

# 古方黄芪散调控 AMPK/mTOR 自噬信号通路改善 肝脏脂肪变性的机制

冯雯敏, 苏安宇, 黄小玲, 王春怡\*  
(广州中医药大学 中药学院, 广州 510006)

**[摘要]** 目的: 基于腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路, 探讨古方黄芪散调节自噬减轻小鼠肝脏脂肪变性改善非酒精性脂肪肝(NAFLD)的作用机制。方法: 通过数据库收集黄芪散主要化学成分及NAFLD相关靶点, 对交集靶点进行基因本体(GO)分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路富集分析、构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络, 并进行体内实验验证。雄性C57BL/6J小鼠60只, 适应性喂养1周后随机分为正常组、模型组、二甲双胍组(0.25 g·kg<sup>-1</sup>)、黄芪散低、高剂量组(0.5、1 g·kg<sup>-1</sup>), 每组12只。采用高脂饮食(HFD)诱导小鼠NAFLD模型, 造模的同时灌胃给药13周, 每天1次。通过检测随机血糖、血清中总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、游离脂肪酸(NEFA)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平和肝脏中TG含量; 称量肝脏湿重并计算肝指数; 采用苏木素-伊红(HE)染色、油红O染色、透射电子显微镜(TEM)、实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)对C57BL/6J小鼠进行动物体内药效验证和机制探讨。结果: 通过网络药理学分析, 结合前期研究基础, 预测黄芪散可能通过AMPK/mTOR自噬信号通路改善NAFLD。体内实验结果表明, 与正常组比较, 模型组小鼠随机血糖、体质量、血清中TC、LDL-C和NEFA、肝脏湿重、肝指数和肝脏TG含量显著升高( $P < 0.01$ ), 小鼠肝脏增大, HE染色可见小鼠肝脏脂滴(LDs)大量空泡化, 油红O染色显示肝细胞脂肪堆积, 透射电镜未见明显自噬体和自噬溶酶体, 微管相关蛋白1轻链3(LC3)A、LC3B、AMPK $\alpha$ 1 mRNA表达和AMPK、磷酸化(p)-AMPK、p-AMPK/AMPK蛋白表达显著下调( $P < 0.01$ ), LC3 II/I、p-mTOR蛋白水平显著上调( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 黄芪散低、高剂量组小鼠体质量、肝脏湿重、血清TG、NEFA水平明显降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), HE染色和油红O染色显示肝脏病理改变得到改善, 肝脏透射电镜可见少量自噬溶酶体和自噬小体; 黄芪散低剂量组肝指数显著降低( $P < 0.01$ ), 黄芪散高剂量组随机血糖、血清TC水平、肝脏TG含量明显降低( $P < 0.05$ ); Western blot和Real-time PCR结果显示, 黄芪散低、高剂量组LC3A、LC3B mRNA和LC3 II/I、p-AMPK、p-AMPK/AMPK蛋白表达显著上调( $P < 0.01$ ), p62 mRNA和p62、p-mTOR蛋白表达明显下调( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。结论: 黄芪散可能通过AMPK/mTOR信号通路促进自噬和恢复自噬通量, 减轻肝脏脂肪变性, 从而改善NAFLD。

**[关键词]** 黄芪散; 非酒精性脂肪肝; 网络药理学; 腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR); 自噬

**[中图分类号]** R2-0; R22; R285.5; R289; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)10-0021-10

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20230705 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20230222.1708.003.html>

**[网络出版日期]** 2023-02-23 10:34:27

## Mechanism of Huangqisan Regulating Autophagy by AMPK/mTOR Signaling Pathway Against Hepatic Steatosis

FENG Wenmin, SU Anyu, HUANG Xiaoling, WANG Chunyi\*  
(School of Pharmaceutical Science, Guangzhou University of Chinese Medicine,  
Guangzhou 510006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the mechanism of Huangqisan (HQS) in regulating autophagy to

**[收稿日期]** 2022-12-21

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金项目(81503375)

**[第一作者]** 冯雯敏, 在读硕士, 从事中药复方防治代谢性疾病的作用机制研究, E-mail: fungmanman@163.com

**[通信作者]** \* 王春怡, 副教授, 硕士生导师, 从事代谢性疾病中药复方药效物质基础及作用机制研究, E-mail: wangchunyi@gzucm.edu.cn

alleviate hepatic steatosis and improve non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) based on adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase (AMPK)/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway. **Method:** The main chemical components and targets of HQS and NAFLD-related targets were collected from database and the intersection targets were used for Gene Ontology (GO) functional enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis. The protein-protein interaction (PPI) network was constructed, and *in vivo* experimental verification was conducted. Sixty C57BL/6J male mice were randomly divided into normal control group (NCD), model group high-fat diet (HFD), metformin group (MET, 0.25 g·kg<sup>-1</sup>), low-dose Huangqisan group (HQS-L, 0.5 g·kg<sup>-1</sup>), and the high-dose Huangqisan group (HQS-H, 1 g·kg<sup>-1</sup>), with 12 mice in each group after a one-week acclimatization period. NAFLD model was induced by HFD, and intragastric administration was performed at the same time, once a day for 13 weeks. Random blood glucose, serum total cholesterol (TC), triglyceride (TG), non-esterified fatty acid (NEFA), low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) levels, and liver TG content were determined. The liver weight was weighed, and liver index was calculated. Hematoxylin-eosin (HE) staining, oil red O staining, transmission electron microscope (TEM), real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR), and Western blot were used to verify the effect and reveal the potential mechanism of C57BL/6J mice *in vivo*. **Result:** Through network pharmacology analysis, combined with previous studies, it was predicted that HQS may improve NAFLD by regulating autophagy via the AMPK/mTOR signaling pathway. The result of *in vivo* experiment showed that, as compared with NCD group, random blood glucose, body weight, serum TC, LDL-C, NEFA, liver weight, liver index, and liver TG content of mice in the HFD groups were significantly increased ( $P<0.01$ ). HE staining showed massive lipid droplets (LDs) vacuolated, oil red O staining showed lipid accumulation in liver cells, and no obvious autophagosomes and autolysosome were observed under TEM. The relative mRNA expression of LC3A, LC3B, AMPK $\alpha$ 1 and protein expression of AMPK, phosphorylated (p)-AMPK, and p-AMPK/AMPK were significantly down-regulated ( $P<0.01$ ), while the protein expression of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) II/I and p-mTOR was significantly up-regulated ( $P<0.01$ ). As compared with HFD groups, liver weight, serum TG, and NEFA levels in HQS-L and HQS-H groups were significantly decreased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). HE staining and oil red O staining showed the improvement of liver pathological changes after HQS administration. Under TEM, a small amount of autophagosome and autolysosome were observed. Besides, liver index was significantly decreased in the HQS-L group ( $P<0.01$ ), and random blood glucose, serum TC level and liver TG content were significantly decreased in the HQS-H group ( $P<0.05$ ). The results of Western blot and Real-time PCR showed that the mRNA expression of LC3A and LC3B and the protein expression of LC3 II/I, p-AMPK, and p-AMPK/AMPK were significantly up-regulated ( $P<0.01$ ), while the mRNA expressions of p62 and protein expression of p62 and p-mTOR were significantly down-regulated ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). **Conclusion:** HQS may promote autophagy and restore autophagy flux via the AMPK/mTOR signaling pathway to alleviate hepatic steatosis improving NAFLD.

