

环黄芪醇对四氯化碳致小鼠肝纤维化及糖酵解的影响[△]

吴红雁*, 顾亚琴, 周红成, 陈欣, 张立虎[#](江苏医药职业学院医药生物技术研究院, 江苏盐城 224005)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)14-1677-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.14.03



摘要 目的 研究环黄芪醇(CAG)对四氯化碳(CCl₄)诱导的小鼠肝纤维化(HF)及糖酵解的影响。方法 将雄性ICR小鼠随机分为空白组、模型组和CAG低、中、高剂量组(60、120、240 mg/kg),每组6只。除空白组小鼠腹腔注射橄榄油外,其余各组小鼠均腹腔注射10%CCl₄-橄榄油溶液(5 mL/kg),每周3次,持续8周以复制HF模型。自建模第4周起,各药物组小鼠灌胃相应药液(10 mL/kg),空白组和模型组小鼠灌胃0.5%羧甲基纤维素钠溶液(10 mL/kg),每天1次,持续4周。实验过程中,称定小鼠的体质量;末次灌胃后,称定小鼠的肝脏质量并计算其肝脏指数,检测其肝损伤指标[天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)]、HF相关指标[苏木精-伊红(HE)染色评分、Masson和天狼星红染色胶原容积分数、I型胶原蛋白(collagen I)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)]和糖酵解相关指标[乳酸(LD)、己糖激酶(HK)、磷酸果糖激酶(PFK)、丙酮酸激酶(PK)]的变化情况。结果 与模型组比较,各药物组小鼠胶原沉积和纤维化病变程度均有所减轻,体质量(CAG低剂量组除外)均有所升高($P<0.05$),肝脏指数,血清ALT、AST水平,肝组织病理学HE染色评分、Masson和天狼星红染色胶原容积分数, collagen I、 α -SMA蛋白的表达水平,血清LD含量,以及血清、肝组织中HK、PFK、PK水平(CAG低剂量组肝组织除外)均显著降低($P<0.05$)。结论 CAG对CCl₄诱导的小鼠HF有改善作用,同时降低了其体内糖酵解关键酶和产物水平。

关键词 环黄芪醇;肝损伤;肝纤维化;糖酵解;小鼠

Effects of cycloastragenol on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis and glycolysis in mice

WU Hongyan, GU Yaqin, ZHOU Hongcheng, CHEN Xin, ZHANG Lihu (Institute of Biomedical Technology, Jiangsu Vocational College of Medicine, Jiangsu Yancheng 224005, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To study the effects of cycloastragenol (CAG) on carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatic fibrosis (HF) and glycolysis in mice. **METHODS** Male ICR mice were randomly divided into blank group, model group, CAG low-dose, medium-dose and high-dose groups (60, 120, 240 mg/kg), with 6 mice in each group. Except that blank group was given olive oil intraperitoneally, the mice in other groups were intraperitoneally injected with 10% CCl₄-olive oil solution (5 mL/kg) three times a week for 8 weeks to induce HF model. From the 4th week after modeling, mice in each drug group were given corresponding drug solution intragastrically (10 mL/kg), and mice in blank group and model group were given 0.5% sodium carboxymethyl cellulose solution intragastrically (10 mL/kg), once a day for 4 weeks. During the experiment, the body weight of mice were weighted; after last gastrogavage, the liver weight was weighted and liver indexes of mice were calculated. The changes of hepatic injury indexes [aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT)], related indexes of HF [hematoxylin-eosin (HE) staining score, Masson and Picrosirius red staining collagen volume fraction, collagen I, α -smooth muscle actin (α -SMA)] and related indexes of glycolysis [lactic acid (LD), hexokinase (HK), phosphofructokinase (PFK), pyruvate kinase (PK)] were all detected. **RESULTS** Compared with model group, the collagen deposition and fibrosis of mice in each drug group were reduced, and the body weights of mice (except for CAG low-dose group) were increased to some extent ($P<0.05$). Liver indexes, serum levels of ALT and AST, HE staining score of liver histopathology, Masson and Picrosirius red staining collagen volume fraction, protein expression of collagen I and α -SMA, serum content of LD, the levels of HK, PFK and PK in serum and hepatic tissues (except for hepatic tissue of CAG low-dose group) were all decreased significantly ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** CAG can improve HF in mice induced by CCl₄, and reduce the levels of key enzymes and products of glycolysis. **KEYWORDS** cycloastragenol; hepatic injury; hepatic fibrosis; glycolysis; mice

