基于SREBPs通路的益肾通络方改善脂质代谢异常作用机制研究Δ

赵　靓[1*]，张效威[1]，谢治深[1]，向世勰[1]，段亚飞[1]，高　改[1]，王　潘[1]，马慧芬[1]，孙意冉[1]，陈　洁[2]，徐江雁[1]，张振强[1#]（1.河南中医药大学中医药科学院，郑州　450046；2.马来西亚管理与科技大学国际学术部，马来西亚 雪兰莪州 莎阿南市　47300）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）23-2835-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.23.04

摘　要　目的　基于固醇调节元件结合蛋白（SREBPs）通路探究益肾通络方改善脂质代谢异常的作用机制。**方法**　以C57BLKS/J（*db*/*db*）小鼠为模型动物、C57BLKS/J（*db*/*m*）小鼠为正常对照，通过测定小鼠肝脏系数及血清中总胆固醇（TC）、甘油三酯（TG）、低密度脂蛋白（LDL）、高密度脂蛋白（HDL）含量，观察小鼠肝组织脂肪变性和脂质蓄积情况，测定小鼠肝组织中SREBP-1、SREBP-2蛋白和*Srebp-1c*、*Srebp-2*及其下游脂质代谢相关靶基因（*Fasn*、*Acc1*、*Scd5*、*Fads1*、*Hmgcr*、*Dhcr24*、*Insig-1*、*Fdps*）的mRNA转录水平，来考察1、2.5、5 g/kg益肾通络方改善*db*/*db*小鼠脂质代谢异常的作用机制。以低脂培养的人肝癌细胞HepG2为体外脂质代谢异常细胞模型，以25-HC（SREBPs抑制剂，10 μmol/L）为抑制剂对照，考察125、250、500 μg/mL益肾通络方干预24 h后对细胞中SREBP-1、SREBP-2蛋白和*SREBP-1c*、*SREBP-2*其下游脂质代谢相关靶基因mRNA转录水平的影响，进行体外机制验证。**结果**　1、2.5、5 g/kg益肾通络方均可显著降低模型小鼠TC、TG、LDL水平，显著降低肝组织脂滴阳性面积百分比、肝脏系数，显著下调肝组织中Pre-SREBP-1、n-SREBP-1、Pre-SREBP-2、n-SREBP-2蛋白以及*Srebp-1c*、*Srebp-2*及其下游靶基因的mRNA转录水平，并可显著升高HDL水平，差异均有统计学意义（$P<0.05$或$P<0.01$）。体外细胞实验中，125、250、500 μg/mL益肾通络方作用24 h后细胞中上述蛋白及基因的表达的变化与动物实验一致，且抑制剂对照与250、500 μg/mL益肾通络方给药后细胞中上述蛋白和基因表达水平相比差异均无统计学意义（$P>0.05$）。**结论**　益肾通络方可能通过调控转录因子SREBPs表达，进而抑制脂肪酸及胆固醇合成相关基因的高表达，促进TC、TG的降解，改善脂质代谢异常，抑制脂质蓄积，从而发挥降脂作用。

关键词　益肾通络方；脂质代谢异常；固醇调节元件结合蛋白；脂质蓄积；转录因子

Study on the mechanism of Yishen tongluo formula improving abnormal lipid metabolism based on SREBPs pathway

ZHAO Liang[1], ZHANG Xiaowei[1], XIE Zhishen[1], XIANG Shixie[1], DUAN Yafei[1], GAO Gai[1], WANG Pan[1], MA Huifen[1], SUN Yiran[1], CHEN Jie[2], XU Jiangyan[1], ZHANG Zhenqiang[1]（1. Academy of Chinese Medical Sciences, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. International Academic Affairs Department, Management and Science University, Selangor Darul Ehsan Shah Alam 47300, Malaysia）

ABSTRACT　OBJECTIVE To explore the mechanism of Yishen tongluo formula (YSTLF) in improving abnormal lipid metabolism based on the sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) pathway. **METHODS** Using C57BLKS/J (*db*/*db*) mice as model and C57BLKS/J (*db*/*m*) mice as normal control, the mechanism of 1, 2.5 and 5 g/kg YSTLF improving abnormal lipid metabolism of *db*/*db* mice was investigated by determining the liver coefficient, the contents of serum total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein (HDL), observing steatosis and lipid accumulation in liver tissue of mice, detecting the protein expressions of SREBP-1 and SREBP-2 as well as mRNA transcription levels of *Srebp-1c*, *Srebp-2* and their downstream lipid metabolism-related target genes (*Fasn*, *Acc1*, *Scd5*, *Fads1*, *Hmgcr*, *Dhcr24*, *Insig-1*, *Fdps*) in liver tissue of mice. Using low-fat cultured human liver cancer cell HepG2 as an *in vitro* cell model for abnormal lipid metabolism, and 25-HC (SREBPs inhibitor, 10 μmol/L) as the control, the effects of 125, 250 and 500 μg/mL YSTLF on protein expressions of SREBP-1 and SREBP-2 as well as mRNA transcription of *SREBP-1c*, *SREBP-2* and their downstream lipid metabolism-related target genes were investigated to verify the mechanism *in vitro*. **RESULTS** 1, 2.5, 5 g/kg YSTLF significantly reduced the levels of TC, TG and LDL, the percentage of lipid droplet-positive region in liver tissue and liver coefficient, significantly down-regulated protein expressions of Pre-SREBP-1, n-SREBP-1, Pre-SREBP-2 and n-SREBP-2, and mRNA transcription of *Srebp-1c*, *Srebp-2* and their downstream target genes in liver tissue, while significantly increased HDL level, with statistical significance ($P<0.05$ or

