

· 论 著 ·

肉苁蓉活性成分毛蕊花糖苷通过诱导自噬对 NAFLD 的作用研究^{*}

伊力亚斯·艾萨^{1,2,3}, 木塔力甫·艾买提⁴, 任丽君^{1,2,3}, 付 瑾^{1,2,3△}

(1. 新疆和田学院, 新疆 和田 848000; 2. 新疆和田特色中医药研究重点实验室, 新疆 和田 848000; 3. 新疆和田民族医药工程技术研究中心, 新疆 和田 848000; 4. 新疆医科大学, 新疆 乌鲁木齐 830000)

[摘 要] **目的** 探讨肉苁蓉活性成分毛蕊花糖苷(ACT)的自噬诱导功能及其对非酒精性脂肪肝(NAFLD)的作用。**方法** 以松果菊苷(ECH)和 ACT 作为研究对象,运用 100 μmol/L ACT、ECH 联合自噬溶酶体抑制剂巴佛洛霉素 A1(BafA1)进行干预处理,利用蛋白质免疫印迹技术检测自噬标志性蛋白质微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)-Ⅱ蛋白质相对表达水平;利用不同浓度 ACT 体外干预 HepG2 细胞,采用四甲基偶氮唑盐法检测细胞活性;利用不同浓度 ACT 联合 BafA1 体外干预 HepG2 细胞,采用蛋白质免疫印迹技术检测 LC3-Ⅱ蛋白质表达水平;利用药物干预体外构建的 NAFLD 细胞模型,采用油红 O 染色法对脂滴进行染色,并检测细胞内甘油三酯(TG)水平;通过免疫荧光技术观察 LC3 蛋白和脂滴定位情况。**结果** 在 HepG2 细胞中 ACT 能明显诱导自噬,ACT+BafA1 组 LC3-Ⅱ蛋白质表达水平较 ACT 组明显升高(分别为 1.36±0.11、0.28±0.02),差异有统计学意义($P<0.05$);不同浓度 ACT 干预 24、48 h 后对 HepG2 细胞活力无影响,差异均无统计学意义($P>0.05$)。50 μmol/L ACT 明显诱导 HepG2 细胞自噬,LC3-Ⅱ蛋白质表达水平明显升高(分别为 1.83±0.53、0.35±0.18),ACT 干预组 HepG2 细胞 TG 水平 $[(19.11\pm1.68)\mu\text{g}/\text{mg}]$ 明显低于模型组 $[(34.15\pm1.90)\mu\text{g}/\text{mg}]$,差异均有统计学意义($P<0.05$);ACT 干预组 HepG2 细胞阳性脂滴数量明显减少,细胞内自噬体数目明显增多,与脂滴在空间上显示出明显共定位。**结论** 肉苁蓉 ACT 具有明显的自噬诱导能力,同时,其可能对 NAFLD 具有潜在防治功效。

[关键词] 非酒精性脂肪肝; 肉苁蓉; 毛蕊花糖苷; 自噬

DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2025.03.001 中图法分类号:R282.71

文章编号:1009-5519(2025)03-0577-07 文献标识码:A

Study on the effect of Acteoside (an active ingredient in Cistanche deserticola) on NAFLD by inducing autophagy^{*}

YILİYASI Aisa^{1,2,3}, MUTALIFU Aimaiti⁴, REN Lijun^{1,2,3}, FU Jin^{1,2,3△}

(1. Xinjiang Hetian College, Hetian, Xinjiang 848000, China; 2. Key Laboratory of Xinjiang Hetian Characteristic Chinese Traditional Medicine Research, Hetian, Xinjiang 848000, China; 3. Engineering Research Center of Xinjiang Hetian Traditional Chinese and Ethnic Medicine, Hetian, Xinjiang 848000, China; 4. Xinjiang Medical University, Wulumuqi, Xinjiang 830000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the autophagy inducing function of active ingredient Acteoside (ACT) in Cistanche deserticola and its effect on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Methods** To take Echinacoside (ECH) and ACT as research objects, 100 μmol/L ACT and ECH were combined with autophagy lysosome inhibitor bleomycin A1 (BafA1) for intervention treatment. Protein immunoblotting was used to detect the relative expression level of autophagy marker protein microtubule associated protein 1 light chain 3 (LC3-Ⅱ). HepG2 cells were intervened with different concentrations of ACT in vitro, and cell viability was detected using the tetrazolium salt method. In vitro intervention of HepG2 cells with different concentrations of ACT combined with BafA1, and detection of LC3-Ⅱ protein expression levels using protein immunoblotting technology. A NAFLD cell model constructed in vitro with drug intervention was used to stain lipid droplets

