

• XXXX •

## 绞股蓝皂苷调节 SIRT6/CREB/Nur77 信号通路介导细胞凋亡对代谢相关脂肪性肝病小鼠的影响及机制

孙小扉, 宋因, 曹媛, 刘玉, 张美菱, 朱敬轩, 王嘉鑫, 董元广, 贾连群\*  
(辽宁中医药大学, 沈阳 110847)

**【摘要】** 目的:探究绞股蓝皂苷(GPs)改善代谢相关脂肪性肝病(MAFLD)小鼠肝脏脂质沉积的情况及潜在分子机制。方法:使用比较毒理基因组学数据库(CTD)、瑞士靶点预测数据库(STP)、分子结合数据库(BindingDB)及靶点网络数据库(TargetNet)筛选 GPs 的主要活性成分及作用靶点;通过人类基因卡片数据库(GeneCards)数据库获取疾病相关靶点,并取交集靶点后,使用 Cytoscape 3.9.0 软件构建药物-靶点-疾病网络筛选核心靶点;将 38 只载脂蛋白 E 基因敲除(ApoE<sup>-/-</sup>)小鼠高脂饲料建立 MAFLD 小鼠肝脏脂质沉积模型,造模成功后随机分为模型组、绞股蓝皂苷低剂量组(GPs-L)、绞股蓝皂苷高剂量组(GPs-H)、辛伐他汀组,8 只 C57BL/6J 小鼠作为空白组,空白组给予正常饲料,其余各组高脂饲料喂饲 12 周。第 9 周开始, GPs-L 组、GPs-H 组分别按 1.49、2.97 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>灌胃,辛伐他汀组按 2.275 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,空白组和模型组等体积生理盐水灌胃,共 4 周。全自动生化分析仪检测小鼠血清甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平;苏木素-伊红(HE)染色观察小鼠肝脏病理形态学变化,油红 O 染色观察小鼠肝脏脂质沉积情况;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测各组小鼠肝脏 TG、游离脂肪酸(NEFA)含量;免疫组化检测沉默调节蛋白 6(SIRT6)蛋白表达水平;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)与 Wes 全自动蛋白表达分析系统分析 SIRT6/环磷酸腺苷反应成分结合蛋白(CREB)/孤儿核受体蛋白 77(Nur77)信号通路相关基因与蛋白水平;原位末端转移酶标记法(TUNEL)染色检测细胞凋亡情况。**结果:**共筛选出 GPs 主要活性成分人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、人参皂苷 Rb<sub>3</sub>、人参皂苷 Rd、人参皂苷 Rg<sub>3</sub>、人参皂苷 C-K、绞股蓝皂苷 XLIX 的潜在靶向基因 138 个,MAFLD 疾病相关靶点 11 134 个,共同靶点 120 个,SIRT6 为核心靶点;分子对接结果显示,上述活性成分与 SIRT6 具有强烈的结合能力;与空白组比较,模型组 TC、TG、LDL-C 水平显著升高,HDL-C 水平显著降低(P<0.01);肝脏天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)含量显著升高(P<0.01);肝细胞存在大量脂肪空泡,橘红色脂滴弥散性分布,肝脏脂质沉积明显;TG、NEFA 含量显著上升(P<0.01);SIRT6、CREB、磷酸化(p)-CREB、Nur77、B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)蛋白与 mRNA 表达降低,Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、胱天蛋白酶-9(Caspase-9)、胱天蛋白酶-3(Caspase-3)蛋白与 mRNA 表达明显升高(P<0.05, P<0.01),肝细胞大量凋亡。与模型组比较,经不同剂量 Gps 与辛伐他汀给药干预后,小鼠 TC、TG、LDL-C 水平显著降低,HDL-C 水平显著升高(P<0.01);肝脏 AST、ALT 含量显著降低(P<0.01);肝细胞形态趋于正常且空泡与脂滴减少,肝脏脂质沉积减轻;TG、NEFA 含量显著下降(P<0.01);SIRT6、CREB、p-CREB、Nur77、Bcl-2 蛋白与 mRNA 表达明显升高,Bax、Caspase-9、Caspase-3 蛋白与 mRNA 表达明显降低(P<0.05, P<0.01),肝细胞凋亡情况明显改善,且高剂量给药干预效果尤为显著。**结论:**绞股蓝皂苷能改善 MAFLD 小鼠肝脏脂质沉积情况,与调控 SIRT6/CREB/Nur77 信号通路影响细胞凋亡有关。

**【关键词】** 绞股蓝皂苷; 代谢相关脂肪性肝病; 沉默调节蛋白 6(SIRT6)/环磷酸腺苷反应成分结合蛋白(CREB)/孤儿核受体蛋白 77(Nur77)信号通路; 细胞凋亡

[中图分类号] R575.5;R285;R289 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(XXXX)XX-0001-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20251613

[网络出版地址]

[网络出版日期] XXXX-XX-XX



### Impact and Mechanism of Gypenosides on MAFLD Mice via Regulating SIRT6/CREB/Nur77 Signaling Pathway and Mediating Apoptosis

[收稿日期] 2025-08-21

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82374423, 82074145)

[第一作者] 孙小扉,在读博士,从事中西医结合基础研究,E-mail:sxf199806@163.com

[通信作者] \* 贾连群,博士,教授,从事中西医结合防治心血管疾病研究,E-mail:jlq-8@163.com

SUN Xiaofei, SONG Nan, CAO Yuan, LIU Yu, ZHANG Meiling, ZHU Jingxuan, WANG Jiabin,  
DONG Yuanguang, JIA Lianqun\*

(*Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China*)