Δ**基金项目**　国家重点研发计划项目（No.2020YFE0201800）；河南省重点研发专项（No.221111520300）；河南省重点研发与推广专项（科技攻关）（No.232102310454）

＊**第一作者**　硕士研究生。研究方向：中西医结合治疗慢性代谢性疾病。E-mail：525651451@qq.com

＃**通信作者**　教授，博士生导师，博士。研究方向：中西医结合防治重大慢性代谢性疾病。E-mail：zhang_zhenqiang@126.com

$P<0.01$). In the cell experiment *in vitro*, the expressions of the above-mentioned proteins and genes in the cells treated with YSTLF at 125, 250 and 500 μg/mL for 24 hours were consistent with those in the animal experiment; there was no significant difference in the expressions of the above-mentioned proteins and genes between inhibitor control group and 250, 500 μg/mL YSTLF groups ($P>0.05$). **CONCLUSIONS** YSTLF can regulate the expression of transcription factor SREBPs, so as to inhibit the high expression of fatty acid and cholesterol synthesis-related genes, promote the degradation of TC and TG, improve the abnormality of lipid metabolism and inhibit lipid accumulation, thus playing the role of lipid-lowering.

KEYWORDS Yishen tongluo formula; abnormal lipid metabolism; sterol regulatory element binding proteins; lipid accumulation; transcription factors

脂质代谢异常是指脂类成分在合成到分解过程中出现异常，导致脂质蓄积，血浆中脂蛋白的水平、结构和功能发生改变[1-2]。脂质代谢异常是脂肪性肝病、动脉粥样硬化、糖尿病及其并发症、肥胖等代谢相关疾病的重要致病因素，已经严重影响人们的生活质量[3]。脂质代谢异常与固醇调节元件结合蛋白（sterol regulatory element binding proteins，SREBPs）及其调控的下游靶基因水平密切相关[4-5]。SREBPs亚型中SREBP-1c主要调节游离脂肪酸合成并参与胰岛素介导的葡萄糖代谢和胰岛素抵抗[6-7]；SREBP-2是胆固醇和脂质从头生物合成的主要转录调节因子，其靶基因编码多种关键脂肪生成酶[8-9]。

中医理论认为肾虚血瘀与脂质代谢异常密切相关，肾虚衰则脏腑功能失常，阴阳失调，气化失司，开阖失度，瘀血壅积于内，导致脂质代谢紊乱[10-11]。治疗则当补益肾脾、健运理气、活血化瘀、祛痰化脂。益肾通络方是基于以上组方理论形成的中药验方，由丹参、黄芪、山茱萸、大黄、熟地黄、血竭、鬼箭羽7味中药组成。方中熟地黄益肾填精，为君药；黄芪甘温而益元气、补肾助脾、内消痰脂，山茱萸配伍补益肝肾而助阴阳，二者共为臣药；丹参、大黄逐瘀祛痰，佐以鬼箭羽通络兼化痰脂，三者共为佐药；血竭行瘀消脂，又善散瘀生新，为使药。诸药合用，共奏益肾通络、祛痰化脂之功，主要用于肾虚血瘀所致脂质代谢异常的治疗。

现代药理学研究表明，益肾通络方中黄芪、丹参、大黄等均具有改善脂代谢异常的作用，并且在临床及基础实验中观察到其改善脂质代谢的功效显著[10-13]。然而益肾通络方改善脂质代谢异常的作用及分子机制仍有待进一步确证和阐明。因此，本研究利用C57BLKS/J（*db/db*）转基因小鼠及人肝癌细胞HepG2分别建立体内外脂质代谢异常模型，探究益肾通络方调节脂质代谢异常、改善脂质蓄积的作用及可能的分子机制，以期为益肾通络方改善脂质代谢异常提供科学依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有：Eclipset S100型倒置显微镜（日本Nikon公司），LightCycler96型实时荧光定量PCR仪（美国Roche公司），PAC300型电泳仪、转膜仪、ChemiDoc XRS型自动凝胶成像系统（美国Bio-Rad公司），Forma Series Ⅱ Water Jacket型二氧化碳细胞培养箱（美国Thermo Fisher Scientific公司）。

1.2 主要药品与试剂

熟地黄（批号HNTCM-20220519）、黄芪（批号HNTCM-20220520）、山茱萸（批号HNTCM-20220521）、丹参（批号HNTCM-20220522）、大黄（批号HNTCM-20220523）、鬼箭羽（批号HNTCM-20220524）、血竭（批号HNTCM-20220525）等饮片均购自中国仁和制药有限公司，由河南中医药大学药学院王辉教授鉴定为真品。

DMEM培养基（批号10013CVRC）购自美国Corning公司；F-12K培养基（批号2360245）购自美国Gibco公司；低脂血清购自美国Kalen Biomedical公司；BeyoRT™ Ⅲ cDNA第一链合成试剂盒（批号103118190503）购自碧云天生物技术公司；25-羟基胆固醇（25-hydroxycholesterol，25HC）（批号113134）购自美国Med Chem Express公司；潮霉素B（批号V900372）购自德国Roche公司；甘油三酯（triglyceride，TG）、总胆固醇（total cholesterol，TC）、低密度脂蛋白（low-density lipoprotein，LDL）和高密度脂蛋白（high-density lipoprotein，HDL）试剂盒（批号分别为E-BC-K261-M、E-BC-K109-M、E-EL-M1363c、E-EL-M1402c）均购自武汉ElabScience公司；Power Up™ SYBR™ Green PCR Master Mix试剂盒（批号00837276）购自美国Thermo Fisher Scientific公司；鼠源β-肌动蛋白（β-actin）单克隆抗体（货号sc8432）购自美国Santa Cruz公司；鼠源SREBP-1单克隆抗体、兔源SREBP-2多克隆抗体（货号ab3259、ab30682）均购自英国Abcam公司；辣根过氧化物酶（HRP）标记的山羊抗兔免疫球蛋白G（IgG）二抗、HRP标记的山羊抗小鼠IgG二抗（货号SA00001-2、SA00001-1）均购自武汉Proteintech公司。