**[Keywords]** Huangqisan; non-alcoholic fatty liver disease; network pharmacology; adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase (AMPK)/mammalian target of rapamycin (mTOR); autophagy

非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)影响着世界上30%以上的人口<sup>[1]</sup>,其特征是除了酒精和其他对肝脏有明显损害的致病因素造成的肝损伤外,脂滴在肝脏过量沉积<sup>[2]</sup>。随着生活水平的提高,久坐的生活方式和西方饮食导致NAFLD发病率逐年呈上升趋势。然而,NAFLD作用机制复杂,目前还没有针对NAFLD的有效治疗药物,改变生活方式和控制

饮食作为主要的治疗方法具有患者依从性差的缺点<sup>[3]</sup>。尽管胰岛素增敏剂和抗氧化剂等药物具有一定的疗效,但仍有恶心、呕吐、腹泻等不良反应<sup>[4-8]</sup>。因此,寻找治疗NAFLD的有效药物迫在眉睫。

黄芪散(HQS)为经典中药古方,始记于宋代《圣济总录》,在明朝被转录于《普济方》(卷180)消渴门。HQS由3味传统中药组成:Astragalus

*membranaceus* var. *mongholicus* (黄芪, HQ)、*Morus alba* (桑白皮, SBP)和*Pueraria lobata* (葛根, GG),以1:2:1的比例组成,用于治疗消渴症—即现代医学体系中的2型糖尿病(T2DM)<sup>[9]</sup>。有研究证据表明,T2DM是NAFLD的独立危险因素<sup>[10]</sup>。前期的研究验证了HQS对T2DM的基本疗效<sup>[11]</sup>:HQS可以有效改善高脂饮食(HFD)联合链脲佐菌素(STZ)诱导的T2DM小鼠和大鼠的胰岛素抵抗<sup>[12-14]</sup>,同时还可以有效改善HFD诱导大鼠的血脂异常,减轻肝脏脂肪变性<sup>[15-17]</sup>,其作用机制与调节腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)信号通路有关。

近年来,AMPK/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路介导的自噬被认为是一种重要的保护机制,可能是治疗NAFLD的一种新策略。结合前期研究基础,可以推测AMPK/mTOR自噬信号通路可能是HQS改善NAFLD肝脏脂肪变性的重要机制之一。本研究中,首先通过网络药理学分析挖掘HQS改善NAFLD的潜在作用靶点,获得其对假说的生物信息学理论支撑,继而采用HFD诱导的脂肪肝小鼠模型,验证HQS对HFD诱导的脂肪肝小鼠模型肝脏自噬及AMPK/mTOR信号通路的影响,探讨其对改善肝脏脂肪变性的作用机制。该研究为阐明古方黄芪散的临床应用及成方制剂的研发提供实验依据。

## 1 网络药理学分析方法

**1.1 黄芪散活性成分及相关靶点筛选** 通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)(<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)寻找黄芪、桑白皮和葛根3味中药的主要活性成分和相应靶点。经过文献研究,本研究选择口服生物利用度(OB)≥30%和类药性(DL)≥18%作为HQS主要活性成分初步筛选的条件。利用Uniprot蛋白质数据库(<https://www.uniprot.org/>)将化合物作用的蛋白质靶点标准化为对应的基因Symbol。

**1.2 非酒精性脂肪肝病相关靶点筛选** 以“non-alcoholic fatty liver disease”为关键词,挖掘OMIM(<https://www.omim.org/>)、TTD(<https://db.idrblab.net/ttd/>)和GeneCard(<https://www.genecards.org/>)数据库中与NAFLD相关的潜在靶点。在GeneCards数据库中,相关性评分值(relevance score)越高则代表该靶点与疾病联系越密切。若靶点过多则设定Score值大于中位数的目标靶点作为NAFLD的潜在靶点,合并3个疾病数据库的靶点,删除重复值得到与NAFLD相关的疾病靶点。

**1.3 黄芪散主要活性成分-NAFLD靶点蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建** 为明确黄芪散方药相关靶点与NAFLD靶点间的相互作用,利用微生物在线工具(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)绘制韦恩(Venn)图获得HQS与NAFLD的交集靶点共95个。将黄芪散主要活性成分靶点与NAFLD靶点分别导入Cytoscape3.8.2 Bisogenet插件中,生成“药物活性成分靶点”网络和“疾病靶点”网络,两者取交集得到“黄芪散主要活性成分-NAFLD靶点”PPI网络。

**1.4 基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)分析** 将95个交集靶点上传至Metascape平台(<http://www.metascape.org/>),设置 $P < 0.01$ ,对其主要参与的生物过程和信号通路进行富集分析,选取排名前20的结果进行数据可视化。

## 2 体内实验验证

### 2.1 材料

**2.1.1 动物** C57BL/6J雄性小鼠,体质量18~22 g,购自浙江维通利华,合格证号SCXK(浙)2019-0001,饲养环境为(20±2) °C,湿度50%±5%,12 h/12 h明暗交替,自由摄食和饮水。所有动物实验均按照广州中医药大学动物伦理委员会审核批准的《实验动物护理与使用指南》进行(项目编号ZYD-2021-169)。

