

• XXXX •

基于 Apaf1 感知 MPT 介导细胞凋亡/焦亡对肝细胞 脂质沉积的影响及涤痰汤的干预作用

朱敬轩, 宋因, 刘玉, 董元广, 贾连群*, 裴宇鹏*
(辽宁中医药大学, 沈阳 110847)

[摘要] 目的:探讨涤痰汤(DTD)是否通过调控凋亡蛋白酶激活因子1(Apaf1)感知线粒体通透性转换孔(MPT)介导的细胞凋亡/焦亡途径来改善油酸(OA)诱导的肝细胞脂质沉积。方法:人肝癌细胞(HepG2)细胞经 $800 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ OA 诱导以构建肝细胞脂质沉积模型,通过细胞增殖与活性检测(CCK-8)法筛选 DTD 含药血清及 Apaf1 抑制剂 ZYZ488 的最佳干预条件。将 HepG2 细胞分为空白组、OA 组($800 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、OA ($800 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)+SC (10%)组、OA ($800 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)+DTD (10%)组、OA ($800 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)+ZYZ488 ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组。通过油红 O 染色、甘油三酯(TG)和游离脂肪酸(NEFA)水平检测评估肝细胞脂质沉积变化;钙黄绿素乙酰氧基甲酯(Calcein AM)与线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)荧光染色检测线粒体通透性转换孔(MPT)开放及线粒体膜电位变化;流式检测凋亡与焦亡细胞数目;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测 Apaf1、E 蛋白(GSDME)、聚腺苷二磷酸-核糖聚合酶1(PARP1)、胱天蛋白酶(Caspase)-3、Caspase-4、Caspase-9 基因 mRNA 表达;免疫荧光检测 Apaf1 表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)分析 Apaf1、GSDME、PARP1、Caspase-3、Caspase-4、Caspase-9、剪切的(cleaved)-Caspase-3、cleaved-Caspase-9 蛋白表达。结果:DTD 含药血清显著降低 OA 诱导的 HepG2 细胞 TG 与 NEFA 水平($P<0.01$),并有效改善肝细胞脂质沉积。DTD 含药血清可抑制 MPT 过度开放及线粒体膜电位下降($P<0.01$)。同时,DTD 含药血清可明显下调 Apaf1 介导的凋亡(Caspase-9/Caspase-3/PARP1)和焦亡(Caspase-4/Caspase-3/GSDME)通路关键蛋白及基因表达($P<0.05$),其作用与 ZYZ488 效果相似。结论:涤痰汤可通过抑制 Apaf1 感知 MPT 介导的细胞凋亡与焦亡途径,改善肝细胞脂质沉积。

[关键词] 肝细胞脂质沉积; 涤痰汤; 凋亡蛋白酶激活因子1(Apaf1); 线粒体通透性转换孔(MPT); 凋亡; 焦亡

[中图分类号] R575.5;R285;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(XXXX)XX-0001-12

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20251612

[网络出版地址]

[网络出版日期] XXXX-XX-XX **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>



Effect of Apaf1-mediated Apoptosis/Pyroptosis on Lipid Deposition in Hepatocytes and Intervention Effect of Ditantang

ZHU Jingxuan, SONG Nan, LIU Yu, DONG Yuanguang, JIA Lianqun*, PEI Yupeng*
(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate whether Ditantang (DTD) improves oleic acid (OA)-induced hepatic lipid accumulation by regulating apoptosis/pyroptosis pathways mediated by apoptosis-related protein activator 1 (Apaf1) sensing the mitochondrial permeability transition pore (MPTP). **Methods:** HepG2 cells were treated with $800 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ OA to establish a hepatocyte lipid accumulation model. The optimal intervention conditions for DTD-containing serum and the Apaf1 inhibitor ZYZ488 were screened using the CCK-8 assay. HepG2 cells were divided into the following groups: NC group, OA group ($800 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), OA ($800 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + serum control (SC, 10%) group, OA ($800 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + DTD-containing serum (10%)

[收稿日期] 2025-09-22

[基金项目] 辽宁省科技计划项目-辽宁省科技计划联合计划(基金)项目(应用基础研究项目)(2023JH2/101700208);自然科学类高校基本科研项目创新团队项目(LJ222510162020)

[第一作者] 朱敬轩,在读博士,从事中西医结合防治代谢性疾病的研究,E-mail:321692607@qq.com

[通信作者] *裴宇鹏,高级实验师,硕士生导师,硕士,从事中西医结合防治代谢性疾病的研究,E-mail:pedtrainzhz7676@163.com;

*贾连群,教授,博士生导师,博士,从事中西医结合防治代谢性疾病的研究,E-mail:jlq-8@163.com

group, and OA ($800 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + ZYZ488 ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group. Hepatic lipid accumulation was evaluated by Oil Red O staining and measurement of triglyceride (TG) and non-esterified fatty acid (NEFA) levels. Calcein-AM and JC-1 fluorescence staining were used to assess MPTP opening and mitochondrial membrane potential alterations. Flow cytometry was performed to determine apoptotic and pyroptotic cell numbers. Real-time PCR was used to detect mRNA expression of Apaf1, gasdermin E (GSDME), poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1), Caspase-3, Caspase-4, and Caspase-9. Immunofluorescence analysis was used to assess Apaf1 expression. Western blot analysis was performed to evaluate protein expression of Apaf1, GSDME, PARP1, Caspase-3, Caspase-4, Caspase-9, cleaved-Caspase-3, and cleaved-Caspase-9. **Results:** DTD-containing serum significantly reduced TG and NEFA levels in OA-induced HepG2 cells ($P<0.01$) and effectively mitigated intracellular lipid droplet accumulation. DTD-containing serum inhibited excessive MPTP opening and mitochondrial membrane potential decline ($P<0.01$). Meanwhile, DTD-containing serum downregulated key genes and proteins in Apaf1-mediated apoptosis (Caspase-9/Caspase-3/PARP1) and pyroptosis (Caspase-4/Caspase-3/GSDME) pathways ($P<0.05$), with effects comparable to those of ZYZ488. **Conclusion:** DTD improves hepatic lipid accumulation by inhibiting Apaf1-sensed MPTP-mediated apoptosis and pyroptosis pathways.

[Keywords] lipid deposition in hepatocytes; Ditantang; apoptosis-related protein activator 1 (Apaf1); mitochondrial permeability transition pore (MPTP); apoptosis; pyroptosis

代谢相关脂肪性肝病(MAFLD)已成为全球慢性肝病的主要类型,流行病学调查显示其影响全球近33%的人口,并成为肝病相关并发症和死亡的重要病因^[1]。肝脏脂质沉积是MAFLD的核心病理特征,其发生机制与干预策略研究具有重要的临床与科学意义。有研究表明,肝脏脂质沉积的发生发展与肝细胞程序性死亡密切相关^[2-3],其中细胞凋亡与焦亡是脂质沉积肝细胞的死亡形式之一^[4-6]。线粒体通透性转换孔(MPTP)的异常开放是触发肝细胞凋亡与焦亡的关键环节,而凋亡蛋白酶激活因子1(Apaf1)作为线粒体死亡通路的核心传感器,可能通过整合死亡信号调控这2种死亡模式的转换^[7-8]。线粒体通透性转换(MPT)可触发经典凋亡通路,通过促使凋亡小体[Apaf1/胱天蛋白酶(Caspase)-9]形成,进而激活下游Caspase-3以诱导细胞凋亡^[9];此外,MPT还能介导Apaf1与Caspase-4结合,形成焦亡小体复合物进而激活E蛋白(GSDME)蛋白通路以引发细胞焦亡^[7-8]。这种交叉对话是否为构成肝细胞脂质沉积的放大器,值得深入探讨。中药通过多成分、多靶点、多途径协同调控在改善肝脏脂质沉积中兼具调节代谢紊乱、抑制细胞死亡和减轻炎症反应的综合优势^[10]。课题组前期研究发现涤痰汤治疗肝脏脂质沉积与血脂异常疗效显著^[11-12]。涤痰汤出自明代《奇效良方》,由法半夏、茯苓、姜南星、橘红、枳实、竹茹、人参、石菖蒲、甘草组成。研究表明,涤痰汤可抑制凋亡发生^[13],涤痰汤中的人参^[14]、茯苓^[15]、石菖蒲^[16]均能抑制焦亡发生。涤痰汤能否通过Apaf1感知MPT介导细胞凋亡/焦亡发挥改善肝细胞脂质沉积的作用目前尚未报道。基于此,本研究立足于Apaf1感知MPT介导细胞凋亡/焦亡的关键作用,旨在探讨涤痰汤是否通过该途径

