·论　著·

大豆苷元调节 SIRT1/AMPK 信号通路对非酒精性脂肪肝大鼠自噬反应的影响

吴德建[1],杨　秋[2],谢桂丹[1],彭　鑫[1]
儋州市人民医院:1. 消化内科;2. 检验科,海南儋州 571799

摘　要:目的　探讨大豆苷元(DAI)对非酒精性脂肪肝(NAFLD)大鼠自噬反应的影响,以及沉默信息调节因子 1(SIRT1)/腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)信号通路在此过程中的作用。**方法**　将 60 只健康雄性 SD 大鼠分为对照组、NAFLD 组、DAI 低剂量组(DAI-L 组)和 DAI 高剂量组(DAI-H 组)和 DAI-H+SIRT1 抑制剂(EX-527)组。通过喂养高脂饲料 12 周构建 NAFLD 模型。检测肝脏指数、血清天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移(ALT)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)水平,以及肝组织病理形态学变化、肝细胞凋亡率、微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)阳性表达和自噬、SIRT1/AMPK 信号通路相关蛋白表达水平。**结果**　与对照组比较,NAFLD 组大鼠肝脏指数,血清 AST、ALT、TC、TG 水平、NAFLD 活动度积分(NAS)评分,肝细胞凋亡率,肝组织 LC3 阳性表达水平,p62 蛋白表达水平升高($P<0.05$),Beclin-1、LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ、SIRT1、p-AMPK/AMPK 蛋白表达降低($P<0.05$),并存在严重肝损伤。与 NAFLD 组比较,DAI-L 组和 DAI-H 组可改善大鼠上述指标的变化,且 DAI-H 组改善更明显,而 EX-527 可减弱 DAI-H 对大鼠上述指标的改善作用。**结论**　DAI 可能通过促进 SIRT1/AMPK 信号通路激活增强自噬反应,减轻 NAFLD 大鼠肝脏损伤。

关键词:大豆苷元;　非酒精性脂肪肝;　自噬;　沉默信息调节因子 1;　腺苷酸活化蛋白激酶;　信号通路

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.19.018　　**中图法分类号:**R285.5;R575.5
文章编号:1673-4130(2023)19-2395-07　　**文献标志码:**A

Effect of Daidzein on autophagy in rats with non-alcoholic fatty liver disease by regulating SIRT1/AMPK signaling pathway

WU Dejian[1],*YANG Qiu*[2],*XIE Guidan*[1],*PENG Xin*[1]
1. *Department of Gastroenterology*;2. *Department of Laboratory Medicine*,
Danzhou People's Hospital,*Danzhou*,*Hainan* 571799,*China*

Abstract:Objective　To investigate the effect of Daidzein (DAI) on autophagy in rats with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and the role of silent information regulator 1 (SIRT1)/adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway in this process. **Methods**　Sixty healthy male SD rats were divided into control group, NAFLD group, DAI low-dose group (DAI-L group), DAI high-dose group (DAI-H group) and DAI-H+SIRT1 inhibitor group (EX-527). NAFLD model was established by feeding high-fat diet for 12 weeks. The liver index, serum aspartate aminotransferase (AST), alanine transaminase (ALT), total cholesterol (TC), triglyceride (TG) levels, liver histopathological changes, hepatocyte apoptosis rate, positive expression of microtubule-associated protein-1 light chain 3 (LC3), autophagy and SIRT1/AMPK signaling pathways related protein expression were detected. **Results**　There was severe liver injury; compared with NAFLD group, DAI-L group and DAI-H group can improve the changes of the above indexes of rats, and the improvement of DAI-H group is more obvious; however, DAI-H+EX-527 group could weaken the improvement effect of DAI-H group on the above indexes of rats. Compared with the control group, the liver index, serum AST, ALT, TC, TG levels, NAFLD activity score (NAS), hepatocyte apoptosis rate, LC3 positive expression level in liver tissue, and p62 protein expression increased in NAFLD group ($P<0.05$). Meanwhile, Beclin-1, LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ, SIRT1, P-AMPK/AMPK protein expression decreased ($P<0.05$), and there was serious liver injury. Compared with NAFLD group, DAI-L group and DAI-H group could improve the above indexes, and the improvement was more obvious in DAI-H group. However, EX-527 could weaken

作者简介:吴德建,男,主治医师,主要从事肝炎、肝硬化的诊疗研究。

the improvement of DAI-H on the above indexes in rats. **Conclusion**　Daidzein may enhance autophagy and alleviate liver injury in NAFLD rats by promoting the activation of SIRT1/AMPK signaling pathway.

