

水蛭对非酒精性脂肪肝病小鼠的保护作用及其机制[△]

温紫云^{1*}, 韩倩倩¹, 吕 晴¹, 魏 亮¹, 聂文强¹, 洪 敏¹, 潘芸芸^{1,2#} (1. 广东药科大学附属第一医院中医科, 广州 510080; 2. 南方医科大学南方医院临床药学中心, 广州 510515)

中图分类号 R965;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2024)10-1193-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.10.07



摘要 **目的** 探讨水蛭对非酒精性脂肪肝病(NAFLD)小鼠的保护作用及潜在机制。**方法** 将雄性载脂蛋白E基因敲除(*ApoE*^{-/-})小鼠随机分为模型组和水蛭低、高剂量组(0.45、0.9 g/kg), 每组10只; 另取同周龄野生型雄性C57BL/6J小鼠10只, 作为对照组。对照组小鼠以基础维持饲料喂养, 其余各组小鼠以高脂饲料喂养12周以建立NAFLD模型。第13周, 各药物组小鼠灌胃相应药液, 每天1次, 连续8周。末次给药后, 测定各组小鼠的体重、肝脏质量, 并计算肝脏指数; 检测其血清核因子κB(NF-κB)、肿瘤坏死因子α(TNF-α)、白细胞介素1β(IL-1β)、IL-6、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平; 观察其肝组织病理形态学变化, 并检测肝组织中过氧化物酶体增殖物激活受体γ(PPARγ)、沉默信息调节因子1(SIRT1)蛋白的表达情况。**结果** 与对照组比较, 模型组小鼠肝组织可见较多的脂肪空泡和炎症细胞浸润, 并有明显的脂质堆积; 其体重、肝脏质量及肝脏指数和血清NF-κB、TNF-α、IL-1β、IL-6、TC、TG、LDL-C水平均显著升高, 血清HDL-C水平和肝组织中PPARγ、SIRT1蛋白的表达水平均显著降低($P<0.01$)。与模型组比较, 水蛭低、高剂量组小鼠肝组织病理改变均有所缓解; 其体重、肝脏质量及肝脏指数和血清NF-κB、TNF-α、IL-1β、IL-6、TC、TG、LDL-C水平均显著降低, 血清HDL-C水平和肝组织中PPARγ、SIRT1蛋白的表达水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 水蛭可能通过激活PPARγ、SIRT1蛋白的表达来调节肝脏脂质代谢、抑制炎症反应, 从而发挥对NAFLD的改善作用。

关键词 水蛭; 非酒精性脂肪肝病; *ApoE*^{-/-}小鼠; 脂质堆积; 炎症反应; SIRT1; PPARγ

Protective effect and mechanism of Hirudo on mice with non-alcoholic fatty liver disease

WEN Ziyun¹, HAN Qianqian¹, LYU Qing¹, WEI Liang¹, NIE Wenqiang¹, HONG Min¹, PAN Yunyun^{1,2} (1. Dept. of traditional Chinese medicine, the First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510080, China; 2. Clinical Pharmacy Center, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To explore the protective effects and potential mechanisms of Hirudo on mice with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in mice. **METHODS** The male *ApoE*^{-/-} mice were randomly divided into the model group and Hirudo low-dose and high-dose groups (0.45, 0.9 g/kg), with 10 mice in each group; another 10 wild-type male C57BL/6J mice were chosen as the control group. The control group was fed with basal maintenance chow and the remaining groups were fed with high-fat chow for 12 weeks to establish the NAFLD model. Each administration group was given corresponding solution intragastrically, once a day, for 8 consecutive weeks. In the 13th week, the body weight and liver weight of mice in each group were measured after the last medication, and the liver index was calculated; the serum levels of nuclear factor-κB (NF-κB), tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β), IL-6, total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) were detected; the liver pathomorphological changes were observed; the protein expressions of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ) and silence information regulator type 1 (SIRT1) were detected. **RESULTS** Compared with the control group, the liver tissue of mice in the model group showed more fat vacuoles and infiltration of inflammatory cells, with significant lipid accumulation; the body weight, liver weight and liver index of the mice, and serum levels of NF-κB, TNF-α, IL-1β, IL-6, TC, TG and LDL-C significantly increased, while the serum level of HDL-C, the protein expressions of PPARγ and SIRT1 in liver tissues significantly decreased ($P<0.01$). Compared with the model group, the pathological changes in liver tissue of mice were all relieved in Hirudo low-dose and high-dose groups; the body weight, liver weight and liver index, the serum levels of NF-κB, TNF-α, IL-1β, IL-6, TC, TG and LDL-C decreased significantly, while the serum level of HDL-C, the protein expressions of PPARγ and SIRT1 in liver tissue all increased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). **CONCLUSIONS** Hirudo can regulate liver lipid metabolism and inhibit inflammation by activating the protein expressions of PPARγ and SIRT1, thus having a significant ameliorative effect on NAFLD.