**[Abstract]** **Objective:** This paper aims to investigate the impact and underlying molecular mechanism of gypenosides (GPs) on improving lipid deposition in the liver of metabolic-associated fatty liver disease (MAFLD) mice. **Methods:** By using databases including the Comparative Toxicogenomics Database, SwissTargetPrediction, Binding Database Home, and TargetNet, the main active components of GPs and their action targets were screened. Disease-related targets were obtained from the GeneCards database. After obtaining the intersection targets, Cytoscape 3.9.0 software was used to construct a network of drug, target, and diseases to screen core targets. Thirty-eight ApoE<sup>-/-</sup> mice were fed a high-fat diet to establish liver lipid deposition models of MAFLD mice. After successful modeling, they were randomly divided into a model group, a low-dose GPs group (GPs-L), a high-dose GPs group (GPs-H), and a simvastatin group. Eight C57BL/6J mice were used as the blank control group, which was given normal feed. The mice in the remaining groups were fed with high-fat feed for 12 weeks. Starting from the ninth week, the mice in the GPs-L group and the GPs-H group were gavaged with GPs at 1.49 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> and 2.97 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, respectively. The mice in the simvastatin group were gavaged with simvastatin at 2.275 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, and those in the blank control group and the model group were gavaged with the same volume of normal saline for a total of four weeks. The fully automatic biochemical analyzer was used to detect triglycerides (TG), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) in the serum of mice. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological morphological changes of the liver in mice, and oil red O staining was used to observe the lipid deposition in the liver of mice. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the contents of TG and non-esterified fatty acid (NEFA) in the livers of mice in each group. The protein expression level of sirtuin (SIRT6) was detected by immunohistochemistry. The SIRT6/cAMP-response element binding protein (CREB)/orphan nuclear receptor 77 (Nur77) signaling pathway, apoptosis-related genes, and protein levels were analyzed by real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) and the Wes automated Western blot system. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) staining was employed to detect cell apoptosis. **Results:** A total of 138 potential target genes of the main active components of GPs, such as ginsenoside Rb<sub>1</sub>, ginsenoside Rb<sub>2</sub>, ginsenoside Rd, ginsenoside Rg<sub>3</sub>, ginsenoside compound K, and gypenoside XLIX, are screened. There are 11 134 MAFLD-related targets, with 120 common targets identified, among which SIRT6 is the core target. Molecular docking results show that the above active components have a strong binding affinity with SIRT6. Compared with those in the blank control group, the levels of TC, TG, and LDL-C in the model group are significantly increased, and the level of HDL-C is significantly decreased ( $P<0.01$ ). The contents of aspartate transferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) in the liver are increased ( $P<0.01$ ). There are a large number of fat vacuoles in hepatocytes, and orange-red lipid droplets are diffusely distributed, with obvious lipid deposition in the liver. The contents of TG and NEFA are increased ( $P<0.01$ ). The protein and mRNA expressions of SIRT6, CREB, p-CREB, Nur77, and B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) are decreased, while the protein and mRNA expressions of Bcl-2-associated X protein (Bax), cysteine-aspartic protease-9 (Caspase-9), and Caspase-3 are increased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Extensive hepatocyte apoptosis is observed. Compared with those in the model group, after intervention with different doses of GPs and simvastatin, the levels of TC, TG, and LDL-C of mice in the GPs group and simvastatin group are significantly decreased, and the level of HDL-C is significantly increased ( $P<0.01$ ). The contents of AST and ALT in the liver are decreased ( $P<0.01$ ). The morphology of hepatocytes tends to be normal, with a decrease in vacuoles and lipid droplets, and the lipid deposition in the liver is alleviated. The contents of TG and NEFA are decreased significantly ( $P<0.01$ ). The protein and mRNA expressions of SIRT6, CREB, p-CREB, Nur77, and Bcl-2 are increased, while the protein and mRNA expressions of Bax, Caspase-9, and Caspase-3 are decreased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). The condition of hepatocyte apoptosis shows significant improvement, and the intervention effect of high-dose administration is particularly significant. **Conclusion:** GPs can improve lipid deposition in the liver of MAFLD mice, which is associated with the regulation of the SIRT6/CREB/Nur77 signaling pathway and subsequent effects on cell apoptosis.

**[Keywords]** gypenoside; metabolic-associated fatty liver disease; sirtuin (SIRT6)/cAMP-response element binding protein (CREB)/orphan nuclear receptor 77 (Nur77) signaling pathway; apoptosis

作为代谢综合征在肝脏的表现,代谢相关脂肪性肝病(MAFLD)的患病率在世界范围内大幅增加,在全球范围内一般人群患病率约为25%<sup>[1-2]</sup>,涵盖从单纯性脂肪变性到非酒精性脂肪性肝炎的疾病谱,并可进展为肝硬化及肝细胞癌,可能进一步发展为肝硬化和肝癌<sup>[1]</sup>。研究证实该疾病与动脉粥

样硬化性心血管疾病(ASCVD)密切相关,且ASCVD心血管事件是该病患者主要死因<sup>[3]</sup>。而MAFLD具有高度复杂的病理生理学特征及多因素驱动的疾病进展机制,因此探究防治MAFLD的防治机制与策略至关重要,具有显著的医学价值与公共卫生意义。

中草药绞股蓝与人参、三七等高价值中药相比,具有成本低、供应丰富、环境适应性强等优点,绞股蓝皂苷(GPs)作为绞股蓝的主要活性成分,是一类具有重大开发价值的化合物,与传统的小分子化学药物的单一的作用靶点及不良作用相比,具有多靶点多途径的作用机制及不良反应较少的优势<sup>[4]</sup>。现代研究显示其具有调节脂代谢、抗肿瘤、抗炎及改善糖脂代谢紊乱等多种药理活性<sup>[5-8]</sup>。本课题组前期实验证实,GPs能显著降低高脂饮食诱导的载脂蛋白E基因敲除(ApoE<sup>-/-</sup>)小鼠的血清甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平,且无明显药物不良反应<sup>[9]</sup>。虽然GPs改善血脂水平与防治MAFLD的药效已被证实,但其机制仍需进一步探索。

沉默调节蛋白6(SIRT6)调控能量代谢、衰老、基因组稳定性、凋亡和自噬等重要生理过程,研究证实SIRT6在维持代谢稳态中发挥关键作用,其功能障碍可导致肝病、心血管疾病等多种疾病<sup>[10-11]</sup>。该蛋白可通过双重调控机制(抑制TG合成/促进脂肪酸氧化)来防止肝脏脂肪变性<sup>[12]</sup>。SIRT6可上调环磷酸腺苷反应成分结合蛋白(CREB)的表达,进一步上调下游分子孤儿核受体蛋白77(Nur77)的表达水平,进而通过Nur77调控细胞凋亡,影响疾病的发生发展<sup>[13-14]</sup>。细胞凋亡是有序的细胞自我消亡过程,可由DNA损伤、营养匮乏或氧化应激等细胞受损信号触发,进而激活相应的凋亡通路,NAFLD的发展与肝细胞释放的凋亡相关因子密切相关<sup>[15]</sup>。因此,基于以上背景,本研究旨在探讨GPs是否可以通过调节SIRT6/CREB/Nur77信号通路影响细胞凋亡,进而改善NAFLD小鼠肝脏脂质沉积情况。

## 1 材料

**1.1 动物** 实验选用38只ApoE<sup>-/-</sup>基因敲除小鼠和8只C57BL/6J野生型小鼠[雄性,SPF级,体质量(20±2)g],均由辽宁长生生物技术有限公司提供,合格证号SYXK(辽)2024-0006。实验动物饲养于辽宁中医药大学实验动物中心,环境条件控制为温度(22±1)℃、相对湿度50%±5%,自然光照周期,自由进食饮水。

**1.2 伦理** 本研究方案已获辽宁中医药大学实验动物伦理委员会批准(批准号21000042019090)。

**1.3 药物及试剂** GPs(西安天丰生物科技有限公司,批号NF-201910,提取来源为绞股蓝,纯度93%);辛伐他汀(浙江海正药业股份有限公司,批号H20010676,规格10 mg/片);Hi Fi-Script DNA

Removal cDNA Synthesis Kit、Ultra SYBR Mixture(康为世纪生物科技有限公司,批号分别为CW2582、CW2601);聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)蛋白浓度测定试剂盒(杭州弗德生物科技有限公司,批号20210425);TG、TC、LDL-C、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)检测试剂盒(上海透景诊断科技有限公司,批号分别为BH016Z、BH017Z、BH018Z、BH019Z);游离脂肪酸(NEFA)试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司,批号A042-2-1);苏木素-伊红(HE)染色、改良油红O染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为G1120、G1261);丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂盒(四川迈克生物科技股份有限公司,批号分别为0521037、0721023);小鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )试剂盒(上海源桔生物有限公司,批号YJ002095);SIRT6、CREB、磷酸化(p)-CREB、Nur77、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、胱天蛋白酶-9(Caspase-9)、胱天蛋白酶-3(Caspase-3)、切割型(cleaved)-Caspase-9抗体(上海艾比玛特医药科技有限公司,批号分别为TN25725、T55426、T55043、TB2249、T40056、T40051、T55782、T40044、TA5240); $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)、cleaved-Caspase-3(武汉三鹰生物技术有限公司,批号分别为66009-1-Ig、19677-1-AP);免疫组化试剂盒(北京百奥莱德科技有限公司,批号ZN2939-EGO);原位末端转移酶标记法(TUNEL)试剂盒(上海碧云天生物科技股份有限公司,批号C1098)。