Key words: Daidzein;　non-alcoholic fatty liver disease;　autophagy;　silent information regulator 1;　adenosine monophosphate-activated protein kinase;　signaling pathway

近年来，肥胖和 2 型糖尿病患病率上升，非酒精性脂肪肝(NAFLD)发病率亦持续上升且呈低龄化趋势，并随着病程延长，非酒精性单纯性脂肪肝可能发展为非酒精性脂肪肝炎，甚至发展成肝硬化、肝细胞癌[1-2]。目前，由于 NAFLD 诊断困难、发病机制复杂、缺乏标准的治疗方法，其仍是世界范围内的公共卫生问题[3]。因此，寻找安全、高效的早期干预措施阻滞或延缓 NAFLD 病情进展具有重要意义。大豆苷元(DAI)是一种大豆异黄酮，具有抗炎和抗氧化作用，已有研究表明 DAI 预处理可减轻刀豆球蛋白 A 诱导的肝损伤小鼠氧化应激和肝细胞凋亡[4]。自噬作为一种通过溶酶体吞噬降解自身组分的细胞内分解代谢途径，在调节胰岛素抵抗、脂质代谢和改善 NAFLD 的肝细胞脂肪变性中发挥重要作用[5]。激活沉默信息调节因子 1(SIRT1)/腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)信号通路增强自噬，可减轻高脂饮食喂养的 NAFLD 大鼠脂质沉积[6]。此外，DAI 治疗糖尿病大鼠可升高 AMPK 和 SIRT1 表达水平，降低血糖并调节血脂水平，减轻氧化应激，缓解心肌组织损伤[7]。基于此，笔者推测 DAI 可能通过调节 SIRT1/AMPK 信号通路激活自噬反应，减轻 NAFLD 大鼠肝脏损伤。为验证上述猜测，本研究着重观察 DAI 在改善 NAFLD 大鼠肝脏损伤时对自噬及 SIRT1/AMPK 信号通路的影响，以期为 NAFLD 的药物治疗提供实验依据。

1　材料与方法

1.1　实验动物　60 只健康雄性 SD 大鼠，无特定病原体(SPF)级，6～7 周龄，体重(200±10)g，由中国科学院上海药物研究所提供，生产许可证号：SCXK(沪)2020-0005。大鼠饲养环境：温度(23±2)℃，湿度(50±5)%，12 h 光/暗循环，自由饮水摄食。本研究遵循《实验动物保护条例》相关规定，符合动物实验学“3R”原则(即减量化原则、再使用原则、再循环原则)。

1.2　试剂与仪器　DAI(上海源叶生物科技有限公司，货号：B20227-20 mg)；SIRT1 抑制剂(EX-527，美国 MCE 公司，货号：HY-15452)；天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)；苏木素-伊红(HE)染色试剂盒、原位末端标记法(TUNEL)凋亡检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司，货号：G1120-100、T2130-50T)；免疫组化试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司，货号：E-IR-R215)；SYBR Green Realtime PCR Master Mix(日本 TOYOBO 公司，货号：QPK-201)；微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)、Beclin-1、p62、SIRT1、AMPK、磷酸化的 AMPK(p-AMPK)、GAPDH 抗体(兔抗)及辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔 IgG(美国 Abcam 公司)。cobas c 311 全自动生化分析仪(德国罗氏诊断)；Sunrise 酶标仪(上海帝肯贸易有限公司)；E100 生物显微镜(日本尼康公司)；ABI 7500 RT-qPCR 仪(美国 Thermofisher 公司)；ZF-268 全自动凝胶成像分析系统(上海金鹏分析仪器有限公司)。

1.3　分组、造模与给药　60 只大鼠适应性饲养 1 周后按照随机数表法分为对照组、NAFLD 组、DAI 低剂量组(DAI-L 组)、DAI 高剂量组(DAI-H 组)和 DAI-H＋EX-527 组，每组 12 只。对照组大鼠给予普通饲料，其余组大鼠给予高脂饲料(普通饲料＋10%猪油＋1%胆固醇＋0.5%胆酸钠等)以构建 NAFLD 模型，连续喂养 12 周[8-9]。造模结束后每组随机取 2 只大鼠处死，通过观察大鼠肝脏外部形态、肝组织病理学改变等判断是否造模成功。确定造模成功后，每组剩余的 10 只大鼠进行后续实验。参照文献[7,10]并结合预实验结果进行相应处理，DAI-L 组、DAI-H 组大鼠分别灌胃 50、100 mg/kg DAI；DAI-H＋EX-527 组大鼠灌胃 100 mg/kg DAI 同时腹腔注射 5 mg/kg EX-527；NAFLD 组和对照组给予等量生理盐水。其中，DAI 每天灌胃 1 次，EX-527 每 3 天腹腔注射 1 次，连续 6 周。

1.4　样本收集与肝脏指数检测　末次给药后大鼠禁食 12 h，称取体重。随后腹腔注射 50 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉大鼠，腹主动脉取血，血样 4 ℃静置 1 h 后以 3 000 r/min 离心 15 min，取上层血清，保存于－20 ℃冰箱。处死大鼠，摘取肝脏组织，使用 4 ℃预冷的生理盐水清洗干净，并用滤纸吸除多余水分，称量肝脏湿重，计算每只大鼠肝脏指数[肝脏指数(%)＝大鼠肝脏湿重(g)/大鼠体重(g)×100%][11]。称量肝脏湿重后立即将每只大鼠的肝脏组织分成 4 份，1 份置于 4%多聚甲醛中固定，1 份使用生理盐水制备 10%组织匀浆液，剩余 2 份置于－80 ℃冰箱保存。

1.5　全自动生化分析仪检测血清肝功能指标及血脂水平　严格参照全自动生化分析仪及各自试剂盒操作说明，检测大鼠血清肝功能指标(AST、ALT)及血脂(TC、TG)水平。