[△]基金项目 国家自然科学基金项目(No.82074139);广东省中医药局科研项目(No.20213013, No.20211232)

*第一作者 硕士研究生。研究方向: 中医药防治心血管疾病。

E-mail: ziyunwen1997@163.com

#通信作者 副研究员, 硕士生导师, 博士。研究方向: 中医药防治心血管疾病。E-mail: huiyun1227@163.com

KEYWORDS Hirudo; non-alcoholic fatty liver disease; *ApoE*^{-/-} mice; lipid accumulation; inflammatory response; SIRT1; PPAR γ

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)又称代谢相关脂肪性肝病,以肝实质细胞脂肪变性和脂肪贮积为主要特征。该疾病影响着全球30%~40%的人口^[1],与糖尿病、心脑血管疾病的发生密切相关^[2]。NAFLD的发病机制复杂,涉及胰岛素抵抗、氧化应激、炎症激活和线粒体功能障碍等“多重打击假说”^[3]。目前,NAFLD的治疗主要依赖生活方式的改变,虽有诸多新药正处于临床试验阶段,但全球范围内尚无针对该疾病的药物获批上市。

过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ)在NAFLD患者体内呈低表达,若被激活则有助于减少患者肝脏脂质堆积,提示PPAR γ 可能是NAFLD的潜在治疗靶点^[4]。沉默信息调节因子1(silence information regulator type 1, SIRT1)是抗NAFLD研究的新靶点,其过表达可抑制高脂饮食引起的肝脏脂质堆积及炎症反应,并可调控糖脂代谢、胰岛素分泌等多条代谢通路,在NAFLD的发生、发展中具有关键作用^[5]。

水蛭为水蛭科动物蚂蟥 *Whitmania pigra* Whitman、水蛭 *Hirudo nipponica* Whitman 或柳叶蚂蟥 *Whitmania acranulata* Whitman 的干燥全体,具有破血逐瘀、通经消癥的功效,其相关中成药制剂已被广泛用于糖尿病、心脑血管疾病等血脂代谢异常相关疾病的临床治疗^[6-7]。现代药理研究表明,水蛭具有调节脂质代谢、抗炎、减轻氧化损伤等作用^[8];同时,本课题组前期研究证实,水蛭可显著抑制载脂蛋白E基因敲除(*ApoE*^{-/-})小鼠的动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)形成,有明显的降脂作用。考虑到NAFLD的病理基础与AS相似^[9],故本研究拟以高脂饮食诱导 *ApoE*^{-/-} 小鼠建立NAFLD模型,基于PPAR γ 、SIRT1初步探讨水蛭对NAFLD小鼠的保护作用及潜在机制,旨在为水蛭抗NAFLD药理作用的深入研究及后续临床应用提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括CryoStar NX50型冰冻切片仪、Multiskan MK3型酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司),Leica 819型病理刀片(上海徕卡仪器有限公司),LUKYM-I型样品冷冻研磨仪(广州露卡测序仪器有限公司),BG-Power 600i型电泳仪(北京百晶生物技术有限公司),Y-THM型光学显微镜、Tanon 4600型超灵敏化学发光成像系统(上海天能生命科学有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