**2.1.2 药物及制备** HQS提取物由课题组自制(批号20210618),制备方法质量控制见已发表的文献<sup>[14]</sup>,黄芪、葛根、桑白皮原药材按1:2:1的比例粉碎,60%乙醇提取,浓缩提取液,浓缩液采用大孔树脂分离纯化,用水、40%乙醇、70%乙醇和氨水梯度洗脱,收集洗脱液,浓缩,真空干燥即得。盐酸二甲双胍片(格华止,中美上海施贵宝制药有限公司,批号ABY4053),HQS提取物和盐酸二甲双胍临用前均用0.5%阿拉伯树胶水溶液充分溶解并研磨均匀制成混悬液备用。

**2.1.3 试剂** 低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和游离脂肪酸(NEFA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为20211220、20220106),总胆固醇(TC)和甘油三酯(TG)试剂盒(上海荣盛生物药业股份有限公司,批号分别为20210603122、20210402120),RIPA裂解液和BCA蛋白试剂盒(康为世纪生物科技股份有限公司,批号分别为01408/28421、32521),微管相关蛋白1轻链3(LC3)、p62、自噬效应蛋白Beclin1、AMPK $\alpha$ 、磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶(p-AMPK)、磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR)抗体(美国Cell Signaling Technology公司,

批号分别为4、6、7、8、21、12),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GADPH)、 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)一抗和辣根过氧化物酶(HRP)偶联二抗(美国Affinity公司,批号分别为#62u0922、#12w2944、#56j9958),ECL发光液(美国Millipore公司,批号21015B4),TRIzol试剂、RT试剂盒和实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(湖南艾科瑞生物工程有限公司,批号分别为A3A1994、A3A0300、A3A1505);小鼠GAPDH内源性内参基因引物[生工生物工程(上海)股份有限公司,批号I506KA4523],油红O染液、苏木素染液、伊红染液(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为CR2106126、CR2111017、CR2103216)。

**2.1.4 仪器** 164-5056型电泳仪和转膜仪(美国Bio-Rad公司),Giotto型染色机(意大利Diapath公司),Nikon Eclipse Ti-SR型倒置荧光显微镜(日本尼康公司),HT7700型透射电子显微镜(日本Hitachi公司),ABI 7500型Real-time PCR仪(美国Thermo公司)。

## 2.2 方法

**2.2.1 动物分组与造模** 小鼠适应性喂养1周后随机分为5组,分别为正常组(NCD)、模型组(HFD)、二甲双胍组(MET)、HQS低剂量组(HQS-L)、HQS高剂量组(HQS-H),每组12只。NCD小鼠给予正常对照饲料,其他各组参照潘磊等<sup>[18]</sup>采用高脂饮食建立NAFLD动物模型。造模期间同时给予药物干预,NCD和HFD给予0.5%阿拉伯树胶(溶媒)口服灌胃,其他3组分别给予二甲双胍( $0.25\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、HQS低剂量( $0.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )和HQS高剂量( $1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )口服灌胃,每日1次,剂量设置参考前期研究<sup>[14]</sup>。每周记录体质量,第12周末,测定随机血糖。第13周

末,解剖小鼠,采血,取肝组织称重,并计算肝指数:肝指数=肝脏湿重/体质量 $\times 100\%$ 。

**2.2.2 血清分析和肝脏TG含量测定** 血清TC、TG、LDL-C(酶法)、NEFA(ACS-PAP法)及肝脏TG含量根据试剂盒说明书进行检测。

**2.2.3 组织病理分析** 肝脏组织在4%多聚甲醛中固定,制作石蜡切片进行苏木素-伊红(HE)染色。新鲜肝脏组织制作冰冻切片进行油红O染色。倒置荧光显微镜下观察肝脏组织病理学变化并拍照。

**2.2.4 透射电镜(TEM)观察肝脏自噬体和自噬溶酶体的变化** 肝脏组织2.5%戊二醛固定,1%四氧化锇( $\text{OsO}_4$ )后固定,切片脱水包埋后制成超薄切片,2%醋酸铀饱和乙醇溶液避光染色,TEM成像。

**2.2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组蛋白的表达情况** 使用RIPA裂解液提取肝脏组织蛋白,测定蛋白浓度并归一化。在 $100\text{ }^\circ\text{C}$ 下煮沸,制备变性蛋白样品。蛋白样品经SDS-PAGE电泳后,转膜至PVDF膜,5%BSA或脱脂奶粉的TBST封闭2 h,一抗(LC3、p62、Beclin1、p-AMPK、p-mTOR、AMPK 1:1 000;GAPDH、 $\beta$ -actin 1:3 000) $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜。次日,二抗(1:3 000)室温孵育2 h。最后通过ECL发光液显影,并用Image J软件进行分析。

**2.2.6 Real-time PCR检测各组肝组织内mRNA表达情况** TRIzol试剂提取肝组织总RNA,测定RNA浓度,按照试剂盒说明书将RNA反转录为cDNA。以cDNA为模板进行PCR反应,反应体系 $20\text{ }\mu\text{L}$ ,cDNA模板 $2\text{ }\mu\text{L}$ ,扩增条件为 $95\text{ }^\circ\text{C}$ 预变性30 s, $95\text{ }^\circ\text{C}$ 变性5 s, $60\text{ }^\circ\text{C}$ 退火1 min,40个循环。数据分析采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法,所有引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司设计,见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	上游序列(5'-3')	下游序列(5'-3')	长度/bp
GAPDH	GGTTGTCTCCTGCGACTTCA	TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC	183
LC3A	CTGTCTCGATAAGACCAAGTT	GTCTTCATCCTTCTCCTGTTC	185
LC3B	CCACCAAGATCCCAGTGATTAT	TGATTATCTTGATGAGCTCGCT	120
p62	GAACACAGCAAGCTCATCTTTC	AAAGTGTCCATGTTTCAGCTTC	96
AMPK $\alpha$ 1	CAACCAGCCCACCTGACTCT	CGTGGTGTTCGGCAACCAA	91
AMPK $\alpha$ 2	ATGATGAGGTGGTGGAGCAGAGG	AGTGAGAGAGCCAGAAAGGGAGTG	134
mTOR	CTGATCCTCAACGAGCTAGTTC	GGTCTTTGCACTACTGTTCATG	112

**2.2.7 统计学分析** 采用SPSS 26.0软件数据统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,若符合正态分布则使

用单因素方差分析;若不符合正态分布则使用非参数检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 网络药理学分析结果

**3.1.1 黄芪散活性成分及靶点的获取** TCMSP数据库收集得到HQ、GG和SBP中的化合物总数分别为87、18和194,经初步筛选,得到51个潜在主要活性成分,其中HQ、GG和SBP的主要活性成分数量分别为20、4、32种,靶点数量分别为214、69和193个,合并删除重复值共获得靶点220个,构建黄芪散活性成分与靶点网络(见增强出版附加材料)。