**1.4 仪器** Thermo Scientific Multiskan FC型酶标仪(德国Thermo Scientific公司);7180型全自动生化分析仪(日本日立公司);NanoDrop2000型微量分光光度计(美国赛默飞世尔科技公司);QuantStudio3型PCR扩增仪(美国Applied Biosystems公司);Wes全自动蛋白表达分析系统(美国Protein Simple公司)。

## 2 方法

**2.1 Gps潜在活性成分靶向基因与MAFLD疾病靶点筛选** 筛选CPs中能较准确推测结构的化学成分,根据已有文献报道整理出Gps主要活性成分,整合运用比较毒理基因组学数据库(CTD)、瑞士靶点预测数据库(STP)、分子结合数据库(BindingDB)及靶点网络数据库(TargetNet)进行Gps主要活性成分潜在靶点预测。在人类基因卡片数据库(GeneCards)疾病基因数据库检索MAFLD疾病相

关靶点。通过相互作用基因/蛋白质检索工具数据库 (STRING) 和通用蛋白质资源库 (UniProt) 对上述基因信息标准化处理。

**2.2 构建药物-靶点-疾病网络图** 将 MAFLD 疾病相关靶点与 Gps 主要活性成分潜在靶点取交集, 获得以 Gps 潜在干预 MAFLD 的靶点。将药物-疾病交集靶点导入 Cytoscape 3.9.0 软件, 构建 Gps 活性成分干预 MAFLD 的“药物-成分-靶点”网络, 并将其可视化。

**2.3 “活性成分-靶点”分子对接** 将靶蛋白导入 PyMOL 软件, 剔除靶点蛋白中的配体和非蛋白分子。利用 AutoDockTools-1.5.6 软件, 定义好配体与受体, 将配体调整到盒子中心后, 用 Vina 软件运行计算。最后通过 Discovery Studio 3.5 软件, 显示对接后药物成分与受体间作用力。

**2.4 动物分组及给药** 空白组由 8 只 C57BL/6J 小鼠组成, 采用常规饲料喂养。小鼠适应性喂养 1 周后, 高脂喂饲 (高脂饲料含 78.85% 基础饲料、0.15% 胆固醇、21% 脂肪) 38 只 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠 8 周。随机选取 6 只 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠进行病理学评估, HE 染色显示肝小叶结构紊乱伴微泡/大泡型脂肪变性, 油红 O 染色显示肝组织内可见大量橘红色脂滴沉积, 表明 MAFLD 模型构建成功。模型建立成功后将 32 只 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠随机分为模型组、绞股蓝皂苷低剂量组 (GPs-L)、绞股蓝皂苷高剂量组 (GPs-H)、辛伐他汀组, 每组各 8 只。根据课题组前期给药方法<sup>[16]</sup>, 并查阅现有文献中绞股蓝中 GPs 的比例, 以临床成人每日绞股蓝最高用量 30 g、GPs 纯度 93% 为依据, 通过《人与动物间体表面积折算的等效剂量比值表》折算<sup>[17]</sup>, 设置 GPs-L 与 GPs-H 组分别给予 GPs 1.49、2.97 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 进行灌胃给药, 辛伐他汀组 2.275 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 灌胃给药辛伐他汀, 等体积生理盐水灌胃空白组与模型组, 连续 4 周。末次给药后禁食 12 h 称质量, 采集血样经 4 °C、3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min (离心半径 10 cm) 制备血清, -80 °C 保存, 采用颈椎脱位法处死动物后, 迅速摘取肝脏组织, 部分用 4% 多聚甲醛固定, 其余组织分装后液氮速冻, 转移至 -80 °C 超低温冰箱保存备用。

**2.5 各组小鼠血清血脂水平测定** 全自动生化分析仪检测小鼠血清中 TC、TG、LDL-C、HDL-C 和肝功能 AST、ALT 含量。

**2.6 各组小鼠肝脏形态学检测** HE 染色: 取固定后的肝组织经标准脱水、透明及石蜡包埋程序处理, 制备 5 μm 切片行 HE 染色, 镜下观察组织学特

征。油红 O 染色: 肝组织冰冻切片经 70% 乙醇处理, 油红 O 染色后漂洗, 苏木素复染并分化返蓝, 甘油封片后观察肝脏组织情况。

**2.7 各组小鼠肝脏 TG、NEFA 及炎症因子 TNF-α 水平测定** 根据试剂盒说明书, 酶标仪测定。

**2.8 实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 检测 SIRT6/CREB/Nur77 信号通路及凋亡相关基因 mRNA 表达** 肝脏组织剪碎, 肝组织总 RNA 经 TRIzol 试剂提取并定量后按逆转录试剂盒说明书的操作流程合成 cDNA。采用 SYBR Green 法进行扩增, 反应程序 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 15 s 退火 60 °C, 1 min, 40 个循环。计算基因相对表达量, 结果定量分析选取 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 法。实验所需引物由北京博迈德基因技术有限公司完成合成, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列 (5'-3')	长度/bp
SIRT6	上游 CCCACAAAACATGACCGCC	126
	下游 TTTGTCTAGCACGCAGGGTC	
Nur77	上游 CGGCCATTAGATGAGACCC	153
	下游 TCATAAGTCTGGCTCGGGGA	
Bcl-2	上游 GAACTGGGGGAGGATTGTG	194
	下游 GCATGCTGGGGCCATATAGT	
Bax	上游 GAACCATCATGGGCTGGACA	145
	下游 GTGAGGACTCCAGCCACAAA	
Caspase-9	上游 GTGTTCCAGGAAGATCAGGG	106
	下游 GAGGAAGGGCAGAAGTTCACAT	
Caspase-3	上游 TCTGACTGGAAAGCCGAACTCT	209
	下游 AAAGGGACTGGATGAACCACGAC	
β-actin	上游 GGTCTGTCGACAACGGCTC	117
	下游 ATCCACCACATCACACCCTGG	

**2.9 免疫组化检测 SIRT6 蛋白表达** 石蜡切片经二甲苯脱蜡后, 梯度乙醇水合; 采用 0.3% 甲醇过氧化氢溶液封闭内源性过氧化物酶活性 30 min。热诱导抗原回收, 121 °C, 10 min, 使用柠檬酸盐为基础的缓冲溶液, 其中含有 10 mmol·L<sup>-1</sup> 柠檬酸钠, 调节 pH 为 6.0。非特异性位点经山羊血清封闭后, 依次进行一抗 (1:100) 和二抗 (1:1 000) 孵育。采用链霉亲和素-生物素复合物法 (SABC) 法, 3, 3'-二氨基联苯胺 (DAB) 显色后苏木素对比染色, 光镜观察 SIRT6 蛋白表达定位, 并用 ImageJ 进行分析。

**2.10 Wes 全自动蛋白表达分析系统检测 SIRT6/CREB/Nur77 信号通路及凋亡相关蛋白表达** 取冻存肝组织于放射免疫沉淀法 (RIPA) 裂解液中破碎,

BCA法测定蛋白浓度。采用Wes全自动蛋白表达分析系统进行蛋白检测:上样,一抗工作液采用Antibody Diluent II稀释液按说明书推荐比例配制SIRT6、p-CREB、CREB、Nur771、Bcl-2、Bax、Caspase-9、Caspase-3、 $\beta$ -actin(1:100)。样品在 $2\ 500\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min(离心半径18 cm),后上机检测,所有条带均通过Compass for SW软件进行成像与采集Compass for SW软件对结果进行成像。采用 $\beta$ -actin作为内参蛋白,以空白组为对照进行标准化。使用ImageJ软件对目标蛋白及内参蛋白条带进行灰度值分析,目标蛋白相对表达量=目标蛋白峰面积/内参蛋白峰面积。

