

基于脂质代谢异常探讨黄蛭口服液对急性高脂血症小鼠肝细胞凋亡及铁死亡的调节作用



张 哲, 庞晓妍, 牛梦园, 戴卫波, 曾聪彦

广州中医药大学附属中山中医院 (广东中山 528400)

【摘要】目的 基于脂质代谢异常探讨黄蛭口服液对急性高脂血症小鼠肝细胞凋亡和铁死亡的影响。**方法** 选取 40 只 SPF 级的 C57BL/6 小鼠, 随机分为正常对照组、模型组、黄蛭口服液低、高剂量组、非诺贝特组, 每组 8 只。各给药组分别按相应剂量灌胃给与黄蛭口服液和非诺贝特, 正常对照组和模型组给予等量蒸馏水, 连续给药 5 d。除正常对照组外, 其余各组在给药第 3 天时, 肌肉注射四丁酚醛 (Triton WR-1339) 构建高脂血症模型。给药结束后检测小鼠血清血脂水平和肝功能两项, 采用 HE 染色法观察肝脏病理变化、油红 O 染色观察脂质累积情况, 用组织铁试剂盒检测肝组织中的铁含量。通过 Western Blot 检测肝脏 ATP 结合盒转运蛋白 A1 (ABCA1)、三磷酸腺苷结合转运蛋白 G 超家族成员 5 抗体 (ABCG5)、肝 X 受体 α (LXR α)、去唾液酸糖蛋白受体 1 (ASGR1)、活化的聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 (cleaved-PARP)、活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (cleaved-caspase 3)、B 淋巴细胞瘤 -2 基因 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、转铁蛋白受体 1 (TFR1)、溶质载体家族 7 成员 11 (SLC7A11)、谷氨酸半胱氨酸连接酶 (GCLM)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4)、铁蛋白重链 1 (FTH1) 蛋白表达变化。**结果** 与模型组相比, 黄蛭口服液组可减少肝组织脂质空泡, 减轻脂肪变性程度; 降低肝脏中二价铁含量及血清中总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 含量, 同时升高高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 含量; 黄蛭口服液组小鼠肝组织 ABCA1、ABCG5、LXR α 、Bcl-2、SLC7A11、GCLM、GPX4、FTH1 表达水平明显升高, ASGR1、cleaved-PARP、cleaved-caspase 3、Bax、TFR1 表达水平明显下降。**结论** 黄蛭口服液可减轻急性高脂血症小鼠脂质代谢异常, 从而缓解肝细胞凋亡及铁死亡。

【关键词】 黄蛭口服液; 脂质代谢; 铁死亡; 凋亡; 急性高脂血症

【中图分类号】 285.5 **【文献标识码】** A

The regulatory effect of Huangzhi oral liquid on hepatocyte apoptosis and ferroptosis in acute hyperlipidemia mice based on abnormal lipid metabolism

ZHANG Zhe, PANG Xiaoyan, NIU Mengyuan, DAI Weibo, ZENG Congyan

Zhongshan Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Guangzhou University of

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202403087

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (82305119); 全国中药特色技术传承人才培养项目 (T20234832005); 广东省中山市科技计划项目 (2005A122, 2006C012)

通信作者: 曾聪彦, 主任中药师, 硕士研究生导师, Email: zszcy@126.com

Traditional Chinese Medicine, Zhongshan 528400, Guangdong Province, China

Corresponding author: ZENG Congyan, Email: zszcy@126.com

【Abstract】Objective To investigate the effect of Huangzhi oral liquid on ferroptosis and apoptosis of hepatocytes in acute hyperlipidemia mice based on abnormal lipid metabolism. **Methods** Forty SPF grade C57BL/6 mice were randomly assigned to the normal control group, the model group, Huangzhi oral liquid low-dose and high-dose groups, and fenofibrate group, with 8 mice in each group. All administration groups were given Huangzhi oral liquid and fenofibrate by gavage at corresponding doses, while the normal control group and the model group were given the same dose of distilled water for a period of 5 days. on the third day of administration, in addition to the normal control group, other groups were injected intramuscularly with Triton WR-1339 to establish a hyperlipidemia model. After the administration, the serum lipid levels and liver function in mice were detected. The pathological changes of liver were observed by HE staining and lipid accumulation was observed by oil red O staining. The iron content in liver tissues was detected by tissue iron assay kit. The changes in protein expression of ABCA1, ABCG5, LXR α , ASGR1, cleaved-PARP, cleaved-caspase 3, Bcl2, Bax, TFR1, SLC7A11, GCLM, GPX4 and FTH1 in liver were detected by Western Blot. **Results** Compared with the model group, Huangzhi oral liquid could reduce the lipid vacuoles in liver tissues, alleviate the degree of lipid degeneration, reduce the content of TC, TG, LDL-C, AST and ALT in serum, increase the content of HDL-C, increase the protein expression levels of ABCA1, ABCG5, LXR α , Bcl-2, SLC7A11, GCLM, GPX4 and FTH1 in mice liver tissues, reduce the protein expression levels of ASGR1, cleaved-PARP, cleaved-caspase 3, Bax and TFR1. **Conclusion** Huangzhi oral liquid can alleviate the abnormal lipid metabolism in acute hyperlipidemia mice, thus alleviates hepatocyte apoptosis and ferroptosis.

【Keywords】 Huangzhi oral liquid; Lipid metabolism; Ferroptosis; Apoptosis; Acute hyperlipidemia

高脂血症是由各种因素引起的脂质代谢失调，其主要症状是血浆中的甘油三酯（triacylglycerol, TG）、总胆固醇（total cholesterol, TC）和高密度脂蛋白（high-density lipoprotein, HDL）水平偏低，或是低密度脂蛋白（low-density lipoprotein, LDL）水平偏高^[1]。血脂异常与心血管疾病死亡率呈正相关，包括心肌梗死和中风^[2]。因此，调节总胆固醇代谢紊乱对于预防心血管疾病具有重要意义。