[△] 基金项目 国家自然科学基金资助项目(No.81873134);江苏高校“青蓝工程”中青年学术带头人培养对象资助项目(No.苏教师函[2020]10号);江苏高校“青蓝工程”优秀教学团队培养对象资助项目(No.苏教师函[2021]11号)

* 第一作者 副教授,博士。研究方向:中药药理学。电话:0515-88159750。E-mail:why20133055@163.com

通信作者 副教授,博士。研究方向:中药资源加工与利用。电话:0515-88159280。E-mail:zlh800927@163.com

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)是由多种原因致慢性肝损害所引发的病理改变,任何肝脏损伤在肝脏修复愈合的过程中都存在纤维化的过程;如果损伤因素长期存在,纤维化的过程将长期持续,最终可能会发展为肝硬化^[1]。肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)主要位于肝脏的狄氏腔内,正常情况下处于静止状态;在外界

损伤刺激下,HSCs将被激活,其活化和快速增殖被普遍认为是HF形成的中心环节,因此现阶段研究将HSCs作为HF疾病治疗的关键靶标^[2]。有研究表明,在肝损伤过程中,活化的HSCs受到HF微环境的影响,其能量代谢方式将发生转变,由氧化磷酸化供能途径转变为糖酵解途径,后者具有葡萄糖摄取率高、糖酵解活跃、代谢产物乳酸(lactic acid,LD)含量高的优势^[3]。这样的能量代谢方式能为HSCs持续供能,有利于其持续活化,从而推动HF的不断进展^[3]。可见,HSCs糖酵解在HF中具有重要作用,抑制糖酵解途径可抑制HSCs增殖、阻断HSCs向肌成纤维细胞转化、抑制并改善HF,可作为治疗HF的潜在策略。

黄芪初载于《神农本草经》,味甘,性微温,“主痈疽,久败疮,排脓止痛,大风癰疾,五痔,鼠痿,补虚,小儿百病”^[4]。作为一种补益中药,黄芪被广泛应用于临床治疗及日常保健。环黄芪醇(cycloastragenol,CAG)是从黄芪中分离出的一种次生代谢产物,是由黄芪药理活性成分黄芪甲苷经水解而得。与黄芪甲苷相比,CAG的脂溶性更强,更容易通过细胞膜而被吸收入体^[5]。近年来研究表明,CAG具有广泛的药理作用,如抗衰老、抗炎、减轻脑损伤、抑制肺纤维化、抗抑郁等^[6]。此外有研究指出,黄芪、黄芪甲苷有抗HF的作用,CAG能有效改善非酒精性脂肪性肝病^[7],还能抑制阿霉素致小鼠肝脏脂质过氧化物水平的升高^[8]。同时亦有证据表明,CAG可通过激活糖代谢相关受体(如法尼醇X受体)来显著降低高脂饮食所致的肝脏脂质堆积,从而改善肝脏脂肪病变^[7]。由此可见,CAG可能通过调控能量代谢过程来发挥肝脏保护作用。基于此,本研究拟采用四氯化碳(CCl₄)诱导的HF小鼠模型来探究CAG对其HF及糖酵解的影响,旨在为阐释该成分抗HF作用(尤其是通过影响糖酵解过程来发挥能量代谢调控作用)的机制提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

SpectraMax型多功能酶标仪购自美谷分子仪器(上海)有限公司;IX53型光学显微镜购自日本Olympus公司;RM2235型石蜡切片机购自德国Leica公司;5424R型台式高速冷冻离心机购自德国Eppendorf公司;YD-6D型组织包埋机、YD-A型组织摊片机、YD-B型组织烤片机均购自金华市科迪仪器设备有限公司;YP502N型电子天平购自上海菁海仪器有限公司。