^{*} 基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2022D01B41)。
作者简介:伊力亚斯·艾萨(1990—),博士研究生,副教授,主要从事药物研发方面的工作。△ 通信作者,E-mail:312499090@qq.com。
网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1129.R.20250221.1313.024\(2025-02-21\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1129.R.20250221.1313.024(2025-02-21))

using Oil Red O staining method and detect intracellular triglyceride (TG) levels. Observe the localization of LC3 protein and lipid droplets through immunofluorescence technology. **Results** ACT can significantly induce autophagy in HepG2 cells, and the expression level of LC3-II protein of ACT+BafA1 group was significantly increased compared to ACT group (1.36 ± 0.11 , 0.28 ± 0.02 , respectively), with statistical significance difference ($P < 0.05$). Different concentrations of ACT intervention had no effect on HepG2 cell viability after 24 and 48 hours, and the differences were not statistically significant ($P > 0.05$). $50 \mu\text{mol/L}$ ACT significantly induced autophagy in HepG2 cells, and the expression level of LC3-II protein was significantly increased (1.83 ± 0.53 , 0.35 ± 0.18 , respectively). The TG level of HepG2 cells in the ACT intervention group [$19.11 \pm 1.68 \mu\text{g/mg}$] was significantly lower than that in the model group [$34.15 \pm 1.90 \mu\text{g/mg}$], and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The number of positive lipid droplets in HepG2 cells in the ACT intervention group decreased significantly, and the number of autophagosomes inside the cells increased significantly, showing clear co localization with lipid droplets in space. **Conclusion** Cistanche deserticola ACT has significant autophagy induction ability, and it may have potential preventive and therapeutic effects on NAFLD.

[Key words] Non-alcoholic fatty liver disease; Cistanche deserticola; Acteoside; Autophagy

在过去的几十年里,非酒精性脂肪肝(NAFLD)已成为最常见的慢性肝病,全球患病率约为成人人群的 25%,并被认为是与代谢综合征具有密切的相关性^[1]。虽然 NAFLD 患者发生肝脏相关并发症的概率不到 10%,但 NAFLD 却是并发肝硬化、原发性肝癌等肝脏相关疾病的危险因素,给患者造成了巨大的经济负担^[2-5]。尽管人们对 NAFLD 的关注日益增加,但 NAFLD 作为一种重要的慢性疾病并未得到充分重视。因此,进一步深入揭示 NAFLD 的发病机制及寻找行之有效的治疗策略成为亟须解决的难题^[6-7]。

最近研究表明,细胞自噬在肝脏生理和病理中具有重要作用^[8]。自噬功能障碍或失调与酒精相关性肝病^[9]、NAFLD^[10]、非酒精性脂肪性肝炎^[11]、肝细胞性肝癌^[12]等多种肝脏疾病有关。NAFLD 的病理学特征在于非酒精的刺激下肝细胞内甘油三酯(TG)和其他中性脂滴(LD)的过量沉积。对肝脏而言,调节这些 LD 分解代谢的 2 条主要途径分别为脂肪分解和自噬。脂肪分解途径由细胞质中性脂肪酶,如激素敏感脂肪酶和 TG 脂肪酶调节。在与之相对应的脂肪自噬途径中,LD 可能通过直接募集自噬相关蛋白形成自噬体,进而被选择性摄取,随后自噬体包裹的 LD 进一步递送至溶酶体,并在溶酶体中被酸性脂肪酶分解。因此,针对肝细胞激活脂肪自噬成为防治 NAFLD 的有效策略。

肉苁蓉是一种珍贵的中草药,在传统中药配方中已广泛用于临床,同时,也长期被用作保健食品补充剂。肉苁蓉中含有多种生物活性成分,其中最重要的是肉苁蓉苯乙醇苷。松果菊苷(ECH)和毛蕊花糖苷(ACT)作为苯乙醇苷的代表,已被报道具有许多重要的生物活性,如抗氧化、神经保护、免疫调节、肝脏保护等^[13]。在肝脏保护作用方面,有研究发现,ECH 可

通过降低炎症介质、抑制转化生长因子- β 及降低肝脏纤维化相关基因表达水平等途径起到肝保护作用。ACT 对化学和药物诱发的肝损伤发挥明显保护作用,如酒精、四氯化碳、脂多糖等。ACT 通过减轻有毒化学物质引起氧化应激,清除肝脏内积累的活性氧并减少丙二醛浓度,同时,明显增加肝脏超氧化物歧化酶活性和还原型谷胱甘肽含量,明显改善肝脏的组织病理学损伤和凋亡。然而,肉苁蓉苯乙醇苷在发挥肝脏保护作用方面是否有细胞自噬过程的参与尚鲜见相关文献报道。基于此,本研究利用常规细胞生物学方法,借助体外细胞模型初步探讨了肉苁蓉苯乙醇苷的自噬诱导作用,并探索其可能的药理学功能,旨在为今后开发药物提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象 以 ECH、ACT 作为研究对象。

1.1.2 材料 HepG2 细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司,ECH(批号:B21209)、ACT(批号:B20715,高效液相色谱法纯度 $\geq 98\%$)均购自上海源叶生物公司,DMEM 高糖培养基(批号:SH30243.01)、磷酸盐缓冲液(PBS)、胰蛋白酶均购自美国 HyClone 公司,胎牛血清(批号:04-002-1A)购自以色列 BI 公司,青霉素/链霉素(批号:SV30010.01)购自美国 HyClone 公司,四甲基偶氮唑盐(MTT,批号:M8180)购自中国北京索莱宝公司,TG 检测试剂盒(批号:BC0625)购自中国北京索莱宝公司,油红 O(批号:O0625-100G)、二甲基亚砷(批号:BCBZ1685)均购自美国 Sigma-Aldrich 公司,自噬溶酶体抑制剂巴佛洛霉素 A1(BafA1,批号:tlrl-baf1)购自美国 Invitrogen 公司,自噬激活剂雷帕霉素(批号:S17098)购自中国上海源叶生物公司,微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3,批号:L7543,种属:兔,稀释比例为 1:1

