青藤碱对小鼠非酒精性脂肪性肝炎的改善作用及机制Δ

曾　诚[1,2*]，翁良坤[2]（1.广东药科大学附属第一医院临床药学重点专科，广州　510699；2.广东药科大学新药研发中心，广州　510006）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2024）14-1701-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.14.05

摘　要　目的　探究青藤碱（Sin）对非酒精性脂肪性肝炎（NASH）的改善作用及潜在机制。**方法**　以雄性C57BL/6J小鼠为对象，将其随机分为标准饲料（SCD）组、高脂饲料（HFD）组、Sin低剂量组（Sin-L组，50 mg/kg）、Sin高剂量组（Sin-H组，100 mg/kg），每组6只。SCD组小鼠以SCD正常喂养，其余组小鼠均以HFD连续饲养24周以复制NASH模型；于17周起，各药物组小鼠分别灌胃相应药液，每天1次，连续8周。末次给药后，称定各组小鼠体重、肝脏质量并计算肝脏指数；检测其肝组织中总胆固醇（TC）、甘油三酯（TG）含量和血清中天冬氨酸转移酶（AST）、丙氨酸转氨酶（ALT）、白细胞介素1β（IL-1β）、IL-18含量；观察其肝细胞脂肪变性、肝纤维化，并定位肝脏脂滴；检测其IL-18、IL-1β mRNA和炎症相关蛋白[IL-1β、剪切的IL-1β（cleaved-IL-1β）]、纤维化相关蛋白[Ⅰ型胶原蛋白（Col-Ⅰ）、α-平滑肌肌动蛋白（α-SMA）、结缔组织生长因子（CTGF）]、通路相关蛋白[腺苷一磷酸活化的蛋白激酶（AMPK）、磷酸化AMPK（p-AMPK）、Yes相关蛋白（YAP）、磷酸化YAP（p-YAP）]的表达情况。以人肝癌细胞HepG2为对象，将其分为对照组、油酸（OA）组、Sin 50 μmol/L组、Sin 100 μmol/L组、OA+Sin 50 μmol/L组和OA+Sin 100 μmol/L组，处理24 h后，观察其脂滴蓄积情况，并检测其通路相关蛋白的表达情况。**结果**　与HFD组比较，Sin各剂量组小鼠的肝细胞脂肪变性、纤维化病变和脂滴蓄积均有所缓解；其体重，肝脏质量，肝脏指数（Sin-L组除外），血清AST、ALT、IL-1β、IL-18含量，肝组织中TG、TC含量，IL-1β、IL-18 mRNA的表达水平，以及cleaved-IL-1β蛋白和纤维化相关蛋白的表达水平均显著降低（$P<0.01$）；肝组织中IL-1β蛋白的表达水平和AMPK、YAP蛋白的磷酸化水平均显著升高（$P<0.01$）。与OA组比较，OA+Sin各浓度组细胞的脂滴蓄积均明显减少，AMPK、YAP蛋白的磷酸化水平均显著升高（$P<0.05$）。**结论**　Sin可改善NASH小鼠肝组织的炎症反应、脂质沉积和纤维化，其机制可能与激活AMPK信号通路、促进YAP蛋白磷酸化相关。

关键词　非酒精性脂肪性肝炎；青藤碱；腺苷一磷酸活化的蛋白激酶；Yes相关蛋白；炎症反应

Improvement effects and mechanism of sinomenine on non-alcoholic steatohepatitis in mice

ZENG Cheng[1,2], WENG Liangkun[2] (1. Key Specialty of Clinical Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510699, China; 2. Center for Drug Research and Development, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the improvement effects of sinomenine (Sin) on non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and its potential mechanism. **METHODS** Male C57BL/6J mice were randomly divided into standard chow diet (SCD) group, high-fat diet (HFD) group, Sin low-dose group (Sin-L group, 50 mg/kg), and Sin high-dose group (Sin-H group, 100 mg/kg), with 6 mice in each group. The mice of SCD groups were fed with SCD, and other groups were given HFD for consecutive 24 weeks to establish NASH model. Since 17th week, the mice in each drug group were given corresponding drug solutions intragastrically, once a day, for 8 consecutive weeks. After the last medication, the body weight and liver weight of mice were determined, and liver indexes were calculated. The contents of total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) in liver tissue, the serum contents of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), interleukin-1β (IL-1β) and IL-18 were all determined. Hepatic steatosis and fibrosis were observed, and hepatic lipid droplets were located. The expressions of IL-18 and IL-1β mRNA, inflammation-related proteins (IL-1β, cleaved-IL-1β), fibrosis-related proteins [collagen Ⅰ (Col-Ⅰ), α-smooth muscle actin (α-SMA), connective tissue growth factor (CTGF)], and pathway-related protein [adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), phosphorylated AMPK (p-AMPK), Yes-associated protein (YAP), phosphorylated YAP (p-YAP)] were all determined. HepG2 human liver cancer cells were selected as subjects and divided into control group, oleic acid (OA) group, Sin 50 μmol/L group, Sin 100 μmol/L group, OA+Sin 50 μmol/L group and OA+Sin 100 μmol/L group. After 24 hours of treatment, the accumulation of lipid droplets was observed, and the expressions of pathway-related proteins were detected. **RESULTS** Compared to HFD group, hepatic steatosis, fibrotic lesions and lipid droplet accumulation were all

Δ**基金项目**　国家自然科学基金项目（No.82100379）；广东省医学科学技术研究基金项目（No.A2021120）

＊**第一作者**　助理研究员，博士。研究方向：药理学。E-mail：zengcheng@gdpu.edu.cn

alleviated in Sin groups; body weight, liver weight, liver indexes, the contents of AST, ALT, IL-1β, IL-18 in serum and TG, TC in liver tissue, the mRNA expressions of IL-1β and IL-18, and the expressions of cleaved-IL-1β and fibrosis-related proteins all decreased significantly ($P<0.01$); the protein expression of IL-1β, and the phosphorylation levels of AMPK and YAP proteins significantly increased ($P<0.01$). Compared with OA group, the lipid droplet accumulation of cells in OA+Sin groups significantly decreased, while the phosphorylation levels of AMPK and YAP proteins significantly increased ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Sin can ameliorate the inflammation, lipid deposition and fibrosis of liver tissue in mice, the mechanism of which may be associated with activating the AMPK signaling pathway and promoting YAP phosphorylation.