1.2 主要药品与试剂

CAG对照品(批号C14J9Q65733,纯度98%)购自上海源叶生物科技有限公司;CCl₄(分析纯,批号20180320)购自无锡市亚泰联合化工有限公司;天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase,AST)测试盒(货号C010-2)、丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase,ALT)

测试盒(货号C009-2)、LD测试盒(货号A019-2)、己糖激酶(hexokinase, HK)测试盒(货号A077-1)、磷酸果糖激酶(phosphofructokinase, PFK)测试盒(货号A129)、丙酮酸激酶(pyruvate kinase, PK)测试盒(货号A076-1)均购自南京建成生物工程研究所;兔抗小鼠 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)抗体(批号abs120451)、兔抗小鼠I型胶原蛋白(collagen I)抗体(批号abs131984)均购自爱必信(上海)生物科技有限公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(批号SA00003-2-20000121)购自武汉三鹰生物技术有限公司;羧甲基纤维素钠(CMC-Na,批号F0111021)购自国药集团化学试剂有限公司;苏木精-伊红(HE)等染色试剂均购自阿拉丁试剂(上海)有限公司;磷钼酸(批号51429-74-4-20191017)购自北京索莱宝科技有限公司;其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为纯化水。

1.3 实验动物

SPF级雄性ICR小鼠,体质量为20~25 g,由南京青龙山实验动物中心提供,生产许可证号为SCXK(苏)2017-0011。所有小鼠均饲养在24℃恒温、12 h黑暗/光照循环的动物房内,并自由摄食、饮水。本实验方案符合我院相关动物伦理要求,伦理批件号为SYLL-2021-005。

2 方法

2.1 造模、分组与给药

取ICR小鼠,适应性喂养1周后,随机分为空白组、模型组和CAG低、中、高剂量组(60、120、240 mg/kg,以5%CMC-Na溶液为溶剂^[9-12]),每组6只。禁食过夜后,模型组和各药物组小鼠均腹腔注射10%CCl₄-橄榄油溶液(5 mL/kg),每周3次,持续8周以复制HF模型;空白组小鼠腹腔注射等体积橄榄油。自造模第4周起,各药物组小鼠灌胃相应药液,空白组和模型组小鼠灌胃0.5%CMC-Na溶液,灌胃量均为10 mL/kg,每天1次,持续4周。

2.2 小鼠体质量、肝脏指数的测定和样本采集

实验过程中,称定并记录小鼠体质量。末次灌胃后,小鼠禁食、不禁水过夜,于第2天摘眼球取血。血样静置2 h后,以3 000×g离心15 min,取上层血清,于-20℃下保存。随后,将小鼠颈椎脱臼处死,剖取肝脏,称定质量并计算肝脏指数:肝脏指数=肝脏质量/体质量(含末次灌胃前)×100%。迅速切取部分肝组织,置于10%甲醛溶液中固定;剩余肝组织切块,于-80℃下保存。

2.3 小鼠肝损伤指标检测

取“2.2”项下各组小鼠血清样品适量,使用酶标仪以化学比色法检测其血清中AST、ALT水平,严格按照相应试剂盒说明书操作。

2.4 小鼠肝组织病理学检查及相关指标检测

2.4.1 肝组织病理学检查 取“2.2”项下固定于10%甲醛溶液中的各组小鼠肝组织适量,用水冲洗,经乙醇梯度脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后,切片(厚度4~8 μm)。参照文献方法^[10],分别进行HE染色、Masson染色、天狼星红染色,置于显微镜下观察小鼠的肝组织病理情况并拍照。HE染色结果采用Ishak评分法进行定量分析,HE染色评分越高,表明肝损伤越明显;Masson染色和天狼星红染色结果采用Image J软件进行定量分析,结果以胶原容积分数表示,胶原容积分数越高,即胶原阳性区域越大,表明纤维化程度越高^[10]。

