatocellular carcinoma through GLUT2/PEPCK axis of action: in silico molecular modelling and in vivo studies. Med Oncol[J]. 2023;41(1):12.2019;24(2):278.
- [43] Deng G, Wang J, Zhang Q, et al. Hepatoprotective effects of phloridzin on hepatic fibrosis in

- duced by carbon tetrachloride against oxidative stress-triggered damage and fibrosis in rats[J]. Biol Pharm Bull. 2012;35(7):1118-1125.
- [44] 李晚谊, 卮注, 苏学素, 等. 云南茶叶和甜茶的抗过敏活性[J]. 药学实践杂志, 2000(05):292-294.
- [45] 李晚谊. 云南茶叶、甜菜和紫苏抗过敏功能的研究[D]. 西南农业大学, 2001.
- [46] 罗颖, 黄帅, 杨雪彬, 等. 木姜叶柯老叶根皮苷的抗氧化及抑菌活性研究[J]. 中国食品添加剂, 2021, 32(02):51-57.
- [47] 李胜华, 伍贤进, 向晓军. 多穗柯有效成分的提取及抑菌效果研究[J]. 食品科技, 2010, 35(03):211-214.
- [48] 范小龙, 董华强, 张英慧, 等. 多穗柯三叶苷对脂多糖诱导小鼠炎症反应的保护作用[J]. 食品科学, 2014, 35(21):186-189.
- [49] Fan X, Zhang Y, Dong H, et al. Trilobatin attenuates the LPS-mediated inflammatory response by suppressing the NF- κ B signaling pathway[J]. Food Chem. 2015;166:609-615.
- [50] 马琮鉴, 高健美, 孔浩, 等. 根皮苷药理作用研究进展[J]. 医药导报, 2020, 39(03):360-364.
- [51] Shang A, Liu HY, Luo M, et al. Sweet tea (*Lithocarpus polystachyus* rehd.) as a new natural source of bioactive dihydrochalcones with multiple health benefits[J]. Crit Rev Food Sci Nutr. 2022;62(4):917-934.
- [52] Sun Y, Li W, Liu Z. Preparative isolation, quantification and antioxidant activity of dihydrochalcones from Sweet Tea (*Lithocarpus polystachyus* Rehd.)[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2015;1002:372-378.