改善肝细胞脂质沉积。本研究开展有助于阐明涤痰汤作用的具体分子机制,也将为其临床应用提供更为坚实的科学依据,具有重要的理论价值与实践意义。

1 材料

1.1 细胞 人肝癌细胞(HepG2)细胞株购自中国科学院细胞库(细胞目录号为SCSP-510),传代至第5代后开始用于后续实验。

1.2 动物 10只雄性SD大鼠,6~8周龄,体质量180~220 g,购自辽宁长生生物技术股份有限公司,合格证号SCXK(辽)2020-0001。大鼠于辽宁中医药大学实验中心屏障环境下分笼饲养[温度(22 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 、湿度(50 ± 5)%、12 h/12 h明暗周期交替循环],自由摄食饮水。

1.3 伦理 大鼠的饲养和使用符合辽宁中医药大学实验动物伦理委员会相关规定(伦理批件编号21000042021070)。

1.4 试剂 MEM培养基、胎牛血清(FBS)、胰酶、磷酸盐缓冲液(PBS)(北京赛澳美细胞技术有限公司,货号分别为CGM114.06、SA301.02、V、CPT101.02、CBS101.05);细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂(北京兰杰柯科技有限公司,货号BS350B);Apaf1抑制剂(ZYZ488,美国MedChemExpress公司,货号HY-100472);油酸(OA,上海阿拉丁生化科技股份有限公司,货号O0108485);游离脂肪酸(NEFA)、甘油三酯(TG)试剂盒(南京建成生物工程研究所,货号分别为A042-1-1、A110-1-1);预染彩虹蛋白Marker、油红O染色试剂盒、白细胞介素- 1β (IL- 1β)试剂盒、白细胞介素-18(IL-18)试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号分别为PR1910、G1262、SEKH-0002、SEKH-

0028); UltraSYBR Mixture、HiFiScript gDNA Removal RTMasterMix(江苏康为世纪生物科技股份有限公司,货号分别为CW2601M、CW2582M); 线粒体通透性转换孔检测试剂盒、免疫荧光封闭液、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液(5×)、脱脂奶粉(上海碧云天生物技术股份有限公司,货号分别为C2009S、P0260、P0015、P0216); 线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1,武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,货号E-CK-A301); 剪切的(cleaved) Caspase-3、GSDME、Caspase-9多克隆抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号分别为19677-1-AP、13075-1-AP、10380-1-AP); Caspase-3、cleaved Caspase-9、Caspase-4多克隆抗体(上海艾比玛特医药科技有限公司,货号分别为T40044、TA5240、TA5130); Apaf1多克隆抗体(武汉爱博泰克生物科技股份有限公司,货号A0751); 聚腺苷二磷酸-核糖聚合酶1(PARP1)多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司,货号PB9309); 电泳缓冲液(粉剂)、15孔蛋白免疫印迹法(Western blot)预制胶、S-TRANS阳极缓冲液、S-TRANS阴极缓冲液(常州伯仪生物科技有限公司,货号分别为BR0001-02、F15412MGel、BR0007-01、BR0008-01); 一抗稀释液(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号G2025); 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色液、增强化学发光法(ECL)显影液、蛋白定量法(BCA)蛋白测定试剂盒(杭州弗德生物科技有限公司,货号分别为FD8396、FD8020、FD2001)。

1.5 仪器 Mini Protean Tetra Cell型电泳槽、PowerPac Basic型电泳仪、T100 Thermal Cycler型反转录仪器、ZOE型荧光显微镜(美国伯乐生命医学产品有限公司); Infite M200PRO型酶标仪(瑞士Tecan公司); FW6-6型S-TRANS快速多通道半干转印仪(常州伯仪生物科技有限公司); Megafuge 8R型高速离心机、T100梯度聚合酶链式反应(PCR)扩增仪器(美国赛默飞世尔科技公司); 5200型化学发光成像系统(上海天能科技有限公司); ND5000型超微量核酸蛋白检测仪NanoDrop(北京百泰克生物技术有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养与传代 HepG2细胞培养于MEM完全培养基中(含15%FBS),培养条件为37℃,5%CO₂。当细胞生长至90%汇合度时进行传代培养。首先于培养瓶内加入胰酶1 mL消化2 min,随后加入完全培养基2 mL以终止反应。离心

(1 000 r·min⁻¹,2 min,离心半径209 mm)弃去上清保留细胞沉淀,用完全培养基1 mL重悬细胞沉淀,按1:2的比例进行传代。

2.2 涤痰汤含药血清制备 适应性喂养大鼠1周后,经体表面积换算予以人体等效剂量的涤痰汤灌胃(0.74 g·d⁻¹),每日早晚各1次,连续灌胃7 d。7 d后麻醉大鼠,经腹主动脉采血。血液静置1 h后,离心(3 000 r·min⁻¹,10 min,离心半径85 mm,下同),取血清置于56℃孵育30 min以去除补体,最后用0.22 μm过滤器过滤得到含药血清。

2.3 CCK-8检测细胞活力 按每孔5×10³个HepG2细胞接种至96孔板,待细胞贴壁后,分别予以不同浓度的OA、涤痰汤含药血清或ZYZ488分别干预12、24、48 h。每孔加入含有CCK-8 10 μL与基础培养基90 μL,37℃条件下孵育30 min,于450 nm波长下检测吸光度A。细胞活力=(A_{加药}-A_{空白})/(A_{0加药}-A_{0空白})×100%。

2.4 比色法测定TG水平 按每孔1.2×10⁵个HepG2细胞接种至24孔板,待细胞贴壁后,予以相应干预,分为空白组、模型组(OA组)、空白血清组(OA+SC组)、涤痰汤组(OA+DTD组)、ZYZ488组(OA+ZYZ488组)。OA组予以800 μmol·L⁻¹ OA干预24 h;SC组予以800 μmol·L⁻¹ OA与10%空白血清联合干预24 h;DTD组予以800 μmol·L⁻¹ OA与10%涤痰汤含药血清联合干预24 h后,取细胞培养液。设置空白孔、标准孔与样本孔。空白孔、标准孔、样本孔分别加入蒸馏水2.5 μL、标准品2.5 μL、待测样本2.5 μL与TG检测工作液250 μL。37℃条件下孵育10 min,于500 nm波长下检测吸光度A。TG含量=(A_{样本孔}-A_{空白孔})/(A_{标准孔}-A_{空白孔})×C_{标准}。

2.5 比色法测定NEFA水平 按每孔1.2×10⁵个HepG2细胞接种至24孔板,待细胞贴壁后,予以相应干预,分组同上。设置空白孔、标准孔与样本孔。空白孔加入蒸馏水200 μL、缓冲液500 μL、铜试剂工作液1 mL与三氯甲烷4 mL;标准孔加入棕榈酸标准品200 μL、缓冲液500 μL、铜试剂工作液1 mL与三氯甲烷4 mL;样本孔加入待测样本200 μL、缓冲液500 μL、铜试剂工作液1 mL与三氯甲烷4 mL。混匀抽提2 min,3 500 r·min⁻¹离心,10 min后吸取下层抽提液2 mL加入显色剂0.25 mL进行显色。混匀后,静置2 min,于440 nm波长下检测吸光度A。NEFA含量=(A_{样本孔}-A_{空白孔})/(A_{标准孔}-A_{空白孔})×C_{标准}。

2.6 油红O染色 按每孔1.2×10⁵个HepG2细胞接种至24孔板,待细胞贴壁后,予以相应干预,分组同

上。油红O染液按B1:B2=3:2比例配制,混合后静置10 min,经滤膜过滤备用。细胞依次经油红O固定液处理20 min,蒸馏水漂洗2次,60%异丙醇作用20 s。随后细胞依次经过预配油红O染液染色20 min,60%异丙醇漂洗20 s, Mayer苏木素复染2 min,水洗3次后,油红O缓冲液孵育1 min。最后以蒸馏水覆盖细胞,镜检观察。