本研究所用水蛭粉为脉血康胶囊(重庆多普泰制药股份有限公司,国药准字Z10970056,批号20211021,每粒装0.25 g)内容物;油红O染液、伊红染液、苏木精染液、OCT包埋剂(批号分别为G1015、G1002、G1004、GP1007)均购自武汉塞维尔生物科技有限公司;兔源PPAR γ 抗体、SIRT1抗体(批号分别为WL01800、WL02995)均购自沈阳万类生物科技有限公司;兔源甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗(批号分别为2118、7074P2)均购自美国Cell Signaling Technology公司;特超敏ECL化学发光试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒(批号分别为P0018AM、P0010S)均购自上海碧云天生物技术股份有限公司;总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6、核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号分别为MM-0632M1、MM-0631M1、MM-43685M1、MM-44105M1、MM-0132M1、MM-0040M1、MM-0049H1、MM-44130M1)均购自江苏酶免实业有限公司。

1.3 实验动物与饲料

SPF级雄性 *ApoE*^{-/-} 小鼠30只和野生型雄性C57BL/6J小鼠10只,体重16~20 g,均购自广东药康生物科技有限公司,动物生产许可证号为SCXK(粤)2020-0054。所有小鼠均饲养于广东药科大学附属第一医院SPF级动物实验室[室温(23 \pm 2) $^{\circ}$ C,相对湿度(50 \pm 10)%],每12 h昼夜交替,自由进食和饮水。本研究方案得到广东药科大学附属第一医院动物管理委员会的批准(受理编号00311859)。

60%脂肪供能高脂饲料(批号XTHF60)购自江苏省协同医药生物工程有限责任公司;基础维持饲料(批号GDMLAC-260)由广东省医学实验动物中心提供。

2 方法

2.1 造膜、分组与给药

所有小鼠均适应性饲养1周。将30只雄性 *ApoE*^{-/-} 小鼠随机分为模型组和水蛭低、高剂量组,每组10只;另取同周龄野生型雄性C57BL/6J小鼠10只,作为对照组。对照组小鼠以基础维持饲料喂养,其余各组小鼠以高脂饲料喂养12周以建立NAFLD模型(12周后,每组各处死小鼠2只,观察其肝组织病理变化,若可见明显脂肪空泡则确认造模成功^[10])。第13周,水蛭低、高剂量组小鼠灌胃0.45、0.9 g/kg水蛭粉(分别相当于成人临床等效剂

量的1.2倍,剂量参考前期预实验结果设置;以5%羧甲基纤维素钠溶液为溶剂,灌胃体积为10 mL/kg,对照组和模型组小鼠灌胃等体积0.5%羧甲基纤维素钠溶液,每天1次,连续8周。

2.2 样本收集与小鼠体重、肝脏质量、肝脏指数检测

末次给药后,各组小鼠禁食12 h,于次日上午称重;腹腔注射2%戊巴比妥钠麻醉后摘除眼球取血,血样静置1 h后,以3 000 r/min离心15 min,分离上层血清,置于-20 °C冰箱中保存,备用。随后,处死各组小鼠,迅速取出肝脏,以4 °C生理盐水清洗,并用滤纸吸除多余水分,称定肝脏质量,计算小鼠的肝脏指数[肝脏指数(%)=小鼠肝脏质量(g)/小鼠体重(g)×100%]。称定肝脏质量后,取一部分肝组织于10%甲醛中固定,用于苏木精-伊红(HE)染色和油红O染色实验;其余肝组织以液氮速冻后,置于-80 °C冰箱中保存,备用。

2.3 小鼠血清炎症相关因子及血脂水平检测

采用ELISA法检测。取“2.2”项下各组小鼠的血清样品,严格按照相应试剂盒说明书操作,使用酶标仪检测其炎症相关因子(NF-κB、IL-1β、IL-6、TNF-α)和血脂指标(TC、TG、LDL-C、HDL-C)水平。

2.4 小鼠肝组织病理形态学观察

取“2.2”项下经10%甲醛固定的各组小鼠肝组织适量,一部分经脱水、石蜡包埋后切片,进行HE染色,使用显微镜观察其肝组织病理损伤情况;另一部分经OCT包埋剂包埋后冷冻切片,进行油红O染色,使用显微镜观察其肝组织脂质堆积情况。