KEYWORDS non-alcoholic steatohepatitis; sinomenine; AMPK; YAP; inflammatory reaction

非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis,NASH)的主要特征为脂肪变性、炎症反应,并伴有细胞气泡形成,是肝硬化和肝细胞性肝癌的主要诱因[1-2]。然而,目前尚无药物被批准用于NASH的治疗,导致临床可用于改善或逆转NASH患者临床症状的有效药物极度匮乏[3]。因此,研发有效安全的NASH治疗新药具有重要的临床意义。

炎症反应可促使肝纤维化的发生,并可诱导NASH的恶性进展[4]。腺苷一磷酸活化的蛋白激酶(adenosine monophosphate-activated protein kinase,AMPK)/Yes相关蛋白(Yes-associated protein,YAP)信号通路在多种炎症性疾病发生发展过程中具有重要作用[5]。研究表明,AMPK的活化有望改善NASH相关脂质代谢异常并缓解炎症反应[6];而YAP的过度激活则能促进NASH相关肝脏脂质沉积和炎症反应[7]。有研究者通过磷酸化YAP而使YAP的激活受到抑制,从而改善肝脏炎症和纤维化[8];同时有研究指出,AMPK可促进YAP的磷酸化[9]。可见,AMPK/YAP信号通路可能是治疗NASH的潜在靶点之一。

青藤碱(sinomenine,Sin)是一种从中药青风藤中提取的天然生物碱,具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤和调节免疫等多种生物学活性[10]。研究指出,Sin可通过促进AMPK的磷酸化而抑制脂多糖诱导的RAW264.7细胞炎症因子的释放,可减少类风湿关节炎模型小鼠体内白细胞介素1β(interleukin-1β,IL-1β)等炎症因子的分泌[11]。考虑到Sin可促进AMPK的磷酸化,以及AMPK、YAP在NASH发生发展中的重要作用,本研究拟以小鼠为对象,探讨Sin对其NASH的干预作用,并基于AMPK/YAP信号通路探讨Sin肝保护作用的潜在机制,以期为该药在NASH治疗领域中的应用提供理论和实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

1510型全波长酶标仪、EVOS M5000型智能细胞成像系统、Quant Studio™ 1 Plus型实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative PCR,qPCR)仪均购自美国Thermo Fisher Scientific公司;HF151UV型CO_2培养箱购自力康生物医疗科技控股有限公司;1658033小型垂直电泳转印系统购自美国Bio-Rad公司;3300 Mini型化学发光成像系统购自上海勤翔科学仪器有限公司。

1.2 主要药品和试剂

Sin原料药(批号HY-15122,纯度99.88%)购自美国MedChemExpress公司;丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase,ALT)、天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase,AST)、总胆固醇(total cholesterol,TC)、甘油三酯(triglyceride,TG)试剂盒(批号分别为C009-2-1、C010-2-1、A111-1-1、A110-1-1)均购自南京建成生物工程研究所;兔IL-1β、剪切的IL-1β(cleaved-IL-1β)、α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin,α-SMA)、AMPK、磷酸化AMPK(phosphorylated AMPK,p-AMPK)、YAP、磷酸化YAP(phosphorylated YAP,p-YAP)、β-肌动蛋白(β-actin)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(批号分别为31202S、63124S、19245T、2532S、2535S、14074S、13619S、4967S、2118S)均购自美国Cell Signaling Technology公司;兔Ⅰ型胶原蛋白(collagen Ⅰ,Col-Ⅰ)抗体(批号ab270993)购自英国Abcam公司;兔结缔组织生长因子(connective tissue growth factor,CTGF)抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G二抗(批号分别为25474-1-AP、SA00001-4)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;油酸(oleic acid,OA)、RIPA裂解液(批号分别为ST2053、P0013B)均购自上海碧云天生物技术股份有限公司;DMEM培养基、BCA蛋白定量试剂盒(批号分别为C1995500BT、23227)均购自美国Thermo Fisher Scientific公司;苏木精-伊红(HE)、Masson、油红O染色试剂盒(批号分别为G1120、G1340、G1261)均购自北京索莱宝科技有限公司;IL-1β、IL-18酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号分别为EK201BHS、EK218)均购自杭州联科生物技术股份有限公司;ChamQ通用SYBR qPCR预混液(批号Q711-02)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;MTT试剂(批号475989)购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司。

1.3 实验细胞与动物、饲料

人肝癌细胞HepG2购自中国科学院细胞库/干细胞库。

SPF级雄性C57BL/6小鼠,体重约24 g,购自广东省医学实验动物中心,实验动物生产许可证号为SCXK(粤)2022-0002;高脂饲料(high-fat diet,HFD;批号12492M)购自北京博爱港生物技术有限公司;标准饲料(standard chow diet,SCD)由广东药科大学实验动物中

心提供。所有小鼠均饲养于温度（23±2）℃、相对湿度50%～70%、每12 h光照/黑暗循环的动物房内，自由摄食、饮水。本研究饲养环境符合实验动物环境设施要求，实验方案经广东药科大学实验动物伦理委员会批准（受理编号gdpulacspf2022193）。