000)、 β -肌动蛋白(批号:ZRB1312,种属:兔,稀释比例为 1:5 000)抗体均购自美国 Sigma-Aldrich 公司,辣根过氧化物酶标记的二抗(批号:4010-05,种属:山羊抗兔,稀释比例为 1:1 000)购自美国 Southern Biotech 公司, Alexa Fluor 荧光标记的二抗(批号:43328,波长:546,稀释比例为 1:1 000)购自美国 Sigma-Aldrich 公司, BODIPY 493/501(批号:D3922)购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HepG2 细胞使用含有 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 高糖培养基,置于 37 $^{\circ}$ C、5%二氧化碳培养箱培养,待细胞汇合度达 85%时进行传代、铺板、干预等操作。

1.2.2 蛋白质免疫印迹检测

1.2.2.1 ACT、ECH 干预 HepG2 细胞 LC3-II 蛋白质表达水平 BafA1 作为质子泵抑制剂,能使 LC3-II 蛋白质在细胞内大量聚集,进而放大自噬诱导能力。因此,联合运用 BafA1 可作为自噬监测系统评价自噬诱导能力。将对数生长期的 HepG2 细胞传至 3.5 cm 细胞培养皿中过夜培养,运用 100 μ mol/L ACT、ECH 联合 BafA1 进行干预处理 12 h,用预冷 PBS 洗涤细胞并立即在 RIPA 蛋白裂解液中裂解 10 min,离心取上清液,采用二喹啉甲酸蛋白浓度测定试剂盒测定总蛋白浓度,十二烷基硫酸钠缓冲液定量后在 95 $^{\circ}$ C 下加热 10 min,以使蛋白质变性,随即用微量取样器取 30 μ L 样品,在聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳。电泳结束后将蛋白质从凝胶转移至硝酸纤维素膜,用 10%牛奶封闭过夜,特异性一抗室温孵育 1 h,含 0.5% Triton 的 PBS 清洗后用特异性二抗室温孵育 1 h,采用电化学发光法进行显色。上述实验分组分别设为空白对照组、雷帕霉素组、ECH 组、ACT 组、雷帕霉素+BafA1 组、ECH+BafA1 组和 ACT+BafA1 组。

1.2.2.2 不同浓度 ACT 干预 HepG2 细胞 LC3-II 蛋白质表达水平 将对数生长期的 HepG2 细胞传至 3.5 cm 细胞培养皿中过夜培养,运用 25、50、100 μ mol/L ACT 联合 BafA1 进行干预处理 12 h,采用蛋白质免疫印迹检测 LC3-II 蛋白质表达水平。上述实验分组分别设为对照组(CON 组,空白对照)、饥饿组(STA 组,饥饿处理 HepG2 细胞),以及 25、50、100 μ mol/L ACT 组和 BafA1 联合 25、50、100 μ mol/L ACT 组。

1.2.3 MTT 法检测不同浓度 ACT 处理 24、48 h HepG2 细胞存活率 取对数生长期的 HepG2 细胞接种于 96 孔板中,接种密度适中,培养箱中培养 12 h,加入 20、40、60、80、100 μ mol/L ACT 处理 24、48 h,避光加入 0.5 mg/mL 的 MTT 溶液,置于培养箱孵育,4 h 后弃上清液,按每孔 100 μ L 加入二甲亚

砷,37 $^{\circ}$ C 恒温摇床震荡 10 min,酶标仪检测 490 nm 波长的光密度(OD)值,并计算细胞存活率。

1.2.4 体外构建 NAFLD 细胞模型 称取一定质量的棕榈酸(PA)充分溶解于一定体积的异丙醇中制备为 100 mmol/L PA 母液,分装后于-20 $^{\circ}$ C 冰箱中储存备用。利用完全培养基稀释 PA 母液至 100 μ mol/L,同时,加入 1%不含脂肪酸的牛血清白蛋白,37 $^{\circ}$ C 孵育 3 h,制备诱导液。将对数生长期的 HepG2 细胞按合适的密度传至 3.5 cm 细胞培养皿中过夜培养,随后利用配制好的诱导液进行干预。

1.2.5 ACT 干预 NAFLD 体外细胞模型 TG 检测及油红 O 染色

1.2.5.1 TG 检测 将处于对数生长期的 HepG2 细胞按空白对照组、模型组和 ACT 干预组传至 3.5 cm 规格的细胞培养皿中进行培养。模型组采用 100 μ mol/L PA 诱导液进行诱导,ACT 干预组采用 100 μ mol/L PA 诱导液的同时分别加入 50 μ mol/L ACT,干预时间为 24 h。轻轻吸去陈旧培养基,预冷 PBS 缓慢清洗细胞表面 1 次,每个培养皿加入 100 μ L 预冷 RIPA 裂解液,冰上充分裂解 15 min,4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,取 10 μ L 采用酶法检测 TG 水平,另取 10 μ L 用于检测蛋白含量,按 TG 试剂盒说明书检测 TG,并最终每毫克蛋白校正 TG 水平。