**3.1.2 黄芪散活性成分-NAFLD靶点PPI网络的构建** 为了揭示HQS和NAFLD之间复杂的相关性,从GeneCards、OMIM和TTD数据库中收集了1536个NAFLD相关靶标。其中,黄芪散51个主要活性成分和NAFLD共同靶点95个。根据黄芪散活性成分-NAFLD靶点PPI网络显示,黄芪散潜在靶点可与6721个靶点产生直接或间接作用,相互关系可达162154种,与NAFLD直接或间接相关的靶点有11883个,靶点间相互联系可达234168种(见增强出版附加材料)。

**3.1.3 GO和KEGG分析** 进一步对HQS与NAFLD的95个交集靶点进行GO和KEGG分析,将生物过程(BP)、细胞组分(CC)和分子功能(MF)结果绘制条形图(见增强出版附加材料)。结果表明,HQS改善NAFLD参与的生物过程主要包括活性氧代谢过程、对脂多糖和营养水平的响应、凋亡反应等;主要参与的信号通路有晚期糖基化终产物/晚期

糖基化终产物受体(AGE/RAGE)、白细胞介素-17(IL-17)、磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)、肿瘤坏死因子(TNF)、AMPK、mTOR等信号通路,并构建了HQS活性成分-NAFLD靶点-信号通路PPI网络(见增强出版附加材料)。前期有关HQS已发表的研究表明,HQS可以激活AMPK信号通路改善肝脏脂质积累和胰岛素抵抗,结合KEGG分析结果,mTOR作为自噬的关键调节因子,且AMPK/mTOR信号通路是自噬的经典信号通路之一。因此,本研究合理提出HQS通过AMPK/mTOR信号通路调节自噬来减轻肝脏脂肪变性改善NAFLD的假说。

#### 3.2 实验验证结果

**3.2.1 HQS可减轻HFD诱导的C57BL/6J小鼠的血脂异常** 在实验过程中,HFD组的小鼠体质量增长速度明显高于其他4组( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。见表2。第12周末HFD小鼠随机血糖水平显著升高( $P<0.01$ ),而HQS-H给药明显降低了HFD喂养小鼠的随机血糖水平( $P<0.05$ )。此外,与NCD小鼠比较,HFD组血清TC、LDL-C和NEFA水平显著升高( $P<0.01$ ),TG呈上升趋势,但差异无统计学意义,HQS-L给药后TG明显降低( $P<0.05$ ),TC略有降低,HQS-H组TC和TG明显降低( $P<0.05$ );HQS-L和HQS-H给药对LDL-C影响差异无统计学意义,但有降低趋势;与NCD小鼠比较,HFD小鼠血清NEFA显著增加( $P<0.01$ ),HQS治疗后明显降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。见表3。

表2 黄芪散对HFD诱导小鼠体质量的影响( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=12$ )

Table 2 Effect of Huangqisan(HQS) on body weight of HFD-induced mice ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=12$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	第0周	第5周	第10周	第13周
NCD		21.23±0.21	25.28±0.49	26.65±0.45	27.83±0.50
HFD		21.03±0.22	27.76±0.57 <sup>2)</sup>	30.61±0.65 <sup>2)</sup>	32.06±0.70 <sup>2)</sup>
MET	0.25	20.88±0.24	24.75±1.38 <sup>4)</sup>	25.55±1.65 <sup>4)</sup>	27.67±0.32 <sup>4)</sup>
HQS-L	0.5	21.07±0.20	25.16±0.53 <sup>3)</sup>	26.13±0.66 <sup>4)</sup>	28.25±2.12 <sup>4)</sup>
HQS-H	1	21.00±0.24	25.48±0.49 <sup>3)</sup>	26.23±0.60 <sup>4)</sup>	27.96±0.69 <sup>4)</sup>

注:与NCD组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与HFD组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ ,<sup>4)</sup> $P<0.01$ (表3-表7同)

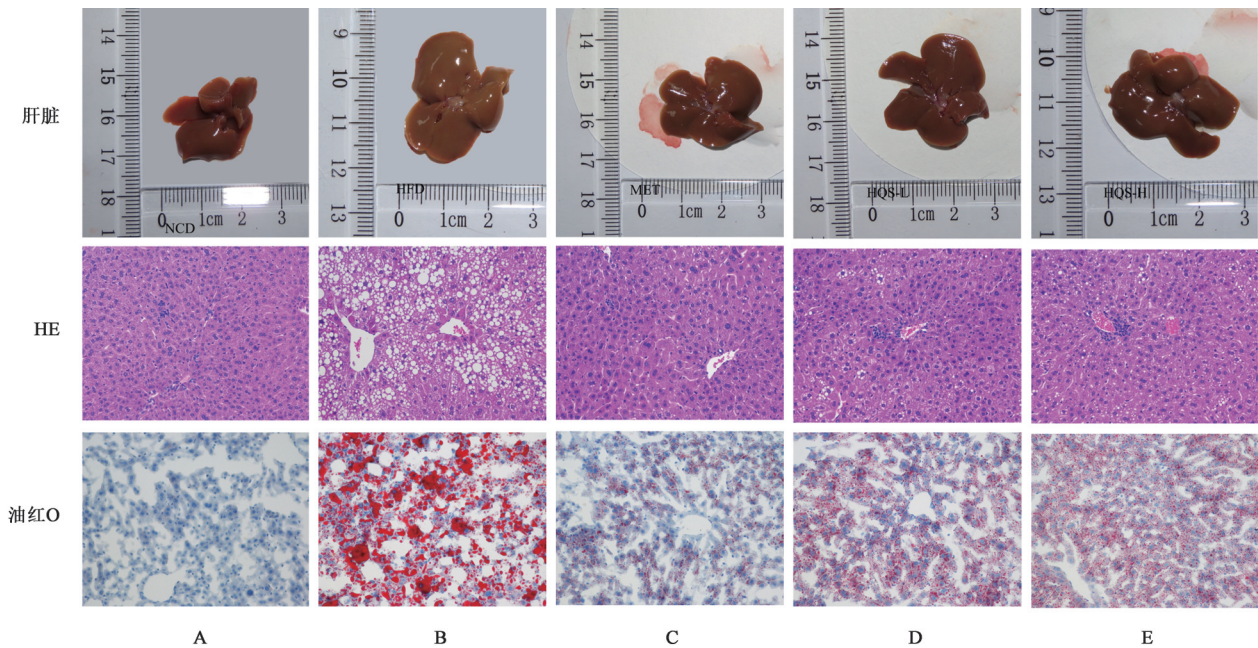
表3 黄芪散对HFD诱导小鼠的血脂异常的影响( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=8$ )