2 方法

2.1 动物实验

2.1.1 分组、造模与给药

采用随机数字表法将24只雄性小鼠分为SCD组、模型组（HFD组）、Sin低剂量组（Sin-L组）、Sin高剂量组（Sin-H组），每组6只。SCD组小鼠以SCD正常喂养，其余组小鼠均以HFD连续饲养24周以复制NASH模型[12]。于17周起，Sin-L、Sin-H组小鼠分别灌胃50、100 mg/kg Sin（剂量根据既往研究结果确定[13]，以生理盐水为溶剂），SCD组和HFD组小鼠灌胃等体积生理盐水，每天1次，连续8周。

2.1.2 取材

末次给药后12 h，称定并记录小鼠体重，腹腔注射0.3%戊巴比妥麻醉后摘眼球取血，血样于4 ℃下以3 000 r/min离心15 min，取上层血清，用于血清肝功能指标和炎症因子含量的检测；取血后处死各组小鼠，分离其肝脏，称定质量后用于肝脏指数测定，病理学观察，TG、TC含量检测，以及qPCR和Western blot实验。

2.1.3 小鼠肝脏指数的测定

取各组小鼠肝脏，用滤纸吸干表面水分，按下式计算肝脏指数：肝脏指数＝小鼠肝脏质量/体重×100%。

2.1.4 小鼠TG、TC、肝功能指标和炎症因子检测

取各组小鼠肝组织适量，加入RIPA裂解液，研磨匀浆，以12 000 r/min离心30 min（重复2～3次），合并上清液，按相应试剂盒说明书操作，使用酶标仪检测肝组织中TG、TC含量。取各组小鼠血清样品适量，按相应试剂盒说明书操作，使用酶标仪检测血清中AST、ALT、IL-1β、IL-18含量。

2.1.5 小鼠肝组织病理学观察

取各组小鼠肝组织适量，用4%多聚甲醛固定后，依次以水冲洗、乙醇梯度脱水，经透明、浸蜡、包埋、修块、切片、展片、捞片、烘片、脱蜡后，分别进行HE染色和Masson染色，用于观察肝细胞脂肪变性和肝纤维化。另取各组小鼠肝组织适量，剪成1.0 cm×1.0 cm的组织块，经OCT胶包埋后，于－20 ℃下冷冻后切片，进行油红O染色，用于观察肝脏脂滴定位。

2.1.6 小鼠肝组织中IL-18、IL-1β mRNA表达检测

采用qPCR法检测。取各组（SCD组除外，主要考察药物对模型小鼠炎症相关mRNA表达的影响）小鼠的肝组织适量，按RNA提取试剂盒提取总RNA，对其进行定量分析后，按逆转录试剂盒说明书进行逆转录，以所得cDNA为模板进行PCR扩增。反应体系共20 μL，包括2×ChamQ通用SYBR qPCR预混液10 μL，正、反向引物各0.5 μL，cDNA模板7 μL，加ddH_2O至20 μL。反应条件包括预变性处理（94 ℃，5 min）、循环反应（95 ℃，5 s；60 ℃，30 s；共40次）、熔解曲线反应（95 ℃，15 s；60 ℃，60 s；95 ℃，15 s）。以GAPDH为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算各目的基因的表达水平，结果以HFD组为参照进行归一化处理。qPCR引物序列及产物长度见表1。

表1 qPCR引物序列及产物长度

目的基因	正向引物	反向引物	产物长度/bp
IL-18	5′-GACAGAATGTGTTCGAGGAT-3′	5′-TAATTCACAGAGAGGGTCACA-3′	127
IL-1β	5′-CCGTGGACCTTCCAGGATGA-3′	5′-GGGAACGTCACACACCAGCA-3′	117
GAPDH	5′-AGGAGTAAGAAACCCTGGAC-3′	5′-CTGGGATGGAATTGTGAG-3′	109

2.1.7 小鼠肝组织中相关蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取各组小鼠肝组织适量，加入RIPA裂解液于冰上裂解30 min，随后于4 ℃下以12 000 r/min离心30 min，取上清液，以BCA法测定蛋白浓度后作变性处理。取变性蛋白适量，进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后转膜，以5%脱脂奶粉室温封闭1 h；加入内参蛋白（GAPDH）、炎症相关蛋白（IL-1β、cleaved-IL-1β）、纤维化相关蛋白（Col-Ⅰ、α-SMA、CTGF）、AMPK/YAP信号通路相关蛋白（AMPK、p-AMPK、YAP、p-YAP）一抗（稀释比例均为1∶1 000），于4 ℃下孵育过夜；洗膜后，加入相应二抗（稀释比例为1∶10 000），于室温下孵育1 h；洗膜后，以ECL显影并在化学发光成像系统下成像。使用Image J 1.47软件计算IL-1β、cleaved-IL-1β、Col-Ⅰ、α-SMA、CTGF蛋白的表达水平（即上述蛋白与内参蛋白GAPDH的条带灰度值比值）和AMPK、YAP蛋白的磷酸化水平（即p-AMPK与AMPK蛋白、p-YAP与YAP蛋白的条带灰度值比值），结果以SCD组为参照进行归一化处理。

2.2 细胞实验

2.2.1 细胞培养

将HepG2细胞接种于含10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素双抗的DMEM培养基（即完全培养基）中，于37 ℃、5%CO_2的条件下培养。

2.2.2 Sin干预浓度筛选

采用MTT法检测。取HepG2细胞，以5 000个/孔接种到96孔板中，用不同浓度Sin（0、50、100、150、200 μmol/L，即Sin不同浓度组；Sin浓度参考相关文献[14]设置）干预，并设置含细胞、不含药物的阴性对照组和不含细胞、不含药物的空白组，每组设置3个复孔。处理24 h后，每孔中加入不含血清的DMEM培养基180 μL和0.5 mg/mL的MTT试剂20 μL，于37 ℃下避光孵育4 h；吸弃上清液，每孔加入二甲基亚砜150 μL，使用酶标仪在570 nm波长下检测每孔的吸光度（A）值，并按下式计算细胞存活率：细胞存活率＝（$A_{Sin不同浓度组}-A_{空白组}$）/（$A_{阴性对照组}-A_{空白组}$）×100%，根据结果筛选后续细胞实验的Sin干预浓度。