1.2.5.2 油红 O 染色 将对数生长期的 HepG2 细胞传至铺有无菌盖玻片的 3.5 cm 培养皿中过夜培养,100 μ mol/L PA 诱导细胞形成脂滴,同时,加入 50 μ mol/L ACT 进行干预处理 24 h。收取细胞玻片,预冷 PBS 清洗 3 次,4%甲醛室温固定 10 min,PBS 清洗细胞表面,加入配制好的油红 O 染液,室温避光染色 15 min,吸去油红 O 染液,双蒸水清洗去多余的染液,60%异丙醇漂洗,双蒸水清洗后封片,显微镜下拍照。

1.2.6 采用免疫荧光技术观察 ACT 处理后自噬体和脂滴 将对数生长期的 HepG2 细胞传至铺有无菌盖玻片的 3.5 cm 培养皿中过夜培养,100 μ mol/L PA 诱导细胞形成脂滴,同时加入 ACT 进行干预处理 24 h。收取细胞玻片,预冷 PBS 清洗 3 次,4%甲醛室温固定 10 min,含有 0.1%皂素的透膜缓冲液室温透膜 15 min,山羊血清室温封闭 1 h,LC3 特异性一抗室温孵育 1 h,PBS 清洗 3 次,加入特异性荧光标记的二抗,室温、避光孵育 1 h。抗体孵育结束后 PBS 清洗 3 次,用脂滴特异性探针 BODIPY 493/503 室温复染 10 min,PBS 清洗后采用防淬灭封片剂封片,避光风干,采用激光共聚焦显微镜观察、拍片记录。上述实验分组分别设为空白对照组、雷帕霉素处理组和 ACT 干预组。

1.3 统计学处理 应用 SPSS25.0 统计软件进行数

据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析和 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ACT、ECH 干预 HepG2 细胞 LC3-II 蛋白质表达水平比较 BafA1 干预后 HepG2 细胞 LC3-II 蛋白质相对表达量(0.67 ± 0.04)明显高于空白对照组(0.41 ± 0.02),雷帕霉素+BafA1 组 HepG2 细胞 LC3-II 蛋白质相对表达量(1.24 ± 0.06)高于雷帕霉素组(0.28 ± 0.02),ECH+BafA1 组、ACT+BafA1 组 HepG2 细胞 LC3-II 蛋白质相对表达量(分别为 0.43 ± 0.02 、 1.36 ± 0.11)均明显高于 ECH 组、ACT 组(分别为 0.18 ± 0.01 、 0.28 ± 0.02),差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 不同浓度 ACT 干预 HepG2 细胞 LC3-II 蛋白质表达水平比较 CON 组 HepG2 细胞 LC3-II 蛋白质表达水平(0.79 ± 0.07)与 STA 组(0.50 ± 0.04)比

较,差异无统计学意义($P > 0.05$);BafA1 联合 25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ ACT 组 HepG2 细胞 LC3-II 蛋白质表达水平(分别为 1.17 ± 0.30 、 1.83 ± 0.53 、 0.97 ± 0.25)均明显高于 25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ ACT 组(分别为 0.38 ± 0.09 、 0.35 ± 0.18 、 0.30 ± 0.15),差异均有统计学意义($P < 0.05$)。50 $\mu\text{mol/L}$ ACT 组 HepG2 细胞 LC3-II 蛋白质表达水平最高。见图 2。

2.3 不同浓度 ACT 干预 24、48 h 后 HepG2 细胞存活率比较 0、20、40、60、80、100 $\mu\text{mol/L}$ ACT 干预 24 h 后 HepG2 细胞 OD 值分别为 0.98 ± 0.17 、 0.99 ± 0.15 、 0.99 ± 0.19 、 1.00 ± 0.12 、 0.94 ± 0.15 、 0.94 ± 0.20 ,干预 48 h 后 HepG2 细胞 OD 值分别为 3.06 ± 0.27 、 2.96 ± 0.27 、 2.88 ± 0.27 、 3.08 ± 0.15 、 3.01 ± 0.13 、 3.09 ± 0.22 。不同浓度 ACT 干预 24、48 h 后 HepG2 细胞 OD 值比较,差异均无统计学意义($F = 0.213$ 、 0.213 , $P = 0.96$ 、 0.36)。见图 3。