肝脏在维持机体内血脂平衡和调节方面具有至关重要的作用，其是脂质生成和分解过程中的核心环节。如果肝脏功能出现问题，可能会引发脂质代谢的不平衡，而当脂质代谢出现紊乱时，脂质可能会在人体内积累^[3]。已有研究表明，配体激活肝 X 受体（liver X receptors, LXRs）是推动胆固醇排出体外的关键因素，LXR α 的激活能够调控一系列参与脂质代谢的下游靶点，例如 ATP 结合盒转运蛋白 A1（ATP-binding cassette

transporter A1, ABCA1）和三磷酸腺苷结合转运蛋白 G 超家族成员 5 抗体（ATP-binding cassette sub-family G member 5, ABCG5）的表达，从而介导胆固醇的外排过程^[4-5]。最近的一项科学研究表明，自由基引起的氧化损伤是肝细胞凋亡的重要原因，当肝脏内的脂质平衡被打破时，脂质过氧化反应会在肝脏内触发，这有可能进一步导致细胞结构被破坏和功能紊乱，从而导致肝细胞发生凋亡以及铁死亡^[6]。脂质代谢相关的疾病与铁死亡有着紧密的关联。更明确地说，脂质代谢失调可能导致脂质过氧化水平上升，而这种过氧化与铁死亡之间存在着紧密的联系。

黄蛭口服液是由广州中医药大学附属中山中医院依据传统经验配方进行研制。该口服液主要由大黄、水蛭、牛蒡子 3 味中药组成，具有活血化瘀、行气化浊的功效。前期临床实验证明黄蛭口服液通过降低丙二醛水平、升高超氧化物歧化酶水平，减缓急性心肌梗死患者经皮冠状动脉介入治疗术后

的心肌缺氧^[7]。临床上这种药物适用于治疗与高血压、高脂血症以及冠状动脉性心脏病等疾病相关的病症^[8-9]，但其具体的作用机制尚未被充分探讨。此研究的目的是了解其作用机制，以期为急性高脂血症的治疗提供关键的理论支撑。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

VICTOR Nivo 型多功能全波长酶标仪 (PerkinElmer); EPHC 400 型垂直电泳槽 (广州道一); ECLIPSE Ti2-A 型荧光显微镜 (Nikon); 10044275 型化学发光成像系统 (Bio-Rad)。

1.2 主要药品与试剂

黄蛭口服液 (中山市中医院制剂室, 批号: 20220207, 规格: 10 mL/支); 非诺贝特 [雅培贸易 (上海) 有限公司, 批号: 30550]; 四丁酚醛 [Triton-WR1339, 西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司, 批号: MKCQ2893]; 一抗 β -actin (武汉赛维尔生物科技有限公司, 批号: AC220227006); 一抗 LXR α (批号: 00104968)、ABCG5 (批号: 00055615)、去唾液酸糖蛋白受体 1 (asialoglycoprotein receptor 1, ASGR1, 批号: 00112530)、B 淋巴细胞瘤 -2 基因 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2, 批号: 11009905)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax, 批号: 00110374) 购于武汉三鹰生物技术有限公司; 一抗 ABCA1 (批号: H661315008) 和谷胱甘肽过氧化物酶 4 (recombinant glutathione peroxidase 4, GPX4, 批号: H661365003) 购于华安生物科技有限公司; 一抗转铁蛋白受体 1 [transferrin receptor protein 1, TFR1, 艾博抗 (上海) 贸易有限公司, 批号: 1000621-9]; 一抗铁蛋白重链 1 (ferritin heavy chain 1, FTH1, 批号: 3c52281)、溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11, 批号: 84a5792)、谷氨酸半胱氨酸连接酶 (recombinant glutamate cysteine ligase, modifier subunit, GCLM, 批号: 72d4644)、活化的聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 (cleaved-poly-ADP ribose polymerase, cleaved-PARP, 批号: 65t3269)、活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (cleaved-caspase 3, 批号: 15z0096)、二抗辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG (H+L) (批号: 88o6572)、Affinity[®] ECL kit

(femtogram) (批号: 60n5049b) 购于江苏亲科生物研究中心有限公司; 二抗辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG [美国 Cell Signaling Technology (CST) 中国分公司赛信通 (上海) 生物试剂有限公司, 批号: 36]; 组织铁含量测定试剂盒 (批号: 20230303)、TG (批号: 20230315)、高密度脂蛋白胆固醇 (high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C, 批号: 20230305)、低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C, 批号: 20230105)、TC (批号: 20230226)、天门冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST, 批号: 20230306)、丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT, 批号: 20230315) 购于南京建成生物工程研究所有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒 (赛默飞世尔科技公司, 批号: xk357435); RIPA 裂解液 (批号: 083123231110)、磷酸酶抑制剂 (批号: 030922220714)、蛋白酶抑制剂 (批号: 030922220714) 购于上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 动物

40 只 SPF 级 6~7 周龄的雄性 C57BL/6 小鼠, 体重 15~17 g, 购自广东省医学实验动物中心, 动物质量合格证号: 44007200113196, 动物使用许可证号: SCXK (粤) 2022-0002。动物饲养室温度为 (22 ± 2) °C, 相对湿度为 55% ± 5%, 人工照明在明暗之间交替使用 (12 h 光照 / 12 h 黑暗), 自由进食饮水。动物实验经广州中医药大学附属中山中医院实验动物伦理委员会批准 (批件号: AEW-2023001)。

1.4 方法

1.4.1 溶液的配制

高、低剂量的黄蛭口服液: 组方由 60 g 大黄、10 g 水蛭、10 g 牛蒡子组成, 将 3 种药材煎煮两次, 合并滤液, 浓缩至 2.08 g/mL (以生药材计), 即黄蛭口服液高剂量 (临床等效剂量 2 倍), 将滤液浓缩至 0.52 g/mL (以生药材计), 即黄蛭口服液低剂量 (临床等效剂量 1/2 倍)。

非诺贝特溶液: 将非诺贝特磨成粉末, 用生理盐水配制成 2.6 mg/mL 的非诺贝特溶液。

Triton-WR1339 溶液: 将 Triton-WR1339 用生理盐水配制成 0.12 g/mL 的 Triton-WR1339 溶液, 现配现用。

1.4.2 分组及给药

经过 1 周适应性喂养后, 将 40 只 C57BL/6 小鼠随机分为正常对照组、模型组、黄蛭口服液低 (5.2 g/kg)、高 (20.8 g/kg) 剂量组和非诺贝特组 (阳性对照, 26 mg/kg), 每组 8 只。以上各给药组均以 10 mL/kg 的剂量灌胃给药, 持续 5 d。给药第 3 天时, 除正常对照组外, 每只小鼠以 10 mL/kg 肌肉注射 Triton-WR1339 溶液构建高脂血症模型^[10]。36 h 后, 造模成功的小鼠给予异氟烷麻醉, 收集小鼠血液和肝脏组织样本, 待进行后续的检测和分析。取材前 12 h 禁食不禁水, 取血后, 将血液在 4 °C 条件下静置 2 h, 然后 1 520 × g 离心 20 min 分离血清, 4 °C 冷藏备用。此外, 部分肝脏组织被固定于 4% 多聚甲醛中, 另一部分储存于 -80 °C 的超低温冰箱内待用。