1.3 动物

本研究所用动物为8周龄雄性C57BLKS/J（*db/db*）小鼠和同窝对照小鼠（*db/m*），共60只，购自江苏集萃药康生物技术股份有限公司，实验动物生产许可证号为SCXK（苏）2018-0008。小鼠购入后饲养于河南中医药大学动物实验中心动物房中。饲养环境温度为（26±3）℃，湿度为（55±5）%，光照/黑暗周期为12 h/12 h。适应性饲养1周后进行实验。所有动物实验方案均经河南中医药大学实验动物伦理委员会审查通过（伦理号

DWLL202108002）。

1.4 细胞

人肝癌细胞HepG2购自美国菌种保藏中心。

2 方法

2.1 益肾通络方对*db*/*db*小鼠脂质代谢异常影响的体内实验

2.1.1 动物分组与给药

将C57BLKS/J（*db*/*db*）小鼠按随机数字表法分为模型组（后文统一为“*db*/*db*组”，予生理盐水）和益肾通络方低、中、高剂量组（1、2.5、5 g/kg，其中的中剂量为人临床等效剂量），每组12只；另取12只C57BLKS/J（*db*/*m*）小鼠作为正常对照组（后文统一为“*db*/*m*组”，予生理盐水）。各组小鼠每天灌胃药物/生理盐水1次，连续8周。

2.1.2 样本取材及肝脏系数测定

所有小鼠在灌胃8周后，称体重，然后眼眶取血并以3 000 r/min离心20 min，取血清，后续用于检测血脂四项。摘除小鼠肝脏并称重，计算肝脏系数：肝脏系数（%）＝肝重（g）/体重（g）×100%。将一部分肝脏用4%多聚甲醛固定，另一部分在－80 ℃冰箱中冷冻保存。

2.1.3 小鼠血脂四项检测

取“2.1.2”项下血清，按照相应试剂盒说明书操作，检测血清中TC、TG、LDL和HDL水平。

2.1.4 小鼠肝组织脂质蓄积情况检测

取“2.1.2”项下用4%多聚甲醛固定24 h的肝组织，常规石蜡包埋切片（厚度4 μm），蒸馏水浸洗，60%异丙醇浸洗2 min，37 ℃油红O染色10 min，60%异丙醇调色后，蒸馏水洗，苏木素复染1.5 min，冲洗后甘油封片。显微镜下观察肝组织脂肪变性及肝组织脂质蓄积情况，阳性表达呈红色。使用Image Pro Plus软件计算红色的阳性区域面积，计算脂滴阳性面积百分比：脂滴阳性面积百分比（%）＝红色脂滴面积/所测视野面积×100%。

2.1.5 小鼠肝组织中*SREBPs*靶基因表达检测

采用RT-qPCR法检测小鼠肝组织中*SREBPs*靶基因的mRNA表达。取“2.1.2”项下冻存的小鼠肝组织，每组选取3只小鼠的样本，采用Trizol法提取组织中总RNA，使用Nanodrop2000系统测定总RNA浓度。按BeyoRT™ Ⅲ cDNA第一链合成试剂盒说明书操作将RNA逆转录成cDNA，并以cDNA为模板进行PCR扩增。PCR扩增条件如下：93 ℃预变性60 s；93 ℃变性60 s，55 ℃退火30 s，72 ℃延伸30 s，循环40次。以β-actin为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法分析目的基因mRNA表达水平。实验重复3次。引物序列及扩增产物大小见表1（引物由郑州点睛科技有限公司设计并合成）。

2.1.6 小鼠肝组织中SREBPs蛋白表达检测

采用Western blot法检测小鼠肝组织中SREBP1、SREBP2蛋白表达。取“2.1.2”项下冻存的小鼠肝组织，每组选取3只小鼠的样本，解冻后用含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液提取组织中总蛋白，以BCA法对总蛋白进行定量。取20 μg高温变性的蛋白进行SDS-PAGE电泳（电泳时间90 min，电压80 V转120 V），并转印到活化的PVDF膜上（转膜电流350 mA，转膜时间120 min），5%脱脂奶粉封闭2 h。加入SREBP1、SREBP2、β-actin一抗（稀释比例均为1∶1 000），4 ℃孵育过夜。用TBST洗涤3次后，加入HRP标记的山羊抗兔及山羊抗小鼠IgG二抗（稀释比例均为1∶10 000），室温孵育2 h。使用ECL Plus超敏发光液孵育条带，并用ChemiDoc XRS系统显影。采用ImageJ V1.8.0软件进行灰度值统计分析，以目的蛋白与内参（β-actin）蛋白条带灰度值的比值表示SREBP1、SREBP2蛋白的表达水平。实验重复3次。

