

杨钊, 闫阮玉, 吴洪雨, 等. 虫草菌丝调节 AMPK/SirT1 信号通路对四氯化碳诱导肝纤维化小鼠的作用 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(5): 630-637.

YANG Z, YAN R Y, WU H Y, et al. Effects of cultured mycelium *Cordyceps sinensis* on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis mice by regulating AMPK/SirT1 signaling pathway [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(5): 630-637.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.05.010

虫草菌丝调节 AMPK/SirT1 信号通路对四氯化碳诱导肝纤维化小鼠的作用

杨钊^{1#}, 闫阮玉^{1#}, 吴洪雨¹, 黄恺², 沈丽¹, 陶艳艳¹, 刘成海^{1,2,3*}, 彭渊^{1*}

(1. 上海中医药大学附属曙光医院肝病研究所, 上海 201203; 2. 上海市中医临床重点实验室, 上海 201203; 3. 肝肾疾病病证教育部重点实验室, 上海 201203)

【摘要】 目的 研究虫草菌丝 (cultured mycelium *Cordyceps sinensis*, CMCS) 对四氯化碳 (CCl₄) 诱导肝纤维化模型小鼠肝腺苷酸活化蛋白激酶/沉默信息调节因子 1 (AMPK/SirT1) 信号通路的作用机制。**方法** 将 C57BL/6 小鼠 ($n = 40$) 按体重分层随机分为 5 组: 正常对照组、CMCS 对照组 (3.0 g/kg)、模型对照组、CMCS 1.5 g/kg 组 (1.5 g/kg) 和 CMCS 3.0 g/kg 组 (3.0 g/kg), 采用腹腔注射 10% CCl₄ (2 mL/kg) 诱导小鼠肝损伤模型。造模与给药 2 周后, 检测血清 ALT、AST、TBil 水平; 苏木素-伊红 (HE) 染色观察肝炎症; 天狼星红染色观察肝胶原沉积; Jamall's 法检测肝羟脯氨酸 (Hyp) 含量; 流式蛋白定量技术 (cytometric bead array, CBA) 检测肝组织 IL-6、MCP-1、IFN- γ 、TNF、IL-10、IL-12p70 水平; 免疫组化观察肝组织 Collagen I 和 SirT1 表达情况; RT-qPCR 检测肝组织 *Prkaa1*、*Prkaa2*、*Lkb1* 和 *p53* 水平。**结果** CCl₄ 染毒 2 周后, 模型对照组血清 ALT、AST、TBil 水平均明显升高 ($P < 0.05$); HE 染色和天狼星红染色分别提示肝内大量炎症细胞浸润和胶原沉积; 肝 Hyp 含量及 IL-6、MCP-1、TNF 表达明显增多 ($P < 0.05$), IL-10 和 IL-12p70 表达明显减少 ($P < 0.01$); 免疫组化染色提示肝组织 Collagen I 表达增多; SirT1 在肝窦间隙表达减少, 在胶原沉积处表达增多; RT-qPCR 检测提示肝组织 *Prkaa1*、*Prkaa2*、*Lkb1* 表达下降, *p53* 表达增多 ($P < 0.05$)。CMCS 可显著降低纤维化小鼠血清 ALT、AST 水平; 降低肝组织 IL-6、MCP-1、TNF 表达 ($P < 0.05$), 上调 IL-10、IL-12p70 水平 ($P < 0.05$); 减少肝炎症细胞浸润、胶原形成和 Hyp 含量, 促进肝窦内 SirT1 表达, 上调肝 *Prkaa1*、*Prkaa2*、*Lkb1* 表达 ($P < 0.05$); 减轻肝内 Collagen I、*p53* 表达 ($P < 0.05$)。与 CMCS 1.5 g/kg 组相比, CMCS 3.0 g/kg 组抑制肝炎症、胶原沉积及上调 AMPK/SirT1 表达更为明显 ($P < 0.05$)。**结论** CMCS 可通过上调 AMPK/SirT1 信号通路而发挥抗 CCl₄ 诱导小鼠肝纤维化的作用。

【关键词】 虫草菌丝; 四氯化碳 (CCl₄); 肝纤维化; AMPK/SirT1 信号通路

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 05-0630-08

Effects of cultured mycelium *Cordyceps sinensis* on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis mice by regulating AMPK/SirT1 signaling pathway

【基金项目】 国家自然科学基金 (81102701, 81874363, 82174057, 82274305), 山西中医药大学科技创新团队项目 (2022TD2003), 曙光学者计划 (SGXZ-201910)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81102701, 81874363, 82174057, 82274305), Science and Technology Innovation Team Project of Shanxi University of Traditional Chinese Medicine (2022TD2003), Shuguang Siming Scholar Plan (SGXZ-201910).