2.7 RNA提取与Real-time PCR检测 TRIzol法提取HepG2细胞RNA,使用HiFiScript gDNA Removal RTMasterMix试剂盒完成RNA反转录反应,使用UltraSYBR Mixture试剂盒完成RNA扩增反应,严格按照说明书操作。RNA扩增程序如下,95℃预变性10 min;95℃变性15 s,60℃退火60 s,进行40个循环。通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算mRNA的相对表达量。引物序列见表1,由博迈德公司合成。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
Apaf1	上游 AGGAAAAAGTAAGAAATGAGCCCAC	25
	下游 TGTCTTACTACTGGAAGAAGAGA	23
GSDME	上游 CACACTGTGCCACTTGCTTC	20
	下游 GTCAGCTGAGGCAACAAGC	20
PARP1	上游 GCCCTAAAGGCTCAGAACGA	20
	下游 CTACTCGGTCCAAGATCGCC	20
Caspase-3	上游 ACTCCACAGCACCTGGTTAT	20
	下游 TCTGTTGCCACCTTTCGGTT	20
Caspase-4	上游 TGGTGGAAACAAAATGTAAGAACTG	25
	下游 GCCTCCATATTCGGATGAGCTTT	23
Caspase-9	上游 CGGCTGGTGGAAAGAGCTG	18
	下游 AGCCTGCCCGCTGGATG	17
GAPDH	上游 CACCATCTTCCAGGAGCGAG	20
	下游 TGATGACCCTTTTGGCTCCC	20

2.8 荧光法观察线粒体通透性转换孔变化 按每孔 1.2×10^5 个HepG2细胞接种至24孔板,待细胞贴壁后,予以相应干预,分组同上。弃去上清液,用 $1 \times$ PBS清洗细胞1次。每孔加入钙黄绿素乙酰氧基甲酯(Calcein AM)500 μ L染色液与荧光淬灭工作液,于37℃条件下孵育40 min。每孔加入37℃预热的培养基500 μ L,37℃条件下孵育30 min。PBS洗2次后,DAPI避光孵育5 min,PBS洗4次后镜检观察绿色荧光强度。

2.9 荧光法观察线粒体膜电位变化 按每孔 1.2×10^5 个HepG2细胞接种至24孔板,待细胞贴壁

后,予以相应干预,分组同上。 $1 \times$ JC-1 Assay Buffer清洗细胞1次。每孔加入JC-1工作液400 μ L,于37℃条件下孵育20 min。 $1 \times$ JC-1 Assay Buffer清洗细胞1次,DAPI避光孵育5 min,PBS洗4次后镜检观察红色、绿色荧光强度。

2.10 免疫荧光观察肝细胞Apaf1表达 按每孔 1.2×10^5 个HepG2细胞接种至24孔板,待细胞贴壁后,予以相应干预,分组同上。细胞经4%多聚甲醛固定15 min后,用 $1 \times$ PBS洗涤3次。0.5% Triton X-100室温处理20 min进行细胞通透后,PBS洗涤3次。封闭液室温封闭20 min后,加入稀释后的Apaf1(1:100),4℃孵育过夜。PBST洗涤3次后,避光条件下DAPI染核5 min,PBST洗涤4次,镜检观察绿色荧光强度。

2.11 乳酸脱氢酶(LDH)测定 收集细胞培养上清液,4 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心5 min。空白孔加入双蒸水20 μ L及基质缓冲液20 μ L;标准孔加入双蒸水4 μ L、0.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 丙酮酸钠标准液16 μ L及基质缓冲液20 μ L;测定孔加入样本16 μ L、基质缓冲液20 μ L及辅酶I溶液4 μ L;对照孔加入双蒸水4 μ L、样本16 μ L及基质缓冲液20 μ L。加样后,轻轻振荡混匀孔板内容物,于37℃孵育15 min。随后每孔加入2,4-二硝基苯肼溶液20 μ L,再次混匀后于37℃继续孵育15 min。之后加入0.4 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH溶液200 μ L,混匀后室温静置5 min,于440 nm波长处测定各孔吸光度A。

2.12 流式检测细胞凋亡与焦亡 将各组细胞4 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心5 min后收集,小心吸除上清,用PBS洗涤细胞2次,4 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心5 min收集细胞,小心吸除上清,残留PBS约50 μ L,每管细胞样品中加入Binding Buffer 500 μ L轻轻重悬细胞。加入膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素(AnnexinV-FITC)5 μ L混匀后,加入Propidium Iodide 5 μ L,混匀。室温避光孵育15 min。随即进行流式检测。

2.13 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测细胞IL-1 β 、IL-18等焦亡炎症因子水平 收集细胞培养上清液,4 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心10 min。 $1 \times$ 洗液浸泡酶标板30 s后弃掉洗液并拍干,重复2次。标准品孔、空白孔、加入经倍比稀释后的标准品、样品稀释液及待测样本100 μ L,室温振荡孵育120 min。弃掉液体,重复洗板4次,拍干。加入生物素化检测抗体100 μ L,室温振荡孵育60 min。弃掉液体,重复洗板4次,拍干。加入酶结合物100 μ L,室温振荡孵育30 min。弃掉液体,重复洗板4次,拍干。加入显色

底物 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)100 μL,室温避光显色 15 min。加入终止液 50 μL,在 630 nm 波长下检测吸光度 A。

2.14 Western blot检测相关的蛋白表达 细胞贴壁后予以相应干预 24 h。加入含蛋白酶抑制剂的放射免疫沉淀法(RIPA)蛋白裂解液,悬液超声破碎后,14 000 r·min⁻¹离心 15 min,取上清。蛋白浓度经 BCA 法测定后,将蛋白统一稀释为同一浓度,加入 5×Loading Buffer煮沸 5 min使蛋白变性。每孔上样蛋白 30 μg 进行 SDS-PAGE 电泳,半干转将蛋白转印至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜。5%脱脂奶粉封闭 1 h,1×TBST 洗涤 3 次(每次 10 min)。分别配制 Apaf1 (1: 800)、GSDME (1: 5 000)、PARP1 (1: 1 000)、Caspase-3 (1: 800)、Caspase-4 (1: 1 000)、Caspase-9 (1: 800)、cleaved Caspase-3 (1: 1 000)和 cleaved Caspase-9 (1: 1 000)一抗工作液,4 °C 孵育过夜。1×TBST 洗涤后,室温孵育二抗 1 h,1×TBST 洗涤 3 次。使用 ECL 显影液曝光检测条带灰度值。

2.15 数据分析 上述实验均重复 3 次,数据统计分析利用 GraphPad Prism 10.0 软件,对数据检验其正态性与方差齐性,正态分布数据的组间比较采用 one-way ANOVA 检验,不服从正态分布的数据采用 Mann-Whitney 检验。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 不同浓度/时间 OA 对 HepG2 细胞活力的影响

选择采用不同浓度 OA 干预 HepG2 细胞 12、24、48 h 后,通过 CCK-8 测定 OA 对 HepG2 细胞活力的影响,结果提示与空白组比较,OA 400~100 μmol·L⁻¹ 浓度组的 HepG2 细胞活力显著降低($P < 0.01$)。随着 OA 浓度逐渐升高,HepG2 细胞活力逐渐降低,见表 2。800 μmol·L⁻¹ 浓度的 OA 作用 24 h 时,细胞活力接近 50%,因此选取 800 μmol·L⁻¹ 浓度的 OA 作用 24 h 用于后续实验。

表 2 OA 对 HepG2 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effect of OA on viability of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	浓度/ μmol·L ⁻¹	细胞活力/%		
		12 h	24 h	48 h
空白组		99.15±6.46	99.65±10.71	100.16±5.20
OA 组	400	96.21±5.63	83.70±2.79 ¹⁾	61.44±6.17 ¹⁾
	600	81.79±7.69 ¹⁾	72.02±6.05 ¹⁾	44.28±4.38 ¹⁾
	800	75.16±5.07 ¹⁾	57.53±2.91 ¹⁾	35.25±1.89 ¹⁾
	1 000	65.31±7.43 ¹⁾	31.85±5.11 ¹⁾	22.05±0.89 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$ (表 3 和表 5 同)

3.2 不同浓度/时间涤痰汤含药血清对 HepG2 细胞活力的影响

选择采用不同浓度涤痰汤含药血清干预 HepG2 细胞 12、24、48 h 后,通过 CCK-8 测定涤痰汤含药血清对 HepG2 细胞活力的影响,结果提示与空白组比较,涤痰汤含药血清 5%~15% 体积分数组的 HepG2 细胞活力显著降低($P < 0.01$)。随着涤痰汤含药血清浓度逐渐升高,HepG2 细胞活力逐渐降低,见表 3。10% 体积分数的涤痰汤含药血清作用 24 h 时,细胞活力接近 50%,因此选取 10% 体积分数的涤痰汤含药血清作用 24 h 用于后续实验。

表 3 涤痰汤含药血清对 HepG2 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of DTD containing serum on viability of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	浓度/%	细胞活力/%		
		12 h	24 h	48 h
空白组		99.19±5.38	99.99±4.25	100.16±5.20
DTD 组	5	88.24±2.12 ¹⁾	84.87±3.92 ¹⁾	69.23±8.79 ¹⁾
	10	80.04±5.11 ¹⁾	57.83±3.59 ¹⁾	48.35±4.46 ¹⁾
	15	78.19±6.43 ¹⁾	46.74±5.21 ¹⁾	37.13±0.95 ¹⁾