表1 小鼠和细胞SREBP靶基因检测的引物序列及扩增产物大小

种属	基因	上游引物序列（5′→3′）	下游引物序列（5′→3′）	扩增产物大小/bp
小鼠	*Srebp-1c*	GATGTGCGAACTGGACACAG	CATAGGGGGCGTCAAACAG	104
	Acc1	CGCCAACAATGGTATTGCAGC	TCGGATTGCACGTTCATTTCG	82
	Fasn	AGAGATCCCGAGACGCTTCT	GCTTGGTCCTTTGAAGTCGAAGA	91
	Fads1	AGCACATGCCATACAACCATC	TTTCCGCTGAACCACAAAATAGA	113
	Scd5	TTCTTGCGATACACTCTGGTGC	CGGGATTGAATGTTCTTGTCGT	97
	β-Actin	GGCTGTATTCCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT	125
	Srebp-2	GTTGACCACGCTGAAGACAGA	CACCAGGGTTGGCACTTGAA	115
	Dhcr24	ACCACTTCGTGGAAGGGTTG	ACTGCCAATGCTATTCAGCTTG	104
	Fdps	GGGTTTGACCGTGGTACAAG	AAGCCTGGAGCAGTTCTACAC	113
	Hmgcr	AGCTTGCCCGAATTGTATGTG	TCTGTTGTGAACCATGTGACTTC	104
	Insig-1	TGTCGGTTTACTGTATCCCTGT	GTTGATGCCAACGAACACGG	109
人	*SREBP-1c*	ACAGTGACTTCCCTGGCCTAT	GCATGGACGGGTACATCTTCAA	98
	ACC1	ATGTCTGGCTTGCACCTAGTA	CCCCAAAGCGAGTAACAAATTCT	112
	FASN	CCGAGACACTCGTGGGCTA	CTTCAGCAGGACATTGATGCC	96
	FADS1	CCAACTGCTTCCGCAAAGAC	GCTGGTGGTTGTACGGCA TA	105
	SCD5	TCTAGCTCCTATACCACCACCA	TCGTCTCCAACTTATCTCCTCC	111
	β-ACTIN	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	CTCCTTAATGTCACGCACGAT	126
	SREBP-2	AACGGTCATTCACCCAGGTC	GGCTGAAGAATAGGAGTTGCC	103
	DHCR24	GCCGCTCTCGCTTATCTTCG	GTCTTGCTACCCTGCTCCTT	97
	FDPS	TGATTGACCTTTCCAGAGCAAG	CTAAAATTGCCATTCCACGAGC	108
	HMGCR	CCTGGCATCATCGCCTGTT	AGAGTGACATTCCTCTGGATCTG	106
	INSIG-1	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	CTCCTTAATGTCACGCACGAT	93

每组选取3只小鼠的样本，解冻后用含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液提取组织中总蛋白，以BCA法对总蛋白进行定量。取20 μg高温变性的蛋白进行SDS-PAGE电泳（电泳时间90 min，电压80 V转120 V），并转印到活化的PVDF膜上（转膜电流350 mA，转膜时间120 min），5%脱脂奶粉封闭2 h。加入SREBP1、SREBP2、β-actin一抗（稀释比例均为1∶1 000），4 ℃孵育过夜。用TBST洗涤3次后，加入HRP标记的山羊抗兔及山羊抗小鼠IgG二抗（稀释比例均为1∶10 000），室温孵育2 h。使用ECL Plus超敏发光液孵育条带，并用ChemiDoc XRS系统显影。采用ImageJ V1.8.0软件进行灰度值统计分析，以目的蛋白与内参（β-actin）蛋白条带灰度值的比值表示SREBP1、SREBP2蛋白的表达水平。实验重复3次。

2.2 益肾通络方改善细胞脂质代谢异常的体外实验

2.2.1 细胞培养及体外脂质代谢异常模型的构建

由于HepG2细胞在低脂血清条件下培养时，细胞中SREBPs会稳定表达[14]，因此，本研究参考文献[15]采用低脂培养的方法构建体外HepG2细胞脂质代谢异常模型，具体操作如下：将细胞接种在含5%胎牛血清、1%青霉素-链霉素的DMEM培养基中，在37 ℃、5%CO_2条件培养24 h，待细胞生长至融合度达到70%时，将细胞转移至低脂血清培养基[DMEM培养基-F12K培养基（1∶1，*V*/*V*），加入5%低脂血清（LPDS）、50 μmol/L甲羟戊酸钠、10 μmol/L美伐他汀和1%青霉素-链霉素，上述各样品的总体积占5%]中继续培养24 h。

2.2.2　RT-qPCR法检测细胞中*SREBPs*靶基因表达

将HepG2细胞接种于6孔培养板内，铺板密度为3×10^4个/孔，置于CO_2培养箱内培养24 h后，将细胞分为对照组、抑制剂组（SREBPs抑制剂25-HC，10 μmol/L，浓度依据文献[15]及前期细胞存活实验结果设置）、不同浓度（125、250、500 μg/mL）益肾通络方给药组（根据前期细胞存活实验结果及浓度等比原则，选择此给药浓度），每组设置3个复孔。各组细胞经含药/空白培养基处理24 h后，弃上清。磷酸盐缓冲液（PBS）清洗细胞3次，胰酶消化，用PBS吹打均匀后转移至EP管中，以1 500 r/min离心5 min，收集细胞。按“2.1.5”项下方法检测细胞中*SREBPs*靶基因水平。实验重复3次。

2.2.3　Western blot法检测细胞中SREBP蛋白表达

细胞按照“2.2.2”项下方法接种、给药培养后，按“2.1.6”项下方法提取细胞总蛋白、定量，取50 μg高温变性的蛋白电泳并测定SREBP蛋白表达。实验重复3次。