Table 3 Effect of HQS on alleviate dyslipidemia in mice fed with HFD ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	随机血糖	TC	TG	LDL-C	NEFA
NCD		7.71±0.22	3.17±0.07	0.81±0.05	0.29±0.02	1.36±0.11
HFD		9.80±0.39 <sup>2)</sup>	6.20±0.18 <sup>2)</sup>	1.10±0.07	1.24±0.06 <sup>2)</sup>	2.28±0.09 <sup>2)</sup>
MET	0.25	8.91±0.14	4.65±0.18 <sup>4)</sup>	0.52±0.03 <sup>4)</sup>	0.77±0.05 <sup>4)</sup>	1.46±0.06 <sup>4)</sup>
HQS-L	0.5	8.54±0.26	5.84±0.23	0.67±0.04 <sup>3)</sup>	0.96±0.13	1.44±0.10 <sup>4)</sup>
HQS-H	1	8.09±0.33 <sup>3)</sup>	5.60±0.29 <sup>3)</sup>	0.69±0.01 <sup>3)</sup>	1.12±0.09	1.48±0.12 <sup>3)</sup>

**3.2.2 HQS减轻HFD诱导的C57BL/6J小鼠的肝脏脂肪变性** 与NCD小鼠比较,HFD小鼠的肝脏增大。正如预期的那样,HFD组的小鼠肝脏湿重、肝指数和肝脏TG含量显著升高( $P<0.01$ ),经HQS给药后肝脏湿重和肝脏TG含量明显降低( $P<0.05, P<0.01$ ),HQS-L给药后肝脏指数显著降低( $P<0.01$ ),

而HQS-H和MET组肝指数较HFD组呈下降趋势但差异无统计学意义。肝脏HE染色显示HFD组小鼠肝脏LDs大量空泡化,油红染色显示HFD组小鼠肝细胞脂肪堆积,脂肪变性较为严重。经HQS给药后,上述肝脏病理结果得到改善。见图1、表4和表5。



注:A.正常组;B.模型组;C.二甲双胍组;D.黄芪散低剂量组;E.黄芪散高剂量组(图2和图3同)

图1 HQS对HFD诱导小鼠的肝脏脂肪变性的影响( $\times 100$ )

Fig. 1 Effect of HQS on ameliorated hepatic steatosis in HFD-induced mice ( $\times 100$ )

表4 HQS对HFD诱导小鼠肝脏湿重和肝指数的影响( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Table 4 Effect of HQS on liver index in HFD- induce mice ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	肝脏湿重/g	肝指数
NCD		1.04 $\pm$ 0.02	3.69 $\pm$ 0.03
HFD		1.60 $\pm$ 0.06 <sup>2)</sup>	4.77 $\pm$ 0.08 <sup>2)</sup>
MET	0.25	1.29 $\pm$ 0.01 <sup>3)</sup>	4.57 $\pm$ 0.07
HQS-L	0.5	1.21 $\pm$ 0.03 <sup>4)</sup>	4.36 $\pm$ 0.13 <sup>4)</sup>
HQS-H	1	1.26 $\pm$ 0.04 <sup>4)</sup>	4.55 $\pm$ 0.09

表5 HQS对HFD诱导小鼠肝脏TG的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 5 Effect of HQS on liver TG in HFD- induce mice ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

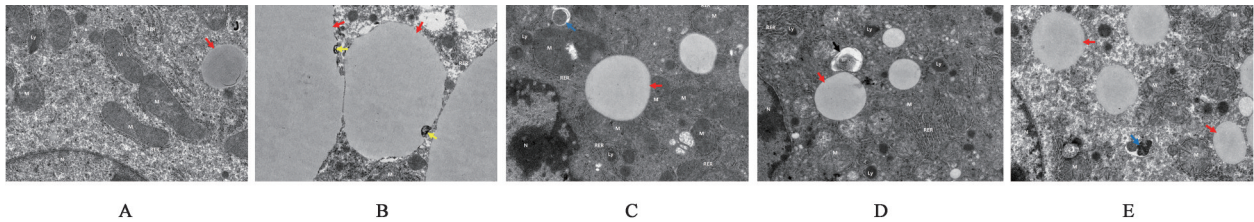
组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	肝脏TG/ $mol\cdot g^{-1}$
NCD		7.2 $\pm$ 0.6
HFD		9.8 $\pm$ 0.6 <sup>2)</sup>
MET	0.25	7.1 $\pm$ 0.5 <sup>4)</sup>
HQS-L	0.5	8.5 $\pm$ 0.8
HQS-H	1	7.7 $\pm$ 0.4 <sup>3)</sup>

**3.2.3 HQS通过促进自噬调节脂质代谢** 采用透射电镜、Western blot和Real-time PCR技术,进一步验证HQS对AMPK/mTOR信号通路和自噬的影响。NCD组肝细胞整体结构相对较好,胞质均匀未见水肿,胞内脂滴数量较少,大小均一,未见明显融合,胞内存在一定量的过氧化物酶体(Ly),可见少量自噬溶酶体;HFD组肝细胞损伤程度相对较高,胞质明显水肿、稀疏,线粒体严重肿胀,较多嵴断裂溶解呈絮状,部分膜结构溶解破损,表面核糖体少量脱颗粒,胞内存在大量巨型脂滴,融合,边缘处可见少量脂滴微自噬,但未见明显自噬体;MET组与HQS-L组细胞损伤程度较低,胞质均未见明显肿胀,前者细胞器形态正常,胞内存在较多脂滴,大小不一,部分融合,存在一定量Ly,少量自噬小体,其内可见线粒体结构,后者线粒体轻度肿胀,胞内脂滴较多,大小较均匀,未见明显融合,存在一定量Ly及少量次级溶酶体(SL)和自噬溶酶体;HQS-H组损伤程度居中,线粒体轻度肿胀,胞内含有多脂滴,大小不一,少量脂滴融合,可见少量自噬溶酶体和