3.3 不同浓度涤痰汤含药血清对 HepG2 细胞 TG 与 NEFA 水平的影响

选择采用不同浓度的空白血清或涤痰汤含药血清干预 HepG2 细胞 24 h 后,通过比色法测定涤痰汤含药血清对 HepG2 细胞 TG 与 NEFA 水平的影响,结果提示,与空白组比较,模型组 TG 与 NEFA 水平显著升高($P < 0.01$)。与 OA+SC 组比较,10% 和 15% 浓度 OA+DTD 组 TG 与 NEFA 水平显著降低($P < 0.01$),10% 浓度的涤痰汤含药血清作用 HepG2 细胞 24 h 时 TG 与 NEFA 水平最低,见表 4。

3.4 不同浓度/时间 ZYZ488 对 HepG2 细胞活力的影响

选择采用不同浓度 ZYZ488 干预 HepG2 细胞

表 4 涤痰汤含药血清对 HepG2 细胞 TG 与 NEFA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Effect of DTD containing serum on TG and NEFA levels in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	浓度/%	TG/mmol·g ⁻¹	NEFA/μmol·L ⁻¹
空白组		0.08±0.01	68.81±12.73
模型组		0.30±0.03 ¹⁾	429.83±6.39 ¹⁾
OA+SC 组	5	0.29±0.02	415.57±25.25
	10	0.29±0.02	423.33±24.94
	15	0.30±0.03	426.26±18.59
OA+DTD 组	5	0.28±0.01	233.27±27.12 ²⁾
	10	0.12±0.01 ²⁾	101.74±15.74 ²⁾
	15	0.16±0.03 ²⁾	231.59±16.13 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 OA+SC 组比较²⁾ $P < 0.01$

12、24、48 h后,通过CCK-8测定 ZYZ488对 HepG2 细胞活力的影响,结果提示与空白组比较,0.1~10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ZYZ488浓度组的 HepG2 细胞活力显著降低($P<0.01$)。随着 ZYZ488 浓度逐渐升高, HepG2 细胞活力逐渐降低,见表5。1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的 ZYZ488 作用 24 h 时,细胞活力接近 50%,因此选取 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的 ZYZ488 作用 24 h 用于后续实验。

3.5 涤痰汤含药血清对 HepG2 细胞脂质沉积的影响

与空白组比较,OA 组 TG 与 NEFA 水平显著升

表5 不同浓度 ZYZ488 对 HepG2 细胞活力的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Effect of different concentrations of ZYZ488 on viability of HepG2 cells ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	浓度 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞活力/%		
		12 h	24 h	48 h
空白组		104.84±4.27	100.88±6.44	100.98±7.63
ZYZ488 组	0.1	92.10±3.16 ¹⁾	83.33±1.79 ¹⁾	35.45±11.27 ¹⁾
	0.5	82.06±5.39 ¹⁾	72.35±4.07 ¹⁾	16.24±2.03 ¹⁾
	1	81.68±4.67 ¹⁾	56.60±5.18 ¹⁾	11.59±2.21 ¹⁾
	2.5	76.79±3.51 ¹⁾	48.92±2.23 ¹⁾	9.56±2.58 ¹⁾
	5	73.37±4.18 ¹⁾	43.77±2.48 ¹⁾	10.65±3.14 ¹⁾
	10	66.22±6.78 ¹⁾	37.97±3.56 ¹⁾	4.84±2.71 ¹⁾

高($P<0.01$),且 HepG2 肝细胞内脂滴明显聚积,提示脂质沉积肝细胞造模成功;与 OA 组比较,OA+ZYZ488 组 TG 与 NEFA 水平显著降低($P<0.01$),肝细胞内脂滴沉积明显改善,提示 ZYZ488 可显著抑制 HepG2 细胞脂质沉积;而与 OA 组比较,SC 组变化差异无统计学意义,提示空白血清对肝细胞脂质沉积无改善作用;与 OA+SC 组比较,OA+DTD 组 HepG2 细胞 TG 与 NEFA 水平均显著降低($P<0.01$),肝细胞内脂滴聚积明显改善,提示涤痰汤含药血清可显著抑制 HepG2 细胞脂质沉积。见表6、图1。

表6 涤痰汤对脂质沉积 HepG2 细胞 TG 与 NEFA 水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of DTD on TG and NEFA levels in HepG2 cells with lipid deposition ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度	TG/ $\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$	NEFA/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
空白组		0.07±0.00	68.81±12.73
OA 组		0.29±0.03 ¹⁾	450.81±36.69 ¹⁾
OA+SC 组	10%	0.29±0.01	442.84±36.47
OA+DTD 组	10%	0.12±0.01 ³⁾	101.74±15.74 ³⁾
OA+ZYZ488 组	1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.08±0.02 ²⁾	76.57±35.78 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与 OA 组比较²⁾ $P<0.01$;与 OA+SC 组比较³⁾ $P<0.01$ (表7-表11、表13同)

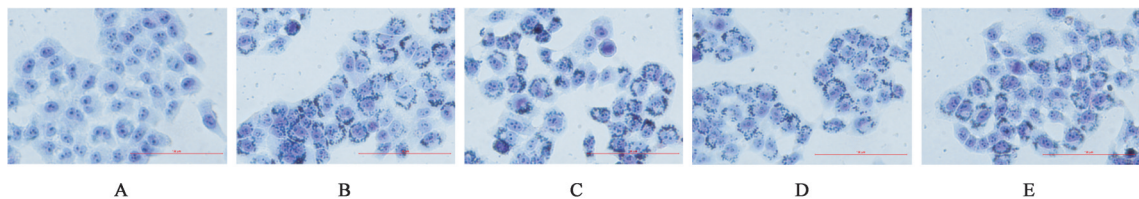


图1 涤痰汤对 OA 诱导的 HepG2 细胞脂滴聚集的影响 (油红 O, Scale bar=100 μm)

Fig. 1 Effect of DTD on lipid droplet aggregation in HepG2 cells induced by OA (Oil Red O, Scale bar=100 μm)

3.6 涤痰汤含药血清对脂质沉积 HepG2 细胞 MPTP 开放的影响 与空白组比较,OA 组绿色荧光显著降低($P<0.01$),提示 MPTP 过度开放;与 OA 组比较,OA+ZYZ488 组绿色荧光显著升高($P<0.01$),提示 MPTP 的过度开放得以改善;而与 OA 组比较,SC 组变化差异无统计学意义,提示空白血清对肝细胞的 MPTP 过度开放无改善作用;与 OA+SC 组比较,OA+DTD 组绿色荧光显著升高($P<0.01$),提示 MPTP 的过度开放得以改善。见图2、表7。

3.7 涤痰汤含药血清对脂质沉积 HepG2 细胞线粒体膜电位的影响 JC-1 的荧光特性具有膜电位依赖性:高膜电位条件下,JC-1 以多聚体形式在线粒体基质中呈现红色荧光;低膜电位条件下,JC-1 多聚体解离为单体,荧光信号转变为绿色。这种红绿

荧光的变化可反映线粒体膜电位状态。本研究结果显示,与空白组比较,OA 组红色荧光显著降低($P<0.01$),绿色荧光显著升高($P<0.01$),提示 JC-1 由多聚体转变为单体形式存在于线粒体基质中,线粒体膜电位降低;与 OA 组比较,OA+ZYZ488 组红色荧光显著升高($P<0.01$),绿色荧光显著降低($P<0.01$),提示 JC-1 由单体转变为多聚体形式存在于线粒体基质中,线粒体膜电位升高;而与 OA 组比较,SC 组变化差异无统计学意义,提示空白血清对肝细胞线粒体膜电位无改善作用;与 OA+SC 组比较,OA+DTD 组红色荧光显著升高($P<0.01$),绿色荧光显著降低($P<0.01$),提示 JC-1 由单体转变为多聚体形式存在于线粒体基质中,线粒体膜电位升高,见图3、表8。