2.3　统计学方法

采用Graph Pad Prism 6.0软件对数据进行统计分析。定量数据进行正态分布及方差齐性检验，若两者均满足，计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD检验；若不符合正态分布，采用Kruskal-Wallis检验；若方差不齐性采用Welch's ANOVA检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3　结果

3.1　体内实验结果

3.1.1　益肾通络方对*db*/*db*小鼠血脂四项的影响

与*db*/*m*组比较，*db*/*db*组小鼠血清中TC、TG、LDL水平显著升高（$P<0.01$），HDL水平显著降低（$P<0.01$）；与*db*/*db*组比较，益肾通络方低、中、高剂量组小鼠血脂四项均显著逆转（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见表2（因*db*/*db*小鼠本身有基因缺陷，在生长过程中，模型组有小鼠发生严重糖尿病症状，皮肤溃烂死亡，因此样本量为10）。

表2　各组小鼠的血脂四项测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=10$，mmol/L）

组别	TC	TG	LDL	HDL
db/*m*组	2.51±0.25	0.87±0.42	0.39±0.49	5.04±0.73
db/*db*组	6.26±0.63[a]	1.92±0.38[a]	5.98±0.79[a]	0.94±0.27[a]
益肾通络方低剂量组	4.45±0.24[b]	1.56±0.47[c]	2.03±0.27[b]	1.64±0.27[b]
益肾通络方中剂量组	4.67±0.34[c]	1.44±0.59[b]	1.64±0.14[b]	2.67±0.44[b]
益肾通络方高剂量组	4.24±0.58[b]	1.14±0.64[b]	1.09±0.26[b]	4.23±0.39[b]

a：与*db*/*m*组比较，$P<0.01$；b：与*db*/*db*组比较，$P<0.01$；c：与*db*/*db*组比较，$P<0.05$。

3.1.2　益肾通络方对*db*/*db*小鼠肝组织脂质蓄积及肝脏系数的影响

与*db*/*m*组比较，*db*/*db*组小鼠肝组织可见大量脂滴聚集，脂滴阳性面积百分比、肝脏系数均显著升高（$P<0.01$）。与*db*/*db*组比较，益肾通络方低、中、高剂量组小鼠肝组织脂滴阳性面积百分比、肝脏系数均显著降低（$P<0.01$）。结果见图1、表3（因在油红染色过程中有个别样本染色失败，因此样本量为9）。

表3　各组小鼠肝组织脂滴阳性面积百分比及肝脏系数测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=9$，%）

组别	脂滴阳性面积百分比	肝脏系数
db/*m*组	1.03±0.34	4.63±0.02
db/*db*组	20.22±0.29[a]	7.73±0.02[a]
益肾通络方低剂量组	11.26±0.37[b]	5.32±0.03[b]
益肾通络方中剂量组	9.36±0.29[b]	4.49±0.03[b]
益肾通络方高剂量组	4.85±0.35[b]	4.43±0.01[b]

a：与*db*/*m*组比较，$P<0.01$；b：与*db*/*db*组比较，$P<0.01$。

3.1.3　益肾通络方对*db*/*db*小鼠SREBPs蛋白表达的影响

与*db*/*m*组比较，*db*/*db*组小鼠肝组织中Pre-SREBP-1、n-SREBP-1、Pre-SREBP-2、n-SREBP-2蛋白表达显著上调（$P<0.05$或$P<0.01$）；与*db*/*db*组比较，益肾通络方各剂量组小鼠肝组织中上述蛋白表达均显著下调（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见图2、表4。

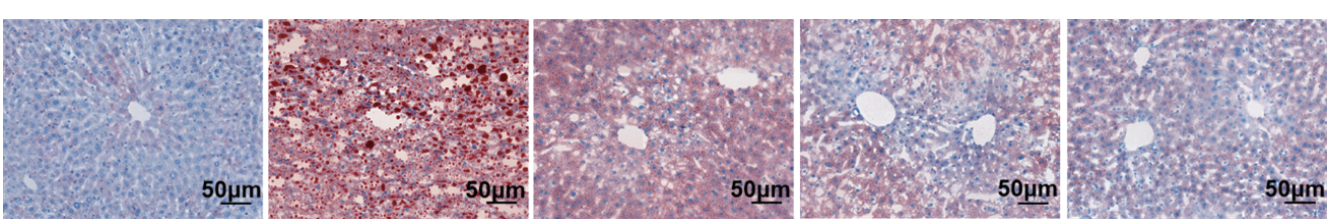
3.1.4　益肾通络方对*db*/*db*小鼠*Srebp-1c*、*Srebp-2*及其靶基因表达的影响

与*db*/*m*组比较，*db*/*db*组小鼠肝组织中*Srebp-1c*及其下游靶基因*Fasn*、*Acc1*、*Scd5*、*Fads1*，*Srebp-2*及其下游靶基因*Hmgcr*、*Dhcr24*、*Insig-1*、*Fdps*的mRNA转录水平均显著升高（$P<0.01$）；与*db*/*db*组比较，各给药组小鼠肝组织中上述基因的mRNA转录水平均显著降低（$P<0.01$）。结果见表5、表6。