2.2.3　细胞脂滴蓄积情况观察

将细胞分为对照组、OA组、Sin 50 μmol/L组、Sin 100 μmol/L组、OA+Sin 50 μmol/L组和OA+Sin 100 μmol/L组（Sin浓度参考“2.2.2”项下结果设置），每组设置3个复孔。OA组细胞以0.5 mmol/L的OA诱导12 h以模拟肝脂质沉积；Sin 50、100 μmol/L组细胞分别用50、100 μmol/L的Sin干预24 h；OA+Sin 50、100 μmol/L组细胞先以0.5 mmol/L的OA诱导12 h，再分别用50、100 μmol/L的Sin干预24 h。随后，按相应试剂盒说明书进行油红O染色，并置于显微镜下观察各组细胞内的脂滴蓄积情况。

2.2.4　细胞中通路相关蛋白表达检测

将细胞按“2.2.3”项下方法分组、处理后，以β-actin为内参，按“2.1.7”项下方法检测并计算细胞中AMPK、YAP蛋白的磷酸化水平，结果以对照组为参照进行归一化处理。

2.3　统计学方法

采用GraphPad Prism 7.01软件对数据进行统计分析。计量资料数据以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用LSD-t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3　结果

3.1　动物实验结果

3.1.1　Sin对NASH小鼠体重、肝脏质量、肝脏指数的影响

与SCD组比较，HFD组小鼠的体重、肝脏质量和肝脏指数均显著升高（$P<0.01$）；与HFD组比较，Sin各剂量组小鼠的体重、肝脏质量和肝脏指数（Sin-L组除外）均显著降低（$P<0.01$）。结果见表2。

表2　各组小鼠体重、肝脏质量和肝脏指数的检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	体重/g	肝脏质量/g	肝脏指数/%
SCD组	32.16±1.73	1.19±0.06	3.71±0.14
HFD组	50.98±2.76[a]	2.53±0.09[a]	4.97±0.28[a]
Sin-L组	40.33±2.51[b]	2.06±0.15[b]	4.80±0.27
Sin-H组	38.25±1.12[b]	1.85±0.09[b]	4.27±0.26[b]

a：与SCD组比较，$P<0.01$；b：与HFD组比较，$P<0.01$。

3.1.2　Sin对NASH小鼠TG、TC、肝功能指标和炎症因子的影响

与SCD组比较，HFD组小鼠肝组织中TG、TC含量和血清中AST、ALT、IL-1β、IL-18含量均显著升高（$P<0.01$）；与HFD组比较，Sin各剂量组小鼠上述指标含量均显著降低（$P<0.01$）。结果见表3。

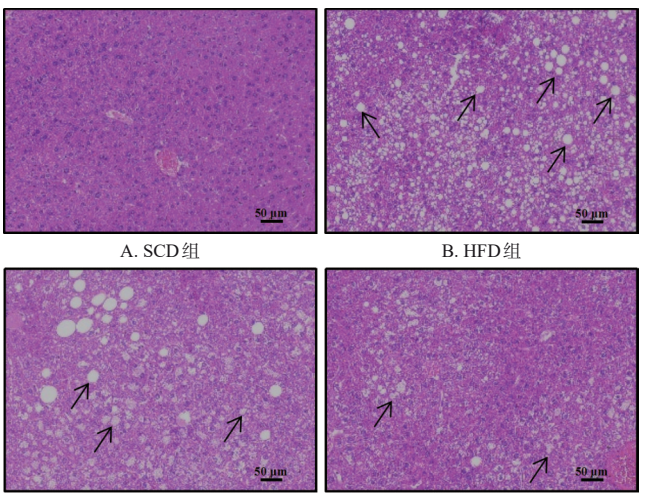
3.1.3　Sin对NASH小鼠肝组织病理特征的影响

HE染色结果显示，与SCD组比较，HFD组小鼠肝细胞出现了明显的脂肪变性，可见明显的脂肪空泡，整体病变较为严重；与HFD组比较，Sin各剂量组小鼠肝细胞脂肪变性得到明显改善。结果见图1。

表3　各组小鼠TG、TC、肝功能指标和炎症因子的检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	TG/(mmol/L)	TC/(mmol/L)	AST/(U/L)	ALT/(U/L)	IL-1β/(pg/mL)	IL-18/(pg/mL)
SCD组	27.59±2.49	3.26±0.64	67.45±4.96	34.26±2.14	73.89±2.54	41.20±1.17
HFD组	99.39±3.06[a]	19.50±3.54[a]	188.23±3.75[a]	116.35±7.03[a]	97.35±2.94[a]	89.43±2.89[a]
Sin-L组	70.08±4.01[b]	9.65±0.98[b]	140.92±6.01[b]	95.82±5.76[b]	89.57±1.38[b]	73.24±2.07[b]
Sin-H组	52.95±2.70[b]	7.90±0.91[b]	101.55±4.16[b]	68.13±7.63[b]	78.24±1.79[b]	58.12±2.24[b]