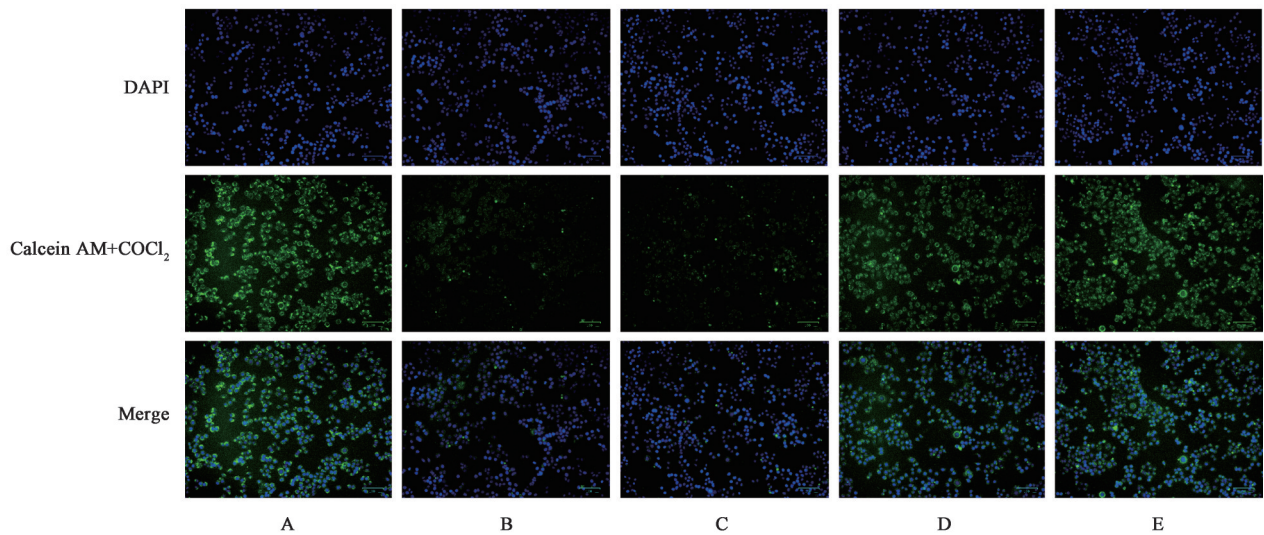


图2 涤痰汤对OA诱导的HepG2细胞MPTP的影响(Calcein AM荧光探针染色, Scale bar=100 μm)

Fig. 2 Effect of DTD on MPTP in HepG2 cells induced by OA (Calcein AM Fluorescent Probe Staining, Scale bar=100 μm)

表7 涤痰汤对OA诱导的HepG2细胞MPTP的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Effect of DTD on MPTP in HepG2 cells induced by OA ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度	平均荧光强度
空白组		118.69±2.94
OA组		63.54±1.90 ¹⁾
OA+SC组	10%	63.16±2.43
OA+DTD组	10%	82.75±1.51 ³⁾
OA+ZYZ488组	1 μmol·L ⁻¹	94.27±3.39 ²⁾

表8 涤痰汤对OA诱导的HepG2细胞线粒体膜电位的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 8 Effect of DTD on mitochondrial membrane potential in HepG2 cells induced by OA ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度	绿色平均荧光强度	红色平均荧光强度
空白组		18.61±3.93	190.18±2.42
OA组		134.92±3.88 ¹⁾	104.76±2.32 ¹⁾
OA+SC组	10%	134.48±4.51	106.47±2.82
OA+DTD组	10%	66.12±1.51 ³⁾	167.13±5.39 ³⁾
OA+ZYZ488组	1 μmol·L ⁻¹	56.04±4.19 ²⁾	166.91±0.95 ²⁾

3.8 涤痰汤含药血清对脂质沉积HepG2细胞LDH释

放的影响 与空白组比较, OA组LDH水平显著升高

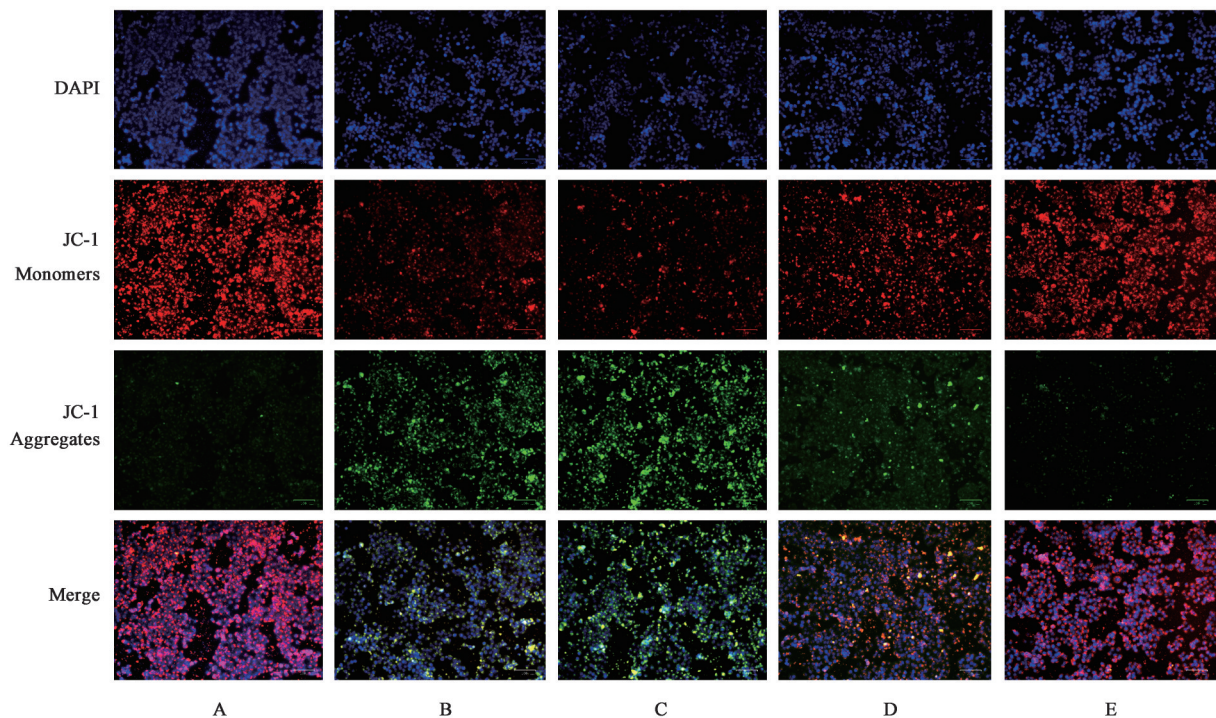


图3 涤痰汤对OA诱导的HepG2细胞线粒体膜电位的影响(JC-1荧光探针染色, Scale bar=100 μm)

Fig. 3 Effect of DTD on mitochondrial membrane potential in HepG2 cells induced by OA (JC-1 Fluorescent Probe Staining, Scale bar=100 μm)

($P<0.01$);与OA组比较,OA+ZYZ488组LDH水平显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$);而与OA组比较,SC组变化差异无统计学意义;与OA+SC组比较,OA+DTD组HepG2细胞LDH水平均显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。见表9。

表9 涤痰汤对OA诱导的HepG2细胞LDH水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 9 Effect of DTD on level of LDH in HepG2 cells induced by OA ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度	LDH/U·L ⁻¹
空白组		14.55±5.07
OA组		125.70±1.90 ¹⁾
OA+SC组	10%	123.30±0.79
OA+DTD组	10%	88.07±3.60 ³⁾
OA+ZYZ488组	1 μmol·L ⁻¹	87.90±1.67 ²⁾

3.9 涤痰汤含药血清对脂质沉积HepG2细胞凋亡/焦亡的影响 与空白组比较,OA组凋亡与焦亡细胞数目显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$);与OA组比较,OA+ZYZ488组凋亡与焦亡细胞数目显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$);而与OA组比较,SC组变化差异无统计学意义;与OA+SC组比较,OA+DTD组HepG2细胞凋亡与焦亡细胞数目均显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。见增强出版附加材料。

3.10 涤痰汤含药血清对脂质沉积HepG2细胞IL-1β与IL-18水平的影响 与空白组比较,OA组IL-1β与IL-18水平显著升高($P<0.01$);与OA组比

较,OA+ZYZ488组IL-1β与IL-18水平显著降低($P<0.01$);而与OA组比较,SC组变化差异无统计学意义;与OA+SC组比较,OA+DTD组HepG2细胞IL-1β与IL-18水平均显著降低($P<0.01$)。见表10。

表10 涤痰汤对OA诱导的HepG2细胞IL-1β与IL-18水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 10 Effect of DTD on level of IL-1β and IL-18 in HepG2 cells induced by OA ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度	IL-1β	IL-18
空白组		36.27±0.971	583.91±3.28
OA组		56.84±2.29 ¹⁾	966.09±3.62 ¹⁾
OA+SC组	10%	56.93±1.56	963.61±2.92
OA+DTD组	10%	47.70±0.75 ³⁾	859.67±3.44 ³⁾
OA+ZYZ488组	1 μmol·L ⁻¹	41.26±1.04 ²⁾	819.76±3.94 ²⁾