3.2　体外实验结果

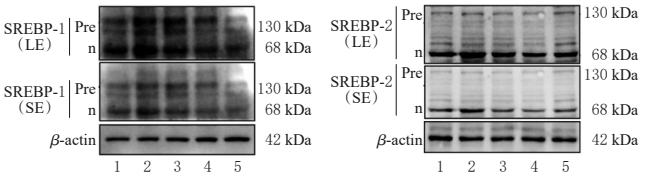
3.2.1　细胞中SREBPs蛋白表达检测结果

与对照组比较，抑制剂组及益肾通络方各浓度组细胞中Pre-SREBP-1、n-SREBP-1、Pre-SREBP-2、n-SREBP-2蛋白表达均显著下调（$P<0.01$），且抑制剂组与益肾通络方中、高浓度组上述蛋白表达水平相比差异均无统计学意义（$P>0.05$）。结果见图3、表7。



A. *db*/*m*组　B. *db*/*db*组　C. 益肾通络方低剂量组　D. 益肾通络方中剂量组　E. 益肾通络方高剂量组

图1　各组小鼠肝组织脂质蓄积情况观察结果（油红染色）



LE：长曝光；SE：短曝光；1：*db/m*组；2：*db/db*组；3：益肾通络方低剂量组；4：益肾通络方中剂量组；5：益肾通络方高剂量组。

图2　各组小鼠肝组织中SREBPs蛋白表达的电泳图

表4　各组小鼠肝组织中SREBPs蛋白表达水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	Pre-SREBP-1/β-actin	n-SREBP-1/β-actin	Pre-SREBP-2/β-actin	n-SREBP-2/β-actin
*db/m*组	1.02±0.03	0.97±0.49	1.01±0.02	0.99±0.03
*db/db*组	1.87±0.18[a]	1.65±0.29[b]	1.50±0.14[a]	1.75±0.23[a]
益肾通络方低剂量组	1.66±0.07[c]	1.30±0.07[c]	1.18±0.21[c]	1.45±0.24[c]
益肾通络方中剂量组	1.44±0.59[d]	1.23±0.14[d]	0.99±0.14[d]	1.09±0.12[d]
益肾通络方高剂量组	1.25±0.06[d]	1.04±0.06[d]	1.07±0.12[d]	1.11±0.13[d]

a：与*db/m*组比较，$P<0.01$；b：与*db/m*组比较，$P<0.05$；c：与*db/db*组比较，$P<0.05$；d：与*db/db*组比较，$P<0.01$。

表5　各组小鼠肝组织中*Srebp-1c*及其下游靶基因mRNA转录水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

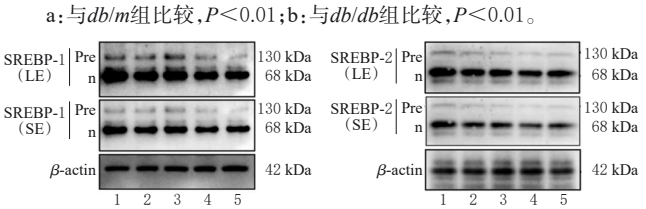
组别	*Srebp-1c* mRNA	*Fasn* mRNA	*Acc1* mRNA	*Scd5* mRNA	*Fads1* mRNA
*db/m*组	1.03±0.13	1.00±0.03	1.00±0.02	1.02±0.13	0.98±0.07
*db/db*组	1.76±0.12[a]	1.90±0.13[a]	2.41±0.12[a]	3.67±0.22[a]	1.32±0.08[a]
益肾通络方低剂量组	1.46±0.23[b]	1.35±0.17[b]	1.91±0.13[b]	3.00±0.15[b]	1.17±0.07[b]
益肾通络方中剂量组	1.28±0.13[b]	1.21±0.08[b]	1.62±0.11[b]	2.77±0.24[b]	1.10±0.05[b]
益肾通络方高剂量组	1.09±0.08[b]	1.00±0.17[b]	1.30±0.10[b]	2.40±0.25[b]	0.96±0.04[b]

a：与*db/m*组比较，$P<0.01$；b：与*db/db*组比较，$P<0.01$。

表6　各组小鼠肝组织中*Srebp-2*及其下游靶基因mRNA转录水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	*Srebp-2* mRNA	*Hmgcr* mRNA	*Dhcr24* mRNA	*Insig-1* mRNA	*Fdps* mRNA
*db/m*组	1.02±0.12	1.00±0.04	1.03±0.02	0.97±0.08	1.01±0.01
*db/db*组	1.94±0.08[a]	1.33±0.21[a]	1.46±0.08[a]	1.97±0.16[a]	1.41±0.13[a]
益肾通络方低剂量组	1.68±0.17[b]	1.12±0.18[b]	1.25±0.16[b]	1.66±0.21[b]	1.21±0.04[b]
益肾通络方中剂量组	1.25±0.12[b]	1.03±0.09[b]	1.02±0.08[b]	1.39±0.16[b]	1.11±0.10[b]
益肾通络方高剂量组	1.10±0.13[b]	0.83±0.03[b]	0.88±0.07[b]	1.19±0.21[b]	0.96±0.11[b]

a：与*db/m*组比较，$P<0.01$；b：与*db/db*组比较，$P<0.01$。



LE：长曝光；SE：短曝光；1：对照组；2：抑制剂组；3：益肾通络方低浓度组；4：益肾通络方中浓度组；5：益肾通络方高浓度组。

图3　各组细胞中SREBPs蛋白表达的电泳图

表7　各组细胞中SREBPs蛋白表达水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	Pre-SREBP-1/β-actin	n-SREBP-1/β-actin	Pre-SREBP-2/β-actin	n-SREBP-2/β-actin
对照组	1.01±0.02	1.02±0.01	1.02±0.03	0.98±0.03
抑制剂组	0.50±0.03[a]	0.63±0.08[a]	0.62±0.04[a]	0.61±0.04[a]
益肾通络方低浓度组	0.90±0.02[bc]	0.90±0.03[bc]	0.63±0.02[a]	0.83±0.04[ac]
益肾通络方中浓度组	0.77±0.10[a]	0.66±0.04[a]	0.61±0.03[a]	0.65±0.04[a]
益肾通络方高浓度组	0.38±0.04[a]	0.57±0.06[a]	0.65±0.03[a]	0.68±0.03[a]

