

降脂红曲改善非酒精性脂肪肝的作用机制研究

苏改改

许昌学院 河南 许昌 461000

【摘要】目的：研究降脂红曲对非酒精性脂肪肝（NAFLD）小鼠肝组织的保护作用及对脂肪分化相关蛋白（ADRP）表达的影响，探讨其可能的作用机制。**方法：**雄性昆明种小鼠 60 只，随机分为正常组、正常给药组、模型组、模型给药组。I、II组喂以正常饲料，III、IV组喂以高脂饲料，约 6 周后，建立非酒精性脂肪肝小鼠模型。建模成功后，第II组、IV组给予血脂康（主要成分为降脂红曲）200mg/kg/d，I、II组喂以等量生理盐水，连续灌胃 4 周。实验结束时采用全自动生化分析仪检测各组小鼠空腹血糖（FBG）、谷丙转氨酶（ALT）、谷草转氨酶（AST）、高密度脂蛋白（HDL）、甘油三酯（TG）、胆固醇（CHO）；HE 染色观察肝组织病理学变化；免疫组织化学方法检测肝组织中 ADRP 的表达；Western Blot 检测肝组织中 ADRP 的表达情况。**结果：**NAFLD 组小鼠 FBG, ALT, AST, TC, TG, 均较 NC 组小鼠升高 ($P < 0.05$)，给予血脂康治疗后上述血清学指标均有所改善 ($P < 0.05$)，NAFLD 组小鼠肝组织 ADRP 表达较正常组明显升高，血脂康治疗后，ADRP 的表达较 NAFLD 组降低。与正常组相比，NAFLD 组肝脏脂肪变性和炎症程度均有所加重，血脂康治疗组较 NAFLD 组肝脏脂肪变性和炎症程度有所改善。**结论：**降脂红曲能改善肝功能，减轻肝脏脂肪变性和炎症程度，并可能通过降低 ADRP 的表达，对非酒精性脂肪肝起到一定的保护作用。

【关键词】：降脂红曲；非酒精性脂肪肝；ADRP

Study on the mechanism of lipid-lowering Monascus improving nonalcoholic fatty liver

Gaigai Su

Xuchang University Henan Xuchang 461000

Abstract: Objective: To study the protective effect of lipid-lowering Monascus on liver tissue of nonalcoholic fatty liver (NAFLD) mice and the expression of adipose differentiation related protein (ADRP), and to explore its possible mechanism. Methods: sixty male Kunming mice were randomly divided into normal group, normal administration group, model group and model administration group. Groups I and II were fed with normal diet, and groups III and IV were fed with high-fat diet. About 6 weeks later, the mouse model of nonalcoholic fatty liver was established. After successful modeling, group II and group IV were given Xuezhikang (mainly composed of lipid-lowering Hongqu) 200mg / kg / D, and groups I and II were fed with the same amount of normal saline for 4 weeks. At the end of the experiment, fasting blood glucose (FBG), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), high density lipoprotein (HDL), triglyceride (TG) and cholesterol (CHO) were measured by automatic biochemical analyzer; He staining was used to observe the pathological changes of liver tissue; The expression of ADRP in liver tissue was detected by immunohistochemistry; The expression of ADRP in liver tissue was detected by Western blot. Results: FBG, alt, AST, TC and TG in NAFLD group were higher than those in NC group ($P < 0.05$). The above serological indexes were improved after Xuezhikang treatment ($P < 0.05$). The expression of ADRP in liver tissue of NAFLD group was significantly higher than that in normal group. After Xuezhikang treatment, the expression of ADRP was lower than that in NAFLD group. Compared with the normal group, the degree of hepatic steatosis and inflammation in NAFLD group were aggravated. The degree of hepatic steatosis and inflammation in Xuezhikang treatment group was improved compared with NAFLD group. Conclusion: Jiangzhi Hongqu can improve liver function, reduce the degree of hepatic steatosis and inflammation, and may protect nonalcoholic fatty liver by reducing the expression of ADRP.