1.6　HE 染色观察肝组织病理形态学　将固定 24 h

后的肝组织制成常规石蜡切片(厚度 4 μm),切片经脱蜡、水化后进行苏木素、伊红染色,显微镜下观察大鼠肝组织病理形态学改变。采用 NAFLD 活动度积分(NAS)评价大鼠肝组织脂肪变性(0%～5%、>5%～33%、>33%～66%、>66%分别记为 0、1、2、3 分)、气球样变(无、不明显且少量、显著且大量分别记为 0、1、2 分)和肝小叶炎症程度(无、<2、2～4、>4 级分别记为 0、1、2、3 分),计算总评分(即 NAS 评分,范围:0～8 分)[12]。

1.7　TUNEL 法检测肝细胞凋亡率　4 μm 厚的石蜡组织切片经脱蜡、水化后置于枸橼酸盐缓冲液中加热进行抗原热修复,3% H_2O_2 灭活内源性酶后滴加 TUNEL 反应缓冲液,DAPI 染核,荧光显微镜下观察染色结果。凋亡细胞呈绿色荧光,计算细胞凋亡率。

1.8　免疫组化法检测肝组织中 LC3 阳性表达　4 μm 厚的石蜡组织切片脱蜡至水、抗原热修复、灭活内源性酶后滴加正常山羊血清进行封闭,滴加一抗(LC3 抗体)4 ℃孵育过夜,滴加聚过氧化物酶标记 IgG 抗体 37 ℃孵育 30 min,DAB 显色、苏木素染细胞核,于显微镜下观察。阳性细胞呈棕黄色或褐黄色,Image ProPlus 6.0 半定量软件测定阳性细胞平均光密度(MOD)。

1.9　Western blotting 检测肝组织中自噬及 SIRT1/AMPK 信号通路相关蛋白表达　RIPA 裂解液充分裂解肝脏组织提取总蛋白,二喹啉甲酸(BCA)法定量蛋白浓度后将各样品蛋白浓度调整一致,取 20 μg 变性蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),切胶后转至聚偏氟乙烯(PVDF)膜,5%牛血清白蛋白(BSA)封闭膜 2 h,膜与一抗稀释液(Beclin-1、p62、LC3、SIRT1、AMPK、p-AMPK、GAPDH 抗体)4 ℃孵育过夜,洗涤后,放入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗稀释液中,室温孵育 1 h,化学发光试剂显色、曝光。Image J 软件分析蛋白条带灰度,以 GAPDH 为内参蛋白。

1.10　统计学处理　采用 SPSS25.0 软件进行数据分析,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,进一步两两组间比较采用 SNK-q 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　　果

2.1　各组大鼠肝脏指数比较　对照组[(2.43±0.18)%]、NAFLD 组[(3.75±0.25)%]、DAI-L 组[(3.12±0.24)%]、DAI-H 组[(2.71±0.20)%]、DAI-H+EX-527 组[(3.42±0.26)%]大鼠肝脏指数比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。与对照组比较,NAFLD 组大鼠肝脏指数升高($P<0.05$);与 NAFLD 组比较,DAI-L 组和 DAI-H 组大鼠肝脏指数降低($P<0.05$),且 DAI-H 组低于 DAI-L 组($P<0.05$);与 DAI-H 组比较,DAI-H+EX-527 组大鼠肝脏指数升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。结果提示,DAI 可减轻 NAFLD 大鼠肝脏损伤,而 EX-527 减弱了 DAI 的作用。

2.2　各组大鼠血清 AST、ALT、TC、TG 水平比较　与对照组比较,NAFLD 组大鼠血清 AST、ALT、TC、TG 水平升高($P<0.05$);与 NAFLD 组比较,DAI-L 组和 DAI-H 组大鼠血清 AST、ALT、TC、TG 水平降低($P<0.05$),且 DAI-H 组低于 DAI-L 组($P<0.05$);与 DAI-H 组比较,DAI-H+EX-527 组大鼠血清 AST、ALT、TC、TG 水平升高($P<0.05$)。见表 1。各组大鼠血清指标比较结果提示,DAI 可改善 NAFLD 大鼠血脂异常,而 EX-527 减弱了 DAI 的作用。

表 1　各组大鼠血清 AST、ALT、TC、TG 水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	AST(U/L)	ALT(U/L)	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)
对照组	39.62±8.53	31.45±5.32	1.52±0.24	0.43±0.08
NAFLD 组	125.37±14.27[a]	86.53±12.24[a]	2.79±0.29[a]	1.50±0.12[a]
DAI-L 组	97.58±12.05[b]	65.29±10.56[b]	2.16±0.26[b]	1.17±0.13[b]
DAI-H 组	69.83±10.56[bc]	46.21±8.03[bc]	1.83±0.21[bc]	0.72±0.09[bc]
DAI-H+EX-527 组	106.35±13.18[d]	70.08±13.12[d]	2.55±0.25[d]	1.24±0.11[d]
F	79.502	43.674	42.221	159.560
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,[a]$P<0.05$;与 NAFLD 组比较,[b]$P<0.05$;与 DAI-L 组比较,[c]$P<0.05$;与 DAI-H 组比较,[d]$P<0.05$。