自噬小体,内含损伤的线粒体结构。见图2。

此外,HQS-L和HQS-H给药可显著升高HFD诱导小鼠肝脏中自噬标志物LC3亚型LC3A和LC3B的mRNA表达水平( $P<0.01$ ),显著降低p62的mRNA表达( $P<0.01$ )。进一步采用Western blot检测参与自噬的重要靶点蛋白水平,与NCD组比较,HFD组肝脏中LC3 II/I蛋白水平显著升高( $P<0.01$ ),同时p62表达也有所增加。与HFD组比较,HQS给药后,肝脏中LC3 II/I蛋白水平显著升高( $P<0.01$ ),而p62水平明显降低( $P<0.05$ ),同时

Beclin1蛋白表达水平差异无统计学意义。见图3、表6。与NCD组比较,HFD明显降低AMPK $\alpha$ 1表达( $P<0.05$ ),AMPK $\alpha$ 2的表达差异无统计学意义,与HFD组比较,HQS-L和HQS-H差异无统计学意义。在蛋白表达水平上,HFD组p-AMPK显著降低且p-mTOR显著升高( $P<0.01$ ),经HQS-L和HQS-H给药后上述结果得到逆转( $P<0.01$ )。见图3、表7。综上,HQS可能通过促进HFD诱导小鼠中AMPK/mTOR信号通路介导的自噬改善肝脏脂肪变性(机制图见增强出版附加材料)。



注:红色箭头.脂滴;黑色箭头.自噬溶酶体;蓝色箭头.自噬小体;黄色箭头.微自噬

图2 透射电镜观察肝脏自噬体和自噬溶酶体(TEM,×4 000)

Fig. 2 Observing autophagosome and autolysosome by transmission electron microscope (TEM,×4 000)

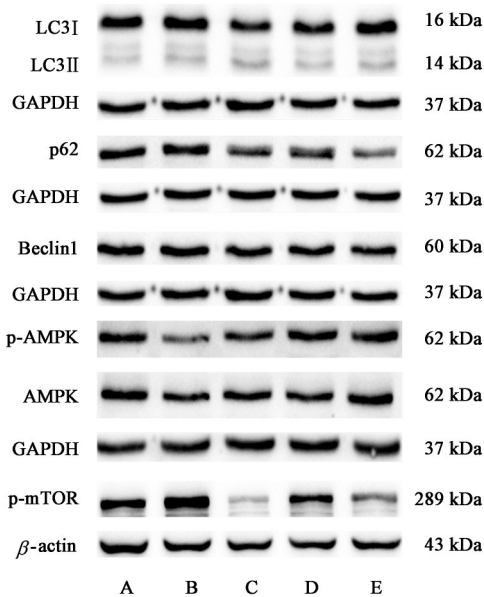


图3 小鼠肝脏自噬相关LC3、p62、Beclin1和AMPK/mTOR信号通路相关蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of liver autophagy related LC3, p62, Beclin1 and AMPK/mTOR-related proteins in mice

#### 4 讨论

NAFLD的主要病理特征是脂滴在肝脏中的过度积累<sup>[19]</sup>。过去人们普遍认可的NAFLD发病机制是“二次打击学说”。该学说认为“第一次打击”是胰岛素抵抗导致的肝脏脂质沉积;“第二次打击”是在第一次打击的基础上引起的肝脏氧化应激、炎症反应和线粒体功能障碍等<sup>[20]</sup>。如今,除了上述因

素,NAFLD的发生受内质网应激、肠道菌群紊乱、环境因素、遗传易感性等“多重打击”影响<sup>[21-22]</sup>。为了强调NAFLD与T2DM的关系,2020年由22个国家组成的国际专家小组提出将NAFLD更名为代谢相关脂肪性肝病(MAFLD),这表明NAFLD的临床诊断和治疗重点已逐渐转移到肥胖、T2DM和代谢异常等相关疾病<sup>[23]</sup>。

在NAFLD早期阶段,肥胖、高脂血症和胰岛素抵抗在HFD诱导的小鼠中普遍可见<sup>[24]</sup>。有关黄芪散有效部位群的一系列研究表明,HQS能有效改善HFD诱导的高脂血症及STZ联合HFD诱导的T2DM大鼠的胰岛素敏感性、肥胖、肝脏脂肪变性和血脂异常。其改善糖脂代谢的机制可能与增加肝糖原合成<sup>[25]</sup>、抑制糖异生<sup>[16]</sup>、调节糖脂代谢相关基因表达<sup>[17]</sup>、调节内质网应激信号通路<sup>[26]</sup>和瘦素-胰岛素轴的平衡<sup>[14]</sup>有关。本研究采用HFD诱导脂肪肝小鼠模型,该模型与人类NAFLD相似,具有典型的NAFLD症状,如肥胖、胰岛素抵抗和其他代谢综合征,且病变过程呈渐进性,常用于NAFLD研究<sup>[27]</sup>。本研究结果与前期有关HQS的报道一致,HFD诱导的模型小鼠经HQS给药治疗后,体质量、血清TG、TC水平、肝脏TG含量和肝脏病变均有所改善。

中药方剂由不同药材组成,具有多成分、多靶点、多途径的独特优势,有助于治疗发病机制复杂

表6 HQS对NAFLD小鼠自噬相关mRNA和蛋白的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 6 Effect of HQS on autophagy-related mRNA and proteins in NAFLD mice ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	LC3A mRNA	LC3B mRNA	p62 mRNA	LC3 II / I	p62/GAPDH	Beclin1/GAPDH
NCD		1.00±0.02	1.00±0.01	1.00±0.03	0.40±0.01	0.76±0.11	0.99±0.01
HFD		0.75±0.04 <sup>2)</sup>	0.78±0.06 <sup>2)</sup>	1.03±0.09	0.68±0.01 <sup>2)</sup>	1.00±0.09	0.70±0.04
MET	0.25	1.07±0.05 <sup>4)</sup>	1.33±0.04 <sup>4)</sup>	0.44±0.02 <sup>4)</sup>	0.71±0.03 <sup>2)</sup>	0.69±0.06 <sup>3)</sup>	0.74±0.11
HQS-L	0.5	0.98±0.06 <sup>4)</sup>	1.22±0.02 <sup>4)</sup>	0.63±1.10 <sup>4)</sup>	0.84±0.01 <sup>4)</sup>	0.80±0.14	0.79±0.12
HQS-H	1	1.02±0.02 <sup>4)</sup>	1.18±0.03 <sup>4)</sup>	0.41±0.05 <sup>4)</sup>	0.79±0.02 <sup>4)</sup>	0.54±0.07 <sup>3)</sup>	0.93±0.03