2.5 小鼠肝组织中PPARγ、SIRT1蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取“2.2”项下各组小鼠冻存的肝组织适量,加入RIPA裂解液,冷冻匀浆,于4 °C以12 000 r/min离心15 min,取上清液并采用BCA法测定蛋白浓度。蛋白经加热变性后,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,并以湿转法转至聚偏二氟乙烯膜上,用5%脱脂奶粉封闭2 h;加入PPARγ、SIRT1、GAPDH一抗(稀释比例分别为1:1 000、1:1 000、1:10 000),于4 °C孵育过夜;以TBST洗膜3次,加入相应二抗(稀释比例为1:20 000),于室温孵育1 h;以TBST洗膜3次,用特超敏ECL化学发光试剂盒显色、曝光。以GAPDH为内参,使用Image J软件分析目的蛋白的表达水平(目的蛋白的表达水平=目的蛋白的条带灰度值/内参蛋白的条带灰度值)。

2.6 统计学方法

采用SPSS 26.00软件进行统计分析,GraphPad

Prism 8.0软件作图。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,进一步两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 水蛭对NAFLD小鼠体重、肝脏质量及肝脏指数的影响

与对照组比较,模型组小鼠的体重、肝脏质量、肝脏指数均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,水蛭低、高剂量组小鼠的体重、肝脏质量、肝脏指数均显著降低($P<0.01$)。结果见表1。

表1 水蛭对NAFLD小鼠体重、肝脏质量及肝脏指数的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	体重/g	肝脏质量/g	肝脏指数/%
对照组	28.71±1.41	1.04±0.10	3.63±0.23
模型组	33.36±0.81 ^a	1.56±0.12 ^a	4.69±0.29 ^a
水蛭低剂量组	29.59±1.42 ^b	1.09±0.10 ^b	3.69±0.30 ^b
水蛭高剂量组	29.64±0.96 ^b	1.06±0.04 ^b	3.59±0.06 ^b

a:与对照组比较, $P<0.01$;b:与模型组比较, $P<0.01$ 。

3.2 水蛭对NAFLD小鼠血清炎症相关因子及血脂水平的影响

与对照组比较,模型组小鼠血清NF-κB、IL-1β、IL-6、TNF-α和TG、TC、LDL-C水平均显著升高,HDL-C水平显著降低($P<0.01$);与模型组比较,水蛭低、高剂量组小鼠血清NF-κB、IL-1β、IL-6、TNF-α和TG、TC、LDL-C水平均显著降低,HDL-C水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见表2。

3.3 水蛭对NAFLD小鼠肝组织病理形态学的影响

HE染色结果显示,对照组小鼠肝组织中肝细胞分布均匀,肝小叶结构正常,肝索排列规整;模型组小鼠肝组织可见较多的脂肪空泡和炎症细胞浸润,肝索不清晰,肝小叶结构模糊;水蛭低、高剂量组小鼠的病理改变均有所缓解,脂肪空泡数量明显减少,但仍有少量炎症细胞浸润。油红O染色结果显示,模型组小鼠肝组织中的脂质堆积较对照组明显增加;而水蛭低、高剂量组小鼠肝组织中的脂质堆积明显减少,水蛭高剂量组更接近于对照组。结果见图1。