a：与SCD组比较，$P<0.01$；b：与HFD组比较，$P<0.01$。

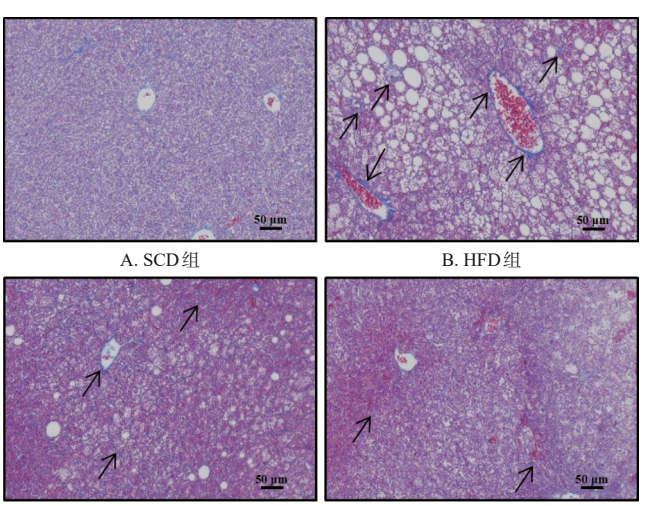


A. SCD组　B. HFD组　C. Sin-L组　D. Sin-H组

黑色箭头：脂肪变性。

图1　各组小鼠肝细胞脂肪变性的显微图（HE染色）

Masson染色结果显示，与SCD组比较，HFD组小鼠肝脏的胶原纤维明显增多；与HFD组比较，Sin各剂量组小鼠肝脏的胶原纤维均有不同程度减少，且Sin-H组减少更明显。结果见图2。

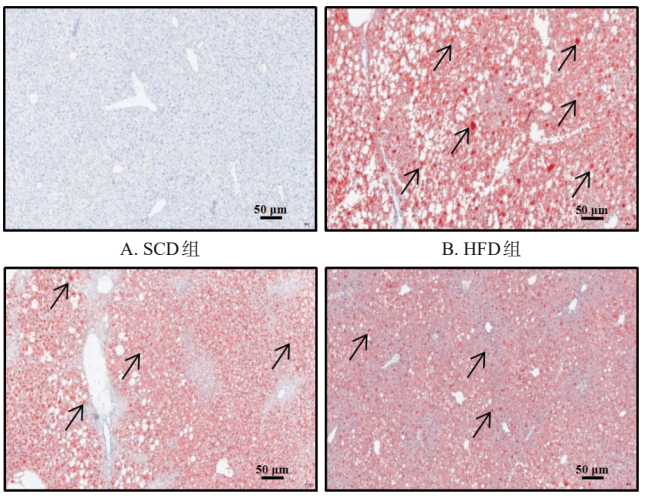


A. SCD组　B. HFD组　C. Sin-L组　D. Sin-H组

黑色箭头：胶原纤维。

图2　各组小鼠肝纤维化的显微图（Masson染色）

油红O染色结果显示，与SCD组比较，HFD组小鼠的脂滴沿肝窦周围弥漫散开，并呈明显的颗粒状；与HFD组比较，Sin各剂量组小鼠肝窦周围的脂滴聚集均不同程度被抑制，脂滴均不同程度缩小，其中Sin-H组抑制效果更明显。结果见图3。



A. SCD组　B. HFD组

C. Sin-L组　D. Sin-H组

黑色箭头：脂滴。

图3　各组小鼠肝脏脂滴定位的显微图（油红O染色）

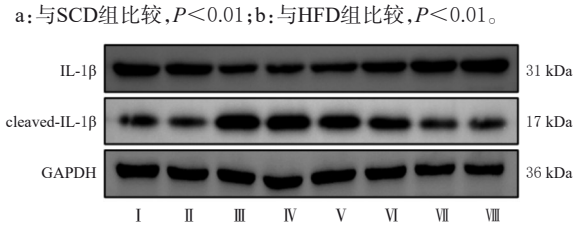
3.1.4　Sin对NASH小鼠肝组织中炎症相关因子mRNA及蛋白表达的影响

与SCD组比较，HFD组小鼠肝组织中IL-1β蛋白的表达水平显著降低，cleaved-IL-1β蛋白的表达水平显著升高（$P<0.01$）；与HFD组比较，Sin各剂量组小鼠肝组织中IL-1β、IL-18 mRNA和cleaved-IL-1β蛋白的表达水平均显著降低，IL-1β蛋白的表达水平均显著升高（$P<0.01$）。结果见表4、图4。

表4　各组小鼠肝组织中炎症相关因子mRNA及蛋白表达的检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	qPCR实验		Western blot实验	
	IL-1β	IL-18	IL-1β/GAPDH	cleaved-IL-1β/GAPDH
SCD组			1.00±0.08	1.00±0.07
HFD组	1.02±0.05	0.99±0.09	0.62±0.09[a]	2.56±0.29[a]
Sin-L组	0.67±0.04[b]	0.64±0.05[b]	0.71±0.05[b]	2.07±0.21[b]
Sin-H组	0.50±0.02[b]	0.44±0.05[b]	0.87±0.07[b]	1.23±0.08[b]

a：与SCD组比较，$P<0.01$；b：与HFD组比较，$P<0.01$。



Ⅰ、Ⅱ：SCD组；Ⅲ、Ⅳ：HFD组；Ⅴ、Ⅵ：Sin-L组；Ⅶ、Ⅷ：Sin-H组。

图4　各组小鼠肝组织中炎症相关蛋白表达的电泳图

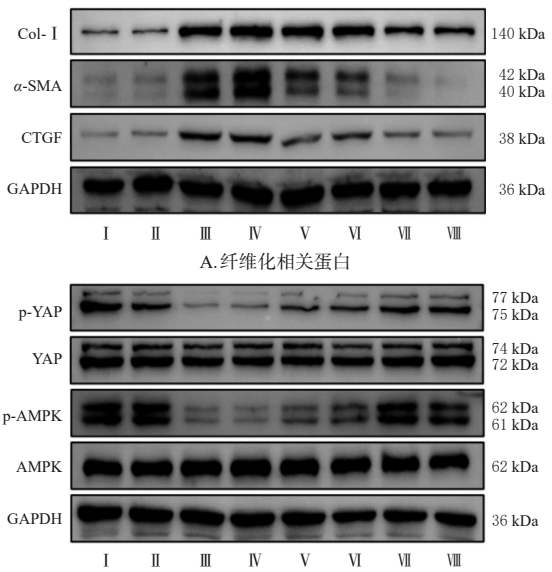
3.1.5　Sin对NASH小鼠肝组织中纤维化及AMPK/YAP信号通路相关蛋白表达的影响