**2.11 TUNEL染色检测细胞凋亡情况** 脱蜡水化后的组织切片经蛋白酶K消化后,按试剂盒说明书进行反应,DAB显色,阳性细胞呈现棕黄色染色。

**2.12 统计分析** 应用SPSS 23.0软件进行数据分析,实验结果数据以 $\bar{x}\pm s$ 表述,其均为至少3个独立实验。符合正态分布的数据采用单因素方差分析,若数据不满足正态分布及方差齐性,则采用非参数检验:两组间差异比较用Mann-Whitney U检验,多组间差异比较用Kruskal-Wallis H检验, $P<0.05$ 则认为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 GPs潜在活性成分靶向基因与MAFLD疾病靶点筛选** 通过CTD、STP、BindingDB及TargetNet 4个数据库筛选出GPs主要活性成分人参皂苷Rb<sub>1</sub>、人参皂苷Rb<sub>3</sub>、人参皂苷Rd、人参皂苷Rg<sub>3</sub>、人参皂苷化合物K、绞股蓝皂苷XLIX的潜在靶向基因

138个;从GeneCards疾病基因数据库检索得到MAFLD疾病相关靶点11 134个。

**3.2 GPs活性成分干预MAFLD的靶点筛选** 将GPs活性成分作用靶点与MAFLD相关靶点导入Venny平台取得交集靶点,得到交集基因120个,占总基因数的1.1%,为GPs活性成分干预MAFLD的潜在作用靶点,见增强出版附加材料。

**3.3 药物-靶点-疾病网络** GPs活性成分干预MAFLD的潜在作用靶点共120个,构建网络图,表明GPs可能通过多成分、多靶点、多通路延缓MAFLD的疾病进程,其中SIRT6较其他蛋白连接到化合物更多,是作用突出的核心靶点,可能是发挥主要作用的影响因素之一。基于拓扑分析和MAFLD相关文献,本课题组聚焦于SIRT6作为最有可能的核心靶点进行后续验证,见增强出版附加材料。

**3.4 分子对接** 将GPs主要活性成分分别与核心靶点SIRT6进行分子对接,结果显示,各活性成分与蛋白对接的结合自由能均 $<-6\ \text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ( $1\ \text{cal}\approx 4.186\ \text{J}$ ),表明各活性成分与各蛋白均有较高的亲和力,其中与SIRT6亲和力最高的是人参皂苷Rb<sub>3</sub>,见增强出版附加材料。

**3.5 GPs对MAFLD模型小鼠血清血脂水平变化的影响** 与空白组比较,模型组TC、TG、LDL-C水平显著升高,HDL-C水平显著降低( $P<0.01$ );给予GPs干预后,与模型组比较,GPs-L、GPs-H、辛伐他汀组TC、TG、LDL-C水平显著降低,HDL-C水平显著升高( $P<0.01$ )。见表2。

表2 GPs对MAFLD模型小鼠血清血脂水平的影响( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	TG	TC	LDL-C	HDL-C
空白组		1.43 $\pm$ 0.17	3.30 $\pm$ 0.27	0.65 $\pm$ 0.07	2.76 $\pm$ 0.11
模型组		5.26 $\pm$ 0.65 <sup>2)</sup>	18.50 $\pm$ 0.81 <sup>2)</sup>	3.24 $\pm$ 0.31 <sup>2)</sup>	0.57 $\pm$ 0.07 <sup>2)</sup>
GPs-L组	1 490	3.75 $\pm$ 0.43 <sup>4)</sup>	15.24 $\pm$ 0.73 <sup>4)</sup>	2.47 $\pm$ 0.18 <sup>4)</sup>	0.72 $\pm$ 0.05 <sup>4)</sup>
GPs-H组	2 970	2.84 $\pm$ 0.25 <sup>4)</sup>	12.38 $\pm$ 1.03 <sup>4)</sup>	1.34 $\pm$ 0.17 <sup>4)</sup>	0.91 $\pm$ 0.10 <sup>4)</sup>
辛伐他汀组	2.275	2.24 $\pm$ 0.22 <sup>4)</sup>	9.47 $\pm$ 0.71 <sup>4)</sup>	1.05 $\pm$ 0.13 <sup>4)</sup>	0.92 $\pm$ 0.08 <sup>4)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ ,<sup>4)</sup> $P<0.01$ (表3-表8同)

**3.6 GPs对MAFLD模型小鼠AST、ALT水平的影响** 与空白组比较,模型组AST、ALT含量显著上升( $P<0.01$ );给予GPs干预后,与模型组比较,GPs-L、GPs-H、辛伐他汀组AST、ALT含量显著下降( $P<0.01$ )。见表3。

**3.7 GPs对MAFLD模型小鼠肝脏脂质沉积情况**

的影响 HE染色结果显示,空白组排列整齐,核居中央,可见肝小叶结构完整;模型组肝细胞肿胀,排列紊乱,胞质内呈现大量泡沫状脂滴蓄积;给药干预后,GPs-L、GPs-H、辛伐他汀组肝细胞形态明显改善,排列有序,脂肪空泡明显减少,其改善情况呈剂量依赖性,见图1。油红O染色结果显

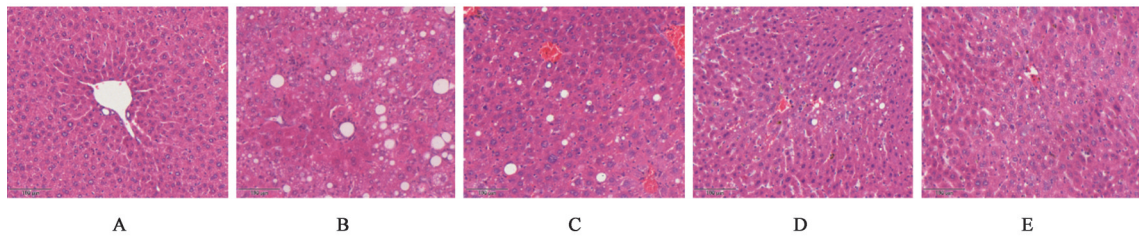
表3 GPs对MAFLD模型小鼠AST、ALT水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 3 Influence of GPs on levels of AST and ALT in MAFLD model mice ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	AST	ALT
空白组		82.25±3.14	49.71±2.04
模型组		117.08±2.51 <sup>2)</sup>	76.28±2.12 <sup>2)</sup>
GPs-L组	1 490	105.49±3.04 <sup>4)</sup>	70.85±1.88 <sup>4)</sup>
GPs-H组	2 970	96.88±2.59 <sup>4)</sup>	61.95±2.00 <sup>4)</sup>
辛伐他汀组	2.275	93.94±1.83 <sup>4)</sup>	61.37±2.42 <sup>4)</sup>

示,空白组肝细胞未见沉积脂质;模型组肝脏弥散分布大量橘红色脂滴,形成明显空泡样变;给药干预后,GPs-L、GPs-H、辛伐他汀组小鼠肝脏橘红色脂滴明显减少,改善情况呈剂量依赖性。见图2。

**3.8 GPs对MAFLD模型小鼠肝脏TG、NEFA水平变化的影响** 与空白组比较,模型组TG、NEFA含量显著上升( $P<0.01$ );给予GPs干预后,与模型组比较,GPs-L、GPs-H、辛伐他汀组TG、NEFA含量显著下降( $P<0.01$ )。见表4。



注:A.空白组;B.模型组;C.GPs-L组;D.GPs-H组;E.辛伐他汀组(图2-图5同)

图1 GPs对MAFLD模型小鼠肝脏组织形态学变化的影响(油红O,×400)

Fig. 1 Influence of GPs on morphological changes of liver tissue in MAFLD model mice (oil red O, ×400)