a：与对照组比较，$P<0.01$；b：与对照组比较，$P<0.05$；c：与抑制剂组比较，$P<0.05$。

3.2.2　细胞中*SREBP-1c*、*SREBP-2*及其下游靶基因mRNA转录水平检测结果

与对照组比较，抑制剂组及益肾通络方各浓度组细胞中*SREBP-1c*及其下游靶基因*FASN*、*ACC1*、*SCD5*、*FADS1*，*SREBP-2*及其下游靶基因*HMGCR*、*DHCR24*、*INSIG-1*、*FDPS*的mRNA转录水平均显著降低（$P<0.01$），且抑制剂组与益肾通络方各浓度组上述指标水平差异均无统计学意义（$P>0.05$）。结果见表8、表9。

表8　各组细胞中*SREBP-1c*及其下游靶基因mRNA转录水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	*SREBP-1c* mRNA	*FASN* mRNA	*ACC1* mRNA	*SCD5* mRNA	*FADS1* mRNA
对照组	1.02±0.07	0.98±0.02	1.06±0.03	1.02±0.02	0.98±0.01
抑制剂组	0.28±0.02[a]	0.36±0.05[a]	0.32±0.02[a]	0.29±0.03[a]	0.34±0.04[a]
益肾通络方低浓度组	0.26±0.02[a]	0.35±0.01[a]	0.48±0.02[a]	0.44±0.03[a]	0.36±0.03[a]
益肾通络方中浓度组	0.20±0.03[a]	0.27±0.04[a]	0.38±0.01[a]	0.48±0.06[a]	0.37±0.04[a]
益肾通络方高浓度组	0.15±0.02[a]	0.16±0.03[a]	0.23±0.04[a]	0.35±0.05[a]	0.34±0.02[a]

a：与对照组比较，$P<0.01$。

表9　各组细胞中*SREBP-2*及其下游靶基因mRNA转录水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	*SREBP-2* mRNA	*HMGCR* mRNA	*DHCR24* mRNA	*INSIG-1* mRNA	*FDPS* mRNA
对照组	1.05±0.02	1.01±0.02	0.98±0.03	0.99±0.02	1.03±0.04
抑制剂组	0.26±0.02[a]	0.28±0.03[a]	0.24±0.03[a]	0.23±0.02[a]	0.36±0.05[a]
益肾通络方低浓度组	0.42±0.06[a]	0.58±0.02[a]	0.36±0.03[a]	0.24±0.03[a]	0.52±0.04[a]
益肾通络方中浓度组	0.37±0.04[a]	0.52±0.04[a]	0.28±0.03[a]	0.20±0.02[a]	0.40±0.05[a]
益肾通络方高浓度组	0.31±0.03[a]	0.45±0.03[a]	0.22±0.01[a]	0.16±0.02[a]	0.30±0.02[a]

a：与对照组比较，$P<0.01$。

4　讨论

脂质为阴精，其贮存、分布与肾密切相关。肾虚气化无力，脾失健运，痰瘀内生；肾阴虚滋生内热，灼津炼液熬而成脂；肾阴亏虚，肝失疏泄，膏脂布化失常。现代研究也表明，脂质代谢异常与肾虚血瘀密切相关[12—13]，肾虚可导致脂质代谢紊乱、TG水平升高以及HDL值降低[13—15]。而益肾通络方则是基于肾虚血瘀理论所得，以益肾通络、祛瘀化脂为主要治法，在治疗高脂血症及脂质代谢异常方面具有良好的理论基础。

血脂四项水平能反映出脂质代谢情况。体内药效考察结果显示，低、中、高剂量益肾通络方均能有效调节*db/db*小鼠血清中TC、TG、HDL、LDL水平的异常变化。油红O在脂肪内能高度溶解，可特异性地使组织内TG等中性脂肪着色，从而反映细胞内脂质蓄积程度。体内外实验可见，益肾通络方可明显改善*db/db*小鼠肝组织TG蓄积及脂肪变性，并且可明显改善HepG2细胞内脂质蓄积，且呈现一定的剂量/浓度依赖性趋势。这提示，益肾通络方能够有效地减少脂质过度蓄积，改善脂质代谢异常。

作为参与脂质代谢调控的重要因子，Pre-SREBPs经2次剪切，释放成熟体n-SREBPs，最终转位到核内修饰活化后，作为转录因子启动下游靶基因[6—7]。其中，SREBP-1c主要参与游离脂肪酸从头合成，调控与TG合成相关的靶基因，如*Acc1*、*Fasn*、*Scd5*等，激活脂质合成