1.4.3 HE 染色观察小鼠肝脏组织病理变化

将肝脏组织固定在 4% 多聚甲醛中, 然后进行脱水、石蜡包埋、切片 (厚度 5~8 μm)、脱蜡等处理; 接着对切片进行染色, 其中苏木精染色 5 min, 伊红染色 2 min; 最后进行脱水封片, 采用显微镜进行图像采集, 获取组织学图像。

1.4.4 油红 O 染色观察小鼠肝脏脂质沉积

将肝脏组织迅速在液氮中冷冻; 接着制作冰冻切片, 获取清晰、平整的切片 (厚度 6~10 μm); 随后在避光条件下对切片进行油红 O 染色 10 min; 为降低背景干扰, 实施背景分化处理; 最后用苏木精染色 5 min 观察整体组织形态; 完成所有步骤后, 对切片进行封片处理, 并采用显微镜采集图像。

1.4.5 生化指标检测

取血清, 按试剂盒说明书操作, 采用酶标仪测定各样本吸光度值, 计算样本中 TC、TG、LDL-C、HDL-C、AST、ALT 含量。

1.4.6 小鼠肝组织铁含量检测

取 0.1 g 小鼠肝组织, 充分研磨, 制备成匀浆液; 将匀浆液用预冷生理盐水按 1:9 (w/v) 的比例进行稀释, 制备成待测溶液; 采用酶标仪进行含量测定, 严格按试剂盒说明书规范操作。

1.4.7 小鼠肝组织相关蛋白表达检测

采用 RIPA 裂解液提取肝组织蛋白质, 用 BCA 法定量 (5 mg/mL), 上样量均为 10 μL。采用 SDS-PAGE 电泳分离, 转印至 PVDF 膜; 用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h、一抗 (稀释比例 1:1 000) 置于 4 °C 冰箱过夜孵育、HRP 标记二抗 (稀释比例 1:10 000) 孵育增强结合能力, 室温孵育 1.5 h, 最后采用 ECL 法显影。用 Image J 系统进行扫描成像与半定量分析。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 软件进行统计分析, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。当结果服从正态分布或近似正态分布时, 使用 One-Way ANOVA 检验; 否则用非参数检验 Kruskal-Wallis One-Way ANOVA (Bonferroni 校正检验) 进行组间两两比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计意义。

2 结果

2.1 黄蛭口服液对急性高脂血症小鼠肝脏病理的影响

HE 染色结果见图 1。正常对照组的肝细胞排列紧凑, 沿着中央静脉呈放射状分布, 且肝索清晰可见; 在模型组的肝细胞中, 可以观察到明显的脂质空泡现象, 这些空泡大小不一, 且排列混乱; 给与黄蛭口服液后, 脂质空泡数量减少, 随着剂量升高变形程度降低, 此外肝细胞形态得到恢复、肝索明显; 非诺贝特组与黄蛭口服液高剂量组的改善程度相当。

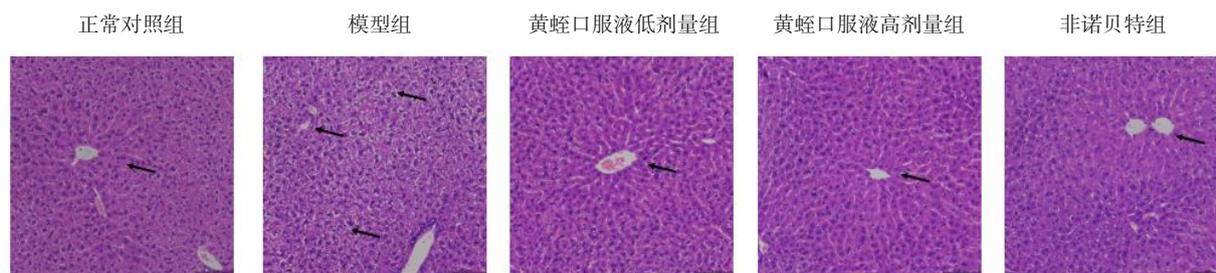


图1 黄蛭口服液对急性高脂血症小鼠肝脏病理的影响 (200 ×)

Figure 1. Effects of Huangzhi oral liquid on liver pathology in mice with acute hyperlipidemia (200 ×)

注: 黑色箭头所指的是肝索及病变的脂质空泡。

2.2 黄蛭口服液对急性高脂血症小鼠肝脏脂质沉积的影响

油红 O 染色结果见图 2。正常对照组小鼠肝脏中并未观察到明显的脂质沉积，细胞核清晰可见；在模型组中，可以观察到明显的橘红色脂滴，

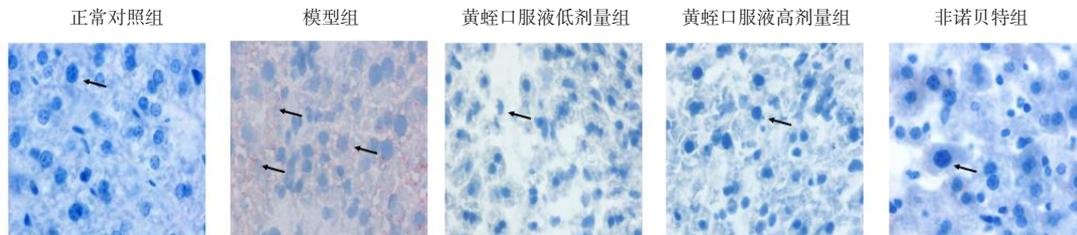


图2 黄蛭口服液对急性高脂血症小鼠肝脏脂质沉积的影响 (400×)

Figure 2. Effects of Huangzhi oral liquid on hepatic lipid deposition in mice with acute hyperlipidemia (400×)

注：黑色箭头所指的是脂滴。

2.3 黄蛭口服液对急性高脂血症小鼠TC和TG水平的影响

与正常对照组比较，模型组小鼠血清中 TC 和 TG 水平显著升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，黄蛭口服液两个剂量组和非诺贝特组小鼠血清中 TC 和 TG 水平显著降低 ($P < 0.01$)；与非诺贝特组比较，黄蛭口服液低剂量组血清中 TC 和 TG 水平显著升高 ($P < 0.01$)。结果表明，黄蛭口服液能有效降低急性高脂血症小鼠血清中 TC 和 TG 水平。具体见图 3。