Keywords: Lipid lowering Monascus; Nonalcoholic fatty liver; ADRP

近年来，随着人民生活水平的提高和饮食结构的改变，非酒精性脂肪性肝病（NAFLD）的发病率逐年增多，NAFLD 是以肝实质细胞发生脂肪堆积和脂肪变性为主要特征，并伴随机体脂质代谢紊乱的一种获得性代谢性疾病。它的发生与肥胖、胰岛素抵抗、高血压和血脂异常密切相关^[1]。研究表明脂滴相关蛋白参与 NAFLD 的发生，这些蛋白质参与脂质代谢和转运，细胞内运输，信号传导和细胞骨架的组成。ADRP 是主要的脂滴相关蛋白，在几乎所有细胞中均稳定表达^[2]。但是 ADRP 调

节脂质代谢的分子机制尚未明确。

在我国古代，红曲又称为丹曲，《本草纲目》中曾记载：“红曲以白饭蒸罨成红色，与营血有同气相求之理，能生血而健脾，气温达肝，味甘益脾之力也”^[3]。近年来，随着国内外研究学者对红曲的深入研究，其显著的降脂活性被发现，但其具体的作用机制尚不清楚。临床上采用血脂康（主要成分是降脂红曲）治疗 NAFLD 取得较好疗效。本研究通过建立 NAFLD 小鼠模型，观察中药降脂红曲对 NAFLD 小鼠肝组织 ADRP 表

达的影响,探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级昆明种雄性小鼠 60 只,8 周龄,体重 (30g),由河南科技大学动物实验中心提供,生产许可证号: SCXK (苏) 2017-0-001,动物饲养于清洁级实验室,温度 (24±2) °C,湿度 (50±10) %,明暗周期为 12h,所有动物均自由饮水进食。

1.2 主要实验仪器

多项目血液生化自动分析仪 (深圳库贝尔生物科技股份有限公司), DYY-8C 型电泳仪、电泳槽 (北京六一生物科技股份有限公司), 显微镜, ELx800 光吸收酶标仪 (美国 Bio—Tek 公司生产), MilliQ Plus 超纯水系统, 离心机等。

1.3 主要药品与试剂

血脂康胶囊 (北京北大维信生物科技有限公司), β -actin (美国 Santa Cruz 公司生产); 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗 (北京博士德生物有限公司), ADRP 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司), 免 SP 免疫组化试剂盒 (北京中杉金桥)。

1.4 模型建立

参照文献制备高脂饲料,高脂饲料由猪油、胆固醇、蛋黄粉、基础饲料组成,造模小鼠每天给予高脂饲料喂养,正常组小鼠每天给予基础饲料喂养,所有动物均自由饮水,连续干预 4 周。

1.5 分组与给药

将 60 只老鼠随机分为正常组、正常给药组、模型组、模型给药组,每组 10 只。正常组和正常给药组喂以普通饲料,模型组和模型给药组喂以高脂饲料,动物给药剂量按照人与小鼠体表面积比折算。给药组按照 200mg/kg/d 连续灌胃 4 周,对照组喂以等量生理盐水。

1.6 血清学指标检测

末次给药后,各组小鼠隔夜禁食禁水,次日上午以 1%戊巴比妥钠腹腔麻醉小鼠,摘除眼球取血,3000rpm,4°C 离心 10 分钟,分离出血清,用全自动生化分析仪检测血清中 AST、ALT、HDL、TG、CHO 和 GLU 的含量。

1.7 病理学观察

解剖小鼠,采集肝脏,称其质量,取适当大小的肝组织,用 4%的多聚甲醛溶液固定,常规脱水、石蜡包埋、切片。进行常规 HE 染色,显微镜下观察肝组织病理学改变。

1.8 免疫印迹法检测肝组织 ADRP 的表达

一抗浓度按说明书稀释,用 ImageJ 软件分析条带灰度值,以 ADRP 的灰度值与 β -actin 的比值,表示 ADRP 的相对表达量。

1.9 统计学处理

采用 SPSS21.0 软件进行数据分析,计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用独立样本 t 检验和配对样本 t 检验,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 给药后各组小鼠血清生化指标和空腹血糖的比较

与正常组相比,高脂组小鼠的空腹 GLU、血清 AST、ALT、TG、CHO 升高,差异有统计学意义 ($P^a < 0.001$, $P^b < 0.01$, $P^c < 0.05$); 与高脂组相比,高脂给药组小鼠空腹 GLU、血清 AST、ALT、TG、CHO 降低,差异有统计学意义 ($P^a < 0.001$, $P^b < 0.01$, $P^c < 0.05$) (附表 1),可见降脂红曲可以调节脂质代谢紊乱,改善模型组小鼠的肝功能,修复受损。