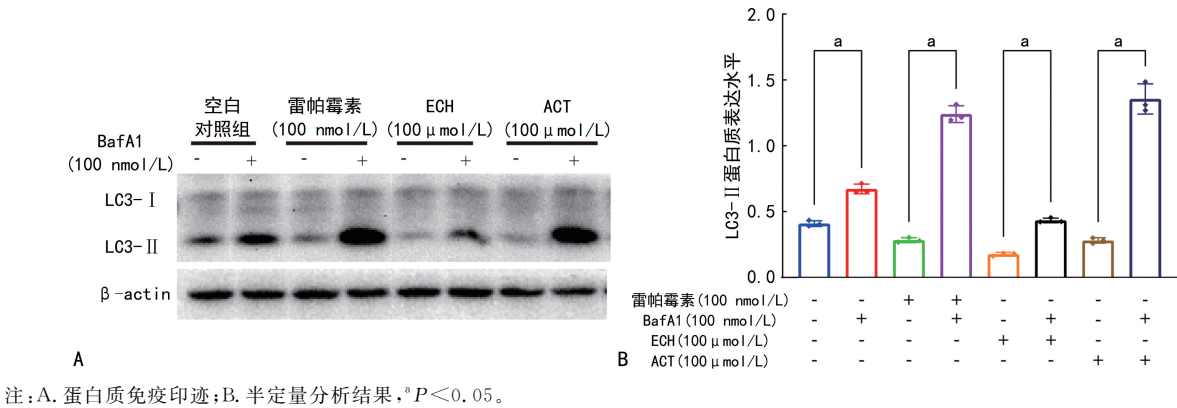


图 1 ACT 与 ECH 干预 HepG2 细胞 LC3-II 蛋白质表达水平比较

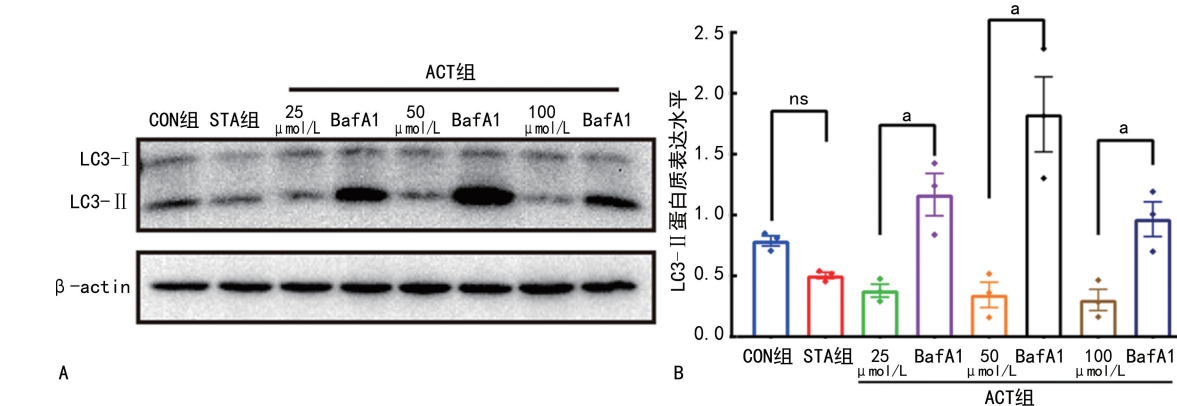
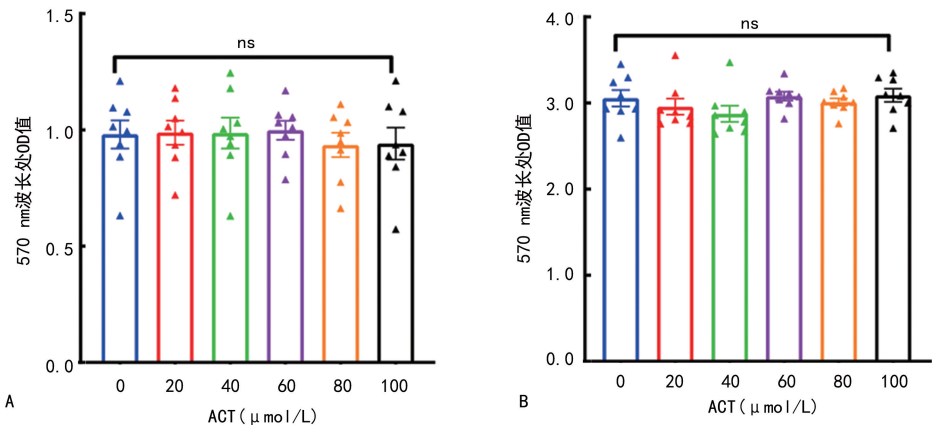


图 2 不同浓度 ACT 干预 HepG2 细胞 LC3-II 蛋白质表达水平比较

2.4 ACT 干预 NAFLD 体外细胞模型 TG 水平、油红 O 染色情况比较 模型组 HepG2 细胞 TG 水平 [$(34.15 \pm 1.90) \mu\text{g/mg}$]均明显高于空白对照组 [$(14.17 \pm 2.74) \mu\text{g/mg}$]、ACT 干预组 [$(19.11 \pm 1.68) \mu\text{g/mg}$],差异均有统计学意义($P < 0.05$)。ACT 干预组 HepG2 细胞被染色的脂滴颗粒明显减