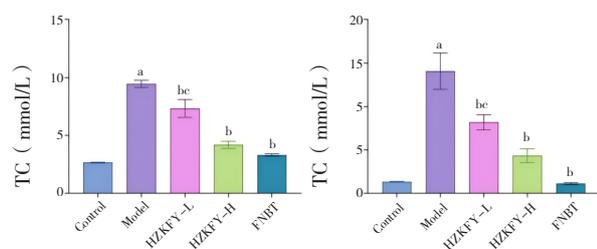


图3 黄蛭口服液对急性高脂血症小鼠TC和TG水平影响 (n=8)

Figure 3. Effects of Huangzhi oral liquid on levels of TC and TG in mice with acute hyperlipidemia (n=8)

注：Control代表正常对照组；Model代表模型组；HZKIFY-L代表黄蛭口服液低剂量组；HZKIFY-H代表黄蛭口服液高剂量组；FNBT代表非诺贝特组；与正常对照组相比，^a $P < 0.01$ ；与模型对照组相比，^b $P < 0.01$ ；与非诺贝特组比较，^c $P < 0.01$ 。

2.4 黄蛭口服液对急性高脂血症小鼠LDL-C和HDL-C水平的影响

与正常对照组比较，模型组小鼠 LDL-C 水平显著升高，而 HDL-C 水平显著降低 ($P < 0.01$)；与模型组比较，黄蛭口服液两个剂量组和非诺贝

脂肪发生明显变性。给与黄蛭口服液后，低、高剂量均不同程度改善脂质沉积，且高剂量组脂质沉积的改善效果更为显著；在非诺贝特组中，脂质沉积亦并不明显，表现出了良好的改善效果。

特组小鼠 LDL-C 水平显著降低，而 HDL-C 水平显著升高 ($P < 0.05$)；与非诺贝特组比较，黄蛭口服液低剂量组 LDL-C 水平表达显著升高 ($P < 0.01$)，黄蛭口服液高剂量组小鼠 HDL-C 水平显著降低 ($P < 0.01$)。结果表明，黄蛭口服液在降低急性高脂血症小鼠 LDL-C 水平的同时，也能提升 HDL-C 水平。具体见图 4。

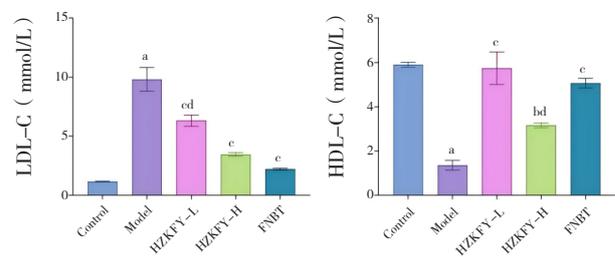


图4 黄蛭口服液对急性高脂血症小鼠LDL-C和HDL-C水平影响 (n=8)

Figure 4. Effects of Huangzhi oral liquid on levels of LDL-C and HDL-C in mice with acute hyperlipidemia (n=8)

注：Control代表正常对照组；Model代表模型组；HZKIFY-L代表黄蛭口服液低剂量组；HZKIFY-H代表黄蛭口服液高剂量组；FNBT代表非诺贝特组；与正常对照组相比，^a $P < 0.01$ ；与模型对照组相比，^b $P < 0.05$ ，^c $P < 0.01$ ；与非诺贝特组比较，^d $P < 0.01$ 。

2.5 黄蛭口服液对急性高脂血症小鼠AST和ALT水平的影响

与正常对照组比较，模型组小鼠 AST 和 ALT 水平显著升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，黄蛭口服液高剂量组和非诺贝特组小鼠 AST 和 ALT 水平，及低剂量组 ALT 水平显著降低 ($P < 0.05$)，低剂量组 AST 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；与非诺贝特组比较，黄蛭口服液低剂量组 ALT 水

平显著升高 ($P < 0.01$)。结果表明, 黄蛭口服液可在一定程度上降低 AST 和 ALT 水平。具体见图 5。

2.6 黄蛭口服液对急性高脂血症小鼠肝脏组织铁水平的影响

与正常对照组比较, 模型组小鼠肝脏组织中的

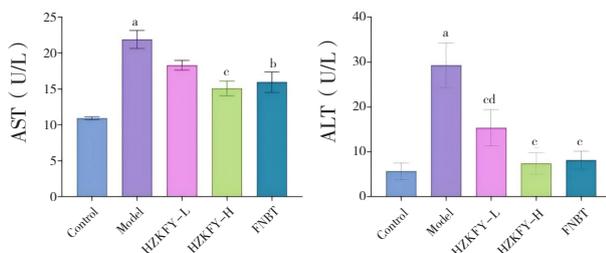


图5 黄蛭口服液对急性高脂血症小鼠AST和ALT水平影响 ($n=8$)

Figure 5. Effects of Huangzhi oral liquid on levels of AST and ALT in mice with acute hyperlipidemia ($n=8$)

注: Control代表正常对照组; Model代表模型组; HZKPY-L代表黄蛭口服液低剂量组; HZKPY-H代表黄蛭口服液高剂量组; FNBT代表非诺贝特组; 与正常对照组相比, ^a $P < 0.01$; 与模型对照组相比, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$; 与非诺贝特组比较, ^d $P < 0.01$ 。

2.7 黄蛭口服液对急性高脂血症小鼠脂质外排相关蛋白表达的影响

与正常对照组比较, 模型组小鼠肝脏中 ABCA1、ABCG5 和 LXR α 表达显著降低, 而 ASGR1 表达显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 黄蛭口服液两个剂量组和非诺贝特组小鼠肝脏中 ABCA1、ABCG5 和 LXR α 表达显著升高,

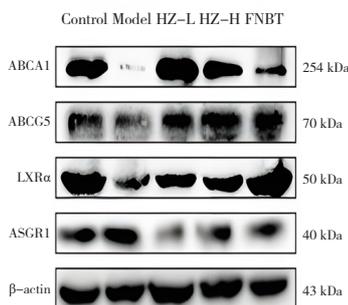


图7 黄蛭口服液对急性高脂血症小鼠脂质外排相关蛋白表达的影响 ($n=3$)

Figure 7. Effects of Huangzhi oral liquid on expression of proteins related to lipid efflux in mice with acute hyperlipidemia ($n=3$)