2.4.2 collagen I、α-SMA表达检测 采用免疫组化法进行检测。取“2.2”项下固定于10%甲醛溶液中的各组小鼠肝组织适量,用水冲洗,经乙醇梯度脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后,切片(厚度5 μm)。切片用3% H₂O₂溶液室温孵育5~10 min以消除过氧化物酶活性,用pH7.4的磷酸盐缓冲液(PBS)清洗2 min×3次,用5%正常山羊血清封闭孵育以减少非特定结合。室温孵育60 min后,弃去血清;分别滴加collagen I、α-SMA一抗(稀释比例分别为1:200、1:500),4℃孵育过夜;用PBS清洗2 min×3次,滴加辣根过氧化物酶标记的IgG二抗(稀释比例1:200),孵育30 min;用PBS清洗2 min×3次后,在室温下以DAB显色剂显色,用水冲洗后,用苏木精复染、二甲苯透明,以中性树脂封片,置于显微镜下观察并拍照,采用Image J软件对阳性区域(棕褐色)的灰度值进行检测,并将其作为相应蛋白的表达水平。

2.5 小鼠糖酵解相关指标检测

取“2.2”项下各组小鼠血清和冻存的肝组织(肝组织需匀浆)适量,使用酶标仪,以化学比色法检测其血清中LD含量,以酶联免疫吸附测定法检测其血清及肝组织匀浆上清液中糖酵解关键酶(HK、PFK、PK)水平。严格按照相应试剂盒说明书操作。

2.6 统计学方法

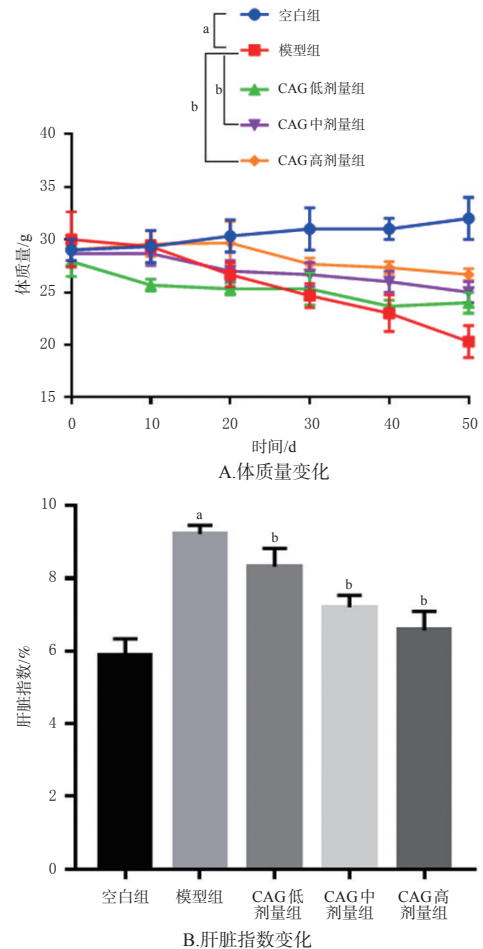
采用SPSS 22.0软件对数据进行统计分析,采用Graphpad Prism 7软件作图。实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用双因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 CAG对CCl₄诱导的HF模型小鼠体质量、肝脏指数的影响

空白组小鼠体质量增长明显。与空白组比较,模型组小鼠体质量整体呈下降趋势($P<0.05$)。与模型组比较,CAG中、高剂量组小鼠体质量均有所增加($P<0.05$)并接近于空白组,其中CAG中、高剂量组的作用更为明显。结果见图1A。

与空白组比较,模型组小鼠的肝脏指数显著升高($P<0.05$);与模型组比较,CAG各剂量组小鼠的肝脏指数均显著降低($P<0.05$)。结果见图1B。



a: 与空白组比较, $P<0.05$; b: 与模型组比较, $P<0.05$

图1 各组小鼠体质量、肝脏指数的变化情况($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

3.2 CAG对CCl₄诱导的HF模型小鼠肝损伤指标的影响

与空白组比较,模型组小鼠血清中ALT、AST水平均显著增加($P<0.05$);与模型组比较,CAG各剂量组小鼠血清中ALT、AST水平均显著降低($P<0.05$)。结果见表1。