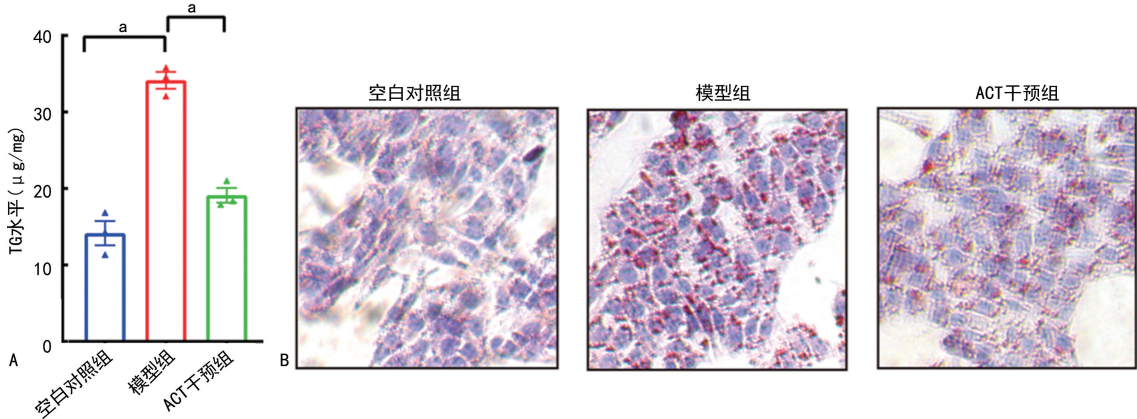
少。见图 4。

2.5 ACT 处理后自噬体和脂滴情况比较 与空白对照组比较,雷帕霉素处理组、ACT 干预组 HepG2 细胞脂滴均明显增多,ACT 干预组 HepG2 细胞 LC3 自噬小体明显增多,且从空间上与脂滴出现共定位。见图 5。



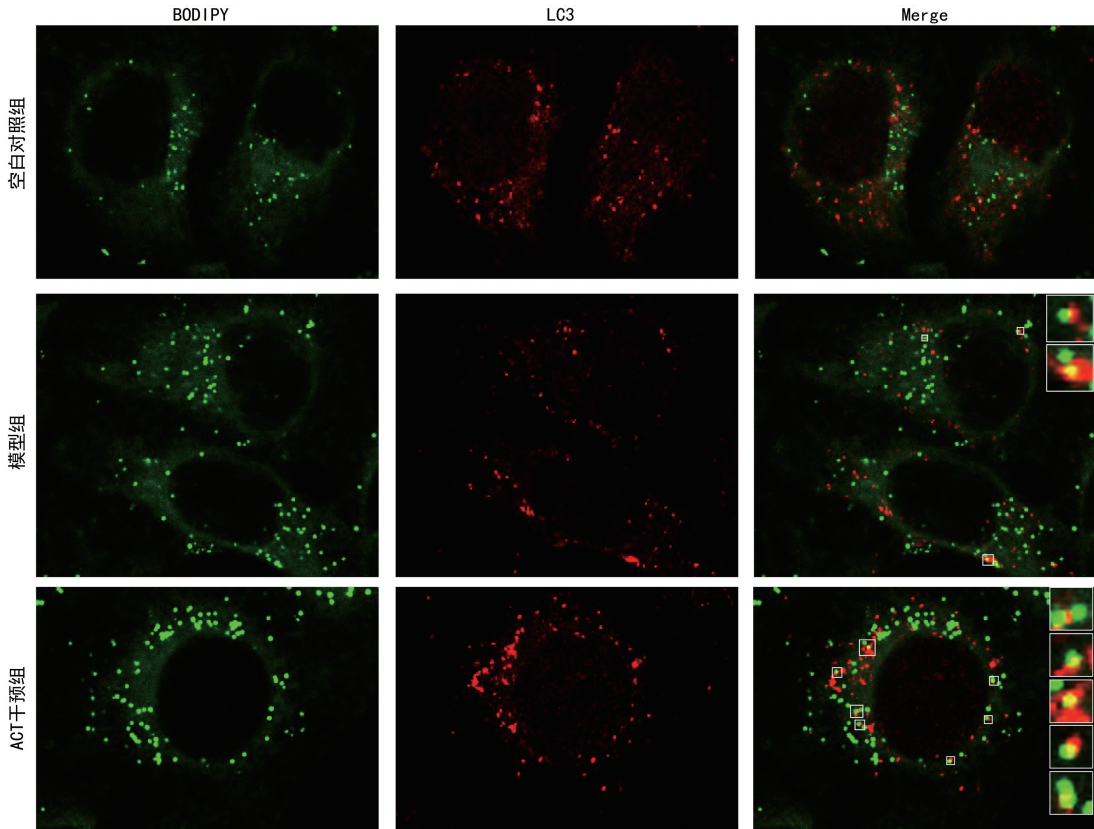
注：A. 不同浓度 ACT 处理 HepG2 细胞 24 h；B. 不同浓度 ACT 处理 HepG2 细胞 48 h；ns 表示 $P>0.05$ 。

图 3 不同浓度 ACT 干预 HepG2 细胞 24、48 h 后 570 nm 波长处 OD 值



注：A. TG 水平；B. 油红 O 染色 (20 $\times$)；与模型组比较，^a $P<0.05$ 。

图 4 ACT 干预 NAFLD 体外细胞模型 TG 水平、油红 O 染色情况比较



注：绿色小点为脂滴；红色小点为 LC3 自噬小体；白色小框为二者共定位。

图 5 ACT 处理后自噬体和脂滴情况比较 (60 $\times$)

3 讨 论

近年来,有研究表明,自噬在预防人类 NAFLD 的发展中发挥了重要作用^[10]。对 NAFLD 患者肝脏及肥胖、高脂饮食小鼠肝脏的自噬相关指标检测结果显示,肝细胞中自噬过程被阻断,进而导致细胞内 TG 等脂滴的大量聚集^[14]。另有研究表明,高脂饮食小鼠特异性敲除肝细胞自噬关键基因 7 后其肝细胞内 TG 水平具有明显增加的现象^[15]。然而,在过表达 ATG7 基因或用雷帕霉素、卡马西平等自噬诱导剂干预后,明显减轻了小鼠肝脏中的脂肪变性^[16-18]。提示通过改善肝脏自噬活性可明显减轻肝脏脂肪变性,为治疗 NAFLD 提供了行之有效的策略。

