

bran-fried Baizhu on the intestinal flora of rats with Pixuxiexie (脾虚泄泻) syndrome was compared, which laid a theoretical basis for the processing mechanism of bran-fried Baizhu. **Methods:** Thirty SD male rats were randomly divided into a normal control group (5 rats) and a model group (25 rats). Raw Dahuang (大黄) water decoction was combined with dietary irregularity to induce Pixuxiexie syndrome. The rats in the model group were randomized into model control group, 3.6 g/kg Baizhu decoction group, 3.6 g/kg bran-fried Baizhu decoction group, 0.9 g/kg Baizhu polysaccharide group, and 1.0 g/kg bran-fried Baizhu polysaccharide group, 5 in each group. Then, rats were administrated with corresponding drugs or normal saline, and the general conditions of rats in each group were observed. After the experiment, rat feces were collected to extract DNA for high-throughput sequencing of 16S rRNA. **Results:** After modeling, rats showed symptoms such as diarrhea, and slow weight gain, or reduced body weight. After administration, compared with the model control group, the administration groups showed fast body weight growth and decrease in stool score, and particularly the decrease in 0.9 g/kg Baizhu polysaccharide group and 1.0 g/kg bran-fried Baizhu polysaccharide group was significant ($P<0.05$). Compared with the normal control group, the model control group exhibited decrease in intestinal flora diversity and imbalance of the flora structure at the levels of phylum and genus. Compared with the model control group, the administration groups demonstrated growth of the abundance and evenness of the intestinal microbial community, and the increase in diversity in 3.6 g/kg bran-fried Baizhu decoction group and 1.0 g/kg bran-fried Baizhu polysaccharide group was significant ($P<0.05$), particularly the 1.0 g/kg bran-fried Baizhu polysaccharide group. At the phylum level, 3.6 g/kg bran-fried Baizhu decoction up-regulated Firmicutes ($P<0.05$). At the genus level, the abundance of *Allobaculum* and *Prevotellaceae_UCG-003* was decreased in the model control group compared with that in the normal control group ($P<0.05$). The abundance of *Allobaculum* was raised in 3.6 g/kg Baizhu decoction group ($P<0.05$), and that of *Prevotellaceae_UCG-003* was elevated in the bran-fried Baizhu decoction group ($P<0.05$). **Conclusion:** The water decoction and polysaccharides of Baizhu have the effect of relieving diarrhea. They regulate the intestinal flora of rats with Pixuxiexie syndrome by increasing the abundance of beneficial bacteria and reducing the abundance of harmful bacteria. The bran-fried Baizhu shows better effect than the raw medicinal on the intestinal flora of Pixuxiexie syndrome rats.

Key words Baizhu (白术), Bran-fried Baizhu, Polysaccharides, Intestinal flora, Pixuxiexie (脾虚泄泻) syndrome

藏药俄色改善 KK-Ay 小鼠脂代谢紊乱的作用研究*

华 桦¹, 刘 俐¹, 刘 芳², 朱 宁¹, 赵军宁^{1**}

(¹四川省中医药科学院 四川省中医药转化医学中心 中医药转化医学四川省重点实验室
国家中医药管理局中药质量生物评价重点研究室 四川省道地药材形成原理与品质评价工程研究中心
四川省道地药材系统开发工程技术研究中心, 成都 610041; ²四川大学华西药学院, 成都 610041)

摘 要 目的: 研究藏药俄色改善 KK-Ay 小鼠脂代谢紊乱的作用及可能的作用机制。方法: 10 只 C57BL/6J 小鼠作为正常对照组, 50 只 KK-Ay 模型小鼠按空腹血糖值随机分为模型对照组、阳性对照组(罗格列酮片 2.67 mg/kg)和俄色提取物 0.75、1.5、3.0 g 原生药/kg 组, 每组 10 只, 连续灌胃给药 35 d, 末次药后测定小鼠血清游离脂肪酸(FFA)、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量; 油红 O 染色法检测肝脏组织中脂质的含量; 免疫组化法检测肾周脂肪组织中超氧化物酶体增殖物激活受体- α (PPAR- α)和 PPAR- γ 蛋白表达; 实时定量荧光(PCR)检测 *Ppar*、*Tnfa* mRNA 表达。结果: 与正常对照组比较, 模型对照组小鼠体质量显著升高, 血清 FFA、TG、TC、TNF- α 含量显著升高($P<0.01$), 小鼠皮下脂肪系数和腹腔脂肪系数显著升高, 小鼠肝脏组织脂滴面积百分比显著升高($P<0.01$), 小鼠脂肪组织 PPAR- α 、 γ 蛋白表达明显降低, 肾周脂肪组织 *Ppar* mRNA 表达明显下调($P<0.05$); 与模型对照组比较, 俄色提取物 1.5、3.0 g/kg 组小鼠体质量和皮下脂肪系数明显降低, 小鼠肝脏组织脂滴面积百分率明显降低, 脂肪组织 PPAR- α 蛋白明显升高, 肾周脂肪组织 *Ppar* mRNA 表达明显上调($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 俄色提取物 3.0 g/kg 组小鼠血清 FFA、TG、TNF- α 含量明显降低, 肾周脂肪组织 *Tnfa* mRNA 表达明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 俄色提取物 0.75 g/kg 组小鼠血清 TC 含量明显降低, 小鼠皮下脂肪系数降低($P<0.05$)。结论: 藏药俄色可改善 KK-Ay 小鼠脂质代谢紊乱, 其作用机制可能与上调肾周脂肪组织 PPAR α 蛋白表达和 PPAR γ 转录以及减轻炎症反应有关。