3.11 涤痰汤含药血清对脂质沉积HepG2细胞Apaf1表达的影响 与空白组比较,OA组绿色荧光显著升高($P<0.01$),提示脂质沉积肝细胞Apaf1表达显著升高;与OA组比较,OA+ZYZ488组绿色荧光显著降低($P<0.01$),提示ZYZ488抑制了脂质沉积肝细胞Apaf1表达;而与OA组比较,SC组变化差异无统计学意义,提示空白血清对脂质沉积肝细胞Apaf1表达无影响;与OA+SC组比较,OA+DTD组绿色荧光显著降低($P<0.01$),提示DTD抑制了脂质沉积肝细胞Apaf1的表达。见图4、表11。

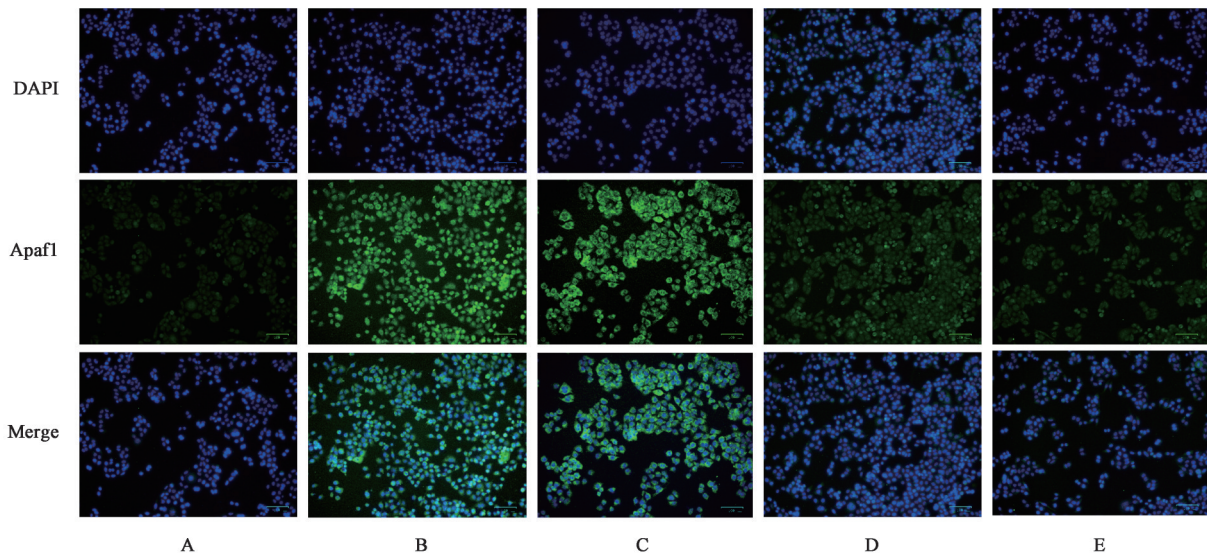


图4 涤痰汤对OA诱导的HepG2细胞Apaf1表达的影响(免疫荧光, Scale bar=100 μm)

Fig. 4 Effect of DTD on Apaf1 expression in HepG2 cells induced by OA (IF, Scale bar=100 μm)

3.12 涤痰汤含药血清对脂质沉积HepG2细胞Apaf1感知MPT介导细胞凋亡关键基因的影响 与

空白组比较,OA组Apaf1、Caspase-9、Caspase-3、PARP1基因与蛋白相对表达显著升高($P<0.01$),提

表 11 涤痰汤对 OA 诱导的 HepG2 细胞 Apaf1 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 11 Effect of DTD on Apaf1 expression in HepG2 cells induced by OA ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度	平均荧光强度
空白组		23.86±2.57
OA 组		127.60±5.30 ¹⁾
OA+SC 组	10%	126.09±3.60
OA+DTD 组	10%	48.29±1.83 ³⁾
OA+ZYZ488 组	1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	37.83±2.17 ²⁾

示脂质沉积肝细胞 Apaf1 感知 MPT 介导细胞凋亡途径被激活;与 OA 组比较,OA+ZYZ488 组 Apaf1、Caspase-9、Caspase-3、PARP1 基因与蛋白相对表达显著降低($P<0.01$),提示 ZYZ488 抑制了脂质沉积肝细胞 Apaf1 感知 MPT 介导细胞凋亡;而与 OA 组比较,SC 组变化差异无统计学意义,提示空白血清对脂质沉积肝细胞 Apaf1 感知 MPT 介导细胞凋亡无影响;与 OA+SC 组比较,OA+DTD 组 Apaf1、Caspase-9、Caspase-3、PARP1 基因与蛋白相对表达明显降低($P<0.05, P<0.01$),提示 DTD 抑制了脂质沉积肝细胞 Apaf1 感知 MPT 介导细胞凋亡。见图 5、表 12、表 13。

3.13 涤痰汤含药血清对脂质沉积 HepG2 细胞 Apaf1 感知 MPT 介导细胞焦亡关键基因的影响 与空白组比较,OA 组 Apaf1、Caspase-4、Caspase-3、GSDME 基因与蛋白相对表达显著升高($P<0.01$),

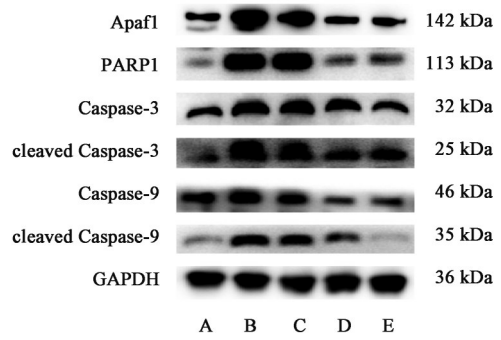


图 5 脂质沉积 HepG2 细胞 Apaf1 感知 MPT 介导细胞凋亡关键蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of protein expression of Apaf1 sensing MPT mediated apoptosis in HepG2 cells with lipid deposition

提示脂质沉积肝细胞 Apaf1 感知 MPT 介导细胞焦亡途径被激活;与 OA 组比较,OA+ZYZ488 组 Apaf1、Caspase-4、Caspase-3、GSDME 基因与蛋白相对表达显著降低($P<0.01$),提示 ZYZ488 抑制了脂质沉积肝细胞 Apaf1 感知 MPT 介导细胞焦亡;而与 OA 组比较,SC 组变化差异无统计学意义,提示空白血清对脂质沉积肝细胞 Apaf1 感知 MPT 介导细胞焦亡无影响;与 OA+SC 组比较,OA+DTD 组 Apaf1、Caspase-4、Caspase-3、GSDME 基因与蛋白相对表达显著降低($P<0.01$),提示 DTD 抑制了脂质沉积肝细胞 Apaf1 感知 MPT 介导细胞焦亡。见图 7、表 14、表 15。

4 讨论

肝脏脂质沉积是 MAFLD 的核心病理特征,研

表 12 涤痰汤对脂质沉积 HepG2 细胞 Apaf1 感知 MPT 介导细胞凋亡关键基因的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 12 Effect of DTD on key genes of Apaf1 perception MPT-mediated apoptosis in lipid-deposited HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度	Apaf1	PARP1	Caspase-3	Caspase-9
空白组		1.01±0.17	1.00±0.09	1.00±0.05	1.00±0.11
OA 组		1.59±0.04 ¹⁾	1.29±0.04 ¹⁾	1.23±0.04 ¹⁾	1.27±0.02 ¹⁾
OA+SC 组	10%	1.56±0.03	1.34±0.03	1.25±0.03	1.29±0.01
OA+DTD 组	10%	1.18±0.03 ⁴⁾	0.98±0.06 ⁴⁾	1.14±0.01 ³⁾	1.12±0.02 ³⁾
OA+ZYZ488 组	1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	1.10±0.03 ²⁾	1.06±0.04 ²⁾	0.96±0.05 ²⁾	1.05±0.02 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与 OA 组比较²⁾ $P<0.01$;与 OA+SC 组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表 14 同)