注: Control代表正常对照组; Model代表模型组; HZKPY-L代表黄蛭口服液低剂量组; HZKPY-H代表黄蛭口服液高剂量组; FNBT代表非诺贝特组; 与正常对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与模型对照组相比, ^b $P < 0.05$ 。

2.8 黄蛭口服液对急性高脂血症小鼠凋亡相关蛋白表达的影响

与正常对照组比较, 模型组小鼠肝脏中

铁含量显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 黄蛭口服液两个剂量组和非诺贝特组小鼠肝脏组织中的铁含量显著降低 ($P < 0.05$); 与非诺贝特组比较, 黄蛭口服液高剂量组小鼠肝脏组织中的铁含量显著升高 ($P < 0.05$)。结果表明, 黄蛭口服液能有效降低小鼠肝脏组织铁水平。具体见图 6。

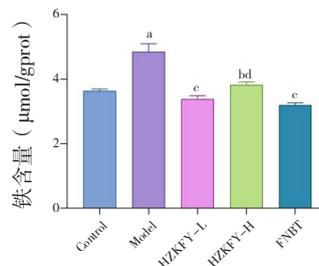
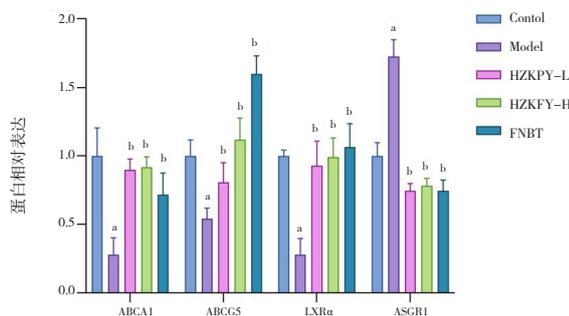


图6 黄蛭口服液对急性高脂血症小鼠肝脏组织铁的影响 ($n=8$)

Figure 6. Effects of Huangzhi oral liquid on iron content of liver tissue in mice with acute hyperlipidemia ($n=8$)

注: Control代表正常对照组; Model代表模型组; HZKPY-L代表黄蛭口服液低剂量组; HZKPY-H代表黄蛭口服液高剂量组; FNBT代表非诺贝特组; 与正常对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与模型对照组相比, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$; 与非诺贝特组比较, ^d $P < 0.05$ 。

而 ASGR1 表达显著降低 ($P < 0.05$); 与非诺贝特组比较, 黄蛭口服液两个剂量组小鼠肝脏中 ABCA1、ABCG5、LXR α 和 ASGR1 表达差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。结果表明, 黄蛭口服液能通过降低 ASGR1 和提高 LXR α 水平, 进而触发其下游的 ABCA1 和 ABCG5 表达, 这有助于胆固醇的排除。具体见图 7。



Bcl-2 表达显著降低, 而 cleaved-PARP、cleaved-caspase 3 和 Bax 表达显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 黄蛭口服液两个剂量组和非诺贝特组小

鼠肝脏中 Bcl-2 表达显著升高, 而 cleaved-PARP、cleaved-caspase 3 和 Bax 表达显著降低 ($P < 0.05$); 与非诺贝特组比较, 黄蛭口服液低剂量组小鼠肝脏中 cleaved-PARP 表达显著升高 ($P < 0.01$)。结果表明, 黄蛭口服液可以通过上调抑调蛋白 Bcl-2, 下调促调蛋白 Bax, 从而抑制其下游 cleaved-PARP 和 cleaved-caspase 3 的表达, 从而有助于减缓肝组织细胞的凋亡过程。具体见图 8。

2.9 黄蛭口服液对急性高脂血症小鼠铁死亡相关蛋白表达的影响

与正常对照组比较, 模型组小鼠肝脏中 SLC7A11、GCLM、GPX4 和 FTH1 表达显著降低,

而 TFR1 表达显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 黄蛭口服液两个剂量组和非诺贝特组小鼠肝脏中 SLC7A11、GCLM、GPX4 和 FTH1 表达显著升高, 而 TFR1 表达显著降低 ($P < 0.05$); 与非诺贝特组比较, 黄蛭口服液两个剂量组的 FTH1 表达及低剂量组的 GCLM 表达显著降低 ($P < 0.05$), 而黄蛭口服液低剂量组的 SLC7A11 表达显著升高 ($P < 0.01$)。结果表明, 黄蛭口服液能够通过上调 SLC7A11、GCLM、GPX4、FTH1 蛋白和下调 TFR1 蛋白, 进而通过抑制铁死亡相关途径, 对急性高脂血症小鼠肝脏脂质沉积产生一定的影响。具体见图 9。

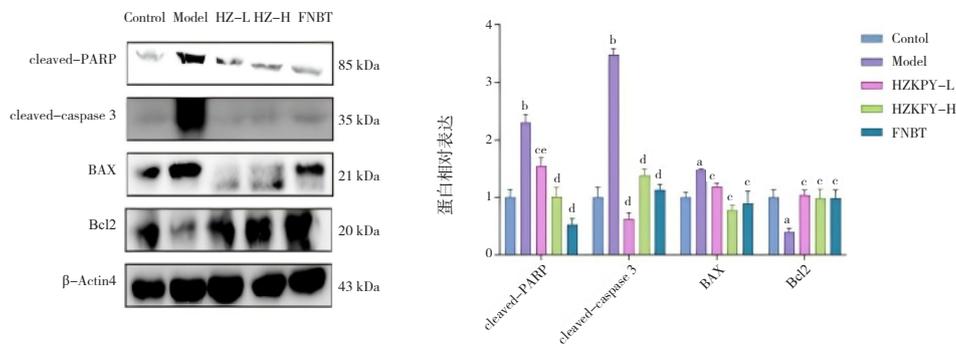


图8 黄蛭口服液对急性高脂血症小鼠凋亡相关蛋白表达影响 ($n=3$)

Figure 8. Effects of Huangzhi oral liquid on expression of apoptosis related proteins in mice with acute hyperlipidemia ($n=3$)

注: Control代表正常对照组; Model代表模型组; HZKFY-L代表黄蛭口服液低剂量组; HZKFY-H代表黄蛭口服液高剂量组; FNBT代表非诺贝特组; 与正常对照组相比, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与模型对照组相比, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$; 与非诺贝特组比较, ^e $P < 0.01$ 。