关键词 俄色; 自发性 2 型糖尿病小鼠; 脂代谢; 超氧化物酶体增殖物激活受体- γ ; 肿瘤坏死因子- α

DOI:10.13412/j.cnki.zyyj.20220412.001

俄色是四川省甘孜藏族自治州南派藏医药的习用药材, 为蔷薇科植物变叶海棠 *Malustoringoides* (Rehd) Hughes. 的干燥叶

及叶芽^[1], 始载于《晶珠本草》, 后又收录进了《藏汉大词典》^[2-4]。藏医传统用法认为俄色可缓解“京尼萨库”症状和降

* 基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(编号: 81703820)。

** 通信作者: 赵军宁, 博士, 研究员, 研究方向: 中药药理与转化医学, E-mail: zarmy@189.cn;

作者简介: 华桦, 硕士, 副研究员, 研究方向: 中药药理学研究, E-mail: 905701276@qq.com。

作者简介: 华桦, 硕士, 副研究员, 研究方向: 中药药理学研究, E-mail: 905701276@qq.com。

低人体“脂肪”。“京尼萨库”是我国藏区特殊高寒地理环境和过食酥油、动物蛋白等生活习惯导致的地区常见多发病,藏医文献记载防治“京尼萨库”病的药方及药材非常丰富,疗效确切^[5-11]。“京尼萨库”为藏医很早就认识到的一种因饮食起居不当,使“培根”和过盛的脂肪不能转化成人体需要的精华,混入尿液并随着尿液排出体外所造成的全身性疾病。“京尼”藏语“尿频”之意,是由于过食咸甜味饮食及性寒而重之食物,少动久坐或坐卧湿地而致培根和脂肪过盛,不能升化成血、肌肉、骨、髓等精华而导致尿量减少,尿液变浑浊,淋漓不断为特征的一种全身性疾病。“萨库”藏语“消耗、消败的浑浊物”之意。藏医认为,藏医的“京尼萨库”病属于现代医学所谓“糖脂代谢障碍疾病”的范畴。糖尿病的发病与食、湿、痰、气、瘀等因素有关^[12]。脂代谢紊乱是糖尿病常见的合并症状,俄色叶具有攻坚化积、除腻涤滞、保肝利胆的作用,可调节血糖血脂^[13]。课题组前期研究发现,变叶海棠提取物能降低 KK-Ay 小鼠体质量和空腹血糖值;还可降低血清 GhbA1c 和 AGEs 浓度;其作用机制可能是通过上调 p-AKT 和 p-GSK 3 β 表达实现的^[14]。

本文通过研究俄色提取物对 2 型糖尿病 KK-Ay 小鼠血和组织中脂质、炎症因子水平及关键信号因子表达的影响,探讨其改善 KK-Ay 小鼠脂代谢的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 试验药物 俄色采自四川省霍炉县,由四川省中医药科学院周先建副研究员鉴定为俄色的干燥叶。称取适量俄色药材,粉碎浸泡 1 h 后加入 10 倍量纯化水,加热至沸腾,保持微沸提取 1 h,重复提取 2 次,合并两次水煎液并过滤,取上清液浓缩至浸膏含原生药 3.23 g/g。加适量蒸馏水研磨均匀,定容制备成相应浓度受试物备用。罗格列酮片,规格:4 mg/片,成都恒瑞制药有限公司生产,批号:200512。

1.2 动物 8 w 龄 SPF 级 KK-Ay 小鼠 70 只,全雄;8 w 龄 C57BL/6J 小鼠 10 只,全雄,购于北京华阜康生物科技股份有限公司,动物生产许可证编号:SCXK(京)2019-0008。动物饲养于 SPF 环境中,温度(20 \pm 1) $^{\circ}$ C,相对湿度 60% \pm 5%,明暗周期 12 h,高脂饲料喂养 KK-Ay 小鼠,标准饲料喂养 C57BL/6J 小鼠。实验动物环境符合国家兔、大鼠、豚鼠、小鼠屏障系统使用设施标准,环境使用许可证号:SYXK(川)2018-100。通过四川省实验动物管理委员会伦理审查,伦理审查批准号:SYLL(2020)-032。

1.3 试剂 Mouse FFA ELISA KIT(批号:ZC-38978)、Mouse TNF- α ELISA KIT(批号:ZC-39024),上海茁彩生物科技有限公司生产;PPAR- α ,兔多克隆抗体(批号:ab215270,abcam);PPAR- γ ,兔单克隆抗体(批号:2443S,Cell Signaling);山羊抗兔工作液(批号:SP-9001)、正常山羊血清(批号:ZLI-9021)、浓缩型 DAB 试剂盒(批号:K135925C),北京中杉金桥生物有限公司;油红 O(批号:Y07512,合肥博美生物科技有限责任公司);多聚甲醛(批号:20190312,国药集团化学试剂有限公司)。

1.4 仪器 转轮式切片机(德国徕卡-2016);酶标仪(Spectra-MAX Plus384,美谷分子仪器有限公司生产);BS-240VET 兽用生化分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司);BMJ-III 型包埋机、TSJ-II 型全自动封闭式组织脱水机、PHY-III 型病理组织漂烘仪,常州市中威电子仪器有限公司;图像分析软件 Image-