肉苁蓉作为中药中常用的一种优良产品,其神经保护作用、免疫调节作用、抗氧化作用、抗癌作用、肝保护作用等药理作用被广泛关注。目前为止,从肉苁蓉中已分离出 120 多种化合物,包括苯乙醇苷、环烯醚萜及其糖苷、木脂素及其糖苷、低聚糖酯、多元醇和多糖^[19]。其中苯乙醇苷是肉苁蓉活性成分中研究最多的一类化合物。ECH、ACT 作为肉苁蓉苯乙醇苷的代表性化合物,在抗氧化剂及保护肝脏、心肌、神经细胞和增强记忆方面具有积极作用^[20-21]。然而,肉苁蓉苯乙醇苷在保护肝脏方面是否有自噬过程的参与尚鲜见相关文献报道。

自噬是普遍存在于体内的自我降解过程,自噬体是细胞自噬的标志物,在自噬体形成过程中,包括 ATG5~12、LC3 在内的一系列自噬相关蛋白发挥着重要作用。因此,本研究通过构建自噬评价系统,从分子水平检测了自噬标志性蛋白质 LC3 表达水平,结果显示,HepG2 细胞在自噬诱导剂雷帕霉素干预的基础上加入 BafA1 处理后,细胞内 LC3-II 蛋白质表达水平明显增加,表明自噬评价系统可精确评估药物的自噬诱导活性;ECH、ACT 联合运用 BafA1 处理后,ECH + BafA1 组、ACT + BafA1 组 HepG2 细胞 LC3-II 蛋白质表达量明显高于 ECH 组、ACT 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。然而,由于自噬过程非常复杂,很容易受外界环境刺激而发生变化。因此,本研究利用 BafA1 阻断自噬流,从而更加精确地评价了 ECH、ACT 的自噬诱导能力,结果显示,在利用 BafA1 阻断自噬流后细胞内自噬体无法在自噬溶酶体降解,导致细胞整体自噬水平明显增加,雷帕霉素、ECH、ACT 干预 HepG2 细胞在联合运用 BafA1 处理后,雷帕霉素 + BafA1 组、ACT + BafA1 组 HepG2 细胞 LC3-II 蛋白质表达水平均较单独使用 BafA1 组升高,ECH + BafA1 组 HepG2 细胞较单独使用 ECH 组明显升高,差异均有统计学意义($P <$

0.05),但与单独使用 BafA1 组比较,HepG2 细胞 LC3-II 蛋白质表达水平降低,表明在 HepG2 细胞中 ACT 具有明显的自噬诱导能力。因此,本研究将 ACT 作为研究对象,进一步研究了其在诱导自噬及发挥肝脏保护等生物学功能方面的药理学活性。在药物研发中安全性是一个首选考虑因素。为评价 ACT 的安全性,本研究进一步检测了 ACT 对 HepG2 细胞存活力的影响,结果显示,不同浓度 ACT 干预时,HepG2 细胞存活力几乎未受到影响,表明 ACT 可作为候选药物进一步研究其药理作用及分子机制。

为进一步确定 ACT 诱导 HepG2 细胞形成自噬体的最佳浓度,本研究利用不同浓度 ACT 联合 BafA1 干预 HepG2 细胞,检测了细胞 LC3-II 蛋白质表达水平,结果显示,50 $\mu\text{mol/L}$ ACT 在 HepG2 细胞内能明显增加自噬体水平。因此,本研究利用 50 $\mu\text{mol/L}$ ACT 干预体外构建的 NAFLD 细胞模型,初步探讨了其肝保护功能与自噬的联系。本研究利用 100 $\mu\text{mol/L}$ PA 体外干预 HepG2 细胞 24 h 后,模型组 HepG2 细胞 TG 水平较空白对照组明显升高,同时,细胞内可明显观察到脂滴的聚集,提示成功构建了 NAFLD 体外细胞模型。本研究为进一步观察 ACT 对 NAFLD 细胞模型的作用,利用 50 $\mu\text{mol/L}$ ACT 干预 NAFLD 体外细胞模型,并通过 TG 水平检测及油红 O 染色方法评价了 ACT 对 NAFLD 的干预效果,结果显示,ACT 干预后 HepG2 细胞 TG 水平、油性脂滴数量均较模型组明显降低,表明 ACT 在 PA 诱导的 NAFLD 细胞模型中能够降低 TG 的活性。本研究为进一步研究 ACT 的降脂活性与细胞自噬的关系,利用 LC3-II 特异性蛋白抗体和 BODIPY 荧光灯探针自噬体和脂滴进行共染,观察到 ACT 干预后 HepG2 细胞内自噬体数量较对照组明显增多,与本研究蛋白质免疫印迹结果一致,进一步证实 ACT 在 HepG2 细胞内具有自噬诱导活性。另外,药物干预后细胞内自噬体与脂滴出现共定位现象,表明 ACT 改善 PA 诱导的 NAFLD 脂肪变性作用可能有细胞自噬过程的参与。然而,在 NAFLD 细胞模型中,ACT 是否通过噬脂途径发挥降低细胞内 TG 水平的药理学活性,尚需进一步通过阻断细胞内自噬过程来阐释相关作用机制。