与SCD组比较，HFD组小鼠肝组织中Col-Ⅰ、α-SMA、CTGF蛋白的表达水平均显著升高，而AMPK、YAP蛋白的磷酸化水平均显著降低（$P<0.01$）；与HFD组比较，Sin各剂量组小鼠肝组织中Col-Ⅰ、α-SMA、CTGF蛋白的表达水平均显著降低，而AMPK、YAP蛋白的磷酸化水平均显著升高（$P<0.01$）。结果见表5、图5。

表5　各组小鼠肝组织中纤维化及AMPK/YAP信号通路相关蛋白表达的检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	Col-Ⅰ/GAPDH	α-SMA/GAPDH	CTGF/GAPDH	p-AMPK/AMPK	p-YAP/YAP
SCD组	1.00±0.09	1.00±0.21	1.00±0.15	1.00±0.07	1.00±0.06
HFD组	3.50±0.38[a]	2.86±0.24[a]	5.86±0.33[a]	0.30±0.07[a]	0.25±0.09[a]
Sin-L组	3.07±0.14[b]	2.21±0.36[b]	3.12±0.21[b]	0.58±0.11[b]	0.61±0.14[b]
Sin-H组	2.27±0.19[b]	1.11±0.23[b]	1.80±0.13[b]	0.82±0.12[b]	0.81±0.04[b]

a：与SCD组比较，$P<0.01$；b：与HFD组比较，$P<0.01$。



A. 纤维化相关蛋白

B. AMPK/YAP信号通路相关蛋白

Ⅰ、Ⅱ：SCD组；Ⅲ、Ⅳ：HFD组；Ⅴ、Ⅵ：Sin-L组；Ⅶ、Ⅷ：Sin-H组。

图5　各组小鼠肝组织中纤维化和AMPK/YAP信号通路相关蛋白表达的电泳图

3.2　细胞实验结果

3.2.1　Sin干预浓度筛选结果

与Sin 0 μmol/L组比较，Sin 50、100 μmol/L组细胞的存活率差异均无统计学意义（$P>0.05$），而Sin 150、200 μmol/L组细胞的存活率均显著降低（$P<0.05$）。结果见表6。结合该结果和既往研究结果[14]，本研究选择50、100 μmol/L作为后续细胞实验Sin的干预浓度。

表6　不同浓度Sin对HepG2细胞存活率的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	细胞存活率/%	组别	细胞存活率/%
Sin 0 μmol/L组	100.00±3.66	Sin 150 μmol/L组	85.51±4.15[a]
Sin 50 μmol/L组	100.31±2.91	Sin 200 μmol/L组	78.74±2.68[a]
Sin 100 μmol/L组	100.87±5.29		

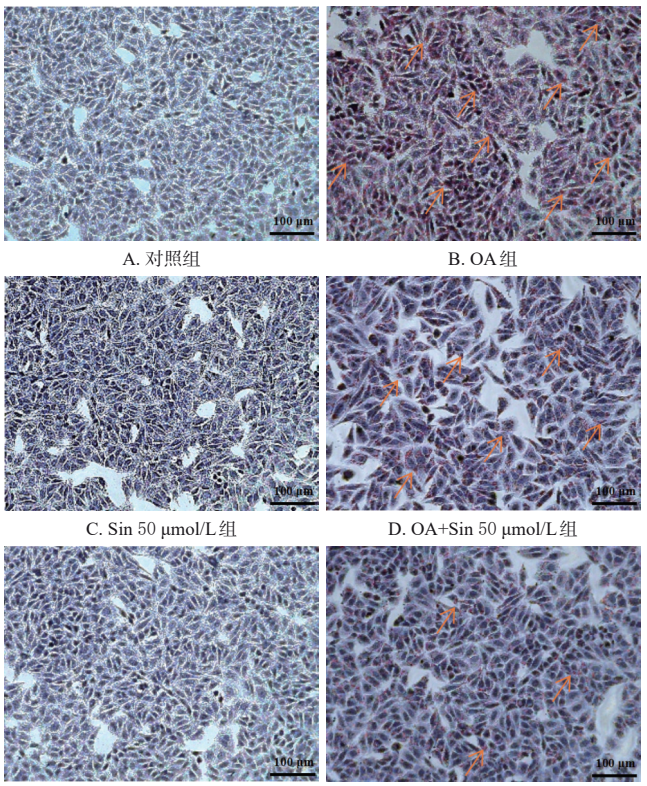
a：与Sin 0 μmol/L组比较，$P<0.05$。

3.2.2　Sin对OA诱导的HepG2细胞中脂滴蓄积的影响

与对照组比较，Sin 50、100 μmol/L组细胞未见明显异常，而OA组细胞中脂滴蓄积明显；与OA组比较，OA+Sin 50 μmol/L组和OA+Sin 100 μmol/L组细胞中脂滴蓄积均有所减少。结果见图6。