Pro Plus 6.0(美国 Media Cybernetics 公司);数码三目摄像显微镜(BA400Digital,麦克奥迪实业集团有限公司)。

1.5 方法

1.5.1 分组及给药 SPF 级 KK-Ay 小鼠 70 只,8 w 龄,体质量 18 g~20 g,全雄,均高脂饲料喂养 14 d 后,禁食不禁饮 4 h,测定小鼠空腹血糖,若血糖值大于 11.1 mol/L 则视为模型诱导成功^[14]。10 只 C57BL/6J 小鼠作为正常对照组,以普通饲料喂养。50 只成模 KK-Ay 小鼠按空腹血糖值随机分为模型对照组、罗格列酮片 2.67 mg/kg 组和俄色提取物 0.75、1.50、3.0 g 原生药/kg 组^[14],每组 10 只。各组灌胃给予相应药物,正常对照组和模型对照组给予等体积蒸馏水,给药体积均为 10 mL/kg,1 次/d,连续给药 35 d。

1.5.2 观察指标

1.5.2.1 称体质量 于给药前及给药后每周固定时间测定一次。

1.5.2.2 血清游离脂肪酸(FFA)、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)和肿瘤坏死因子(TNF- α)含量测定 于给药 35 d 后禁食不禁水过夜,水合氯醛麻醉小鼠后摘眼球取血,血液静置 30 min 后 4 000 r/min 离心 10 min,收集血清,按照 ELISA 试剂盒说明书,测定小鼠血清 FFA、TNF- α 含量;采用自动生化分析仪测定血清 TG、TC 含量。

1.5.2.3 皮下脂肪系数和腹腔脂肪系数测定 分别取小鼠皮下脂肪和腹腔脂肪,称质量,计算皮下脂肪和腹腔脂肪指数(脂肪质量 g/体质量 100 g)。

1.5.2.4 肝脏油红 O 染色法测定脂质含量 摘取小鼠肝脏,置于 10%甲醛溶液中固定 24 h。进行 OTC 包埋,切片,通过油红 O 染色法,由图像分析软件 Image-Pro Plus 6.0 计算百分比,检测肝脏组织中脂质的水平。

1.5.2.5 免疫组化检测肾周脂肪组织中 PPAR- α 和 PPAR- γ 蛋白表达 将固定的组织脱水并包埋在石蜡中,切片。用柠檬酸盐溶液修复抗原,滴加山羊血清封闭液进行封闭;将载玻片与稀释的 PPAR- α [1:400(浓度)],PPAR- γ [1:30(浓度)]的一抗一起孵育,并在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;滴加生物素化二抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min;使用 DAB 显色试剂盒,混匀试剂后滴加到切片上,室温显色,蒸馏水洗涤,苏木素轻度复染,脱水,透明,中性树胶封片。采用显微摄像系统对切片进行图像采集。

1.5.2.6 实时定量荧光 qPCR 检测 *Ppar*、*Tnfa* mRNA 表达 精确称取脂肪组织,每 0.1 g 加入 1 mL 的 Total RNA Extraction Reagent 提取总 RNA。紫外分光光度计测定:分别测定组织总 RNA 在 260 nm 和 280 nm 处的光密度值(OD),并计算 RNA 的含量和纯度。从组织总 RNA 逆转录合成总 cDNA,稀释探针及引物,依次加入每管中,用 ABI7500HT 型荧光定量 PCR 仪测定溶解曲线。反应温度 95 $^{\circ}$ C,时间 30 s,95 $^{\circ}$ C,5 s,55 $^{\circ}$ C,30 s,72 $^{\circ}$ C,30 s,45 个循环。采用 $\Delta\Delta Ct$ 值法计数出与基线水平的差值及给药组相对于空白对照组的基因 mRNA 表达变化的倍数(计算公式为差别倍数 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ 给药组 - ΔCt 对照组, $\Delta Ct = Ct$ 待测物 - Ct β -actin)。引物信息见表 1。

表 1 所用引物及碱基序列

引物名称	上游	引物大小 /bp	下游	引物大小/ bp
<i>Bactin</i>	gaagatcaagatcattgctcc	21	tactctctgtctgatcca	20
<i>Ppar</i>	cctcttggaagcccttggacttt	25	catctcttgagacaccttggeaaca	26
<i>Tnfa</i>	gcggtgctatgctcagccttct	26	gggtgtgtgagtgtagggctctgg	26

1.5.3 统计学方法 所有数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用SPSS 13.0 单因素方差分析法(one-way ANOVA)对试验数据统计分析, LSD-t 或 Tamhane's T_2 进行各组样本间差异显著性分析。 $P<0.05$ $P<0.01$ 为两组具有显著差异。

2 结果

2.1 俄色提取物对 KK-Ay 小鼠体质量的影响 在试验各时间点,与正常对照组比较,模型对照组体质量均显著升高($P<0.01$);与模型对照组比较,俄色提取物 1.5、3.0 g 生药/kg 组在给药各时间点体质量均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);俄色提取物 0.75 g 生药/kg 组在给药第 2、3、4、5 w 体质量显著降低($P<0.01$)。见图 1。

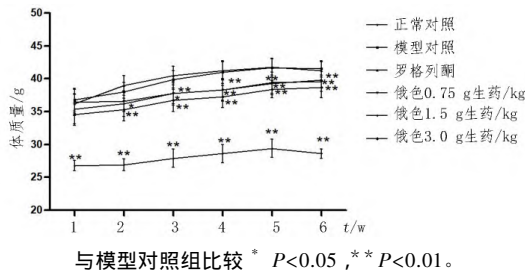


图 1 俄色提取物对 KK-Ay 小鼠体质量的影响 ($\bar{x}\pm s$ $n=10$)