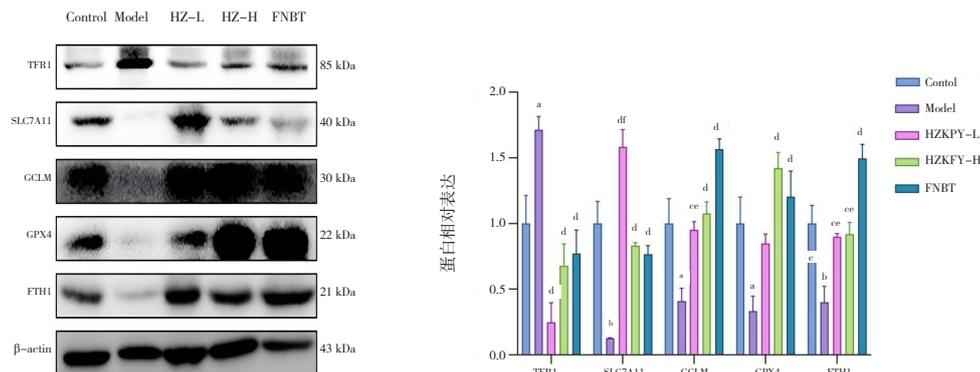


图9 黄蛭口服液对急性高脂血症小鼠铁死亡相关蛋白表达的影响 ($n=3$)

Figure 9. Effects of Huangzhi oral liquid on expression of iron death related proteins in mice with acute hyperlipidemia ($n=3$)

注: Control代表正常对照组; Model代表模型组; HZKFY-L代表黄蛭口服液低剂量组; HZKFY-H代表黄蛭口服液高剂量组; FNBT代表非诺贝特组; 与正常对照组相比, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与模型对照组相比, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$; 与非诺贝特组比较, ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$ 。

3 讨论

高脂血症的根本病因在于肝、脾、肾等脏腑功能失调, 导致痰浊和血瘀的形成。针对肝郁者,

治疗以疏肝理气、通畅血脉为主, 如采用柴胡疏肝散等方剂进行调理和治疗; 针对脾虚者, 治疗以健脾利湿、化痰活血为主, 如采用六君子汤等方剂进行调理和治疗; 针对肾虚者, 治疗以补肾

温肾为主,如采用金匱肾气丸等方剂进行调理和治疗;针对痰瘀者,治疗以化痰活血祛瘀为主,如采用血府逐瘀汤等方剂进行调理和治疗^[11]。黄蛭口服液以水蛭为主药,辅以大黄、牛蒡子制成的纯中药口服液。经动物实验证明,水蛭粉可减少脂质过氧化作用对细胞造成损伤^[12]。此外,水蛭中的主要成分水蛭素能抑制 Bax 和 caspase 3 的表达,从而缓解了细胞凋亡^[13]。大黄通过影响与胆固醇代谢相关的酶,调节了 TC 水平^[8,14]。此外黄蛭口服液在临床上能降低血浆 TC 及 TG,升高血浆 HDL-C 水平。大黄、水蛭、牛蒡子合用,共奏祛瘀活血、化浊散结之功。

黄蛭口服液可有效改善急性高脂血小鼠的血脂水平以及肝脏损伤,主要表现为小鼠血清中的 TC、TG、LDL-C、AST、ALT 水平显著降低,而 HDL-C 水平显著升高。在高脂血症患者异常的血脂指标中,TC 水平的异常升高会更容易产生高风险斑块,诱发严重的心血管疾病^[15]。已有研究表明 ASGR1、LXR α 是肝脏中特异性高表达且具有调节 TC 代谢作用的两个因子^[16-17]。ASGR1,一种在人体肝脏中高表达的蛋白质,可以内化血液中脱唾液酸糖蛋白并将其引领至溶酶体进行降解^[18]。研究表明,如果 ASGR1 低表达,可促进 TC 的排泄,且提高 LXR α 的表达^[19]。LXR α 能够上调 ABCA1 和 ABCG5/G8,在 TC 转运到 HDL 以及将其排泄至胆汁和粪便的过程中均起到了关键作用^[20]。综上所述,黄蛭口服液通过参与 TC 的转运、排泄来调节及治疗急性高脂血。其作用机制可能是黄蛭口服液下调 ASGR1 的表达,导致 LXR α 的表达上调,促进下游 ABCA1 蛋白的表达,进而增加了 HDL-C 的生成。同时,黄蛭口服液还能对 ABCG5 进行上调,这样就能促进 TG 和 TC 向外转运,减少脂质在肝脏中的沉积。

铁死亡是近年来提出的一种新的细胞程序性死亡形式,脂质过氧化累积是其特点之一,异常的脂质代谢会诱导细胞发生铁死亡^[21-22]。铁作为人体必需的微量元素,对于维持机体健康具有至关重要的作用。在高脂血症模型小鼠的研究中,通过拮抗肝细胞铁死亡相关因子,可以有效地保护肝脏,减少肝细胞脂质过氧化物的发生和肝脏脂质沉积。这一发现为防治高脂血症及其引发的肝脏损伤提供了新的治疗策略^[23]。在铁死亡过程中,SLC7A11、GPX4、FTH1、TFR1 是其中的关键分

子,对铁死亡有重要的调控作用。GPX4 是一种关键的抗氧化酶,其的失活会导致脂质过氧化物的积累。此外,Fe²⁺ 可催化并增强脂质过氧化物的发生^[24]。TFR1 是一种已鉴定的铁死亡标记物,通过受体介导的内吞作用将转铁蛋白结合的铁携带到细胞中,从而控制细胞对铁的吸收,然后通过前列腺六跨膜上皮抗原 3 将 Fe³⁺ 还原为 Fe²⁺^[25]。而 FTH1 则是通过负责将 Fe²⁺ 氧化成 Fe³⁺,减少 Fe²⁺ 的蓄积,从而减少脂质过氧化^[26]。SLC7A11 可将胱氨酸从细胞外运输至细胞内,同时将向细胞外运输谷氨酸,从而合成谷胱甘肽,以还原 GPX4 发挥其抗脂质过氧化反应的作用^[27]。GCLM 则是谷胱甘肽生产的一个限速步骤^[28]。本研究发现黄蛭口服液可使高脂血小鼠肝内组织铁水平降低,但相较黄蛭口服液高剂量组而言,黄蛭口服液低剂量组调控 TFR1 和 FTH1 的效果更佳,所以能更有效地将组织中的 Fe²⁺ 转变为 Fe³⁺ 的同时减少 Fe³⁺ 转变为 Fe²⁺,故黄蛭口服液低剂量组中所检测到的组织铁含量更低。综上,黄蛭口服液可提高高脂血小鼠肝组织中 GPX4、SLC7A11、FTH1、GCLM 蛋白表达,降低 TFR1 蛋白表达,减少肝内 Fe²⁺ 沉积,改善肝功能。