2.3　各组大鼠肝组织病理形态学改变及 NAS 评分比较　对照组大鼠肝细胞排列整齐,大小均匀;NAFLD 组大鼠肝组织中出现大量脂肪空泡、明显气球样变及炎性细胞浸润和细胞坏死;DAI-L 组和 DAI-H 组大鼠上述肝组织病理学损伤均有不同程度改善,其中 DAI-H 组改善更为明显;相比于 DAI-H 组,DAI-H+EX-527 组大鼠肝组织病理学损伤加重。对照组、NAFLD 组、DAI-L 组 DAI-H 组、DAI-H+

EX-527 组 NAS 评分分别为(0.00±0.00)、(6.54±0.78)、(4.72±0.62)、(2.65±0.54)、(5.48±0.70)分;NAFLD 组 NAS 评分高于对照组,DAI-L 组和 DAI-H 组 NAS 评分均低于 NAFLD 组,DAI-H+EX-527 组高于 DAI-H 组($P<0.05$)。见图 1。结果提示,DAI 可改善 NAFLD 大鼠肝组织病理学损伤,而 EX-527 减弱了 DAI 的作用。

2.4　各组大鼠肝细胞凋亡率比较　与对照组[(6.51±1.12)%]比较,NAFLD 组大鼠肝细胞凋亡率[(35.62±3.98)%]升高($P<0.05$);与 NAFLD 组比较,DAI-L 组和 DAI-H 组大鼠肝细胞凋亡率[(24.24±3.27)%、(10.35±2.59)%]降低($P<0.05$),且 DAI-H 组低于 DAI-L 组($P<0.05$);与 DAI-H 组比较,DAI-H+EX-527 组大鼠肝细胞凋亡率[(26.36±3.18)%]升高($P<0.05$)。见图 2。结果提示,DAI 可缓解 NAFLD 大鼠肝细胞凋亡,而 EX-527 减弱了 DAI 的作用。

2.5　各组大鼠肝组织中 LC3 阳性表达水平比较　LC3 主要表达于细胞核中,LC3 阳性细胞核内可见棕黄色或褐黄色颗粒。各组阳性表达水平比较:与对照组(0.93±0.10)比较,NAFLD 组大鼠肝组织中 LC3 阳性细胞数量较少,颜色较浅,LC3 阳性表达水平(0.48±0.14)降低($P<0.05$);与 NAFLD 组比较,DAI-L 组和 DAI-H 组大鼠肝组织中 LC3 阳性细胞数量较多,颜色较深,LC3 阳性表达水平[(0.66±0.13)、(0.85±0.15)]升高($P<0.05$),且 DAI-H 组变化更为明显($P<0.05$);与 DAI-H 组比较,DAI-H+EX-527 组大鼠肝组织中 LC3 阳性细胞数量减少,颜色变浅,LC3 阳性表达水平(0.57±0.12)降低($P<0.05$)。见图 3。结果提示,DAI 可能通过促进 LC3 表达增强 NAFLD 大鼠肝组织自噬反应,而 EX-527 减弱了 DAI 的作用。