2.2 俄色提取物对 KK-Ay 小鼠血清 FFA、TG 和 TC 含量的影响 与正常对照组比较,模型对照组血清 FFA、TG 和 TC 含量均显著升高($P<0.01$);与模型对照组比较,罗格列酮 2.67 mg/kg 组、俄色提取物 3.0 g 生药/kg 组小鼠 FFA 和 TG 含量明显降低($P<0.05$);俄色提取物 0.75 g 生药/kg 组小鼠 TC 含量明显降低($P<0.05$)。见表 2。

表 2 俄色提取物对 KK-Ay 小鼠血清 FFA、TG 和 TC 含量的影响 ($\bar{x}\pm s$ $n=10$)

组别	剂量 (g/kg)	FFA/ ($\mu\text{mol/L}$)	TG/ ($\mu\text{mol/L}$)	TC/ (mmol/L)
正常对照		22±8 **	0.7±0.1 **	2.45±0.24 **
模型对照		48±18	2.5±0.8	3.87±0.43
罗格列酮	2.67×10 ⁻³	28±10 **	1.8±0.5*	3.16±0.81*
俄色提取物	0.75	39±17	2.2±1.0	3.31±0.64*
俄色提取物	1.5	36±12	1.8±0.7	3.71±0.58
俄色提取物	3.0	30±14*	1.8±0.4*	3.31±0.68

与模型对照组比较 * $P<0.05$, ** $P<0.01$ (下同)。

2.3 俄色提取物对 KK-Ay 小鼠血清 TNF- α 含量的影响 与正常组比较,模型对照组小鼠血清 TNF- α 含量显著升高($P<0.01$);与模型对照组比较,罗格列酮 2.67 mg/kg 组、俄色提取物 3.0 g 生药/kg 组小鼠血清 TNF- α 含量显著降低($P<0.01$)。见表 3。

表 3 俄色提取物对 KK-Ay 小鼠血清 TNF- α 含量的影响 ($\bar{x}\pm s$ $n=10$)

组别	剂量/(g/kg)	TNF- α /(pg/mL)
正常对照		37±12 **
模型对照		64±13
罗格列酮	2.67×10 ⁻³	43±16 **
俄色提取物	0.75	54±20
俄色提取物	1.5	52±19
俄色提取物	3.0	46±10 **

2.4 俄色提取物对 KK-Ay 小鼠皮下脂肪系数和腹腔脂肪系数的影响 与正常对照组比较,模型对照组小鼠皮下脂肪系数和腹腔脂肪系数显著升高($P<0.01$);与模型对照组比较,俄色提取物 0.75 g 生药/kg 组小鼠皮下脂肪系数明显降低($P<0.05$);罗格列酮 2.67 mg/kg、俄色提取物 1.5、3.0 g 生药/kg 组小鼠腹腔脂肪明显降低($P<0.05$)。见表 4。

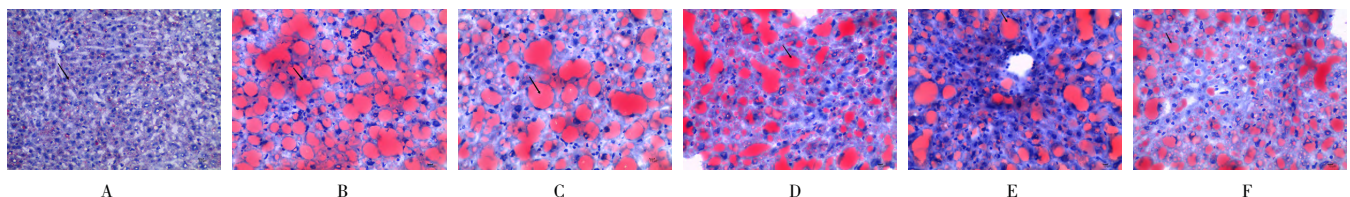
表 4 俄色提取物对 KK-Ay 小鼠皮下脂肪系数和腹腔脂肪系数的影响 ($\bar{x}\pm s$ $n=10$)

组别	剂量/(g/kg)	皮下脂肪质量/ 体质量	腹腔脂肪质量/ 体质量
正常对照		0.4±0.4 **	1.7±0.5 **
模型对照		5.4±1.0	5.5±0.6
罗格列酮	2.67×10 ⁻³	5.3±1.1	4.9±0.5*
俄色提取物	0.75	4.1±1.1*	4.9±0.7
俄色提取物	1.5	4.9±0.4	4.9±0.5*
俄色提取物	3.0	5.3±1.1	4.4±1.0*

2.5 俄色提取物对 KK-Ay 小鼠肝脏油红 O 染色的影响 与正常对照组比较,模型对照组小鼠肝脏组织脂滴面积百分比显著升高($P<0.01$);与模型对照组比较,俄色提取物 1.5、3.0 g 生药/kg 组小鼠肝脏组织脂滴面积百分比明显降低($P<0.05$)。见表 5、图 2。

表 5 俄色提取物对 KK-Ay 小鼠肝脏油红 O 染色的影响 ($\bar{x}\pm s$ $n=10$)

组别	剂量/(g/kg)	脂滴面积/%
正常对照		6±11 **
模型对照		56±10
罗格列酮	2.67×10 ⁻³	43±8
俄色提取物	0.75	49±4
俄色提取物	1.5	41±6*
俄色提取物	3.0	42±2*