细胞凋亡被视为多种过程的关键环节,例如正常的细胞更新、免疫系统的正常发育和功能执行、胚胎发育以及化学因素诱导的细胞死亡^[29]。Bcl-2 家族中的 Bcl-2、Bax 蛋白是目前已知的细胞凋亡中最重要的调控蛋白^[30]。促凋亡蛋白 Bax 被激活后,破坏线粒体膜的完整性,促进细胞色素 c 的释放,导致 caspase 3 的激活。Bcl-2 可通过抑制 caspase 级联反应下游最关键的凋亡执行者 caspase 3 减少凋亡的发生。cleaved-PARP 的产生受到 caspase 3 的催化作用,切割 PARP 并将其激活,随后激活其他凋亡相关的蛋白酶,以完成细胞凋亡过程^[31]。在受损的肝组织中,促凋亡蛋白如 Bax、cleaved-caspase 3 和 cleaved-PARP 的表达将增加,抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达将减少。在本研究中,黄蛭口服液显著逆转了这些作用,通过下调 Bax/Bcl-2 两蛋白的比例,从而抑制下游的 cleaved-caspase 3 及 cleaved-PARP 的表达,从而减弱肝组织细胞的凋亡。

综上所述,黄蛭口服液对急性高脂血症小鼠具有良好的降脂效果,并且能有效抑制肝组织细胞的凋亡及减少肝内铁沉积。其机制可能是抑制

ASGR1 的表达, 从而上调 LXR α , 促进 ABCA1 和 ABCG5 蛋白的表达, 加速胆固醇外排; 通过提高小鼠肝组织中 GPX4、SLC7A11、FTH1、GCLM 蛋白表达, 降低 TFR1 蛋白表达, 减少肝脏脂质沉积; 通过使凋亡蛋白 Bcl-2 表达增加, Bax 表达减少, 从而抑制高脂血症小鼠肝组织细胞的凋亡。

参考文献

- 王小刚, 赵娴, 李悦, 等. 高脂血症发病机制及治疗研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(12): 196–200. [Wang XG, Zhao X, Li Y, et al. Research progress of pathogenesis and treatment of hyperlipidemia[J]. Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2020, 22(12): 196–200.] DOI: 10.13194/j.issn.1673–842x.2020.12.044.
- Karr S. Epidemiology and management of hyperlipidemia[J]. Am J Manag Care, 2017, 23(9 Suppl): S139–S148. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28978219/>.
- 王杰, 贾连群, 宋囡, 等. 四君子汤通过铁死亡途径改善动脉粥样硬化小鼠肝脏脂质沉积 [J]. 解剖科学进展, 2021, 27(1): 75–78. [Wang J, Jia LQ, Song N, et al. Sijunzi decoction improves lipid deposition in atherosclerotic mice via iron death pathway[J]. Progress of Anatomical Sciences, 2021, 27(1): 75–78.] DOI: 10.16695/j.cnki.1006–2947.2021.01.020.
- 马晶鑫, 郭金洲, 陈海宁, 等. 淡豆豉异黄酮通过 PPAR γ /LXR α /ABCA1 信号通路改善动脉粥样硬化小鼠脂质代谢的作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(11): 110–118. [Ma JX, Guo JZ, Chen HN, et al. Isoflavones from Sojae Semen Praeparatum regulate lipid metabolism in atherosclerotic mice through PPAR γ /LXR α /ABCA1 signaling pathway[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2022, 28(11): 110–118.] DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20220940.
- 黄晓其, 吴晓丽, 颜思珊, 等. 蜂胶对 Triton–WR1339 所致高脂血症小鼠的降脂作用及调控脂质代谢机制 [J]. 南方医科大学学报, 2018, 38(8): 1020–1025. [Huang XQ, Wu XL, Yan SS, et al. Lipid-lowering effect of propolis in mice with Triton–WR1339-induced hyperlipidemia and its mechanism for regulating lipid metabolism[J]. Journal of Southern Medical University, 2018, 38(8): 1020–1025.] DOI: 10.3969/j.issn.1673–4254.2018.08.20.
- 黄桂芹, 付宇, 缪明星, 等. 铁死亡介导的抗肿瘤免疫治疗研究进展 [J]. 肿瘤防治研究, 2023, 50(7): 700–704. [Huang GQ, Fu Y, Miao MX, et al. Research progress on ferroptosis-mediated antitumor immunotherapy[J]. Cancer Research on Prevention and Treatment, 2023, 50(7): 700–704.] DOI: 10.3971/j.issn.1673–4254.2018.08.20.
- 梁慧秋. 黄蛭口服液干预急性心肌梗死 PCI 后再灌注损伤的临床研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2015. <https://cdmd.cnki.com.cn/Article/CDMD-10572-1015363500.htm>.
- 曾聪彦, 李雪山, 万英, 等. 黄蛭口服液的制备及临床疗效观察 [J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(5): 669–670. [Zeng CY, Li XS, Wang Y, et al. Preparation and clinical curative effect of Huangzhi oral liquid[J]. Chinese Journal of Hospital Pharmacy, 2007, 27(5): 669–670.] DOI: 10.3321/j.issn:1001–5213.2007.05.042.
- 缪灿铭, 何训昌, 李燕林, 等. 脑脂平治疗高脂血症的临床观察 [J]. 广州中医药大学学报, 1999, 16(4): 296–298. [Miao CM, He XC, Li YL, et al. Clinical observation of Naozhiping in treating hyperlipidemia[J]. Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, 1999, 16(4): 296–298.] DOI: 10.3969/j.issn.1007–3213.1999.04.013.
- 李钰婷, 蔡大可, 郑柳怡, 等. NLRP3 基因敲除增强芹菜素对 Triton–WR 1339 所致高脂血症的降血脂及抗炎作用研究 [J]. 中国药理学通报, 2020, 36(4): 543–549. [Li YT, Cai DK, Zheng LY, et al. Knockout of NLRP3 enhances hypolipidemic effect and anti-inflammatory effect of apigenin in Triton–WR 1339-induced hyperlipidemia mice[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2020, 36(4): 543–549.] DOI: 10.3969/j.issn.1001–1978.2020.04.018.
- 孙悦, 马国庆. 中医治疗高脂血症的研究概况 [J]. 中国民族民间医药, 2023, 32(4): 55–58. [Sun Y, Ma GQ. Research progress in TCM treatment of hyperlipidemia[J]. Chinese Journal of Ethnomedicine and Ethnopharmacy, 2023, 32(4): 55–58.] <https://www.cnki.com.cn/Article/CJFDTotol-MZMJ202304013.htm>.
- 李美兰. 水蛭配方在高脂血症中的应用 [J]. 云南医药, 2022, 43(4): 57–59. [Li ML. Application of leech formula in hyperlipidemia[J]. Medicine and Pharmacy of Yunnan, 2022, 43(4): 57–59.] https://www.nstl.gov.cn/paper_detail.html?id=3d2969aef53ff0adffe6ae8b5279b66.
- 彭鑾. 水蛭素通过 p38 MAPK/IKK/NF- κ B 通路调节大鼠血运障碍皮瓣炎症反应及细胞凋亡相关因子表达