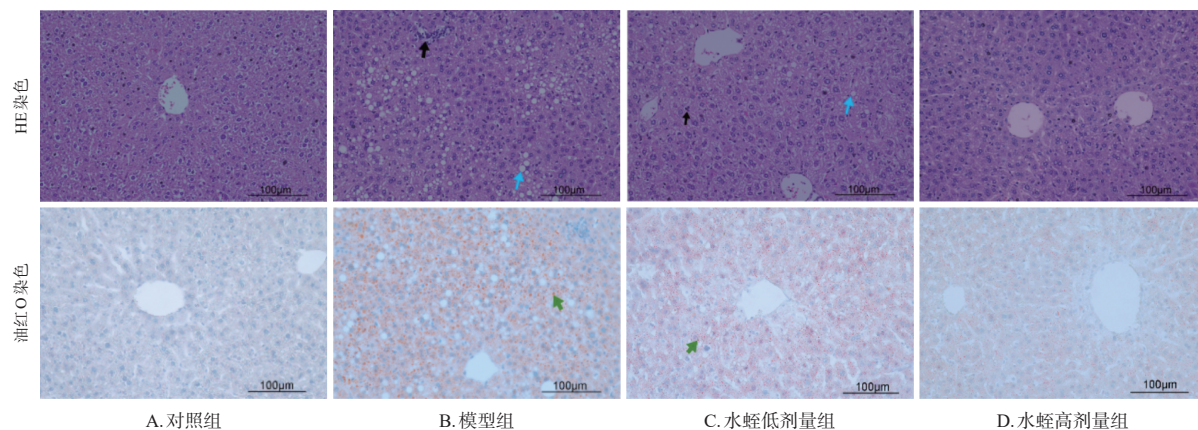
3.4 水蛭对NAFLD小鼠肝组织中PPARγ、SIRT1蛋白表达的影响

与对照组比较,模型组小鼠肝组织中PPARγ、SIRT1蛋白的表达水平均显著降低($P<0.01$);与模型组比较,水蛭低、高剂量组小鼠肝组织中PPARγ、SIRT1蛋白的表达水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见图2。

表2 水蛭对NAFLD小鼠血清炎症相关因子及血脂水平的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

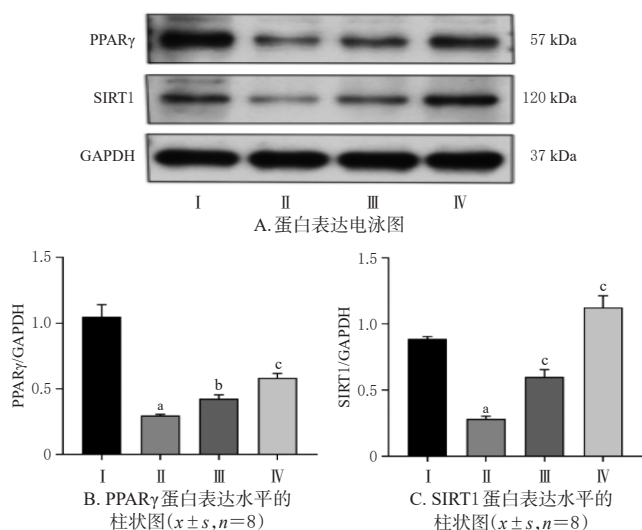
组别	NF-κB/(pg/mL)	IL-1β/(pg/mL)	IL-6/(pg/mL)	TNF-α/(pg/mL)	TC/(mmol/L)	TG/(mmol/L)	LDL-C/(mmol/L)	HDL-C/(mmol/L)
对照组	872.21±51.15	97.56±6.04	96.67±4.35	490.59±47.12	3.68±0.47	0.78±0.24	1.19±0.37	2.07±0.28
模型组	1 091.65±48.90 ^a	117.82±6.63 ^a	114.62±5.75 ^a	588.23±33.10 ^a	27.50±1.07 ^a	2.32±0.25 ^a	21.73±1.76 ^a	0.44±0.15 ^a
水蛭低剂量组	965.17±41.55 ^b	104.35±3.85 ^b	104.79±4.17 ^b	520.23±22.17 ^b	20.42±1.67 ^b	1.91±0.16 ^b	17.29±1.40 ^b	1.63±0.25 ^b
水蛭高剂量组	909.21±39.44 ^b	97.36±6.10 ^b	98.05±3.63 ^b	506.42±35.83 ^b	16.62±1.32 ^b	1.28±0.33 ^b	13.14±1.09 ^b	1.90±0.18 ^b

a:与对照组比较, $P<0.01$;b:与模型组比较, $P<0.01$;c:与模型组比较, $P<0.05$ 。



蓝色箭头:脂肪空泡;黑色箭头:炎症细胞浸润;绿色箭头:脂质堆积。

图1 水蛭对NAFLD小鼠肝组织病理形态学影响的显微图



I:对照组;II:模型组;III:水蛭低剂量组;IV:水蛭高剂量组;a:与对照组比较, $P<0.01$;b:与模型组比较, $P<0.05$;c:与模型组比较, $P<0.01$ 。