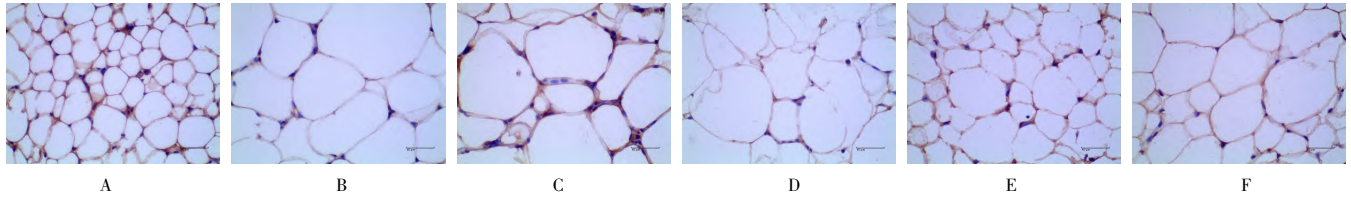
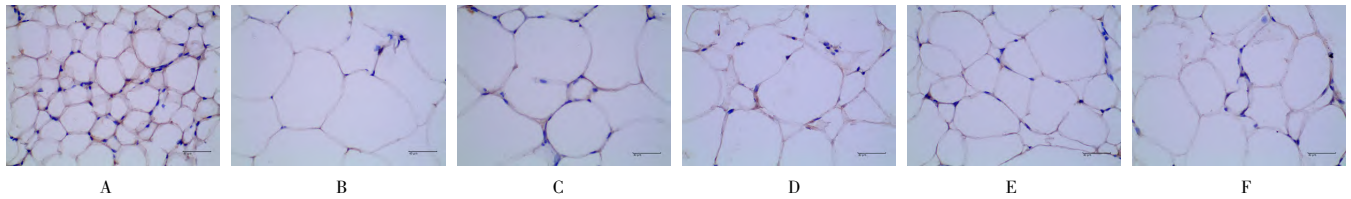


A: 正常对照; B: 模型对照; C: 罗格列酮 2.67 mg/kg; D: 俄色提取物 0.75 g 生药/kg; E: 俄色提取物 1.5 g 生药/kg; F: 俄色提取物 3.0 g 生药/kg(下同)。

图 2 俄色提取物对 KK-Ay 小鼠模型肝脏油红 O 染色的影响($\times 400$)

2.6 俄色提取物对 KK-Ay 小鼠脂肪组织 PPAR- α 、 γ 蛋白表达的影响 与正常对照组比较,模型对照组小鼠脂肪组织 PPAR- α 、 γ 蛋白表达明显降低($P<0.05$);与模型对照组比较,俄色提

取物 1.5、3.0 g 生药/kg 组小鼠脂肪组织 PPAR- α 蛋白表达明显升高($P<0.05$)。见图 3、4、表 6。

图3 俄色提取物对 KK-Ay 小鼠脂肪组织 PPAR- α 蛋白表达的影响(IHC $\times 400$)图4 俄色提取物对 KK-Ay 小鼠脂肪组织 PPAR- γ 蛋白表达的影响(IHC $\times 400$)表6 俄色提取物对 KK-Ay 小鼠模型脂肪组织 PPAR- α 、 γ 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$ $n=10$)

组别	剂量/ (g/kg)	PPAR- α / (平均光密度)	PPAR- γ / (平均光密度)
正常对照		0.259 \pm 0.012*	0.222 \pm 0.005*
模型对照		0.249 \pm 0.010	0.212 \pm 0.007
罗格列酮	2.67 $\times 10^{-3}$	0.254 \pm 0.010	0.216 \pm 0.007
俄色提取物	0.75	0.251 \pm 0.011	0.212 \pm 0.011
俄色提取物	1.5	0.260 \pm 0.005*	0.212 \pm 0.010
俄色提取物	3.0	0.260 \pm 0.009*	0.211 \pm 0.006

2.7 俄色提取物对 KK-Ay 小鼠肾周脂肪组织 *Ppar*、*Tnfa* mRNA 表达的影响 与正常对照组比较,模型对照组小鼠肾周脂肪组织 *Ppar* mRNA 表达显著下调,*Tnfa* mRNA 表达显著上调 ($P<0.01$);与模型对照组比较,罗格列酮 2.67 mg/kg 组、俄色提取物 3.0 g 生药/kg 组小鼠肾周脂肪组织 *Ppar* mRNA 表达显著上调 ($P<0.01$),*Tnfa* mRNA 表达明显下调 ($P<0.05$)。见表 7。

表7 俄色提取物对 KK-Ay 小鼠肾周脂肪组织 *Ppar*、*Tnfa* mRNA 表达影响($\bar{x} \pm s$ $n=10$)

组别	剂量/ (g/kg)	<i>Ppar1</i>		<i>Tnfa1</i>	
		2 $^{-\Delta\Delta Ct}$	2 $^{-\Delta\Delta Ct}$	2 $^{-\Delta\Delta Ct}$	2 $^{-\Delta\Delta Ct}$
正常对照		1.03 \pm 0.25**	1.03 \pm 0.24**		
模型对照		0.60 \pm 0.08	2.10 \pm 0.61		
罗格列酮	2.67 $\times 10^{-3}$	0.96 \pm 0.15**	1.23 \pm 0.32*		
俄色	0.75	0.71 \pm 0.11	1.59 \pm 0.36		
俄色	1.5	0.79 \pm 0.22	1.49 \pm 0.24		
俄色	3.0	0.98 \pm 0.24**	1.30 \pm 0.18*		