3.2.3　Sin对OA诱导的HepG2细胞中AMPK/YAP信号通路相关蛋白表达的影响

与对照组比较，Sin 50、100 μmol/L组细胞中AMPK、YAP蛋白的磷酸化水平差异均无统计学意义



A. 对照组　B. OA组

C. Sin 50 μmol/L组　D. OA+Sin 50 μmol/L组

E. Sin 100 μmol/L组　F. OA+Sin 100 μmol/L组

橙色箭头：脂滴。

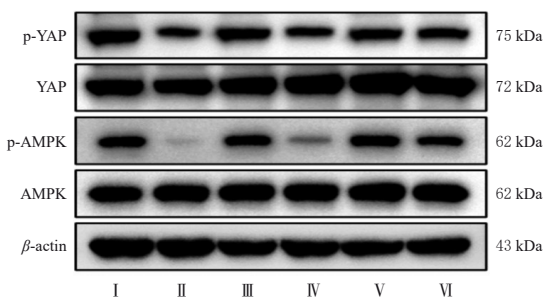
图6　各组细胞中脂滴蓄积的显微图（油红O染色）

（$P>0.05$），而OA组细胞中AMPK、YAP蛋白的磷酸化水平均显著降低（$P<0.01$）。与OA组比较，OA+Sin 50 μmol/L组和OA+Sin 100 μmol/L组细胞中AMPK、YAP蛋白的磷酸化水平均显著升高（$P<0.05$）。结果见表7、图7。

表7　各组细胞中AMPK/YAP信号通路相关蛋白表达情况的检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	p-AMPK/AMPK	p-YAP/YAP
对照组	1.00±0.04	1.00±0.04
OA组	0.12±0.03[a]	0.51±0.17[a]
Sin 50 μmol/L组	1.03±0.04	1.03±0.03
OA+Sin 50 μmol/L组	0.31±0.04[b]	0.78±0.03[b]
Sin 100 μmol/L组	1.01±0.06	1.02±0.05
OA+Sin 100 μmol/L组	0.79±0.05[b]	0.91±0.05[b]

a：与对照组比较，$P<0.01$；b：与OA组比较，$P<0.05$。



Ⅰ：对照组；Ⅱ：OA组；Ⅲ：Sin 50 μmol/L组；Ⅳ：OA+Sin 50 μmol/L组；Ⅴ：Sin 100 μmol/L组；Ⅵ：OA+Sin 100 μmol/L组。

图7　各组细胞中AMPK/YAP信号通路相关蛋白表达的电泳图

4　讨论

NASH的发病机制复杂，涉及多种途径驱动的炎症、肝细胞损伤和纤维化等生物学过程，其病理表现包括肝细胞脂肪变性、肝细胞气球样变、炎症和纤维化、肝硬化[1]。据统计，NASH的患病率不断升高，且约20%的NASH患者将发展为肝硬化，严重影响其生活质量[15]。然而，目前尚无治疗NASH的特效药物获批上市，现有药物的疗效欠佳且副作用较多[3,15]，故迫切需要寻找新的有效、安全的治疗药物。

Sin作为我国传统中药的活性成分，具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎、抗菌等多种药理活性[16]，临床应用前景广阔。本研究结果显示，经Sin干预后，NASH小鼠体内TG、TC、AST、ALT的释放均受到明显抑制，且肝脏指数明显改善；进一步的HE、Masson和油红O染色结果显示，Sin能减轻NASH小鼠肝组织的脂肪变性、纤维化和脂滴蓄积；细胞水平的油红O染色结果也显示，Sin可抑制OA诱导的HepG2细胞的脂滴蓄积，提示Sin对NASH具有一定的改善作用，具有潜在的开发价值。

炎症反应是NASH发生发展过程中的重要环节。促炎细胞因子能够激活肝星状细胞，进而促进胶原蛋白沉积，最终促使纤维形成[17]。肝纤维化是NASH患者的主要组织病理学特征之一，代表NASH患者存在严重的进行性肝损伤[18]。本研究结果表明，Sin可降低HFD诱导的NASH小鼠体内炎症因子IL-18、IL-1β的含量，减少炎症蛋白cleaved-IL-1β蛋白的表达，并减少肝组织中纤维化相关蛋白（Col-Ⅰ、α-SMA、CTGF）的表达。上述结果提示，Sin可能通过抑制炎症反应、减少肝脏纤维化来改善NASH。

文献报道，Sin可激活AMPK信号通路以缓解炎症反应[11]。AMPK在调节真核生物的细胞能量平衡中发挥着至关重要的作用[5]。激活AMPK信号通路能有效减少脂质沉积和促炎细胞因子的产生，最终抑制脂肪肝的发展[6]。此外，在肝脏中特异性敲除AMPK编码基因可加重HFD诱导的NASH小鼠的肝脏病变[19]。这些研究证据充分表明，AMPK信号通路的激活可能是NASH的潜在治疗靶点。为了深入研究Sin是否通过激活AMPK信号通路抑制炎症反应以改善NASH，本研究利用Western blot技术进行检测，结果显示，与SCD组小鼠和对照组HepG2细胞比较，HFD组小鼠肝组织和OA组HepG2细胞中AMPK蛋白的磷酸化水平均显著降低，而不同剂量/浓度的Sin可不同程度地升高小鼠肝组织和HepG2细胞中AMPK蛋白的磷酸化水平，进而激活AMPK信号通路。YAP蛋白是Hippo通路的效应因子，可参与调节器官大小和组织稳态等[20]。正常情况下，YAP蛋白被隔离在细胞质中，无法转入细胞核内；一旦Hippo途径受到抑制，YAP蛋白就会移位至细胞核中，促进一系列生化反应的发生[21]。研究指出，YAP蛋白发生磷酸化后，其可滞留于细胞质内，从而该蛋白的生物学功能将受到抑制[8]；此外，YAP蛋白的磷酸化还可有助于缓解炎症反

应[22]。有文献表明，YAP蛋白的磷酸化能有效改善肝纤维化，且AMPK可以促进YAP蛋白的磷酸化，从而阻滞后者介导的信号转导[8-9]。为了探究Sin是否能够通过激活AMPK信号通路来促进YAP的磷酸化，从而抑制YAP信号通路，进而抑制NASH中的炎症反应，本研究利用Western blot技术进行检测。结果显示，与SCD组小鼠和对照组HepG2细胞比较，HFD组小鼠肝组织和OA组HepG2细胞中YAP蛋白的磷酸化水平均显著降低，而不同剂量/浓度的Sin均能增加小鼠肝组织和HepG2细胞中YAP蛋白的磷酸化水平。上述结果表明，AMPK/YAP信号通路可能是Sin缓解NASH的重要靶点之一。