图2 水蛭对NAFLD小鼠肝组织中PPAR γ 、SIRT1蛋白表达的影响

4 讨论

NAFLD是一种慢性进展性肝病,可增加人们罹患肝硬化、肝移植、肝细胞癌和终末期肝病的风险。近年来,由于人们生活方式的改变、生活条件的提高,有不少儿童和青少年罹患NAFLD,给全社会带来了沉重的疾病负担^[11-12]。载脂蛋白E(apolipoprotein E, ApoE)是一种参与脂蛋白转化、代谢的多态性蛋白,其编码基因敲除(*ApoE*^{-/-})小鼠经高脂饲料喂养后所得的NAFLD模型具有明显的肝脏脂肪变性、炎症特征,是相关研究的可靠动物模型^[13]。本研究结果显示,以高脂饲料连续喂养12周后,模型组小鼠的体重、肝脏质量、肝脏指数均显著升高,肝组织出现了明显的脂肪空泡、炎症细胞浸润和脂质堆积,提示NAFLD模型复制成功。

NAFLD的特点是肝脏脂质堆积和炎症改变。研究

指出,PPAR γ 能促进脂肪细胞分化,减少肝细胞的脂肪生成;同时,激活PPAR γ 可通过阻止M1亚型巨噬细胞活化、激活M2亚型巨噬细胞来抑制IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等炎症因子(促炎细胞因子)的表达,间接减少炎症状态下炎症产物的生成,从而改善NAFLD^[4];此外,PPAR γ 还可通过与NF- κ B相互作用来参与炎症信号转导,从而减少炎症因子的表达。本研究结果显示,模型组小鼠肝组织中PPAR γ 蛋白的表达水平较对照组显著降低,同时血清NF- κ B、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平均较对照组显著升高,肝组织可见较多的脂肪空泡和炎症细胞浸润;经水蛭干预后,各剂量组小鼠肝组织中PPAR γ 蛋白的表达水平均较模型组显著升高,同时其体重、肝脏质量、肝脏指数,血清NF- κ B、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平均较模型组显著降低,肝组织病理改变明显缓解,表明水蛭可通过调控PPAR γ 蛋白的表达来抑制炎症反应,减少肝脏脂质堆积,进而缓解NAFLD。

线粒体功能障碍也是NAFLD的致病机制之一。SIRT1是一种在肝脏中高表达的代谢受体,可通过调节不同途径来恢复受损线粒体功能,减轻肝脏脂肪变性,从而改善NAFLD^[14-15]。此外,有学者提出,SIRT1可靶向调控NF- κ B,从而抑制炎症因子的表达,SIRT1和NF- κ B的拮抗关系对下丘脑控制下的肝脏脂肪变性和代谢能量平衡有益^[16-17]。本研究结果显示,模型组小鼠肝组织中SIRT1蛋白的表达水平较对照组显著降低,血清TG、TC、LDL-C水平均较对照组显著升高,HDL-C水平较对照组显著下降,肝组织脂肪变性严重;经水蛭干预后,各剂量组小鼠肝组织中SIRT1蛋白的表达水平均较模型组显著升高,血清TG、TC、LDL-C水平均较模型组显著降低,HDL-C水平均较模型组显著升高,肝组织脂肪变性明显改善,表明水蛭可通过促进SIRT1蛋白的表达来改善肝脏脂质代谢,进而缓解NAFLD。

综上所述,水蛭可能通过激活 PPAR γ 、SIRT1 蛋白的表达来调节肝脏脂质代谢、抑制炎症反应,从而发挥对 NAFLD 的改善作用,但更深层次的分子机制尚有待进一步研究探讨。