3 讨论

本课题组对俄色的前期研究集中在俄色改善糖代谢的作用及其机制,研究证实了俄色可有效降低糖尿病 KK-Ay 小鼠、链脲菌素所致糖尿病小鼠血糖水平。前期研究发现,俄色提取物可通过改善脂代谢从而促进降血糖作用的实现^[15]。本次试验着重进行了俄色提取物对脂代谢的作用研究,结果表明:俄色提取物可降低 KK-Ay 小鼠体质量,减少皮下脂肪和腹腔脂肪累积,延缓 KK-Ay 小鼠肥胖进程。高脂饲料喂养导致 KK-Ay 小鼠血清 FFA、TC 和 TG 含量显著升高和肝脏组织脂滴面积百分比增加,表明 KK-Ay 小鼠出现脂质代谢紊乱。俄色提取物

3.0 g 生药/kg 组能降低小鼠血清 FFA 和 TG 含量,0.75 g 生药/kg 组能降低小鼠血清 TC 含量,表明俄色提取物具有降低血脂水平的作用。血脂异常是冠心病、心肌梗死、心脏性猝死和缺血性脑卒中的独立而重要的危险因素^[16],俄色提取物的降血脂作用有助于降低疾病风险。肝脏脂肪酸合成和/或摄取超过肝脏氧化和/或输出能力时,脂滴就会在肝实质内积聚^[17]。油红 O 染色试验结果证实与模型对照组相比,俄色提取物能降低脂滴面积百分比,减少脂质在肝脏中的积累。

为进一步了解俄色提取物改善 KK-Ay 小鼠脂质代谢的作用机制,本试验探索了俄色提取物对过氧化物酶体增殖物激活受体 α/γ (PPAR α/γ) 的影响。PPAR α 存在于肝脏和脂肪组织中,对脂肪酸 β -氧化、TG 储存和脂质代谢调节起关键作用^[18]。PPAR α 表达下调导致靶基因肉碱棕榈酰转移酶 1 (CPT-1) 转录减少,影响脂肪酸的线粒体 β -氧化过程导致血清 FFA 增加和肝脏脂质积累^[17]。PPAR γ 是脂肪组织中脂肪细胞分化的主要调节剂,PPAR γ 激动剂通过促进脂肪细胞分化来增加胰岛素敏感性小脂肪细胞的数量,在临床上用作抗糖尿病药物^[19,20]。试验结果显示俄色提取物上调 KK-Ay 小鼠肾周脂肪组织 PPAR α 蛋白的表达,并上调 *Ppar* mRNA 表达,但对 PPAR γ 蛋白表达无明显影响,表明俄色提取物可能通过 PPAR α/γ 降低 KK-Ay 小鼠血清和肝脏脂质水平。

血液中长期存在促炎细胞因子会削弱胰岛素敏感组织中胰岛素受体的信号转导能力,影响糖脂代谢稳态^[21]。而内脏脂肪组织已被证明是慢性全身性炎症的主要来源,脂肪细胞肥大诱导促炎性 M1 巨噬细胞募集到脂肪组织基质中,导致促炎因子 TNF- α 的高度表达^[22,23]。TNF- α 上调固醇调节元件结合蛋白 1 (SREBP-1) 表达,促进脂质合成相关基因激活,导致细胞内脂质积聚^[24]。与正常对照组小鼠相比, KK-Ay 小鼠血清 TNF- α 含量升高,实时定量 PCR 检测结果显示肾周脂肪组织 *Tnfa* mRNA 表达上调,而俄色提取物 3.0 g 生药/kg 组小鼠血清 TNF- α 水平和肾周脂肪组织 *Tnfa* mRNA 表达均明显下调,表明俄色提取物抑制 TNF- α 转录,减轻全身炎症。

综上,俄色提取物可降低 KK-Ay 小鼠体质量、皮下和腹腔脂肪系数以及血清 FFA、TC 和 TG 含量,减少肝脏组织脂滴面积百分比,改善 KK-Ay 小鼠脂质代谢紊乱,其作用机制可能与俄色提取物上调肾周脂肪组织 PPAR α 蛋白表达和 PPAR γ 转录以及减轻炎症反应有关。