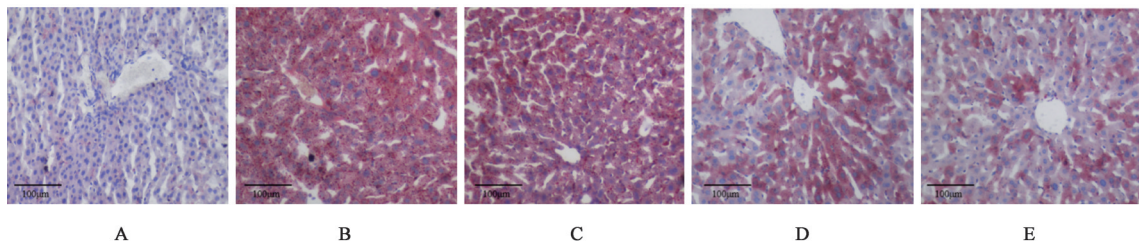


图2 GPs对MAFLD模型小鼠肝脏组织脂质沉积情况的影响(HE,×400)

Fig. 2 Effect of GPs on lipid deposition in liver tissue of MAFLD model mice (HE, ×400)

表4 GPs对MAFLD模型小鼠肝脏TG、NEFA水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 4 Influence of GPs on levels of liver TG and NEFA in MAFLD model mice ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	TG/mmol·L <sup>-1</sup>	NEFA/mmol·g <sup>-1</sup>	TNF-α/ng·L <sup>-1</sup>
空白组		0.59±0.07	0.170±0.006	485.72±18.13
模型组		1.68±0.11 <sup>2)</sup>	0.599±0.020 <sup>2)</sup>	566.50±19.60 <sup>2)</sup>
GPs-L组	1 490	1.32±0.06 <sup>4)</sup>	0.500±0.019 <sup>4)</sup>	521.34±13.53 <sup>4)</sup>
GPs-H组	2 970	1.12±0.08 <sup>4)</sup>	0.400±0.020 <sup>4)</sup>	498.05±19.62 <sup>4)</sup>
辛伐他汀组	2.275	0.94±0.08 <sup>4)</sup>	0.381±0.200 <sup>4)</sup>	485.96±14.51 <sup>4)</sup>

**3.9 GPs对MAFLD模型小鼠肝脏TNF-α水平变化的影响** 与空白组比较,模型组炎症因子TNF-α含量显著上升( $P<0.01$ );给予GPs干预后,与模型组比较,GPs-L、GPs-H、辛伐他汀组TNF-α含量显著下降( $P<0.01$ )。见表4。

**3.10 GPs对MAFLD模型小鼠肝脏SIRT6/CREB/Nur77信号通路及凋亡相关基因mRNA表达的影响** 与空白组比较,模型组SIRT6、Nur77、Bcl-2 mRNA表达显著降低( $P<0.01$ ),Bax、Caspase-9、Caspase-3 mRNA表达显著升高( $P<0.01$ );与模型组

比较,GPs-L组Bcl-2 mRNA表达明显升高( $P<0.05$ ),SIRT6、Nur77虽无显著差异但呈上升趋势,Bax、Caspase-9 mRNA表达明显降低( $P<0.05$ ),Caspase-3虽无显著差异但呈下降趋势;与模型组比较,GPs-H、辛伐他汀组SIRT6、Nur77、Bcl-2 mRNA表达明显升高( $P<0.05, P<0.01$ ),Bax、Caspase-9、Caspase-3 mRNA表达显著降低( $P<0.01$ ),高剂量组干预效果较显著。见表5。

**3.11 GPs对MAFLD模型小鼠肝脏SIRT6蛋白表达的影响** 与空白组比较,模型组SIRT6蛋白表达

表5 GPs对MAFLD模型小鼠肝脏SIRT6/CREB/Nur77信号通路及凋亡相关基因mRNA表达水平的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 5 Effect of GPs on mRNA expression levels of SIRT6/CREB/Nur77 signaling pathway and apoptosis-related genes in liver of MAFLD model mice ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	SIRT6	Nur77	Bcl-2	Bax	Caspase-9	Caspase-3
空白组		1.00±0.05	1.00±0.09	1.01±0.18	1.03±0.28	1.06±0.46	1.00±0.10
模型组		0.23±0.12 <sup>2)</sup>	0.14±0.05 <sup>2)</sup>	0.24±0.12 <sup>2)</sup>	4.78±0.13 <sup>2)</sup>	4.72±1.46 <sup>2)</sup>	3.76±0.73 <sup>2)</sup>
GPs-L组	1 490	0.29±0.06	0.19±0.03	0.70±0.07 <sup>3)</sup>	3.95±0.21 <sup>3)</sup>	1.97±0.41 <sup>3)</sup>	2.87±0.30
GPs-H组	2 970	0.49±0.02 <sup>3)</sup>	0.77±0.13 <sup>4)</sup>	0.72±0.06 <sup>4)</sup>	1.73±0.26 <sup>4)</sup>	1.48±0.31 <sup>4)</sup>	1.39±0.15 <sup>4)</sup>
辛伐他汀组	2.275	0.93±0.11 <sup>4)</sup>	1.14±0.14 <sup>4)</sup>	0.60±0.08 <sup>4)</sup>	1.18±0.13 <sup>4)</sup>	0.97±0.36 <sup>4)</sup>	1.16±0.63 <sup>4)</sup>

显著下调( $P<0.01$ );与模型组比较,GPs-L、GPs-H、辛伐他汀组SIRT6蛋白表达上调( $P<0.01$ ),高剂量组干预效果较显著,见表6、图3。

表6 GPs对MAFLD模型小鼠肝脏SIRT6蛋白表达水平的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 6 Effect of GPs on expression of SIRT6 protein in liver of MAFLD model mice ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	SIRT6
空白组		0.16±0.01
模型组		0.07±0.01 <sup>2)</sup>
GPs-L组	1 490	0.11±0.01 <sup>4)</sup>
GPs-H组	2 970	0.12±0.01 <sup>4)</sup>
辛伐他汀组	2.275	0.15±0.01 <sup>4)</sup>

### 3.12 GPs对MAFLD模型小鼠肝脏SIRT6/CREB/

Nur77信号通路及凋亡相关蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组SIRT6、CREB、p-CREB、Nur77、Bcl-2蛋白表达显著降低( $P<0.01$ ),Bax、cleaved-Caspase-9/Caspase-9、cleaved-Caspase-3/Caspase-3表达明显升高( $P<0.05, P<0.01$ );与模型组比较,GPs-L组SIRT6、p-CREB蛋白表达明显升高( $P<0.05$ ),CREB、Nur77、Bcl-2虽无显著差异但呈上升趋势,Bax蛋白表达明显降低( $P<0.05$ ),cleaved-Caspase-9/Caspase-9、cleaved-Caspase-3/Caspase-3虽无显著差异但呈下降趋势;与模型组比较,GPs-H组、辛伐他汀组SIRT6、CREB、p-CREB、Nur77、Bcl-2蛋白表达明显升高( $P<0.05, P<0.01$ ),Bax、cleaved-Caspase-9/Caspase-9、cleaved-Caspase-3/Caspase-3表达显著降低( $P<0.01$ ),中GPs-M组干预效果较显著,见表7、图4。