表7 HQS对NAFLD小鼠AMPK/mTOR信号通路mRNA和蛋白的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 7 Effect of HQS on mRNA and proteins expression of AMPK/mTOR in NAFLD mice ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	AMPK $\alpha$ 1 mRNA	AMPK $\alpha$ 2 mRNA	mTOR mRNA	AMPK /GAPDH	p-AMPK /GAPDH	p-AMPK /AMPK	p-mTOR / $\beta$ -actin
NCD		1.00±0.01	1.00±0.03	1.00±0.01	1.25±0.07	1.16±0.05	0.94±0.08	0.78±0.05
HFD		0.81±0.00 <sup>2)</sup>	0.89±0.08	1.41±0.04	0.75±0.07 <sup>2)</sup>	0.40±0.03 <sup>2)</sup>	0.54±0.02 <sup>2)</sup>	1.14±0.01 <sup>2)</sup>
MET	0.25	0.84±0.01	1.06±0.06	1.20±0.01	0.83±0.03	0.68±0.02 <sup>3)</sup>	0.82±0.01 <sup>3)</sup>	0.11±0.04 <sup>4)</sup>
HQS-L	0.5	0.88±0.05	0.96±0.10	1.27±0.21	0.81±0.02	1.13±0.10 <sup>4)</sup>	1.38±0.09 <sup>4)</sup>	0.81±0.05 <sup>4)</sup>
HQS-H	1	0.84±0.03	1.01±0.12	1.20±0.05	1.05±0.04 <sup>3)</sup>	1.14±0.09 <sup>4)</sup>	1.10±0.13 <sup>4)</sup>	0.33±0.05 <sup>4)</sup>

的NAFLD。网络药理学技术可以揭示生物系统水平上药物和靶点之间复杂的调节关系<sup>[28]</sup>。在本研究中,通过建立NAFLD关联网络,研究HQS多组分、多靶点的作用机制。在51种HQS潜在主要有效成分中,MOL000098(槲皮素)、MOL000358( $\beta$ -谷甾醇)、MOL000422(山柰酚)、MOL000378(7-O-甲基异微凸剑叶莎醇)和MOL000392(芒柄花素)等多种成分与脂质代谢有关。其中,槲皮素具有降脂减肥和治疗NAFLD的作用,与其改善机体脂肪代谢、抑制TG积累、促进脂肪细胞凋亡<sup>[29]</sup>、调节脂肪因子释放、抗氧化应激、改善胰岛素抵抗有关<sup>[30]</sup>。刺芒柄花素可降低金仓鼠血脂水平,改善肝脏脂肪变性,缓解炎症细胞浸润,提示刺芒柄花素可调节体内血脂代谢,抑制肝脏脂质沉积<sup>[31]</sup>。MOL000417(毛蕊异黄酮)是从黄芪中提取的黄酮类化合物,能够通过激活法尼醇X受体(FXR)对HFD诱导的C57BL/6J小鼠起肝脏保护作用<sup>[32]</sup>。这充分体现了中药复方HQS多组分、多靶点、多途径改善NAFLD的独特优势。

基于网络药理学的预测结果及前期的研究基础,提出了HQS通过AMPK/mTOR信号通路调节自噬减轻肝脏脂肪变性改善NAFLD的假说。自噬是一个高度调节、进化保守的细胞过程,细胞包裹自身折叠错误的蛋白质或衰老的细胞器等,通过转运至溶酶体进行降解,从而实现自我更新,以维持机体内能量物质稳定和内环境稳态的过程。LC3是检

测自噬水平的常用指标,在自噬激活时,LC3 I在泛素样反应酶的作用下转化为LC3 II<sup>[33]</sup>;而p62/SQSTM1在自噬体形成过程中被自噬体包裹,最终被溶酶体降解<sup>[34]</sup>,因此,自噬活性与细胞内整体p62表达水平呈负相关。脂肪分解包括脂解和自噬两种形式,研究表明,当细胞处于应激状态或正常脂肪脂解功能障碍时,将导致过量和异常的中性脂肪以脂滴的形式积聚,细胞通过脂质自噬途径降解脂肪。导致NAFLD发病的危险因素如胰岛素抵抗、过量TG和游离脂肪酸(FFA)积累和氧化应激等,与自噬受损相关<sup>[35]</sup>。AMPK作为细胞生理能量状态的主要传感器,参与脂质代谢、糖代谢和线粒体生物发生等能量物质代谢过程<sup>[36]</sup>。当各种能量相关信号通过AMPK汇集到mTOR时<sup>[37]</sup>,AMPK通过拮抗mTOR复合物1(mTORC1)来调节UNC-51样激酶(ULK)活性影响自噬<sup>[36]</sup>,而AMPK/mTOR是自噬调控的经典信号通路之一。有研究报道表明,小鼠肝细胞自噬在HFD早期短暂增加,但长期HFD可导致自噬水平显著下调,这与HFD抑制p-AMPK表达和上调肝脏中p-mTOR活性有关<sup>[38]</sup>。

本研究中,发现经高脂饲料喂养13周,模型组小鼠肝脏LC3 II / I的表达与正常组相比显著增加,同时p62表达具有相同趋势,说明模型组存在自噬通量受阻现象。与HFD组比较,HQS组小鼠肝脏LC3 II / I的表达明显升高,但p62的表达显著降低,提示HQS可能通过促进自噬和恢复自噬流来改

善肝脏脂肪变性,其具体机制有待进一步研究。此外,体内实验结果显示,HQS可上调NAFLD小鼠p-AMPK的表达及p-AMPK/AMPK值,同时下调p-mTOR的表达,提示HQS调节自噬可能依赖于AMPK/mTOR信号通路。综上所述,HQS减轻肝脏脂肪变性的作用可能与AMPK/mTOR信号通路调控的自噬有关。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] RIAZI K, AZHARI H, CHARETTE J H, et al. The prevalence and incidence of NAFLD worldwide: A systematic review and Meta-analysis [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2022, 7(9): 851-861.

[2] FLORES-TORO JA, GO K L, LEEUWENBURGH C, et al. Autophagy in the liver: Cell's cannibalism and beyond [J]. *Arch Pharm Res*, 2016, 39(8): 1050-1061.

[3] CHALASANI N, YOUNOSSI Z, LAVINE J E, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases [J]. *Hepatology*, 2018, 67(1): 328-357.