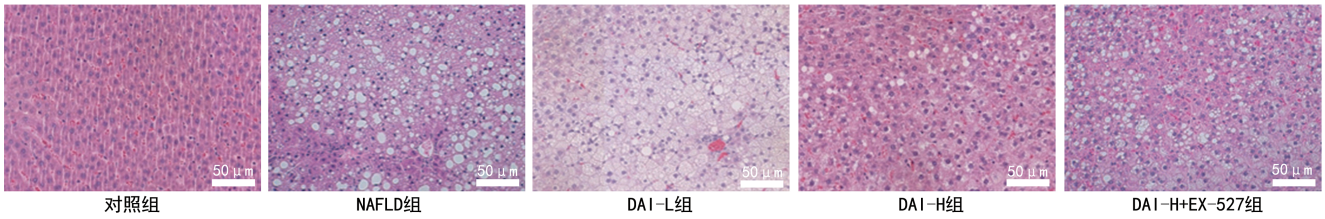


图 1　各组大鼠肝组织 HE 染色结果

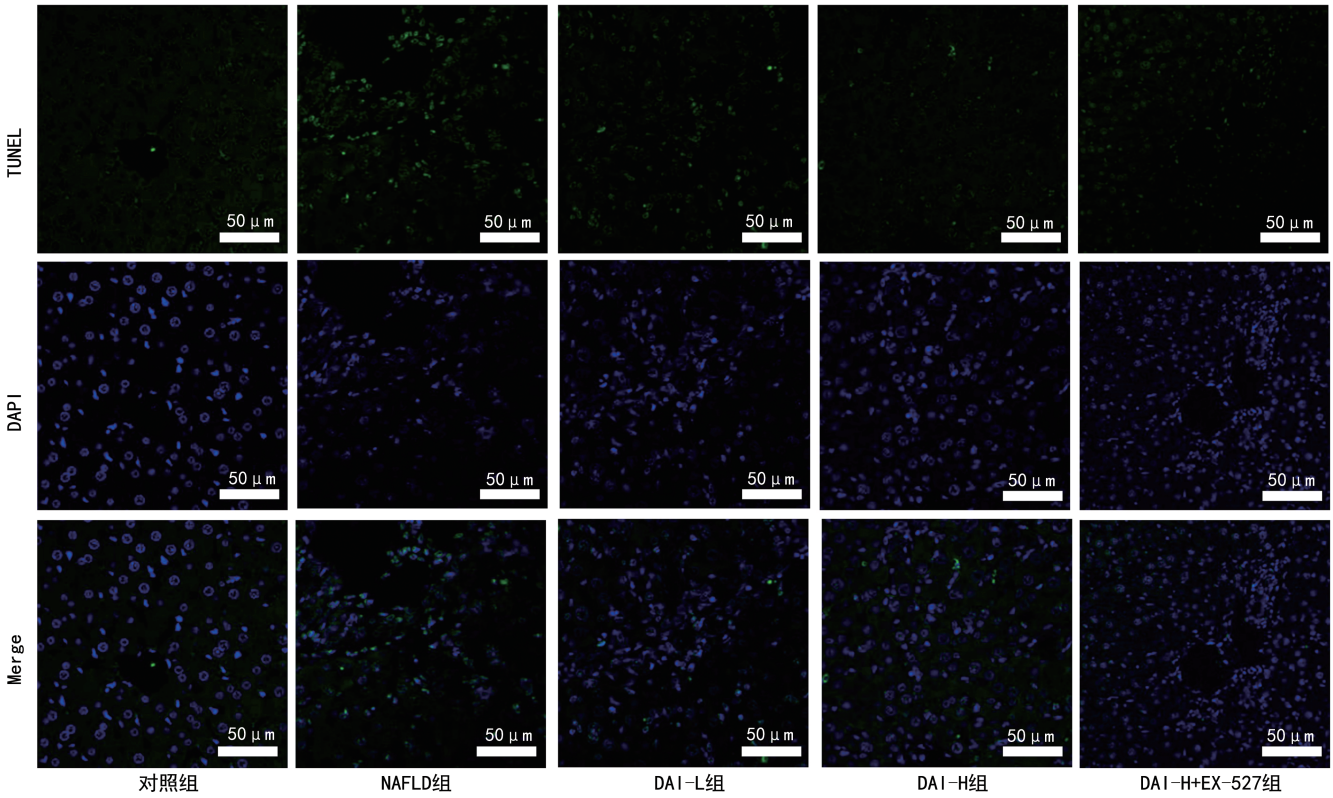
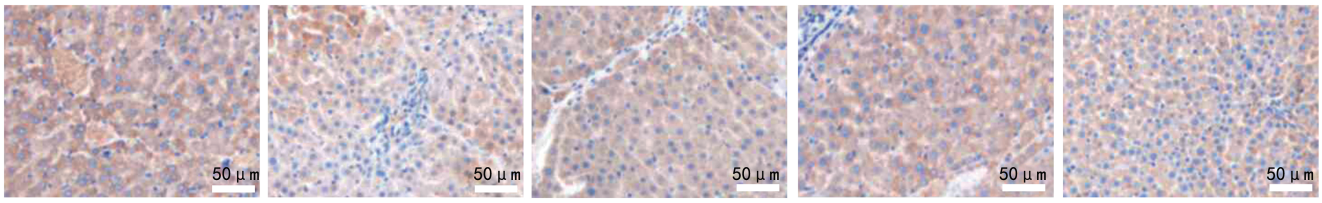


图 2　各组大鼠肝细胞凋亡 TUNEL 染色结果

2.6　各组大鼠肝组织中 Beclin-1、p62、LC3 蛋白表达水平比较　与对照组比较,NAFLD 组大鼠肝组织中 Beclin-1、LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ蛋白表达水平降低($P<0.05$),p62 蛋白表达水平升高($P<0.05$);与 NAFLD

组比较,DAI-L 组和 DAI-H 组大鼠肝组织中 Beclin-1、LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ蛋白表达水平升高($P<0.05$),p62 蛋白表达水平降低($P<0.05$),且 DAI-H 组变化更为明显($P<0.05$);与 DAI-H 组比较,DAI-H+EX-527 组大鼠肝组织中 Beclin-1、LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ蛋白表达水平降低($P<0.05$),p62 蛋白表达水平升高($P<0.05$)。见图 4、表 2。结果提示,DAI 可能通过促进自噬体形成提高 NAFLD 大鼠肝组织自噬水平,而 EX-527 减弱了 DAI 的作用。



对照组　NAFLD组　DAI-L组　DAI-H组　DAI-H+EX-527组

图 3　各组大鼠肝组织中 LC3 免疫组化结果

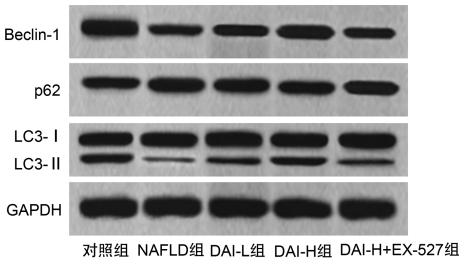


图 4　各组大鼠肝组织中 Beclin-1、p62、LC3 Western blotting 检测结果

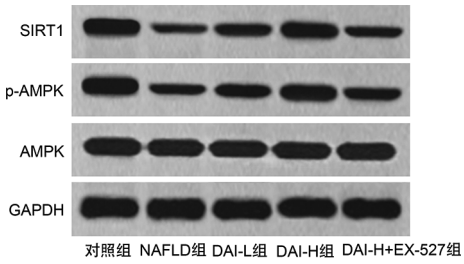


图 5　各组大鼠肝组织中 SIRT1、AMPK、p-AMPK Western blotting 检测结果

表 2　各组大鼠肝组织中 Beclin-1、p62、LC3 蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s$,$n=10$)