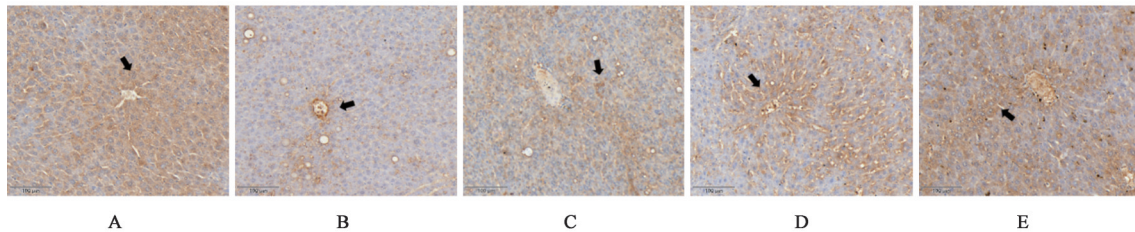


图3 GPs对MAFLD模型小鼠肝脏SIRT6蛋白表达水平的影响(免疫组化,×400)

Fig. 3 Effect of GPs on expression of SIRT6 protein in liver of MAFLD model mice (IHC, ×400)

表7 GPs对MAFLD模型小鼠肝脏SIRT6/CREB/Nur77信号通路及凋亡相关蛋白表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 7 Effect of GPs on SIRT6/CREB/Nur77 signaling pathway and expression of apoptosis-related proteins in liver of MAFLD model mice ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	SIRT6/ β-actin	p-CREB/ β-actin	CREB/ β-actin	Nur77/ β-actin	Bcl-2/ β-actin	Bax/ β-actin	cleaved-Caspase-9/ Caspase-9	cleaved-Caspase-3/ Caspase-3
空白组		1.16±0.08	1.07±0.08	1.16±0.05	0.64±0.07	0.99±0.11	0.33±0.04	0.58±0.17	0.56±0.07
模型组		0.70±0.07 <sup>2)</sup>	0.62±0.10 <sup>2)</sup>	0.26±0.11 <sup>2)</sup>	0.30±0.03 <sup>2)</sup>	0.26±0.21 <sup>2)</sup>	1.03±0.02 <sup>2)</sup>	1.02±0.03 <sup>2)</sup>	0.98±0.06 <sup>1)</sup>
GPs-L组	1 490	0.98±0.16 <sup>3)</sup>	0.87±0.07 <sup>3)</sup>	0.37±0.16	0.41±0.06	0.37±0.30	0.78±0.07 <sup>3)</sup>	0.86±0.09	0.83±0.09
GPs-H组	2 970	1.12±0.05 <sup>4)</sup>	1.02±0.04 <sup>4)</sup>	0.74±0.15 <sup>3)</sup>	0.56±0.02 <sup>4)</sup>	0.74±0.07 <sup>3)</sup>	0.70±0.10 <sup>4)</sup>	0.70±0.03 <sup>4)</sup>	0.68±0.07 <sup>4)</sup>
辛伐他汀组	2.275	1.15±0.11 <sup>4)</sup>	1.02±0.08 <sup>4)</sup>	0.89±0.10 <sup>4)</sup>	0.60±0.07 <sup>4)</sup>	0.89±0.06 <sup>4)</sup>	0.65±0.09 <sup>4)</sup>	0.56±0.04 <sup>4)</sup>	0.61±0.07 <sup>4)</sup>

3.13 GPs对MAFLD模型小鼠肝细胞凋亡的影响 正常细胞核染色后呈蓝色,凋亡细胞核呈深棕色。空白组仅见少量散在凋亡细胞;与空白组比较,模型组凋亡细胞明显增多,阳性面积显著增加

( $P<0.01$ );经给药干预后,与模型组比较,GPs-L、GPs-H、辛伐他汀组肝细胞凋亡情况明显改善,阳性面积显著减少( $P<0.01$ ),且GPs-M组、GPs-H组剂量组凋亡细胞减少情况更为明显,见表8、图5。

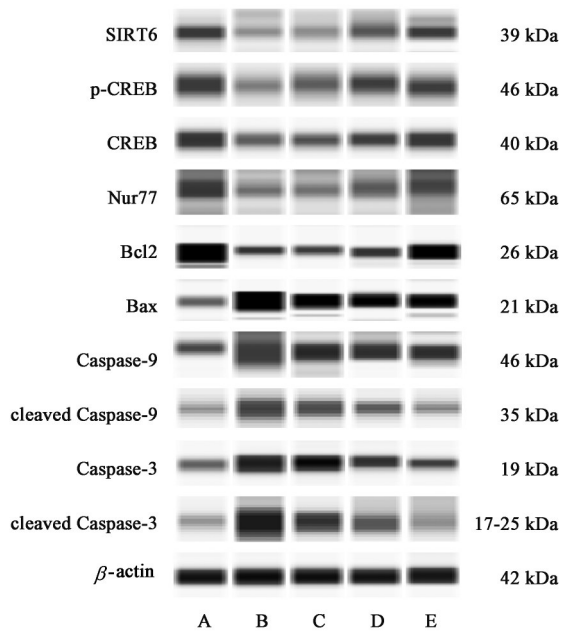


图4 GPs对MAFLD模型小鼠肝脏SIRT6/CREB/Nur77信号通路及凋亡相关蛋白表达电泳

Fig. 4 GPs electrophoresis of SIRT6/CREB/Nur77 signal pathway and expression of apoptosis-related proteins in liver of MAFLD model mice

表8 GPs对MAFLD模型小鼠肝细胞凋亡情况的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 8 Influence of GPs on hepatocyte apoptosis in MAFLD model mice ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	阳性面积/%
空白组		23.18±0.77
模型组		54.08±2.40 <sup>2)</sup>
GPs-L组	1 490	42.06±1.56 <sup>4)</sup>
GPs-H组	2 970	33.23±2.23 <sup>4)</sup>
辛伐他汀组	2.275	23.92±2.58 <sup>4)</sup>

#### 4 讨论

MAFLD患病率持续上升,2018年我国MAFLD的患病率为32.9%,与20世纪初(23.8%)相比增加了9.1%,是公共卫生事业的巨大挑战<sup>[18]</sup>。目前没有批准用于MAFLD的特定治疗方法,患者通常接受伴随疾病(肥胖、2型糖尿病和高血压)的治疗,MAFLD的特定治疗方法亟待开发<sup>[3,19]</sup>。中医药在多靶点多途径治疗疾病方面有着天然优势,中医认为,MAFLD病位在

肝,将其归属为“肝痞”“肝癖”等范畴。《黄帝内经·灵枢集注》载:“中焦之气,蒸津液,化其精微……溢于外则皮肉膏肥,余于内则膏肓丰满”,脾为后天之本,运化水谷精微,当脾虚失健运,水谷精微不归正化,气血生化乏源,水湿不化,凝结成痰,杂糅胶固积于肝络,是MAFLD形成的主要病因病机。传统中药材绞股蓝是课题组专利方(专利号ZL200710010845.9)化痰祛痰方的君药之一,具有益气健脾、祛痰化痰之功效。GPs是其含量较高的有效成分,可通过抗氧化、调节脂质代谢、影响炎症因子等多途径拮抗MAFLD病理进展<sup>[20]</sup>。然而,由于MAFLD发病机制的复杂性,GPs干预MAFLD的作用途径也具有多样性,其具体干预机制、体内药效药动学及毒理学仍待进一步补充探究。课题组前期研究表明,GPs可以通过调控脂肪酸合成途径有效改善ApoE<sup>-/-</sup>小鼠肝脏脂质沉积情况与血脂水平,有效延缓MAFLD进展<sup>[21]</sup>。本研究结果验证了这一点,GPs有效改善了高脂饮食诱导的MAFLD小鼠的血脂水平、肝功能指标、肝脏脂肪变及炎症反应的情况,且这种改善效果呈现明显的剂量-效应关系。同时,本研究对GPs主要活性成分潜在作用靶点及MAFLD相关靶点进行了筛选,基于拓扑分析和MAFLD相关文献,结合MAFLD的主要病理生理机制(包括肝脂质代谢紊乱、胰岛素抵抗、炎症及肝细胞凋亡等),聚焦于SIRT6作为最有可能的核心靶点进行后续验证,并用分子对接技术验证了GPs主要活性成分与SIRT6的强烈结合能力,表明SIRT6可能是GPs干预MAFLD的关键切入点。