参考文献

- [1] 宇妥·元丹贡布. 四部医典(藏文版) [M]. 拉萨: 西藏人民出版社, 1982: 330.
- [2] 帝玛尔·丹增彭措. 晶珠本草 [M]. [出版地不详]: [出版社不详] 1745.
- [3] 罗达尚. 新修晶珠本草 [M]. 成都: 四川科学技术出版社. 2004.
- [4] 嘎玛曲培. 甘露本草明镜 [M]. 西藏: 西藏人民出版社. 1993.
- [5] 王道清, 李敏, 石万银. 藏药“俄色”的资源调查及生药学研究 [J]. 中药与临床, 2011, 2(3): 14-16.
- [6] 毛羽, 吴永康, 冯豫川, 等. 苹果属花楸苹果组植物的新用途 [P]. 中国: 200810170831.8, 2008-10-17.
- [7] 李燕, 谢晓芳, 李丹, 等. 俄色总黄酮对糖尿病的药理作用研究 [J]. 中外医疗, 2013, 14: 25.
- [8] 炉霍县林业开发总公司. 一种预防高原反应的胶囊剂的制备方法及其用途 [P]. 中国: 200810166068.1, 2008-10-17.
- [9] 赵军宁, 华桦, 杨安东, 等. 蔷薇科苹果属植物或其提取物的新用途 [P]. 中国: 201310216177.0, 2013-06-04.
- [10] 赵军宁, 华桦, 杨安东, 等. 一种变叶海棠提取物及其制备方法和其用途 [P]. 中国: ZL201410259005.6, 2016-08-17.
- [11] 李丹, 彭成, 谢晓芳, 等. 藏药俄色不同提取物降血糖作用比较 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(21): 199-203.
- [12] 张惜燕, 胡勇, 邢玉瑞. 糖尿病现代中医创新病机辨析 [J/OL]. 世界中医药, 1-9 [2022-02-21]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.5529.R.20210319.1211.014.html>.
- [13] 四川省食品药品监督管理局. 四川省藏药材标准 [M]. 2014 版. 成都: 四川科学技术出版社, 2014.
- [14] 华桦, 刘刚, 刘芳, 等. 变叶海棠提取物对糖尿病 KK-Ay 小鼠糖代谢作用及机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2021, 37(4): 60-64. DOI: 10.13412/j.cnki.zyyl.2021.04.008.
- [15] 罗园, 华桦, 曾安琪, 等. 变叶海棠提取物对链脲佐菌素所致糖尿病小鼠的作用研究 [J]. 中药药理与临床, 2020, 36(1): 115-120.
- [16] 李木元. 我国血脂异常人数已超 1.6 亿 [N]. 人民政协报, 2015-04-08 (005).
- [17] Souza-Mello V. Peroxisome proliferator-activated receptors as targets to treat non-alcoholic fatty liver disease [J]. World J Hepatol, 2015, 7(8): 1012-1019.
- [18] Yibing Lv, Ji Hao, Chang Liu, et al. Anti-diabetic effects of a phenolic-rich extract from *Hypericum attenuatum Choisy* in KK-Ay mice mediated through AMPK/P13K/Akt/GSK3 β signaling and GLUT4, PPAR γ , and PPAR α expression [J]. Journal of Functional Foods, 2019, 4(61): 103506.
- [19] Takahashi A, Ishizaki M, Kimira Y, et al. Erucic Acid-Rich Yellow Mustard Oil Improves Insulin Resistance in KK-A(y) Mice [J]. Molecules, 2021, 26(3): 546.
- [20] Ito Y, Yamamoto M, Furukawa S, et al. Effects of KY-903, a Novel Tetrazole-Based Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Modulator, in Male Diabetic Mice and Female Ovariectomized Rats [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2021, 44(5): 659-668.
- [21] Felix M Wensveen, Sonja Valentić, Marko Šestan, et al. The "Big Bang" in obese fat: Events initiating obesity-induced adipose tissue inflammation [J]. Eur J Immunol, 2015, 45(9): 2446-2456.
- [22] Shinichi Saitoh, Koen Van Wijk, Osamu Nakajima. Crosstalk between Metabolic Disorders and Immune Cells [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(18): 10017.
- [23] Fujisaka S, Usui I, Bukhari A, et al. Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice [J]. Diabetes, 2009, 4(58): 2574-2582.
- [24] 张松, 朱琳, 郝军, 等. 血清 TNF- α 升高对糖尿病肾脏脂质积聚的影响研究 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(8): 1161-1165.

Effects of Tibetan Medicine Ese in Treatment of Lipid Metabolism Disorders in KK-Ay Mice*

Hua Hua¹, Liu Li¹, Liu Fang², Zhu Ning¹, Zhao Junning^{1**}

(¹Sichuan Institute for Translational Chinese Medicine, Translational Chinese Medicine Key Laboratory of Sichuan Province, Biological Assay Key Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine for Traditional Chinese Medicine Quality, Engineering Research Center for Formation Principle and Quality Evaluation of Genuine Medicinal Materials in Sichuan Province, Sichuan Engineering Technology Research Center of Genuine Regional Drug, Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041; ²West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041)

Objective: To investigate the effects and underlying mechanism of Tibetan medicine Ese on lipid metabolism disorders in KK-Ay mice. **Methods:** Ten C57BL/6J mice were assigned to a normal control group. Fifty KK-Ay model mice were randomly divided into a model control group, a rosiglitazone (2.67 mg/kg) group, and low-, medium-, and high-dose Ese extract groups (0.75 g, 1.5 g, and 3.0 g/kg crude drug), with 10 mice in each group according to fasting blood glucose levels. The serum levels of free fatty acid (FFA), triglyceride (TG), total cholesterol (TC), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were determined after 35 days of continuous administration by gavage. Lipid content in liver tissues was detected by oil red O staining. The protein expression of peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR- α) and peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) in perirenal adipose tissues was determined by the immunohistochemical method. The mRNA expression of PPAR and TNF- α was detected by real-time quantitative PCR. **Results:** Compared with the normal control group, the model control group showed increased body weight, increased serum content of FFA, TG, TC, and TNF- α ($P < 0.01$), elevated subcutaneous fat and abdominal fat coefficients, increased percentage of lipid droplet expression area in liver tissues ($P < 0.01$), reduced protein expression of PPAR- α and PPAR- γ in adipose tissues, and down-regulated PPAR mRNA expression in perirenal adipose tissues ($P < 0.05$). Compared with the model control group, the medium- and high-dose Ese extract groups displayed reduced body weight and subcutaneous fat coefficient ($P < 0.05$), decreased percentage of lipid droplet expression area in liver tissues, increased protein expression of PPAR- α in adipose tissues, and up-

regulated expression of PPAR mRNA in perirenal adipose tissues ($P<0.01$ or $P<0.05$). In the high-dose Ese extract group, the serum levels of FFA, TG, and TNF- α decreased and the expression of TNF- α mRNA in perirenal adipose tissues was reduced ($P<0.01$ or $P<0.05$). In the low-dose Ese extract group, the serum TC level was reduced and the subcutaneous fat coefficient was also reduced ($P<0.05$). **Conclusion:** Tibetan medicine Ese can improve lipid metabolism disorders in KK-Ay mice, and the underlying mechanism may be related to the up-regulation of PPAR- α protein expression and PPAR- γ transcription in perirenal adipose tissues to alleviate inflammatory responses.