表1 各组小鼠血清中ALT、AST水平的检测结果($\bar{x} \pm s$, $n=6$, U/L)

| 组别 | ALT | AST |
|---------|---------------------------|---------------------------|
| 空白组 | 5.00 ± 0.82 | 12.00 ± 0.82 |
| 模型组 | 25.00 ± 2.45 ^a | 27.67 ± 1.25 ^a |
| CAG低剂量组 | 13.72 ± 0.51 ^b | 24.00 ± 0.83 ^b |
| CAG中剂量组 | 9.37 ± 0.59 ^b | 21.00 ± 0.82 ^b |
| CAG高剂量组 | 8.08 ± 0.82 ^b | 15.00 ± 2.05 ^b |

a: 与空白组比较, $P<0.05$; b: 与模型组比较, $P<0.05$

3.3 CAG对CCl₄诱导的HF模型小鼠HF的影响

HE染色结果显示,与空白组比较,模型组小鼠肝脏组织中可见肝细胞散在分布,索状排列不明显且间隙大,有明显的炎症细胞浸润和纤维化病变,且HE染色评分显著升高($P<0.05$);经不同剂量的CAG干预后,各剂量组小鼠的肝损伤程度均较模型组有所减轻,其HE染色评分均显著降低($P<0.05$)。结果见图2、图3A。

Masson染色和天狼星红染色结果显示,与空白组比

较,模型组小鼠的纤维化结构特征清晰,明显可见胶原沉积自汇管区周围向外延伸,纤维条索较粗且着色较深,两者的胶原容积分数均显著升高($P<0.05$),提示存在明显的纤维化病变;经不同剂量的CAG干预后,各剂量组小鼠的胶原沉积和纤维化病变程度均较模型组有所减轻,其胶原容积分数均显著降低($P<0.05$)。结果

见图2,图3B、3C。

免疫组化法检测结果显示,与空白组比较,模型组小鼠肝组织中collagen I、 α -SMA蛋白的表达水平均显著升高($P<0.05$);与模型组比较,CAG各剂量组小鼠肝组织中collagen I、 α -SMA蛋白的表达水平均显著降低($P<0.05$)。结果见图4、图5。