Sirtuins是一类高度保守的NAD<sup>+</sup>依赖性去乙酰化酶家族,是细胞代谢的核心调控者<sup>[22]</sup>,其家族成员SIRT6已被证实可控制与代谢、炎症和DNA修复相关的广泛基因的转录。近3年研究表明其在代谢性疾病中发挥重要调控作用,其作用在MAFLD中尤为突出,其可以通过调节脂肪酸 $\beta$ 氧化、炎症反应、氧化应激等生物学过程影响MAFLD的发生发展<sup>[23-25]</sup>,SIRT6缺失可以降低脂肪甘油三酯脂肪酶的转录活性,降低脂解活性,导致脂质堆积,其过表达则可以减少脂肪酸在肝

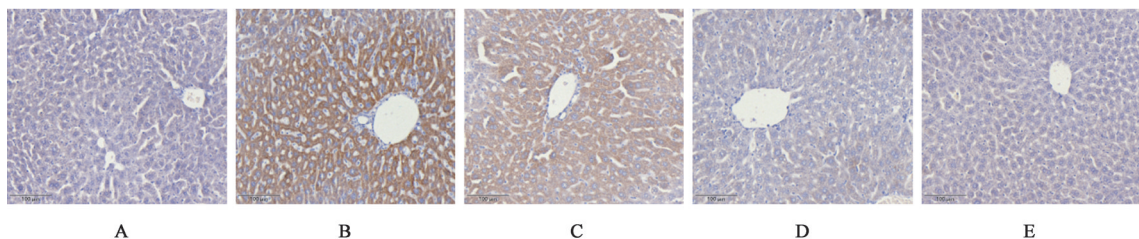


图5 GPs对MAFLD模型小鼠肝细胞凋亡情况的影响(TUNEL,×400)

Fig. 5 Influence of GPs on hepatocyte apoptosis in MAFLD model mice (TUNEL,×400)

脏的过度积累和胰岛素抵抗<sup>[26]</sup>。本研究结果显示,模型组肝组织中SIRT6表达显著下调,GPs能够逆转SIRT6的低表达。SIRT6可以活化CREB,而Nur77的表达受转录因子CREB的调控,这种调控机制在肌肉脂质代谢中起着重要的作用,但在MAFLD中的调控机制有待进一步探索<sup>[13,27]</sup>。Nur77可以作为一种不依赖配体的转录因子发挥作用,调节各种生物过程,包括炎症、氧化应激和代谢异常,在高脂肪喂养的小鼠中,敲除Nur77会增加胰岛素抵抗、肝脏脂肪变性和SREBP1的表达,而过表达Nur77会减少肝脏TG的积累<sup>[28]</sup>。本研究实验显示,与模型组比较,不同剂量GPs干预后肝组织CREB、p-CREB蛋白水平上调,SIRT6、Nur77 mRNA及蛋白水平上调,证明SIRT6/CREB/Nur77信号通路在MAFLD中可能具有重要作用,GPs可以干预该机制。

核受体Nur77通过双重机制调控细胞凋亡过程:在转录水平上,其过表达可显著抑制Bax基因表达,同时促进Bcl-2基因转录<sup>[29]</sup>;在翻译后水平,Nur77能够发生核质转位,与线粒体上的Bcl-2蛋白直接结合,诱导其构象改变,使其从抗凋亡蛋白转变为促凋亡效应分子,进而触发线粒体细胞色素C的大量释放<sup>[30]</sup>。作为线粒体凋亡通路的核心调控因子,Bax与Bcl-2表达失衡可诱导线粒体释放细胞色素C等促凋亡介质,激活Caspase级联反应,内源性凋亡通路的起始因子Caspase-9,启动上游信号,Caspase-3则作为下游效应因子,引发细胞周期阻滞、阻碍DNA损伤修复并破坏细胞结构完整性,驱动细胞走向凋亡<sup>[31-35]</sup>。基于前期研究发现,GPs对ApoE<sup>-/-</sup>小鼠肝脏脂质沉积的改善作用涉及抗凋亡机制<sup>[36-37]</sup>,本研究进一步证实,经给药干预后,抗凋亡因子Bcl-2表达升高,同时促凋亡因子Bax、Caspase-9、Caspase-3的表达降低,提示GPs可能通过SIRT6/CREB/Nur77信号通路影响细胞凋亡,进而改善MAFLD小鼠肝脏脂质沉积情况。

基于以上研究,本课题认为GPs可能通过影响细胞凋亡改善肝脏脂质沉积,进而防治MAFLD,其作用机制可能与SIRT6/CREB/Nur77信号通路有关。后续研究将聚焦具体机制,并在体外实验中进行验证。此外本研究尚有不足之处,如GPs与SIRT6的直接作用关系仍需未来的直接结合相关实验[如表面等离子体共振(SPR)、细胞热位移分析(CETSA)]予以进一步证实,使用ApoE<sup>-/-</sup>小鼠高脂饮食构建MAFLD模型虽然确实可行,但存在一定局限性,未来将构建探索其他适用性更高的模型进行研究。研究机制见增强出版附加材料。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] SANGRO P, DE L T A M, SANGRO B, et al. Metabolic dysfunction-associated fatty liver disease (MAFLD): An update of the recent advances in pharmacological treatment[J]. J Physiol Biochem, 2023, 79(4): 869-879.
  - [2] YOUNOSSI Z M, KOENIG A B, ABDELATIF D, et al. Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes[J]. Hepatology, 2016, 64(1): 73-84.
  - [3] BADMUS O O, HINDS T D J R, STEC D E. Mechanisms linking metabolic-associated fatty liver disease (MAFLD) to cardiovascular disease[J]. Curr Hypertens Rep, 2023, 25(8): 151-162.
  - [4] JIANG Q, YANG T, YANG H, et al. Integrated multi-omics investigation of gypenosides' mechanisms in lowering hepatic cholesterol[J]. Biomolecules, 2025, 15(8): 1205.
  - [5] LEE Y Z, KOW A S F, LEE Q L, et al. Antidiabetic potentials of gypenosides: A review on the preclinical effects in glucose and insulin modulation as well as diabetes-related complications[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2025, 398(11): 14813-14829.
  - [6] LI H, XI Y, LIU H, et al. Gypenosides ameliorate high-fat diet-induced non-alcoholic steatohepatitis via farnesoid X receptor activation[J]. Front Nutr, 2022, 9: 914079.
  - [7] WENG X, LOU Y Y, WANG Y S, et al. New dammarane-type glycosides from *Gynostemma pentaphyllum* and their lipid-lowering activity[J]. Bioorg Chem, 2021, 111: 104843.
  - [8] LIU H, LI X, DUAN Y, et al. Mechanism of gypenosides of *Gynostemma pentaphyllum* inducing apoptosis of renal cell carcinoma by PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 271: 113907.
  - [9] SONG N, JIA L, CAO H, et al. Gypenoside inhibits endothelial cell apoptosis in atherosclerosis by modulating mitochondria through PI3K/Akt/Bad pathway[J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 2819658.
  - [10] CHALKIADAKI A, GUARENTE L. The multifaceted functions of sirtuins in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2015, 15(10): 608-624.
  - [11] O'CALLAGHAN C, VASSILOPOULOS A. Sirtuins at the crossroads of stemness, aging, and cancer[J]. Aging Cell, 2017, 16(6): 1208-1218.
  - [12] BANG I H, KWON O K, HAO L, et al. Deacetylation of XBP1s by sirtuin 6 confers resistance to ER stress-induced hepatic steatosis[J]. Exp Mol Med, 2019, 51(9): 1-11.
  - [13] SONG M Y, HAN C Y, MOON Y J, et al. Sirt6 reprograms myofibers to oxidative type through CREB-dependent Sox6 suppression[J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 1808.
  - [14] 莫黎芳, 李小玲, 韩谊, 等. 下调Nur77抑制PI3K/Akt信号通路促进肺腺癌细胞凋亡和自噬[J]. 海南医学院学报, 2024, 30(12): 897-904.
- MO L F, LI X L, HAN Y, et al. Downregulation of Nur77 accelerates lung adenocarcinoma cells apoptosis and autophagy