【作者简介】 杨钊, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中医药抗肝纤维化药理机制的研究。Email: yangzhao202102@163.com;

闫阮玉, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药抗肝纤维化活性成分筛选的研究。Email: yu20220212@126.com。

#共同第一作者

【通信作者】 刘成海, 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 中医西医结合防治急性慢性肝病的基础与临床研究。

Email: chenghailiu@hotmail.com;

彭渊, 女, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向: 中医药调节免疫抗肝纤维化的基础与临床研究。

Email: pengyuan1026@shutcm.edu.cn。

* 共同通信作者

YANG Zhao^{1#}, YAN Ruanyu^{1#}, WU Hongyu¹, HUANG Kai², SHEN Li¹,
TAO Yanyan¹, LIU Chenghai^{1,2,3*}, PENG Yuan^{1*}

(1. Institute of Liver Diseases, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese
Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Shanghai Key Laboratory of Traditional Chinese Clinical Medicine,
Shanghai 201203, China; 3. Key Laboratory of Liver and Kidney Diseases, Shanghai University of
Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Shanghai 201203, China)

Corresponding author: LIU Chenghai. E-mail: chenghailiu@hotmail.com;
PENG Yuan. E-mail: pengyuan1026@shutcm.edu.cn

[Abstract] Objective To investigate the effects of cultured mycelium *Cordyceps sinensis* (CMCS) on the AMPK/SirT1 signaling pathway in carbon tetrachloride (CCl₄)-induced liver fibrosis in mice. **Methods** Forty male SPF-grade C57BL/6 mice were divided randomly into a normal control group, CMCS control group (3.0 g/kg), model control group, CMCS 1.5 g/kg group, and CMCS 3.0 g/kg group. Mice were injected intraperitoneally with 10% CCl₄ (2 mL/kg) to induce liver fibrosis. Two weeks later, serum levels of alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), and total bilirubin (TBil) were measured. Inflammation and collagen deposition in liver tissue were observed by hematoxylin and eosin (HE) and Sirius red staining, respectively. The content of hydroxyproline in liver tissue was detected by Jamall's hydrochloric acid hydrolysis method. Levels of interleukin (IL)-6, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), interferon, tumor necrosis factor (TNF), IL-10, and IL-12p70 in liver tissue were detected using a cytometric bead array analysis system. Collagen I and SirT1 expression in liver tissue were detected by immunohistochemistry, and *Prkaa1*, *Prkaa2*, *Lkb1*, and *p53* gene expression were detected by real-time fluorescent quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Results** Serum levels of ALT, AST, and TBil were significantly increased in the model control group compared with those in the normal control group ($P < 0.05$). HE and Sirius red staining showed extensive inflammatory cell infiltration and collagen deposition in the liver, respectively. Hydroxyproline content and expression levels of IL-6, MCP-1, and TNF in the liver were significantly increased ($P < 0.05$), while IL-10 and IL-12p70 levels were significantly decreased ($P < 0.01$). Immunohistochemical staining revealed an increase in Collagen I expression and SirT1 staining was decreased in the hepatic sinusoidal space, while collagen deposition was increased. *Prkaa1*, *Prkaa2*, and *Lkb1* gene expression levels were decreased and *p53* was increased in liver tissue ($P < 0.05$). CMCS significantly reduced serum ALT and AST levels, decreased IL-6, MCP-1, and TNF expression in liver tissue ($P < 0.05$), up-regulated IL-10 and IL-12p70 ($P < 0.05$), alleviated liver inflammation, collagen deposition, and hydroxyproline content, up-regulated the expression of SirT1 in the hepatic sinusoidal space, enhanced *Prkaa1*, *Prkaa2*, and *Lkb1* expression ($P < 0.05$), and down-regulated Collagen I and *p53* ($P < 0.05$) in the liver. Compared with CMCS 1.5 g/kg, CMCS 3.0 g/kg significantly inhibited liver inflammation and collagen deposition and up-regulated AMPK/SirT1 expression ($P < 0.05$). **Conclusions** CMCS could improve CCl₄-induced liver fibrosis via up-regulation of the AMPK/SirT1 signaling pathway. **[Keywords]** cultured mycelium *Cordyceps sinensis*; carbon tetrachloride; liver fibrosis; AMPK/SirT1 signaling pathway
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