的转录过程。SREBP-2是胆固醇和脂质从头生物合成的主要转录调节因子[6—7]，可识别血清应答元件（serum response element，SRE）调控*Hmgcr*、*Insig-1*等基因的转录，在胆固醇稳态调控过程中发挥关键作用[16—17]。体内研究结果显示，在*db*/*db*小鼠肝组织中Pre-SREBPs被切割，释放n-SREBPs入核，SREBPs表达升高；经益肾通络方给药后，小鼠肝组织中SREBPs表达显著下调。进一步研究发现，*db*/*db*小鼠肝组织中*Srebp-1c*及其下游靶基因*Fasn*、*Acc1*、*Scd5*、*Fads1*的mRNA转录水平在益肾通络方给药后显著下调。这提示益肾通络方可调控*Srebp-1c*的表达，抑制*Acc1*、*Fasn*、*Scd5*等脂肪酸相关基因的转录，进而抑制TG合成。这与先前研究结果一致[7—10]。此外，小鼠肝组织中*Srebp-2*及其下游胆固醇相关靶基因*Hmgcr*、*Dhcr24*、*Insig-1*、*Fdps*的mRNA转录水平在益肾通络方给药后同样显著下调。体外实验结果与体内实验结果一致，并且在体外实验中，中、高浓度益肾通络方给药后的效果与SREBPs抑制剂25-HC无明显差异。

综上，益肾通络方可能通过调控转录因子SREBPs的表达，从而抑制脂肪酸及胆固醇合成相关基因的高表达，促进TC、TG的降解，改善脂质代谢异常，抑制脂质蓄积，最终发挥降脂作用。本课题组后续将对益肾通络方调控SREBPs通路发挥降脂作用的关键成分及作用靶点进行进一步研究和证实，深入探讨其详细作用机制。

参考文献

[1] DINCER N, DAGEL T, AFSAR B, et al. The effect of chronic kidney disease on lipid metabolism[J]. Int Urol Nephrol, 2019, 51(2): 265-277.

[2] BUZZETTI E, PINZANI M, TSOCHATZIS E A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)[J]. Metabolism, 2016, 65(8): 1038-1048.

[3] ROSQVIST F, IGGMAN D, KULLBERG J, et al. Overfeeding polyunsaturated and saturated fat causes distinct effects on liver and visceral fat accumulation in humans [J]. Diabetes, 2014, 63(7): 2356-2368.

[4] DEBOSE-BOYD R A, YE J. SREBPs in lipid metabolism, insulin signaling, and beyond[J]. Trends Biochem Sci, 2018, 43(5): 358-368.

[5] SU L, ZHOU L K, CHEN F J, et al. Cideb controls sterol-regulated ER export of SREBP/SCAP by promoting cargo loading at ER exit sites[J]. EMBO J, 2019, 38(8): e100156.

[6] SOZEN E, DEMIREL-YALCINER T, SARI D, et al. Deficiency of SREBP1c modulates autophagy mediated lipid droplet catabolism during oleic acid induced steatosis[J]. Metabol Open, 2021, 12: 100138.

[7] GUO C S, CHI Z X, JIANG D L, et al. Cholesterol homeostatic regulator SCAP-SREBP2 integrates NLRP3 inflammasome activation and cholesterol biosynthetic signaling in macrophages[J]. Immunity, 2018, 49(5): 842-856.e7.

[8] GARCÍA-GARCÍA A B, MARTÍNEZ-HERVÁS S, VERNIA S, et al. A very rare variant in *SREBF2*, a possible cause of hypercholesterolemia and increased glycemic levels[J]. Biomedicines, 2022, 10(5): 1178.

[9] HOWE V, SHARPE L J, PRABHU A V, et al. New insights into cellular cholesterol acquisition: promoter analysis of human HMGCR and SQLE, two key control enzymes in cholesterol synthesis[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2017, 1862(7): 647-657.

[10] PANG W Q, WANG D, ZUO Z H, et al. Kidney bean fermented broth alleviates hyperlipidemic by regulating serum metabolites and gut microbiota composition[J]. Nutrients, 2022, 14(15): 3202.

[11] WANG L, ZHENG W, YANG J X, et al. Mechanism of *Astragalus membranaceus* alleviating acquired hyperlipidemia induced by high-fat diet through regulating lipid metabolism[J]. Nutrients, 2022, 14(5): 954.

[12] 张明昊，高一盈，董文霞，等. 复方丹参片对高脂血症模型大鼠血脂水平的改善及肾功能保护作用机制研究[J]. 中国药房，2022，33(7)：818-824.
ZHANG M H, GAO Y Y, DONG W X, et al. Study on the improvement of Compound Danshen tablets on blood lipid levels and the mechanism of protecting renal functions in hyperlipidemia model rats[J]. China Pharm, 2022, 33(7): 818-824.

[13] ZHANG X W, ZHAO L, XIANG S X, et al. Yishen Tongluo formula alleviates diabetic kidney disease through regulating Sirt6/TGF-β_1/Smad2/3 pathway and promoting degradation of TGF-β_1[J]. J Ethnopharmacol, 2023, 307: 116243.

[14] LI Y, GONG W Q, LIU J, et al. Angiopoietin-like protein 4 promotes hyperlipidemia-induced renal injury by downregulating the expression of $ACTN_4$[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2022, 595: 69-75.

[15] XIE Z S, LI E W, GAO G, et al. Zexie Tang targeting FKBP38/mTOR/SREBPs pathway improves hyperlipidemia[J]. J Ethnopharmacol, 2022, 290: 115101.

[16] TRINDADE B C, CEGLIA S, BERTHELETTE A, et al. The cholesterol metabolite 25-hydroxycholesterol restrains the transcriptional regulator SREBP2 and limits intestinal IgA plasma cell differentiation[J]. Immunity, 2021, 54(10): 2273-2287.e6.

[17] BROWN M S, GOLDSTEIN J L. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor[J]. Cell, 1997, 89(3): 331-340.

（收稿日期：2023-05-09　修回日期：2023-10-29）
（编辑：林　静）