组别	Beclin-1	p62	LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ
对照组	0.85±0.06	0.42±0.05	0.48±0.05
NAFLD 组	0.34±0.05[a]	0.78±0.06[a]	0.09±0.03[a]
DAI-L 组	0.51±0.06[b]	0.67±0.06[b]	0.23±0.04[b]
DAI-H 组	0.69±0.07[bc]	0.50±0.05[bc]	0.45±0.05[bc]
DAI-H+EX-527 组	0.45±0.06[d]	0.72±0.06[d]	0.16±0.04[d]
F	112.418	73.165	167.418
P	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,[a]$P<0.05$;与 NAFLD 组比较,[b]$P<0.05$;与 DAI-L 组比较,[c]$P<0.05$;与 DAI-H 组比较,[d]$P<0.05$。

表 3　各组大鼠肝组织中 SIRT1、p-AMPK/AMPK 蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s$,$n=10$)

组别	SIRT1	p-AMPK/AMPK
对照组	0.79±0.07	0.91±0.06
NAFLD 组	0.26±0.05[a]	0.35±0.07[a]
DAI-L 组	0.45±0.08[b]	0.52±0.08[b]
DAI-H 组	0.63±0.08[bc]	0.73±0.07[bc]
DAI-H+EX-527 组	0.31±0.06[d]	0.42±0.07[d]
F	103.193	107.955
P	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,[a]$P<0.05$;与 NAFLD 组比较,[b]$P<0.05$;与 DAI-L 组比较,[c]$P<0.05$;与 DAI-H 组比较,[d]$P<0.05$。

2.7　各组大鼠肝组织中 SIRT1、AMPK、p-AMPK 蛋白表达水平比较　与对照组比较,NAFLD 组大鼠肝组织中 SIRT1、p-AMPK/AMPK 蛋白表达水平降低($P<0.05$);与 NAFLD 组比较,DAI-L 组和 DAI-H 组大鼠肝组织中 SIRT1、p-AMPK/AMPK 蛋白表达水平升高($P<0.05$),且 DAI-H 组高于 DAI-L 组($P<0.05$);与 DAI-H 组比较,DAI-H+EX-527 组大鼠肝组织中 SIRT1、p-AMPK/AMPK 蛋白表达水平降低($P<0.05$)。见图 5、表 3。结果提示,DAI 可激活 NAFLD 大鼠肝组织中 SIRT1/AMPK 通路,而 EX-527 减弱了 DAI 的作用。

3　讨　论

目前,饮食调节、加强体育锻炼等仍是 NAFLD 的主要干预措施,治疗药物也仅限于吡格列酮和维生素 E,但均存在一定不良反应[13]。据报道,自噬参与调节肝脏脂质代谢、炎症和纤维化等病理变化,是代谢相关脂肪肝病的一个新治疗靶点[14]。恩格列净通过激活自噬和减少肝细胞凋亡减轻高脂饮食喂养 $ApoE^{-/-}$ 小鼠 NAFLD 进展[15]。卡格列净通过调节脂质代谢和抑制炎症来改善 NAFLD 的机制与促进自噬有关[16]。故调节自噬反应在 NAFLD 的药物治疗中可能具有重要意义。

DAI 作为大豆异黄酮的主要成分之一,具抗炎、

抗氧化应激、抗癌等多种生物学活性[17-18]。DAI 预处理不仅通过抑制炎症和氧化应激改善脂多糖诱导的肝细胞损伤[19],而且可减轻刀豆球蛋白 A 诱导的肝损伤小鼠氧化应激和肝细胞凋亡[4],但 DAI 对 NAFLD 是否发挥治疗作用尚有待挖掘。本研究通过高脂饲料喂养成功复制了 NAFLD 大鼠模型,具体表现在肝脏指数,血清 AST、ALT、TC、TG 水平,NAS 评分,肝细胞凋亡率升高,且肝组织中出现大量脂肪空泡、明显气球样变,以及炎性细胞浸润和细胞坏死。而 DAI 干预 NAFLD 大鼠后,肝脏指数,血清 AST、ALT、TC、TG 水平,NAS 评分,肝细胞凋亡率降低,表明 DAI 治疗 NAFLD 大鼠同样具有调节血脂水平,减少肝细胞凋亡,改善肝功能,减轻肝脏损伤的功效。

据报道,DAI 衍生物 X-11-5-27 通过促进自噬抑制 NLRP3 炎性体活性[20]。大豆异黄酮通过刺激 BEX2/BNIP3/NIX 通路激活线粒体自噬来保护 SH-SY5Y 神经元[21]。但 DAI 是否可通过激活自噬减轻 NAFLD 中肝脏损伤尚不明确。本研究中,NAFLD 模型大鼠肝组织中自噬标志物(LC3)阳性表达水平,自噬启动的关键调节因子(Beclin-1)、自噬体成熟标记物(LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ)蛋白表达水平均降低,而自噬的选择性底物(p62)蛋白表达水平均升高。本研究结果表明,高脂饲料诱导的 NAFLD 大鼠中自噬水平降低。进一步分析发现,DAI 干预 NAFLD 大鼠后肝组织中 LC3 阳性表达水平,Beclin-1、LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ蛋白表达水平均升高,而 p62 蛋白表达水平降低,表明 DAI 可增强 NAFLD 大鼠肝组织中自噬反应。