表 13 涤痰汤对脂质沉积 HepG2 细胞 Apaf1 感知 MPT 介导细胞凋亡关键蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 13 Effect of DTD on protein expression of Apaf1 sensing MPT mediated apoptosis in HepG2 cells with lipid deposition ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度	Apaf1 /GAPDH	PARP1 /GAPDH	Caspase-3 /GAPDH	cleaved-Caspase-3 /GAPDH	Caspase-9 /GAPDH	cleaved-Caspase-9 /GAPDH
空白组		0.37±0.02	0.10±0.01	0.33±0.01	0.26±0.01	0.57±0.01	0.13±0.02
OA 组		0.76±0.01 ¹⁾	0.61±0.05 ¹⁾	0.53±0.03 ¹⁾	0.65±0.05 ¹⁾	0.72±0.02 ¹⁾	0.55±0.03 ¹⁾
OA+SC 组	10%	0.77±0.03	0.63±0.06	0.52±0.01	0.64±0.03	0.74±0.04	0.55±0.04
OA+DTD 组	10%	0.39±0.03 ³⁾	0.15±0.01 ³⁾	0.37±0.03 ³⁾	0.40±0.03 ³⁾	0.56±0.03 ³⁾	0.34±0.02 ³⁾
OA+ZYZ488 组	1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.37±0.03 ²⁾	0.17±0.01 ²⁾	0.33±0.01 ²⁾	0.40±0.04 ²⁾	0.51±0.02 ²⁾	0.11±0.01 ²⁾

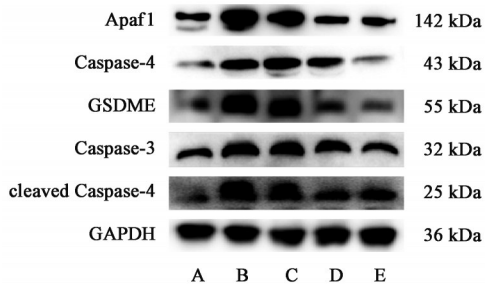


图7 脂质沉积 HepG2 细胞 Apaf1 感知 MPT 介导细胞焦亡关键蛋白表达电泳

Fig. 7 Electrophoresis of protein expression of Apaf1 sensing MPT mediated pyroptosis in HepG2 cells with lipid deposition

究肝脏脂质沉积不仅是理解 MAFLD 发病机制的关键,更是开发有效治疗手段的基础。本研究确定了 $800 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 OA 作用于 HepG2 细胞能够诱导肝细胞脂质沉积,这一结果与课题组前期研究结果一致^[17]。涤痰汤作为传统中医经典方剂,首载于明代《奇效良方》,由法半夏、茯苓、胆南星等 9 味药材组成。研究表明人参、茯苓、陈皮与甘草的有效成分具有抗肝脏脂质沉积作用^[18-21]。课题组前期研究发现加味涤痰汤可有效改善大鼠肝脏脂质沉积^[3]。本研究通过油红 O 染色、TG 与 NEFA 水平检测提示 10% 浓度的涤痰汤含药血清能够显著抑制 OA 诱导的肝细胞脂质沉积,这一结果与体内实验相佐证^[3]。

在肝脏脂质沉积的发生发展中,细胞凋亡与细胞焦亡是 2 种重要的程序性细胞死亡形式,共同参与肝细胞损伤、炎症反应和疾病进展。细胞焦亡作

为炎症反应模式,会促使大量炎症介质释放,从而加剧肝脏的炎症进程并促进肝脏纤维化^[22]。细胞凋亡可由 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^[23],肝细胞可通过产生凋亡相关细胞因子,促进 MAFLD 进展^[24]。线粒体是感知各种刺激并由此控制细胞命运的中心枢纽。通常线粒体膜是不可渗透的,低分子量溶质由于生理或病理刺激而瞬间流过线粒体膜,称为 MPT。MPT 会导致线粒体通透性变化,最终导致线粒体膜电位耗散、细胞器肿胀和细胞死亡发生^[25]。该过程与多种疾病密切相关^[26-29],而 MPT 在肝脏脂质沉积中调控的下游机制不甚清晰,因此本研究探讨了 MPT 在肝细胞脂质沉积中的作用。MPT 激活 Apaf1, Apaf1 招募并激活 Caspase-4。在 Apaf1 焦亡小体中激活的 Caspase-4 切割 Caspase-3,其进一步激活 GSDME 以引发焦亡^[30]。研究证实 MPT 激活使线粒体内膜通透性改变使得 Cyt-c 从线粒体释放到细胞质, Cyt-C 的释放是线粒体凋亡的重要信号,可激活 Caspase-3/Caspase-9,裂解 PARP1 从而诱导细胞凋亡发生^[31]。本研究对细胞 MPT 开放、线粒体膜电位的多维检测结果表明,脂质沉积肝细胞 MPT 过度开放,而涤痰汤含药血清可改善脂质沉积肝细胞 MPT 的开放。同时,发现在脂质沉积肝细胞中 Apaf1 介导的凋亡与焦亡被显著激活,而涤痰汤含药血清干预后 Apaf1 介导的凋亡与焦亡均被抑制。本研究存在一定的局限性。首先,

表 14 涤痰汤对脂质沉积 HepG2 细胞 Apaf1 感知 MPT 介导细胞焦亡关键基因的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 14 Effect of DTD on key genes of Apaf1 perception MPT-mediated pyroptosis in lipid-deposited HepG2 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度	Apaf1	Caspase-4	Caspase-3	GSDME
空白组		1.01±0.17	1.00±0.08	1.00±0.05	1.00±0.07
OA 组		1.59±0.04 ¹⁾	1.31±0.05 ¹⁾	1.23±0.04 ¹⁾	1.54±0.05 ¹⁾
OA+SC 组	10%	1.56±0.03	1.30±0.04	1.25±0.03	1.48±0.03
OA+DTD 组	10%	1.18±0.03 ⁴⁾	1.12±0.02 ⁴⁾	1.14±0.01 ³⁾	1.24±0.01 ³⁾
OA+ZYZ488 组	1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	1.10±0.03 ²⁾	1.03±0.02 ²⁾	0.96±0.05 ²⁾	1.08±0.03 ²⁾

表 15 涤痰汤对脂质沉积 HepG2 细胞 Apaf1 感知 MPT 介导细胞焦亡关键蛋白的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 15 Effect of DTD on protein expression of Apaf1 sensing MPT mediated pyroptosis in HepG2 cells with lipid deposition ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度	Apaf1 /GAPDH	Caspase-4 /GAPDH	GSDME /GAPDH	Caspase-3 /GAPDH	cleaved-Caspase-3 /GAPDH
空白组		0.37±0.02	0.18±0.00	0.17±0.01	0.33±0.01	0.26±0.01
OA 组		0.76±0.01 ¹⁾	0.57±0.02 ¹⁾	0.65±0.02 ¹⁾	0.53±0.03 ¹⁾	0.65±0.05 ¹⁾
OA+SC 组	10%	0.77±0.03	0.59±0.01	0.65±0.03	0.52±0.01	0.64±0.03
OA+DTD 组	10%	0.39±0.03 ³⁾	0.41±0.03 ³⁾	0.39±0.02 ³⁾	0.37±0.03 ³⁾	0.40±0.03 ³⁾
OA+ZYZ488 组	1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.37±0.03 ²⁾	0.16±0.02 ²⁾	0.28±0.02 ²⁾	0.33±0.01 ²⁾	0.40±0.04 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与 OA 组比较²⁾ $P<0.01$;与 OA+SC 组比较³⁾ $P<0.01$

研究主要基于HepG2细胞系,后续将在原代肝细胞及体内模型中进一步验证。其次,尽管本研究确认了涤痰汤对Apaf1通路的影响,但其具体调控过程仍有待明确,相关验证工作正在开展。

综上所述,本文研究了涤痰汤体外对脂质沉积肝细胞的药效作用及Apaf1感知MPT介导细胞凋亡与焦亡的调控机制,为肝脏脂质沉积的发病机制提供了新的理论依据,为中药复方的作用机制研究提供了科学支撑。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 范建高,杨荣. 全球非酒精性脂肪性肝病的流行趋势与疾病负担[J]. 中华消化杂志, 2023, 43(4): 248-252.
FAN J G, YANG R. Global prevalence trends and disease burden of non-alcoholic fatty liver disease[J]. Chin J Dig, 2023, 43(4): 248-252.

[2] SHOJAIE L, IORGA A, DARA L. Cell death in liver diseases: A review[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(24): 9682.

[3] 刘诗卉,李冬冬,张宏坤,等. 细胞死亡在NAFLD发生发展中的研究进展[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2024, 45(16): 1578-1582.
LIU S H, LI D D, ZHANG H K, et al. Research advances on cell death in the development of non-alcoholic fatty liver disease[J]. J Qiqihar Med Univ, 2024, 45(16): 1578-1582.

[4] SCHWABE RF, LUEDDE T. Apoptosis and necroptosis in the liver: A matter of life and death[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2018, 15(12): 738-752.