表 1 各组小鼠血清生化指标和血糖的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

	正常组	正常给药组	高脂组	高脂给药组
ALT	58.6±2.96	49.2±1.48	92.2±3.89a	56.0±3.16a
AST	123±37.9	99.2±20	124±9.82c	93.4±7.79c
TG	3.04±1.07	2.16±0.57	3.70±1.06c	0.60±0.05b
CHO	3.37±0.61	3.14±0.64	6.00±0.26a	3.98±0.78c
GLU	6.92±1.41	7.18±1.48	11.48±0.68b	7.86±0.68b

注:表 1 高脂组与正常组相比, $P^a < 0.001$, $P^b < 0.01$, $P^c < 0.05$,高脂给药组与高脂组相比, $P^d < 0.001$, $P^e < 0.01$, $P^f < 0.05$ 。

2.2 各组小鼠肝脏 HE 染色结果

HE 染色光镜下可见正常组肝组织结构完整,肝细胞形态规则;高脂组小鼠肝组织胞质中有大量脂滴空泡,脂肪变性明显;给药组小鼠肝组织较正常组小鼠仍可见轻度脂肪沉积,与高脂组小鼠相比,肝组织脂肪变性程度明显减轻,脂滴数量明显减少。

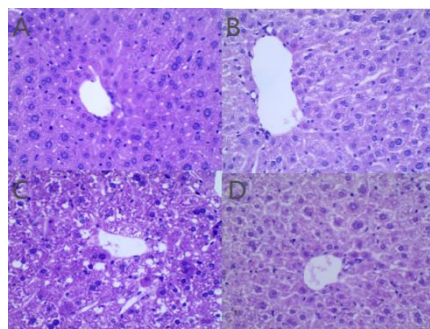


图 1 各组小鼠肝组织病理学变化 (HE 染色, $\times 200$)

A 高脂给药组 B 高脂组 C 正常给药组 D 正常组

2.3 肝指数

肝指数是肝脏质量与体质量的比值,一般情况下该比值比较恒定。肝系数增大,一般见于肝脏充血、水肿或炎症等情况;减小则表示脏器萎缩或者其他退行性改变。与正常组相比,高脂组小鼠的肝质量、肝指数增加,差异有统计学意义 ($P^b < 0.01$,

$P^c<0.001$)；与高脂组相比，高脂给药组小鼠肝质量、肝指数减少，差异有统计学意义 ($P^a<0.05$) (附表2)，可见降脂红曲可以有效降低非酒精性脂肪肝小鼠的肝指数，缓解肝脏脂肪变性，减轻肝脏炎症及充血水肿。

表2 各组小鼠肝指数

组别	体质量 (g)	肝脏质量 (g)	肝指数 (肝脏质量/体质量)
正常组	46±2.86	2.03±0.23	0.04±0.004
正常给药组	41±4.50	1.50±0.10	0.03±0.003
高脂组	50±2.15	2.66±0.14b	0.06±0.002c
高脂给药组	46±4.29	2.32±0.54a	0.05±0.011a

高脂组与正常组相比， $P^b<0.01$ ， $P^c<0.001$ ，高脂给药组与高脂组相比， $P^a<0.05$ 。

2.4 各组小鼠肝组织 ADRP 蛋白的表达情况

图像分析结果显示，与正常组 (30.56 ± 9.35) 相比，NAFLD 模型组小鼠肝组织 ADRP 蛋白表达量显著增高 ($P<0.01$)；与高脂组相比，高脂给药组小鼠肝组织 ADRP 蛋白表达量降低 ($P<0.05$)，降脂红曲可能通过降低 ADRP 蛋白的表达对非酒精性脂肪肝起到一定的保护作用 (附图2)。

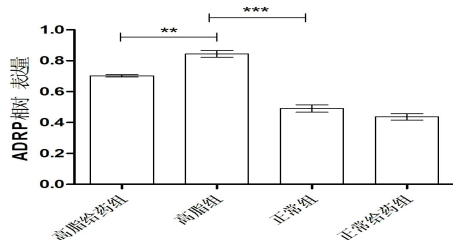


图2 各组小鼠肝组织 ADRP 蛋白的表达情况

参考文献:

- [1] Liu,F., Wang,C., Zhang,L., et al. Metformin prevents hepatic steatosis by regulating the expression of adipose differentiation-related protein[J]. International journal of molecular medicine,2014,33(1):51-58.
- [2] Bickel PE, Tansey JT, Welte MA. PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores.[J]. Biochimica et Biophysica Acta. Molecular and cell biology of Lipids,2009,1791(6):419-440.
- [3] 孔岩玲,刘龙涛,吴敏.降脂红曲国内外研究进展[J].黑龙江药,2005(6):56-57.
- [4] 许炎煌,范建高.非酒精性脂肪肝病治疗药物研究进展[J].上海医药,2020,41(19):3-6,11.
- [5] 严煜钧,刘仲华,林勇,等.茶叶中 EGCG 对非酒精性脂肪肝大鼠的调脂保肝作用研究[J].茶叶科学,2014(3):221-229.
- [6] 徐静,李楠,王俊红,等.二甲双胍对 2 型糖尿病合并非酒精性脂肪肝大鼠肝脏 SIRT1 和 UCP2 表达的影响[J].中南大学学报(医学版),2013(9):882-887.
- [7] 陈中强,翟莹,尚萍萍,等.胆固醇对高脂诱导的非酒精性脂肪肝病的影响[J].武汉轻工大学学报,2015(2):43-46.
- [8] 杨旭东,张杰,杨骄霞.羊栖菜多糖对 2 型糖尿病大鼠脂肪分化相关蛋白表达的影响[J].中国食物与营养,2011,17(6):62-63.

作者简介: 苏改改 (1988-) 女, 汉族, 河南省许昌市人, 助教, 理学硕士, 单位: 许昌学院, 研究方向: 生物化学与分子生物学。
基金项目: 许昌学院校级一般科研项目《降脂红曲改善非酒精性脂肪肝的作用机制研究》, 项目编号: 2021YB015; 许昌学院校级科研项目“降脂红曲改善非酒精性脂肪肝的作用机制研究”(项目编号: 2021YB015)

3 讨论

非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 是一种常见的慢性肝脏疾病, 是一种与胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 和遗传易感密切相关的代谢应激性肝脏损伤。临床表现为肝实质细胞脂质蓄积和脂肪变性, 与脂质代谢紊乱等代谢综合征密切相关^[4,5]。NAFLD 的发病机制迄今还没有完全阐明, 普遍接受的是 Day 和 James 的“二次打击”学说。大量研究表明, 脂肪组织在胰岛素抵抗的发病机制中占有重要地位^[6,7]。研究表明脂滴相关蛋白参与 NAFLD 的发生, ADRP 的过度表达与脂滴扩张和细胞内三酰甘油 (TAG) 质量增加有关。ADRP 作为细胞内脂质积聚及与脂肪沉积相关疾病的灵敏而特异的指标, 对脂肪组织的分化和功能非常重要, 特别是与肥胖、胰岛素抵抗形成有关^[8]。

本实验结果显示, 降脂红曲能明显降低非酒精性脂肪肝模型组小鼠空腹 GLU 及血清 AST、ALT、TG、CHO 水平, 降低肝指数, 有效改善肝功能及肝脏脂质沉积; 病理切片显示降脂红曲保护组小鼠肝细胞及中央静脉周围脂滴空泡较对照组减少, 表明肝组织中脂质沉积减少, 高血脂症状得到改善。此外, 与对照组相比, 降脂红曲保护组小鼠肝组织中 ADRP 的表达也有所下降, 这提示可能与其抑制 ADRP 基因的表达有关。与此前文献报道的 ADRP 缺乏与肝脏 TAG 含量降低和高脂喂养导致的肝脏脂肪变性减弱有关的观点相一致^[2]。

综上所述, 降脂红曲能改善肝功能, 减轻肝脏脂肪变性和炎症程度, 并可能通过降低 ADRP 的表达, 对非酒精性脂肪肝起到一定的保护作用, 但其具体作用机制还有待进一步研究。