综上所述,在肉苁蓉 2 种苯乙醇苷类化合物中,ACT 在 HepG2 细胞内具有明显的自噬诱导能力,同时,在 PA 诱导的肝脂肪变性细胞模型中,ACT 明显降低了 HepG2 细胞内 TG 水平,ACT 干预后 HepG2 细胞内自噬体与脂滴具有一定的共定位关系,表明 ACT 在肝脏保护功能作用方面自噬可能作为一种新

的途径参与了其药理过程。在后续的研究中将利用自噬阻断剂对 ACT 降脂的作用机制进行深入研究,为将来的新药研发奠定基础。

参考文献

- [1] YOUNOSSI Z M, KOENIG A B, ABDELATIF D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes[J]. *Hepatology*, 2016, 64(1): 73-84.
- [2] HUANG D Q, EL-SERAG H B, LOOMBA R. Global epidemiology of NAFLD-related HCC: trends, predictions, risk factors and prevention[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(4): 223-238.
- [3] PAIK J M, GOLABI P, YOUNOSSI Y, et al. Changes in the global burden of chronic liver diseases from 2012 to 2017: the growing impact of NAFLD[J]. *Hepatology*, 2020, 72(5): 1605-1616.
- [4] ESTES C, RAZAVI H, LOOMBA R, et al. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease[J]. *Hepatology*, 2018, 67(1): 123-133.
- [5] AHMED E A, EL-DERANY M O, ANWAR A M, et al. Metabolomics and lipidomics screening reveal reprogrammed signaling pathways toward cancer development in non-alcoholic steatohepatitis[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 24(1): 210.
- [6] ALEXANDER M, LOOMIS A K, FAIRBURN-BEECH J, et al. Real-world data reveal a diagnostic gap in non-alcoholic fatty liver disease[J]. *BMC Med*, 2018, 16(1): 130.
- [7] LAZARUS J V, EKSTEDT M, MARCHESINI G, et al. A cross-sectional study of the public health response to non-alcoholic fatty liver disease in Europe[J]. *J Hepatol*, 2020, 72(1): 14-24.
- [8] ZHANG Q Q, GUO J, SHI C X, et al. The SIRT2-AMPK axis regulates autophagy induced by acute liver failure[J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 16278.
- [9] KIM H G, HUANG M H, XIN Y, et al. The epigenetic regulator SIRT6 protects the liver from alcohol-induced tissue injury by reducing oxidative stress in mice[J]. *J Hepatol*, 2019, 71(5): 960-969.
- [10] WU X Q, POULSEN K L, SANZ-GARCIA C, et al. MLKL-dependent signaling regulates autophagic flux in a murine model of non-alcohol-associated fatty liver and steatohepatitis[J]. *J Hepatol*, 2020, 73(3): 616-627.
- [11] FU J, DENG W, GE J, et al. Sirtuin 1 alleviates alcoholic liver disease by inhibiting HMGB1 acetylation and translocation[J]. *Peer J*, 2023, 11: e16480.
- [12] ZHAO D, DU L L. Epr1, a UPR-upregulated soluble autophagy receptor for reticulophagy[J]. *Autophagy*, 2020, 16(11): 2112-2113.
- [13] TUREYEN A, DEMIREL H H, DEMIRKAPI E N, et al. Tubuloside a, a phenylethanoid glycoside, alleviates diclofenac induced hepato-nephro oxidative injury via Nrf2/HO-1[J]. *J Cell Mol Med*, 2023, 27(21): 3404-3413.
- [14] VESGA-JIMÉNEZ D J, MARTIN C, BARRETO G E, et al. Fatty acids: an insight into the pathogenesis of neurodegenerative diseases and therapeutic potential[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(5): 2577.
- [15] WANG Y, GUO Y F, XU Y Y, et al. HIIT ameliorates inflammation and lipid metabolism by regulating macrophage polarization and mitochondrial dynamics in the liver of type 2 diabetes mellitus mice[J]. *Metabolites*, 2022, 13(1): 14.
- [16] SCRIMIERY R, LOCATELLI L, CAZZANIGA A, et al. Ultrastructural features mirror metabolic derangement in human endothelial cells exposed to high glucose[J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 15133.
- [17] PAQUETTE M, YAN M, RAMÍREZ-REYES J M J, et al. Loss of hepatic flcn protects against fibrosis and inflammation by activating autophagy pathways[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 21268.
- [18] LAI J L, LIAN Y E, WU J Y, et al. Verapamil induces autophagy to improve liver regeneration in non-alcoholic fatty liver mice[J]. *Adipocyte*, 2021, 10(1): 532-545.
- [19] FU Z F, FAN X, WANG X Y, et al. Cistanches herba: an overview of its chemistry, pharmacology, and pharmacokinetics property[J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 219: 233-247.
- [20] ZHOU X L, XU M B, JIN T Y, et al. Preclinical evidence and possible mechanisms of extracts or compounds from cistanches for Alzheimer's disease[J]. *Aging Dis*, 2019, 10(5): 1075-1093.
- [21] WANG H, LI Y, BIAN Y, et al. Potential hepatoprotective effects of cistanche deserticola Y. C. Ma: integrated phytochemical analysis using UPLC-Q-TOF-MS/MS, target network analysis, and experimental assessment[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1017572.

(收稿日期: 2024-07-10 修回日期: 2024-11-24)