综上所述，Sin可抑制NASH小鼠的炎症反应和肝脏脂质蓄积，减轻肝纤维化，上述改善作用可能与激活AMPK信号通路、促进YAP蛋白磷酸化相关。虽然本研究提出了Sin基于AMPK/YAP信号通路改善NASH的潜在机制，但NASH发病机制复杂，是否涉及其他信号通路及通路间的相互作用仍有待后续进一步探讨。

参考文献

[1] FRASER D A, WANG X Y, LUND J, et al. A structurally engineered fatty acid, icosabutate, suppresses liver inflammation and fibrosis in NASH[J]. J Hepatol, 2022, 76(4): 800-811.

[2] SCHUSTER S, CABRERA D, ARRESE M, et al. Triggering and resolution of inflammation in NASH[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2018, 15(6): 349-364.

[3] HARRISON S A, ALLEN A M, DUBOURG J, et al. Challenges and opportunities in NASH drug development[J]. Nat Med, 2023, 29(3): 562-573.

[4] MIREA A M, TACK C J, CHAVAKIS T, et al. IL-1 family cytokine pathways underlying NAFLD: towards new treatment strategies[J]. Trends Mol Med, 2018, 24(5): 458-471.

[5] CHEN X, LI X, ZHANG W Y, et al. Activation of AMPK inhibits inflammatory response during hypoxia and reoxygenation through modulating JNK-mediated NF-κB pathway[J]. Metabolism, 2018, 83: 256-270.

[6] FANG C Q, PAN J H, QU N, et al. The AMPK pathway in fatty liver disease[J]. Front Physiol, 2022, 13: 970292.

[7] SONG K, KWON H, HAN C, et al. Yes-associated protein in Kupffer cells enhances the production of proinflammatory cytokines and promotes the development of nonalcoholic steatohepatitis[J]. Hepatology, 2020, 72(1): 72-87.

[8] TONG G Z, CHEN X X, LEE J, et al. Fibroblast growth factor 18 attenuates liver fibrosis and HSCs activation via the SMO-LATS1-YAP pathway[J]. Pharmacol Res, 2022, 178: 106139.

[9] LUO L, GUO J M, LI Y, et al. Klotho promotes AMPK activity and maintains renal vascular integrity by regulating the YAP signaling pathway[J]. Int J Med Sci, 2023, 20(2): 194-205.

[10] 李修政，董家潇，许晓东. 青藤碱抗炎镇痛作用及机制的研究新进展[J]. 河北医药，2020，42(20)：3148-3153.
LI X Z, DONG J X, XU X D. New research progress on the anti-inflammatory analgesic effects of sinomenine and its action mechanism[J]. Hebei Med J, 2020, 42(20): 3148-3153.

[11] LI R Z, GUAN X X, WANG X R, et al. Sinomenine hydrochloride bidirectionally inhibits progression of tumor and autoimmune diseases by regulating AMPK pathway [J]. Phytomedicine, 2023, 114: 154751.

[12] LAN T, YU Y, ZHANG J, et al. Cordycepin ameliorates nonalcoholic steatohepatitis by activation of the AMP-activated protein kinase signaling pathway[J]. Hepatology, 2021, 74(2): 686-703.

[13] FAN H, TU T T, ZHANG X, et al. Sinomenine attenuates alcohol-induced acute liver injury via inhibiting oxidative stress, inflammation and apoptosis in mice[J]. Food Chem Toxicol, 2022, 159: 112759.

[14] YUAN M L, ZHAO B, JIA H P, et al. Sinomenine ameliorates cardiac hypertrophy by activating Nrf2/ARE signaling pathway[J]. Bioengineered, 2021, 12(2): 12778-12788.

[15] SHEKA A C, ADEYI O, THOMPSON J, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: a review[J]. JAMA, 2020, 323(12): 1175-1183.

[16] GU H P, LI J R, NI Y H. Sinomenine improves renal fibrosis by regulating mesenchymal stem cell-derived exosomes and affecting autophagy levels[J]. Environ Toxicol, 2023, 38(10): 2524-2537.

[17] LUO X J, LI H G, MA L Q, et al. Expression of STING is increased in liver tissues from patients with NAFLD and promotes macrophage-mediated hepatic inflammation and fibrosis in mice[J]. Gastroenterology, 2018, 155(6): 1971-1984.e4.

[18] AJMERA V, LOOMBA R. Imaging biomarkers of NAFLD, NASH, and fibrosis[J]. Mol Metab, 2021, 50: 101167.

[19] ZHAO P, SUN X L, CHAGGAN C, et al. An AMPK-caspase-6 axis controls liver damage in nonalcoholic steatohepatitis[J]. Science, 2020, 367(6478): 652-660.

[20] KANG L J, YI J J, LAU C W, et al. AMPK-dependent YAP inhibition mediates the protective effect of metformin against obesity-associated endothelial dysfunction and inflammation[J]. Antioxidants, 2023, 12(9): 1681.

[21] PERUMAL N, PERUMAL M, HALAGOWDER D, et al. Morin attenuates diethylnitrosamine-induced rat liver fibrosis and hepatic stellate cell activation by co-ordinated regulation of Hippo/YAP and TGF-β_1/Smad signaling[J]. Biochimie, 2017, 140: 10-19.

[22] MELI V S, ATCHA H, VEERASUBRAMANIAN P K, et al. YAP-mediated mechanotransduction tunes the macrophage inflammatory response[J]. Sci Adv, 2020, 6(49): eabb8471.

（收稿日期：2023-12-29　修回日期：2024-05-09）
（编辑：张元媛）