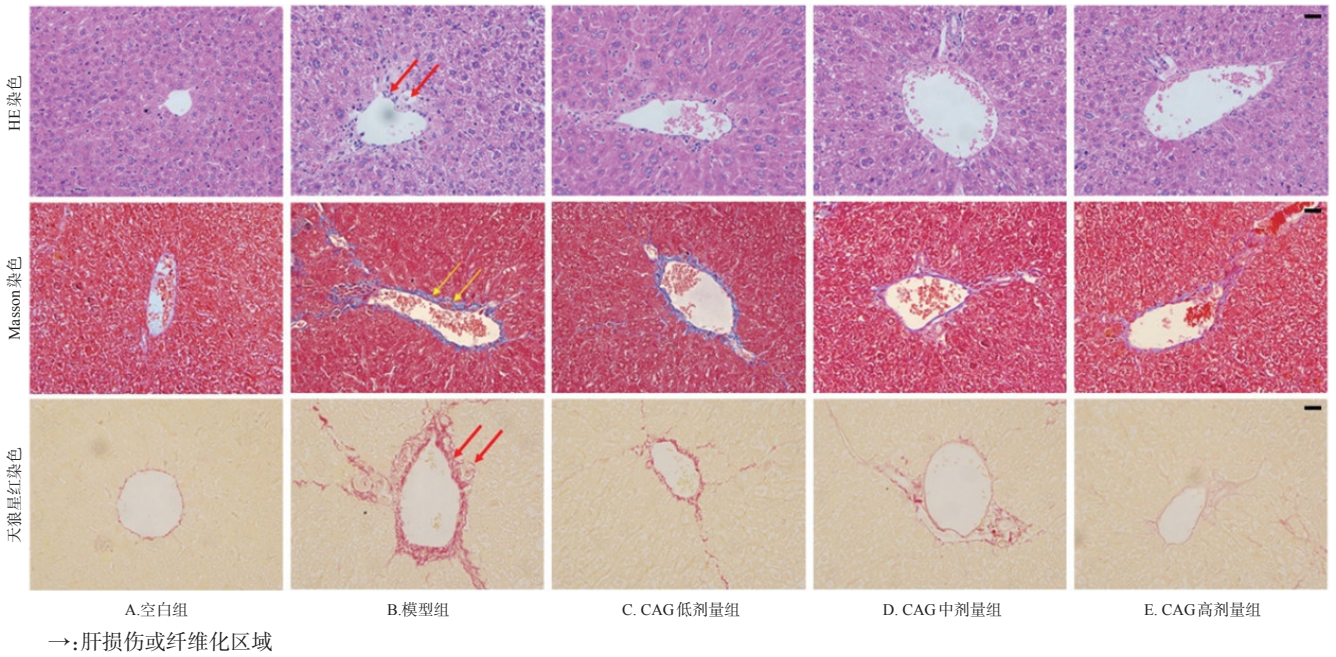


图2 各组小鼠肝组织病理学观察的显微图($\times 400$)