- through the inhibition of the PI3K/Akt pathway[J]. *J Hainan Med Univ*, 2024, 30(12): 897-904.
- [15] KETELUT-CARNEIRO N, FITZGERALD K A. Apoptosis, pyroptosis, and necroptosis-oh my the many ways a cell can die [J]. *J Mol Biol*, 2022, 434(4): 167378.
- [16] 宋囡, 杨芳, 曹慧敏, 等. 绞股蓝总甙调控mTOR/ULK1通路对ApoE<sup>-/-</sup>小鼠动脉粥样硬化的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2018, 26(2): 127-132.
- SONG N, YANG F, CAO H M, et al. Gypenoside influences the progression of atherosclerosis in the ApoE<sup>-/-</sup> mouse through mTOR/ULK1 pathway[J]. *Chin J Arteriosclerosis*, 2018, 26(2): 127-132.
- [17] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1184.
- XU S Y, BIAN R L, CHEN X. *Experimental Methodology of Pharmacology*[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002: 1184.
- [18] YU C, WANG M, ZHENG S, et al. Comparing the diagnostic criteria of MAFLD and NAFLD in the Chinese population: A population-based prospective cohort study [J]. *J Clin Transl Hepatol*, 2022, 10(1): 6-16
- [19] ZHAO Y, ZHOU Y, WANG D, et al. Mitochondrial dysfunction in metabolic dysfunction fatty liver disease (MAFLD)[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(24): 17514.
- [20] 梁晓爽, 滕媛, 赵志伟, 等. 绞股蓝皂苷治疗肝病的研究进展[J]. *药学进展*, 2023, 47(9): 717-726.
- LIANG X S, TENG Y, ZHAO Z W, et al. Research progress of gypenosides in the treatment of liver disease[J]. *Prog Pharm Sci*, 2023, 47(9): 717-726.
- [21] 孙小扉, 宋囡, 曹媛, 等. 基于SQLE/CA3/SREBP1c途径研究绞股蓝皂苷改善非酒精性脂肪肝病的机制[J]. *天然产物研究与开发*, 2026, 37(4): 687-693.
- SUN X F, SONG N, CAO Y, et al. Study on the mechanism of gypenosides regulating SQLE/CA3/SREBP1c pathway mediating fatty acid synthesis to improve nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2025, 37(4): 687-693.
- [22] FELDMAN J L, DITTENHAFFER-REED K E, DENU J M. Sirtuin catalysis and regulation[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(51): 42419-27.
- [23] LI L, ZENG J, ZHANG X, et al. SIRT6 ablation in the liver causes fatty liver that increases cancer risk by upregulating Serpina12[J]. *EMBO Rep*, 2024, 25(3): 1361-1386.
- [24] HUANG J, LI J, PENG Y, et al. The lack of PPAR $\alpha$  exacerbated the progression of non-alcoholic steatohepatitis in mice with spleen deficiency syndrome by triggering an inflammatory response[J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1381340.
- [25] SUN Y, ZHENG C, LI T, et al. GB1a activates SIRT6 to regulate lipid metabolism in mouse primary hepatocytes[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(11): 9540.
- [26] 崔天琦. 人参皂苷Rd激活SIRT6改善高脂饮食诱导的非酒精性脂肪性肝病的研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2024.
- CUI T Q. SIRT6 activated by ginsenoside Rd alleviates non-alcoholic fatty liver induced by high fat diet[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2024.
- [27] 段继燕. Nur77在肝癌转移中的功能和机制研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2017.
- DUAN J Y. The function and mechanism of Nur77 in liver cancer metastasis[D]. Xiamen: Xiamen University, 2017.
- [28] 李旭丹. 核受体Nur77在非酒精性脂肪性肝炎和肝癌中的靶点作用及新型调控机制[D]. 厦门: 厦门大学, 2022.
- LI X D. The target role and new regulatory mechanism of nuclear receptor Nur77 in nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma[D]. Xiamen: Xiamen University, 2022.
- [29] YAO Y, WANG B, YU K, et al. Nur77 improves ovarian function in reproductive aging mice by activating mitophagy and inhibiting apoptosis[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2024, 22(1): 86.
- [30] 徐倩. Bcl-2模拟磷酸化修饰对Bcl-2与Nur77相互作用的影响[D]. 武汉: 中国科学院大学(中国科学院精密测量科学与技术创新研究院), 2021.
- XU Q. The effect of mimic phosphorylation modification of Bcl-2 on the interaction between Bcl-2 and Nur77 [D]. Wuhan: University of Chinese Academy of Sciences (Innovation Academy for Precision Measurement Science and Technology, Chinese Academy of Sciences), 2021.
- [31] WATANABE T, FUJIWARA Y, CHAN F. Current knowledge on non-steroidal anti-inflammatory drug-induced small-bowel damage: A comprehensive review[J]. *J Gastroenterol*, 2020, 55(5): 481-495.
- [32] OLA M S, NAWAZ M, AHSAN H. Role of Bcl-2 family proteins and Caspases in the regulation of apoptosis [J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 351(1/2): 41-58.
- [33] 冯健愉, 朱玉山, 陈佺, 等. Bcl-2家族蛋白的生理功能及结构基础[J]. *中国细胞生物学学报*, 2019, 41(8): 1477-1489.
- FENG J Y, ZHU Y S, CHEN Q, et al. Physiological function and structural basis of Bcl-2 family proteins[J]. *Chin J Cell Res*, 2019, 41(8): 1477-1489.
- [34] MENG M, YUE Z, CHANG L, et al. Anti-rheumatoid arthritic effects of paris saponin VII in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes and adjuvant-induced arthritis in rats [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 683698.
- [35] 柴喜平, 李盛华, 周明旺, 等. 益肾健骨丸对膝关节炎大鼠软骨组织AMPK/CyclinY/CDK16通路表达及软骨细胞自噬、凋亡的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2024, 31(10): 89-95.
- [36] CHAI X P, LI S H, ZHOU M W, et al. Effects of Yishen Jiangu pill on AMPK/Cyclin Y/CDK16 pathway expressions and chondrocyte autophagy and apoptosis in cartilage tissue of knee osteoarthritis rats [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med*, 2024, 31(10): 89-95.
- [37] 赵卓, 高浩, 杨莹, 等. 绞股蓝皂苷抑制Bcl-2L12凋亡通路改善ApoE<sup>-/-</sup>动脉粥样硬化小鼠肝脏脂质沉积[J]. *中国中西医结合杂志*, 2023, 43(10): 1221-1227.
- ZHAO Z, GAO H, YANG Y, et al. Gypenosides improve liver lipid deposition in ApoE<sup>-/-</sup>AS mice by inhibiting the Bcl-2L12 apoptosis pathway[J]. *Chin J Integr Med*, 2023, 43(10): 1221-1227.

[责任编辑 顾雪竹]