Key words Ese mice with spontaneous type 2 diabetes, lipid metabolism, PPAR- γ , TNF- α

基于网络药理学分析土茯苓-石韦药对治疗衰老相关慢性肾脏病的作用机制*

李志强^{2,3}, 朱婧婧², 周熙谋², 王昉², 何伟明^{1**}

(¹南京中医药大学附属医院江苏省中医院, 南京 210029; ²南京中医药大学, 南京 210046;

³第一临床医学院临床医学实验研究中心, 南京 210046)

摘要 目的: 采用网络药理学方法和实验验证, 分析土茯苓-石韦药对治疗衰老相关慢性肾脏病(aging-related chronic kidney disease, ARCKD)的有效成分、潜在作用靶点及机制, 为其临床应用提供理论基础。方法: 借助中药系统药理学数据库及分析平台(TCMSP)筛选该药对的有效成分, 使用TCMSP、STITCH和SWISS数据库获取该药对的潜在作用靶点, 并利用UniProt数据库将靶点蛋白规范化。利用The Human Phenotype Ontology、DisGeNET和Therapeutic Target Database(TTD)数据库进行疾病靶点筛选后, 与药物靶点交集获取ARCKD的潜在作用靶点。通过Cytoscape软件构建“药物-活性成分-靶点”网络, 将潜在作用靶点导入STRING数据库再构建蛋白互相作用(PPI)网络, 进行深入分析。通过DAVID平台进行基因本体(GO)功能富集和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析, 并检测马兜铃酸(AAI)模型小鼠的肾功能和病理染色, 检测马兜铃酸诱导的NRK-52E细胞肿瘤蛋白P53(TP53)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1A(P21)、 α -平滑肌激动蛋白(α -SMA)、波形蛋白(Vimentin)的表达。结果: 土茯苓-石韦药对治疗衰老相关慢性肾脏病的有效成分有17个, 潜在作用靶点112个, PPI靶点筛选分析获得核心靶点6个, 重要靶点27个, 次要靶点36个, 构成以TP53为中心的复杂作用网络。GO功能富集涉及532个条目, 主要影响衰老、氧化还原、炎症应答、细胞增殖的正性调节等过程; KEGG通路富集获得137条, 涉及P53、癌症、NF- κ B和AMPK等相关通路。动物实验结果表明, 与模型对照组相比, 土茯苓-石韦药对及槲皮素能改善小鼠的血肌酐、尿素氮、尿酸、尿蛋白及病理损伤; 细胞实验结果证实, 该药对的共有活性成分(槲皮素)能改善马兜铃酸诱导的细胞衰老与损伤, 下调P53、P21、 α -SMA、Vimentin蛋白的表达。结论: 土茯苓-石韦药对以TP53为核心的复杂网络调节发挥肾脏保护作用, 槲皮素是其关键活性成分。该药对和槲皮素能改善AAI模型小鼠肾功能以及肾脏病理损伤, 其中槲皮素可有效改善AAI诱导的细胞衰老与损伤, 其机制可能与下调P53信号通路有密切关系。

关键词 土茯苓; 石韦; 网络药理学; 衰老; 慢性肾脏病

慢性肾脏病(CKD)是指肾脏结构或功能异常的持续时间 ≥ 3 个月, 对健康有影响的肾脏疾病^[1]。肾脏是最容易老化的器官之一, 与一般人群相比, CKD患者的肾脏衰老过程大大加速^[2], 衰老日益成为CKD发生发展的独立危险因素。前期研究显示, 江苏省中医院CKD就诊人群里中老年比例约为72%^[3], 而另一项研究表明改善肾小管上皮细胞衰老的同时可改善上皮细胞间充质转化^[4], 这提示干预肾脏细胞衰老可能是拮抗肾纤维化的新方向。

邹氏肾科传承于一代名医邹云翔教授, 国医大师邹燕勤教授师承其父, 认为肾气衰退和气血不足为ARCKD发病之本, 并常兼夹湿热、水湿、瘀血等^[5]。其后孙伟教授创新性提出护肾延“衰”理念, 并系统性归纳为“肾虚湿(热)瘀”理论, 以“益肾清利活血”为治疗大法^[6], 临床上取得了很好的疗效。在此基础上, 前期通过数据挖掘发现土茯苓和石韦为清利法的核心药

对之一^[3], 但目前关于该药对治疗ARCKD的化学成分和作用机制研究较少。网络药理学基于系统生物学理论, 整合了众多数据库资源, 生物信息学和药理学等方法, 应用系统调节的整体观, 为我们认识中医药配伍应用, 多靶点、多机制调控疾病提供了思路^[7]。因此本研究利用网络药理学识别和预测该药对治疗ARCKD的活性成分、作用靶点和通路, 并利用AAI诱导肾脏细胞衰老与损伤^[8], 通过细胞实验验证关键通路机制, 动物实验验证药效, 为其临床应用和科学阐释提供了证据和支持。

1 材料和方法

1.1 试验药物 土茯苓(*Smilax glabra* Roxb.)为百合科植物光叶菝葜的根状茎, 石韦(*Pyrrosia lingua* (Thunb.) Farwell)为水龙骨科植物石韦的干燥叶, 购于江苏省中医院, 并由药学部田磊

* 基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81774269); 江苏省研究生科研与实践创新计划项目(编号: KYCX20_1527)。

** 通信作者: 何

伟明, 主任中医师, 硕士生导师, E-mail: mousehwm@163.com;

作者简介: 李志强, 硕士研究生, 从事中医内科学肾病方向研究, E-mail:

784430419@qq.com。