参考文献

- [1] GOLABI P, SHAH D, YOUNOSSI Z M. How to identify advanced nonalcoholic fatty liver disease in the primary care setting[J]. *Semin Liver Dis*, 2023, 43(2): 142-148.
- [2] LEE E, KORF H, VIDAL-PUIG A. An adipocentric perspective on the development and progression of non-alcoholic fatty liver disease[J]. *J Hepatol*, 2023, 78(5):1048-1062.
- [3] PETRESCU M, VLAICU S I, CIUMĂRNEAN L, et al. Chronic inflammation: a link between nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and dysfunctional adipose tissue[J]. *Medicina*, 2022, 58(5):641.
- [4] CHEN H, TAN H B, WAN J, et al. PPAR- γ signaling in nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and therapeutic targets[J]. *Pharmacol Ther*, 2023, 245:108391.
- [5] GREGORIO E D, COLELL A, MORALES A, et al. Relevance of SIRT1-NF- κ B axis as therapeutic target to ameliorate inflammation in liver disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11):3858.
- [6] 韩倩倩,温紫云,吕晴,等. 含水蛭中成药治疗动脉粥样硬化的网状 Meta 分析[J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(1): 234-246.
- HAN Q Q, WEN Z Y, LYU Q, et al. Network meta-analysis of Chinese patent medicine containing *Hirudo* in treatment of atherosclerosis[J]. *China J Chin Mater Med*, 2023, 48(1):234-246.
- [7] 徐寒莹,张冬梅,卢靖,等. 水蛭治疗脑卒中的作用机制研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(18): 209-217.
- XU H Y, ZHANG D M, LU J, et al. Mechanism of *Hirudo* in treatment of stroke: a review[J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2023, 29(18):209-217.
- [8] WU J K, YANG Q. Effect of leech on lipid metabolism and liver in hyperlipidemia rats[J]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2018, 43(4):794-799.
- [9] 冯骁腾,杜敏,张一凡,等. 桃红饮减轻 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化并发非酒精性脂肪肝氧化应激损伤和纤维化的作用研究[J]. *时珍国医国药*, 2023, 34(1):1-5.
- FENG X T, DU M, ZHANG Y F, et al. Effect of Taohongyin decoction on oxidative stress injury and fibrosis of atherosclerosis with non-alcoholic fatty liver in ApoE^{-/-} mice[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2023, 34(1):1-5.
- [10] 徐永斌,张磊,张宇,等. 基于网络药理学和实验研究探讨加味甘姜苓术汤对非酒精性脂肪肝小鼠模型影响及作用机制[J]. *世界中西医结合杂志*, 2023, 18(1):74-84.
- XU Y Y, ZHANG L, ZHANG Y, et al. Effect of modified Ganjiang lingzhu decoction on nonalcoholic fatty liver in mice and its mechanism based on network pharmacology and experiments[J]. *World J Integr Tradit West Med*, 2023, 18(1):74-84.
- [11] YOUNOSSI Z, ANSTEE Q M, MARIETTI M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018, 15(1):11-20.
- [12] WONG V W, EKSTEDT M, WONG G L, et al. Changing epidemiology, global trends and implications for outcomes of NAFLD[J]. *J Hepatol*, 2023, 79(3):842-852.
- [13] LE Y F, GUO J N, LIU Z J, et al. Calenduloside E ameliorates non-alcoholic fatty liver disease via modulating a pyroptosis-dependent pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 319(Pt 2):117239.
- [14] ZENG C F, CHEN M K. Progress in nonalcoholic fatty liver disease: SIRT family regulates mitochondrial biogenesis[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(8):1079.
- [15] LIOU C J, LEE Y K, TING N C, et al. Protective effects of licochalcone A ameliorates obesity and non-alcoholic fatty liver disease via promotion of the Sirt-1/AMPK pathway in mice fed a high-fat diet[J]. *Cells*, 2019, 8(5):447.
- [16] SINGH V, UBAID S. Role of silent information regulator 1 (SIRT1) in regulating oxidative stress and inflammation[J]. *Inflammation*, 2020, 43(5):1589-1598.
- [17] YANG Y S, LIU Y, WANG Y W, et al. Regulation of SIRT1 and its roles in inflammation[J]. *Front Immunol*, 2022, 13:831168.

(收稿日期:2023-11-16 修回日期:2024-03-08)

(编辑:张元媛)