[4] ZHOU Q, SU J, JI M. Progress in the treatment of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *China Med Her*, 2020, 17(6): 26-29.

[5] 许炎煌, 范建高. 非酒精性脂肪性肝病治疗药物研究进展 [J]. *上海医药*, 2020, 41(19): 3-6, 11.

[6] ATTIA S L, SOFTIC S, MOUZAKI M. Evolving role for pharmacotherapy in NAFLD/NASH [J]. *Clin Transl Sci*, 2021, 14(1): 11-19.

[7] TARGHER G, COREY K E, BYRNE C D, et al. The complex link between NAFLD and type 2 diabetes mellitus-mechanisms and treatments [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(9): 599-612.

[8] MANTOVANI A, DALBENI A. Treatments for NAFLD: State of Art [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(5): 2350.

[9] NING G, HONG J, BI Y, et al. Progress in diabetes research in China [J]. *J Diabetes*, 2009, 1(3): 163-172.

[10] AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetes-2021 [J]. *Diabetes Care*, 2021, 44(Supplement 1): S15-S33.

[11] 陈艳芬, 王春怡, 李卫民, 等. 古方黄芪散降糖作用的实验研究 [J]. *广东药学院学报*, 2010, 26(1): 73-76.

[12] 李艳, 高英, 高颖, 等. 黄芪散及其拆方对T2DM大鼠胰岛素抵抗及肝组织 $11\beta$ -HSD1, PEPCK的影响 [J].

中国实验方剂学杂志, 2017, 23(15): 136-142.

[13] 王春怡, 郝梦娇, 胡方利, 等. 黄芪散有效部位群对II型糖尿病大鼠肝脏AMPK/SREBP-1c通路的影响 [J]. *中药新药与临床药理*, 2018, 29(6): 679-686.

[14] XU S, YE B, LI J, et al. *Astragalus mongholicus* powder, a traditional Chinese medicine formula ameliorate type 2 diabetes by regulating adipoinular axis in diabetic mice [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 973927.

[15] HAO M, GUAN Z, GAO Y, et al. Huangqisan ameliorates hyperlipidemia with obesity rats via activating brown adipocytes and converting white adipocytes into brown-like adipocytes [J]. *Phytomedicine*, 2020, 78: 153292.

[16] LI Y, WANG C, JIN Y, et al. Huangqisan improves glucose and lipid metabolism and exerts protective effects against hepatic steatosis in high fat diet-fed rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 126: 109734.

[17] 郝梦娇, 党院霞, 周欣欣, 等. 黄芪散对高脂血症大鼠AMPK/ACC/CPT1通路的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(12): 2586-2592.

[18] 潘磊, 张金彪, 崔荣岗, 等. 非酒精性脂肪肝C57BL/6小鼠模型的建立 [J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20(40): 6054-6059.

[19] SCORLETTI E, CARR R M. A new perspective on NAFLD: Focusing on lipid droplets [J]. *J Hepatol*, 2022, 76(4): 934-945.

[20] 赵瀚东, 杨帆, 詹丽. 非酒精性脂肪性肝病发病机制研究进展 [J]. *解放军医学院学报*, 2022, 43(3): 366-371.

[21] PAFILI K, RODEN M. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) from pathogenesis to treatment concepts in humans [J]. *Mol Metab*, 2021, 50: 101122.

[22] BENICE K K, BIRNBAUM M J. Metabolic drivers of non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Mol Metab*, 2021, 50: 101143.

[23] ESLAM M, NEWSOME P N, SARIN S K, et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement [J]. *J Hepatol*, 2020, 73(1): 202-209.

[24] NEVZOROVA Y A, BOYER-DIAZ Z, CUBERO F J, et al. Animal models for liver disease - A practical approach for translational research [J]. *J Hepatol*, 2020, 73(2): 423-440.

[25] 王春怡, 高颖, 李艳, 等. 黄芪散有效部位群对II型糖尿病大鼠肝糖原及糖异生酶的影响 [J]. *中药新药与临床药理*, 2018, 29(1): 1-7.

[26] 李艳, 曹美群, 陶文聪, 等. 黄芪散对高脂饮食诱导肥

- 胖大鼠肝脏内质网应激信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(21): 6-11.
- [27] FELLMANN L, NASCIMENTO A R, TIBIRIÇA E, et al. Murine models for pharmacological studies of the metabolic syndrome [J]. *Pharmacol Ther*, 2013, 137(3): 331-340.
- [28] 谷文超, 陈聪, 宋咏梅, 等. 网络药理学在中医复方研究中的应用现状[J]. *山东中医杂志*, 2021, 40(6): 662-667.
- [29] 孙卉, 滕浩, 杜密英, 等. 槲皮素降脂减肥机制研究进展[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(16): 349-353. 62.
- [30] 张超, 李昌平. 槲皮素治疗非酒精性脂肪性肝病的作用机制研究进展[J]. *中药新药与临床药理*, 2015, 26(5): 718-721.
- [31] 赵培, 杨媛, 徐扬, 等. 刺芒柄花素调节血脂代谢及改善动脉粥样硬化病变的实验研究[J]. *中国新药杂志*, 2009, 18(10): 925-929.
- [32] DUAN X, MENG Q, WANG C, et al. Effects of calycosin against high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease in mice[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2018, 33(2): 533-542.
- [33] VUJIĆ N, BRADIĆ I, GOERITZER M, et al. ATG7 is dispensable for LC3-PE conjugation in thioglycolate-elicited mouse peritoneal macrophages[J]. *Autophagy*, 2021, 17(11): 3402-3407.
- [34] YOSHII S R, MIZUSHIMA N. Monitoring and Measuring Autophagy[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(9).
- [35] GUAL P, GILGENKRANTZ H, LOTERSZTAJN S. Autophagy in chronic liver diseases: The two faces of Janus[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2017, 312(3): C263-C273.
- [36] TAMARGO-GÓMEZ I, MARIÑO G. AMPK: Regulation of metabolic dynamics in the context of autophagy[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(12): 3812.
- [37] SAIKIA R, JOSEPH J. AMPK: A key regulator of energy stress and calcium-induced autophagy [J]. *J Mol Med*, 2021, 99(11): 1539-1551.
- [38] 徐玲, 马红艳, 杨军, 等. 高脂饮食通过 p-AMPK/mTOR 信号通路下调小鼠肝细胞自噬水平[J]. *基础医学与临床*, 2018, 38(1): 37-41.

[责任编辑 周冰冰]