- 的研究[D]. 南宁: 广西医科大学, 2016. DOI: 10.7666/d.D00999845.
- 14 王磊. 大黄水蛭合剂治疗糖尿病高脂血症的机理分析[J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16(52): 153. [Wang L. Mechanism analysis of Rhubarb and leech mixture in treating diabetic hyperlipidemia[J]. World Latest Medicine Information, 2016, 16(52): 153.] DOI: 10.3969/j.issn.1671-3141.2016.52.092.
- 15 冯莹印, 高晓, 宋金玉, 等. 高脂血症与颈动脉粥样硬化斑块的关系研究[J]. 医学信息, 2022, 35(13): 89-93. [Feng YY, Gao X, Song JY, et al. Relationship between hyperlipidemia and carotid atherosclerotic plaque[J]. Medical Information, 2022, 35(13): 89-93.] DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2022.13.019.
- 16 韩汶润, 张丹丹, 朱彦, 等. 肝 X 受体调控脂代谢研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2021, 35(5): 391-400. [Han WR, Zhang DD, Zhu Y, et al. Research progress in regulation of lipid metabolism by liver X receptors[J]. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 2021, 35(5): 391-400.] DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2021.05.009.
- 17 Zhao W, Xu S, Weng J. ASGR1: an emerging therapeutic target in hypercholesterolemia[J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 8(1): 43. DOI: 10.1038/s41392-023-01319-5.
- 18 夏梦蝶. ASGR1 在肝细胞脂质摄取中的作用及机制[D]. 湖南衡阳: 南华大学, 2022. DOI: 10.27234/d.cnki.gnhuu.2022.000886.
- 19 Cao K, Zhang K, Ma M, et al. Lactobacillus mediates the expression of NPC1L1, CYP7A1, and ABCG5 genes to regulate cholesterol[J]. Food Sci Nutr, 2021, 9(12): 6882-6891. DOI: 10.1002/fsn3.2600.
- 20 Wang JQ, Li LL, Hu A, et al. Inhibition of ASGR1 decreases lipid levels by promoting cholesterol excretion[J]. Nature, 2022, 608(7922): 413-420. DOI: 10.1038/s41586-022-05006-3.
- 21 刘晓萍, 毛德文, 林玉培, 等. 铁死亡在不同肝脏疾病的研究进展[J]. 海南医学院学报, 2024, 30(6): 463-468. [Liu XP, Mao DW, Lin YP, et al. Research progress of ferroptosis in different liver diseases[J]. Journal of Hainan Medical University, 2024, 30(6): 463-468.] DOI: 10.13210/j.cnki.jhmu.20230615.002.
- 22 余增, 黄承浩. 脂质代谢调节肿瘤细胞铁死亡研究进展[J]. 生命科学, 2020, 32(7): 738-745. [Yu Z, Huang HC. Lipid metabolism regulates ferroptosis in tumor[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2020, 32(7): 738-745.] DOI: 10.13376/j.cbcls/2020093.
- 23 马贵萍, 于忠杨, 卿立金, 等. 加味二至丸通过抑制铁死亡减轻高脂血症小鼠肝脏脂质沉积[J]. 中国病理生理杂志, 2022, 38(2): 259-266. [Ma GP, Yu ZY, Qing LJ, et al. Jiawei-Erzhi pills attenuate liver lipid deposition in mice with hyperlipidemia by inhibiting ferroptosis[J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2022, 38(2): 259-266.] DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2022.02.009.
- 24 Lam P, Cheung F, Tan HY, et al. Hepatoprotective effects of Chinese medicinal herbs: a focus on anti-inflammatory and anti-oxidative activities[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(4): 465. DOI: 10.3390/ijms17040465.
- 25 Zheng J, Conrad M. The metabolic underpinnings of ferroptosis[J]. Cell Metab, 2020, 32(6): 920-937. DOI: 10.1016/j.cmet.2020.10.011.
- 26 黄荣, 张艳艳, 刘晓闯, 等. 桃红四物汤通过上调 FTH1 抑制铁死亡治疗子宫异常出血[J]. 中南药学, 2023, 21(9): 2275-2281. [Huang R, Zhang YY, Liu XC, et al. Effect of Taohong Siwu decoction against abnormal uterine bleeding in rats by inhibiting ferroptosis via up-regulating FTH1[J]. Central South Pharmacy, 2023, 21(9): 2275-2281.] DOI: 10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.002.
- 27 Ratan RR. The chemical biology of ferroptosis in the central nervous system[J]. Cell Chem Biol, 2020, 27(5): 479-498. DOI: 10.1016/j.chembiol.2020.03.007.
- 28 Lyu D, Zhong C, Dixit D, et al. EGFR promotes ALKBH5 nuclear retention to attenuate N6-methyladenosine and protect against ferroptosis in glioblastoma[J]. Mol Cell, 2023, 83(23): 4334-4351. DOI: 10.1016/j.molcel.2023.10.025.
- 29 Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death[J]. Toxicol Pathol, 2007, 35(4): 495-516. DOI: 10.1080/01926230701320337.
- 30 Newton K, Strasser A, Kayagaki N, et al. Cell death[J]. Cell, 2024, 187(2): 235-256. DOI: 10.1016/j.cell.2023.11.044.
- 31 邢布点. Caspase-8/Caspase-3/PARP-1 信号通路 with 房颤患者的相关性研究[D]. 安徽蚌埠: 蚌埠医学院, 2023. DOI: 10.26925/d.cnki.gbbyc.2023.000045.

收稿日期: 2024 年 03 月 13 日 修回日期: 2024 年 07 月 10 日
本文编辑: 钟巧妮 李 阳