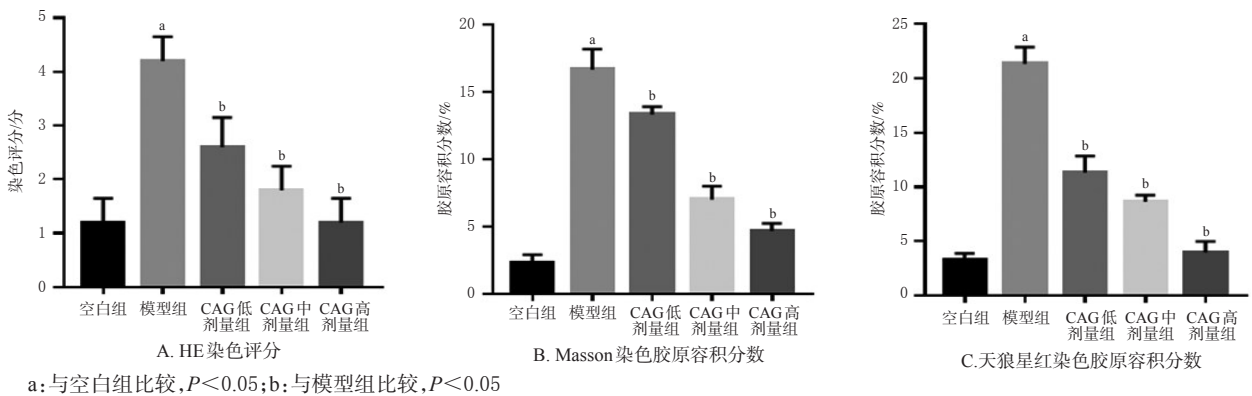


图3 各组小鼠肝组织病理学染色定量分析结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

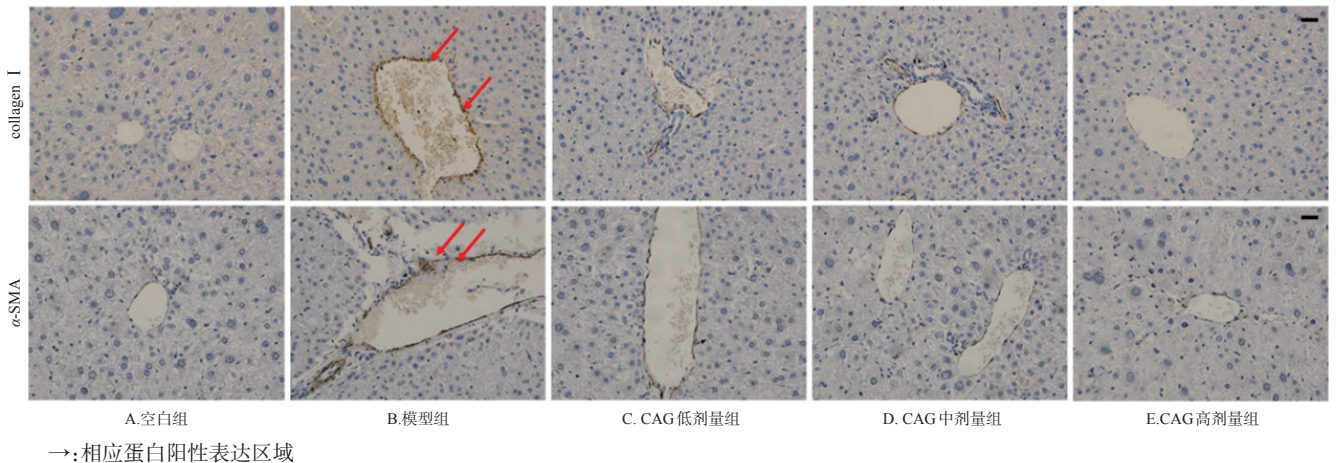
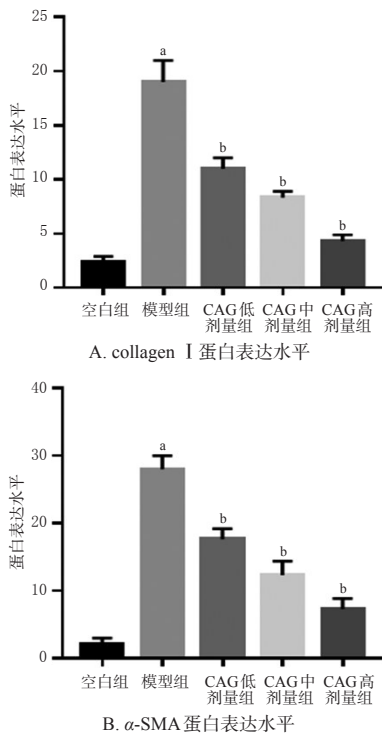


图4 各组小鼠肝组织中collagen I、 α -SMA蛋白表达的免疫组化显微图($\times 400$)



a: 与空白组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$

图5 各组小鼠肝组织中collagen I、 α -SMA蛋白表达水平的检测结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

3.4 CAG对CCl₄诱导的HF模型小鼠糖酵解的影响

与空白组比较,模型组小鼠血清中LD含量和血清、肝组织中HK、PFK、PK水平均显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,CAG各剂量组小鼠血清中LD含量和血清、肝组织中HK、PFK、PK水平(CAG低剂量组肝组织除外)均显著降低($P < 0.05$)。结果见表2、表3。

表2 各组小鼠血清中LD含量和HK、PFK、PK水平的检测结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

| 组别 | LD/(mmol/L) | HK/(U/mL) | PFK/(U/mL) | PK/(U/L) |
|---------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 空白组 | 13.33 ± 1.25 | 89.00 ± 7.79 | 81.67 ± 3.86 | 128.33 ± 6.24 |
| 模型组 | 30.33 ± 1.24 ^a | 210.00 ± 8.16 ^a | 155.00 ± 4.08 ^a | 320.00 ± 21.60 ^a |
| CAG低剂量组 | 26.67 ± 1.27 ^b | 186.00 ± 4.32 ^b | 135.00 ± 4.82 ^b | 282.67 ± 5.25 ^b |
| CAG中剂量组 | 24.67 ± 1.29 ^b | 168.33 ± 6.24 ^b | 122.33 ± 2.05 ^b | 265.33 ± 4.08 ^b |
| CAG高剂量组 | 17.33 ± 1.70 ^b | 116.00 ± 4.33 ^b | 105.00 ± 4.24 ^b | 170.00 ± 8.16 ^b |