有研究显示,多条信号通路如 AMPK/mTOR、SIRT1/AMPK 等均参与自噬调节,并减轻肝损伤[22-23]。但 DAI 通过调节哪条信号通路增强 NAFLD 大鼠自噬反应进而减轻肝脏损伤有待进一步探索。SIRT1 可以直接与 AMPK 启动子结合,二者结合后 AMPK 可以激活 SIRT1 的表达,SIRT1 的表达也可以激活 AMPK,进而形成正反馈回路[24]。本研究中,NAFLD 模型大鼠肝组织中 SIRT1、p-AMPK/AMPK 蛋白表达水平降低,而 DAI 干预 NAFLD 大鼠后 SIRT1、p-AMPK/AMPK 蛋白表达水平升高,提示 DAI 可促进 NAFLD 大鼠肝组织中 SIRT1/AMPK 信号通路激活。为了更充分地验证 SIRT1/AMPK 信号通路的作用,本研究在 DAI 干预基础上给予 SIRT1 抑制剂(EX-527),结果显示,EX-527 不仅可抑制 SIRT1/AMPK 信号通路激活,而且能够减弱 DAI 对 NAFLD 大鼠肝脏损伤的改善作用。以上研究结果说明,DAI 可能通过促进 SIRT1/AMPK 信号通路激活增强自噬反应,同时调节血脂水平、增强抗氧化能力、减少肝细胞凋亡、改善肝功能,进而减轻 NAFLD 大鼠肝脏损伤。PANT 等[25]研究亦显示,富硒益生菌通过上调 AMPK、SIRT1 表达激活自噬改善高糖高脂饮食诱导的 NAFLD 大鼠肝功能、肝脂肪变性等症状。

综上所述,DAI 可能通过促进 SIRT1/AMPK 信号通路激活增强自噬反应,减轻 NAFLD 大鼠肝脏损伤。本研究为 NAFLD 的治疗药物选择和治疗靶点设计提供了一定理论基础。但由于受实验经费、实验条件等限制,本研究尚存在一定不足之处:(1)未通过电镜观察肝组织中自噬小体变化;(2)未采用特异性抑制剂直接干预 AMPK;(3)DAI 是否还可通过其他通路调控 NAFLD 中自噬反应尚不明确;(4)DAI 的最佳给药剂量和给药方式仍不清楚等。本课题组将在后续实验中进一步完善相关研究,从而为 DAI 用于 NAFLD 治疗提供更多证据。

参考文献

[1] QUEK J,CHAN K E,WONG Z Y,et al. Global prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in the overweight and obese population:a systematic review and meta-analysis[J]. Lancet Gastroenterol Hepatol,2023,8(1):20-30.

[2] LEE C H,LUI D T,LAM K S. Non-alcoholic fatty liver disease and type-2 diabetes:an update[J]. J Diabetes Investig,2022,13(6):930-940.

[3] PATERNOSTRO R,TRAUNER M. Current treatment of non-alcoholic fatty liver disease[J]. J Intern Med,2022,292(2):190-204.

[4] LI S L,CAO R,HU X F,et al. Daidzein ameliorated concanavalin A-induced liver injury through the Akt/GSK-3β/Nrf2 pathway in mice[J]. Ann Transl Med,2021,9(15):1228.

[5] 张强,刘勤,牛春燕. 利拉鲁肽减轻脂毒性肝细胞损伤并促进自噬改善非酒精性脂肪肝[J]. 中华肝脏病杂志,2021,29(5):456-461.

[6] MEI Y,HU H,DENG L,et al. Therapeutic effects of isosteviol sodium on non-alcoholic fatty liver disease by regulating autophagy via Sirt1/AMPK pathway[J]. Sci Rep,2022,12(1):12857.

[7] LADDHA A P,KULKARNI Y A. Daidzein mitigates myocardial injury in streptozotocin-induced diabetes in rats[J]. Life Sci,2021,284:119664.

[8] 姚臻,李家妮,张可锋,等. 茵栀黄联合罗格列酮对非酒精性脂肪肝大鼠的保护作用[J]. 中药药理与临床,2020,36(2):171-175.

[9] RUIZ-CANIZALES J,DOMÍNGUEZ-AVILA J A,WALL-MEDRANO A,et al. Fiber and phenolic compounds contribution to the hepatoprotective effects of mango diets in rats fed high cholesterol/sodium cholate[J]. Phytother Res,2019,33(11):2996-3007.

[10] CHEN J,XIA H,ZHANG L,et al. Protective effects of

melatonin on sepsis-induced liver injury and dysregulation of gluconeogenesis in rats through activating SIRT1/STAT3 pathway[J]. Biomed Pharmacother,2019,117:109150.

[11] 王蒙蒙,乔雪,方琼莲,等.滇黄芩总黄酮不同极性萃取部位对非酒精性脂肪肝模型大鼠的改善作用研究[J].中国药房,2022,33(11):1338-1342.

[12] KOBYLIAK N,ABENAVOLI L. The role of liver biopsy to assess non-alcoholic fatty liver disease[J]. Rev Recent Clin Trials,2014,9(3):159-169.