[5] 吕文秀,吴文韬,郑士梅,等. 姜黄素抑制顺铂诱导人肾小管上皮细胞系HK-2凋亡[J]. 基础医学与临床, 2018, 38(2): 185-188.
LV W X, WU W T, ZHENG S M, et al. Curcumin inhibits apoptosis of HK-2 cell line induced by cisplatin[J]. Basic Clin Med, 2018, 38(2): 185-188.

[6] LI S J, LIU A B, YU Y Y, et al. The role and mechanism of pyroptosis and potential therapeutic targets in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)[J]. Front Cell Dev Biol, 2024, 12: 1407738.

[7] XU H L, WAN S R, AN Y, et al. Targeting cell death in NAFLD: Mechanisms and targeted therapies[J]. Cell Death Discov, 2024, 10(1): 399.

[8] XU W, CHE Y, ZHANG Q, et al. Apaf-1 pyroptosome senses mitochondrial permeability transition[J]. Cell Metab, 2021, 33(2): 424-436.

[9] 唐辉,肖仔君,蒋鑫炜,等. 高糖应激促脂肪变性肝细胞凋亡的线粒体机制[J]. 中国病理生理杂志, 2016, 32(8): 1419-1424.
TANG H, XIAO Z J, JIANG X W, et al. Mitochondrial mechanism of hyperglycemia-induced apoptosis in primary mouse hepatocytes with steatosis[J]. Chin J Pathophysiol,

2016, 32(8): 1419-1424.

[10] 隆晓荣,袁宁,陶然,等. 中医药治疗非酒精性脂肪性肝病的研究进展[J]. 中西医结合肝病杂志, 2023, 33(9): 860-864.
LONG X R, YUAN N, TAO R, et al. Research advances in traditional Chinese medicine treatment for non-alcoholic fatty liver disease[J]. Chin J Integr Tradit West Med Liver Dis, 2023, 33(9): 860-864.

[11] 庞智文,刘玉,宋囡,等. 加味涤痰汤对非酒精性脂肪肝病大鼠生物节律相关基因的影响及机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(6): 115-124.
PANG Z W, LIU Y, SONG N, et al. Modified Ditan Tang regulates biorhythm-related genes in rat model of non-alcoholic fatty liver disease[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2025, 31(6): 115-124.

[12] 张援,杨卓,王群,等. 涤痰汤调控PPAR γ -LXR-ABCA1/ABCG1通路介导胆固醇流出改善非酒精性脂肪肝的机制研究[J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(11): 111-115, 281.
ZHANG Y, YANG Z, WANG Q, et al. Mechanism of regulating cholesterol outflow mediated by PPAR γ -LXR-ABCA1/ABCG1 pathway by Ditan decoction to improve nonalcoholic fatty liver disease[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2023, 41(11): 111-115, 281.

[13] 程美佳,袁常斌,鞠业涛,等. 涤痰汤通过调节IKB/NF- κ B通路和细胞凋亡抑制阿尔茨海默病小鼠Tau蛋白过度磷酸化[J]. 时珍国医国药, 2024, 35(2): 270-274.
CHENG M J, YUAN C B, JU Y T, et al. Ditan decoction inhibits Tau protein hyperphosphorylation in mice with Alzheimer's disease by regulating IKB/NF- κ B pathway and apoptosis[J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2024, 35(2): 270-274.

[14] 赵培彰,杨桢,何湛湛,等. 人参干预动脉粥样硬化中细胞焦亡的作用机制探讨[J]. 中国中医基础医学杂志, 2024, 30(7): 1240-1246.
ZHAO P Z, YANG Z, HE Z Z, et al. Study on mechanism of ginseng regulating pyroptosis in atherosclerosis[J]. J Basic Chin Med, 2024, 30(7): 1240-1246.

[15] 杨莹,曹媛,赵佼,等. 茯苓多糖通过SQLE/NLRP3/GSDMD信号通路调控肝癌细胞焦亡[J]. 中国病理生理杂志, 2024, 40(3): 444-455.
YANG Y, CAO Y, ZHAO J, et al. Pachymaran regulates pyroptosis of liver cancer cells via SQLE/NLRP3/GSDMD signaling pathway[J]. Chin J Pathophysiol, 2024, 40(3): 444-455.

[16] 陈娟娟. 石菖蒲调控JAK2/STAT3信号通路抑制bEnd. 3细胞焦亡和炎症的机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2023.

[17] CHEN J J. The study on mechanism of Rhizoma Acori Tatarinowii regulating JAK2/STAT3 signaling pathway to inhibit pyroptosis and inflammation in bEnd. 3 cells[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2023.

[17] ZHU J, SONG N, WANG J, et al. Mechanism of action of Danlou tablets affecting MAFLD via KEAP1-mediated

- oxeiptosis[J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 344: 119521.
- [18] 张黎,李燕. 人参皂苷 Rg₁ 调控 lncRNA NEAT1 对非酒精性脂肪肝脂质代谢和细胞炎症的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2024, 44(14): 3479-3483.
ZHANG L, LI Y. Effects of ginsenoside Rg₁ on lipid metabolism and cellular inflammation in nonalcoholic fatty liver by regulating lncRNA NEAT1 [J]. *Chin J Gerontol*, 2024, 44(14): 3479-3483.
- [19] 禹红,刘星,张凡雄,等. 茯苓多糖调控 AMPK 信号通路干预脂质代谢改善非酒精性脂肪性肝病的机制研究[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2025, 35(4): 438-443.
YU H, LIU X, ZHANG F X, et al. The mechanism of Pachyman ameliorating nonalcoholic fatty liver disease by regulating AMPK signaling pathway and lipid metabolism [J]. *Chin J Integr Tradit West Med Liver Dis*, 2025, 35(4): 438-443.
- [20] 陈耿锐. 陈皮多糖通过抑制炎症和内质网应激缓解非酒精性脂肪性肝病的机制研究[D]. 江门: 五邑大学, 2023.
CHEN GR. Study on the mechanism of Tangerine peel polysaccharide alleviating nonalcoholic fatty liver disease by suppressing inflammation and endoplasmic reticulum stress [D]. Jiangmen: Wuyi University, 2023.
- [21] 吴琼. 甘草粗多糖对非酒精性脂肪肝大鼠的保护作用[D]. 银川: 宁夏医科大学, 2019.
WU Q. Hepatoprotective effects of crude *Glycyrrhiza uralensis* polysaccharide on non-alcoholic fatty liver disease in rats[D]. Yinchuan: Ningxia Medical University, 2019.
- [22] FENG Y, LI W, WANG Z, et al. The p-STAT3/ANXA2 axis promotes Caspase-1-mediated hepatocyte pyroptosis in non-alcoholic steatohepatitis[J]. *J Transl Med*, 2022, 20(1): 497.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] YANG L, ZHANG Z, XU M, et al. Constructing a prognostic model based on MPT-related genes and investigate the characteristics of immune infiltration in bladder cancer [J]. *Discov Oncol*, 2025, 16(1): 460.
- [26] 何萍. 纳米钙螯合靶向调控线粒体通透性转换孔减轻牙周炎的研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2023.
HE P. Mitochondrial calcium ion nanogluttons alleviate periodontitis via controlling mPTPs [D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2023.
- [27] 王陵军,洗绍祥,高梦夕,等. 益气温阳活血法对心力衰竭大鼠心肌细胞线粒体通透性转变的影响[J]. *中药新药与临床药理*, 2014, 25(3): 276-279.
WANG L J, XIAN S X, GAO M X, et al. Therapy of benefiting Qi, warming yang and activating blood in inhibiting mitochondrial permeability transition in cardiomyocytes of heart failure rats[J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*, 2014, 25(3): 276-279.
- [28] XIAO Q, ZHONG B, HOU Y, et al. Fighting cancer by triggering non-canonical mitochondrial permeability transition-driven necrosis through reactive oxygen species induction[J]. *Free Radic Biol Med*, 2023, 202: 35-45.
- [29] LIU J, WEI T, QUAN L, et al. Identification and multi-dimensional validation of mitochondrial permeability transition-driven necrosis-related model to assess the prognosis and immunotherapy value in breast cancer[J]. *Eur J Med Res*, 2025, 30(1): 113.
- [30] XU W, CHE Y, ZHANG Q, et al. Apaf-1 pyroptosome senses mitochondrial permeability transition [J]. *Cell Metab*, 2021, 33(2): 424-436.
- [31] 金曼,吴娟,黎笔熙. 线粒体膜通透性转换孔在细胞凋亡中的作用[J]. *医学研究生学报*, 2019, 32(11): 1222-1227.
JIN M, WU J, LI B X. The role of mitochondrial membrane permeability transition pore in apoptosis[J]. *J Med Postgrad*, 2019, 32(11): 1222-1227.

[责任编辑 顾雪竹]