a: 与空白组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$

表3 各组小鼠肝组织中HK、PFK、PK水平的检测结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

| 组别 | HK/(U/mL) | PFK/(U/mL) | PK/(U/L) |
|---------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| 空白组 | 33.10 ± 3.95 | 18.54 ± 0.72 | 60.98 ± 6.69 |
| 模型组 | 76.82 ± 4.43 ^a | 35.85 ± 1.86 ^a | 155.86 ± 9.56 ^a |
| CAG低剂量组 | 73.26 ± 2.09 | 34.60 ± 2.08 | 142.85 ± 5.26 |
| CAG中剂量组 | 58.12 ± 7.79 ^b | 29.52 ± 0.62 ^b | 118.34 ± 13.59 ^b |
| CAG高剂量组 | 41.53 ± 3.76 ^b | 27.81 ± 1.57 ^b | 102.63 ± 11.53 ^b |

a: 与空白组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$

4 讨论

HF是一种由多种因素刺激致肝损伤的慢性疾病,致病因素包括过量饮酒、病毒(包括乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒)感染、非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic

steatohepatitis, NASH)、非酒精性脂肪性肝病和自身免疫性肝炎等^[13]。若治疗不及时, HF将会进一步进展为肝细胞癌^[14]。HF可引发多种肝损伤和相关疾病,且在我国和世界范围内的发病率和病死率均较高^[15]。HSCs活化被认为是HF发生和发展的主要原因:肝损伤可导致HSCs活化,静止状态的HSCs将转变为肌成纤维细胞,从而导致细胞外基质的产生和积累,最终进展为HF^[13]。近年来研究发现,在HSCs活化过程中,细胞内能量代谢方式会发生转变,即由以线粒体氧化磷酸化途径为主转变为以无氧糖酵解途径为主,其中糖酵解关键酶HK、PFK、PK的表达均显著增高,类似于在肿瘤细胞中发现的Warburg效应^[3,16]。这种快速的能量代谢过程在正常生理条件下少量存在;但在HSCs活化过程中,该途径能为HSCs持续供能,因此通过阻断糖酵解途径来切断HSCs的能量供应,从而抑制HSCs活化可成为抗HF的新策略。

CAG是从传统中药黄芪中提取的一种有效成分,具有抗衰老、抗炎、抗肺纤维化、抗抑郁等诸多药理作用^[5],但关于CAG抗HF的作用尚未有报道。为此,本研究以CCl₄诱导构建经典的HF动物模型,观察CAG对小鼠HF的影响。组织病理学和相关指标检测结果显示,经CAG干预后, HF模型小鼠的体质量明显增加,肝脏指数显著降低,肝组织病理学损伤得到明显改善;同时,小鼠血清中AST、ALT水平,肝组织病理学HE染色评分、Masson和天狼星红染色胶原容积分数,以及collagen I、 α -SMA蛋白的表达水平均显著降低,且上述作用均有一定的剂量依赖趋势。这提示CAG可在一定程度上减轻肝损伤,具有一定的抗HF作用。

如前所述,抑制糖酵解可作为治疗HF的潜在策略之一。HK、PFK、PK是糖酵解过程中关键的限速酶,其中HK可催化葡萄糖生成6-磷酸葡萄糖, PFK可催化6-磷酸果糖磷酸化生成1,6-二磷酸果糖,磷酸烯醇式丙酮酸可在PK的作用下转变成丙酮酸,从而为相关生物过程持续供能^[3,17]。因此,本研究通过检测糖酵解终产物LD的含量和糖酵解过程中关键酶HK、PFK、PK的水平来考察CAG是否会影响HF发生发展过程中的糖酵解水平。结果表明,模型组小鼠血清中LD含量明显增加,血清和肝组织中糖酵解关键酶水平均显著升高,提示糖酵解水平上升;经CAG干预后,各剂量组小鼠血清中LD含量明显减少,且血清和肝组织中的糖酵解关键酶水平(低剂量组肝组织除外)均显著降低,提示糖酵解水平下降。可见,CAG对CCl₄诱导的小鼠HF有改善作用,同时降低了HF发生发展过程中的糖酵解水平。但是,CAG改善CCl₄诱导的小鼠HF是否与抑制HSCs的糖酵解有关还需进一步的实验验证。

(下转第1687页)