[13] MAJUMDAR A,VERBEEK J,TSOCHATZIS E A. Non-alcoholic fatty liver disease:current therapeutic options[J]. Curr Opin Pharmacol,2021,61:98-105.

[14] CHEN C L,LIN Y C. Autophagy dysregulation in metabolic associated fatty liver disease:a new therapeutic target[J]. Int J Mol Sci,2022,23(17):10055.

[15] NASIRI-ANSARI N,NIKOLOPOULOU C,PAPOUTSI K,et al. Empagliflozin attenuates non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in high fat diet fed ApoE(－/－) mice by activating autophagy and reducing ER stress and apoptosis[J]. Int J Mol Sci,2021,22(2):818.

[16] XU Z,HU W,WANG B,et al. Canagliflozin ameliorates nonalcoholic fatty liver disease by regulating lipid metabolism and inhibiting inflammation through induction of autophagys[J]. Yonsei Med J,2022,63(7):619-631.

[17] ASKARIPOUR M,NAJAFIPOUR H,SABERI S,et al. Daidzein mitigates oxidative stress and inflammation in the injured kidney of ovariectomized rats:AT1 and Mas receptor functions[J]. Iran J Kidney Dis,2022,1(1):32-43.

[18] 成琼,李真,陈锦辉,等.大豆苷元对人非小细胞肺癌A549、H1299 细胞增殖、迁移能力的影响及机制[J].中国药理学通报,2020,36(2):245-249.

[19] YU Z,YANG L,DENG S,et al. Daidzein ameliorates LPS-induced hepatocyte injury by inhibiting inflammation and oxidative stress[J]. Eur J Pharmacol,2020,885:173399.

[20] ZHOU W,LIU X,CHENG K,et al. X-11-5-27,a daidzein derivative,inhibits NLRP3 inflammasome activity via promoting autophagy[J]. Exp Cell Res,2017,360(2):320-327.

[21] LI P,YAO LY,JIANG Y J,et al. Soybean isoflavones protect SH-SY5Y neurons from atrazine-induced toxicity by activating mitophagy through stimulation of the BEX2/BNIP3/NIX pathway[J]. Ecotoxicol Environ Saf,2021,227:112886.

[22] YAN L S,ZHANG S F,LUO G,et al. Schisandrin B mitigates hepatic steatosis and promotes fatty acid oxidation by inducing autophagy through AMPK/mTOR signaling pathway[J]. Metabolism,2022,131:155200.

[23] YU Q,ZOU L,YUAN X,et al. Dexmedetomidine protects against septic liver injury by enhancing autophagy through activation of the AMPK/SIRT1 signaling pathway[J]. Front Pharmacol,2021,12:658677.

[24] SUN P,NIE M. Effect and mechanism of Angelic Shaoyaosan mediated AMPK/SIRT1 positive feedback loop to promote autophagy and regulate the systemic inflammatory response in acute pancreatitis[J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-Grand),2021,67(2):101-108.

[25] PANT R,SHARMA N,KABEER S W,et al. Selenium-enriched probiotic alleviates western diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in rats via modulation of autophagy through AMPK/SIRT-1 pathway[J]. Biol Trace Elem Res,2023,201(3):1344-1357.

(收稿日期:2023-02-14　修回日期:2023-06-06)

(上接第 2394 页)

[12] GAO Y,FANG L,WANG X,et al. Antioxidant activity evaluation of dietary flavonoid hyperoside using saccharomyces cerevisiae as a model[J]. Molecules,2019,24(4):788.

[13] WEI A,SONG Y,NI T,et al. Hyperoside attenuates pregnancy loss through activating autophagy and suppressing inflammation in a rat model[J]. Life Sci,2020,254:117735.

[14] LI X,LIU K,ZHOU W,et al. MiR-155 targeting FoxO3a regulates oral cancer cell proliferation,apoptosis,and DDP resistance through targeting FoxO3a[J]. Cancer Biomark,2020,27(1):105-111.

[15] BABAR I A,CZOCHOR J,STEINMETZ A,et al. Inhibition of hypoxia-induced miR-155 radiosensitizes hypoxic lung cancer cells[J]. Cancer Biol Ther,2011,12(10):908-914.

[16] QIU C,MA J,WANG M L,et al. MicroRNA-155 deficiency in $CD8^+$ T cells inhibits its anti-glioma immunity by regulating FoxO3a[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci,2019,23(6):2486-2496.

[17] JI H,TIAN D,ZHANG B,et al. Overexpression of miR-155 in clear cell renal cell carcinoma and its oncogenic effect through targeting FOXO3a[J]. Exp Ther Med,2017,13(5):2286-2292.

[18] LIAO W W,ZHANG C,LIU F R,et al. Effects of miR-155 on proliferation and apoptosis by regulating FoxO3a/BIM in liver cancer cell line HCCLM3[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci,2018,22(5):1277-85.

[19] WANG Y,FENG T,DUAN S,et al. miR 155 promotes fibroblast like synoviocyte proliferation and inflammatory cytokine secretion in rheumatoid arthritis by targeting FOXO3a[J]. Exp Ther Med,2020,19(2):1288-1296.

(收稿日期:2022-12-25　修回日期:2023-04-29)