肝纤维化是临床上多种慢性肝病共同的病理表现,以细胞外基质异常沉积、肝组织结构改变和炎症浸润为特点,最终可导致肝硬化、肝衰竭、肝癌,预后较差^[1]。研究表明,肝纤维化与肝内腺苷酸活化蛋白激酶(AMP - activated protein kinase, AMPK)/沉默信息调节因子 1 (silent information regulator of transcription 1, SirT1)信号通路表达异常密切相关^[2],可抑制炎症,改善氧化应激水平,改善肝损伤^[3-4]。

冬虫夏草是我国特有的滋补中药,其应用广泛,不仅补肺益肾,更可止血化痰。然而,天然冬虫夏草因产地特殊且产量有限,价格较昂贵。目前临床上使用的虫草制剂多采用人工培养且价格低廉的虫草菌丝(cultured mycelium *Cordyceps sinensis*, CMCS)发酵粉,其活性成分及药效接近于天然的冬虫夏草^[5]。前期研究发现,CMCS 具有较好的抗肝损伤与抗肝纤维化效应^[6],是否影响 AMPK/SirT1 通路而发挥抗肝损伤和抗肝纤维化的作用,尚不清

楚。本研究拟采用四氯化碳(CCl_4)复制肝纤维化模型,观察 CMCS 影响 AMPK/SirT1 通路抗肝纤维化的作用机制,为进一步研究 CMCS 抗肝纤维化的作用机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

40 只 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠,6 ~ 8 周龄,体重 24 ± 1 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2021-0006】。自由摄食与饮水,饲养环境:12 h/12 h 循环照明,湿度恒定 40% ~ 70%,温度控制在 22 ~ 25 °C,饲养于上海中医药大学实验动物中心【SYXK(沪)2020-0009】。本次实验经上海中医药大学实验动物福利伦理委员会批准(PZSHUTCM2302020003),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀。

1.1.2 主要试剂与仪器

人工发酵虫草菌丝(批号:20160801),上海黄浦制药责任有限公司提供; CCl_4 (货号:10006480),购自上海国药集团化学试剂有限公司;橄榄油(货号:A502795),购自上海生工生物工程有限公司;丙氨酸氨基转移酶(ALT;货号:C009-1-1)、天冬氨酸氨基转移酶(AST;货号:C010-1-1)、总胆红素(TBil;货号:C019-1-1),均购自南京建成生物工程研究所;重组 Collagen I 兔单克隆抗体(货号:ab270993),购自英国 Abcam 公司;SirT1(IF3)小鼠单克隆抗体(货号:8469),购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

IX70 显微图像分析系统(日本 Olympus 公司);Bio-Tek Power Wave XS 酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);病理脱水机(SPP300)、包埋机(EG1140)、切片机(CM1850)、展片水浴锅(HI 1210),均购于德国 LEICA 公司;ABI VIIA RT-qPCR 仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Dxflex 流式细胞分析仪(美国 Beckman 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与造模

40 只 C57BL/6 小鼠适应性饲养 1 周后,按体重分层随机分为 5 组:正常对照组($n = 8$)、CMCS 对照组($n = 8$)、模型对照组($n = 8$)、CMCS 1.5 g/kg 组($n = 8$)和 CMCS 3.0 g/kg 组($n = 8$)。模型对照组、CMCS 1.5 g/kg 组、CMCS 3.0 g/kg 组均腹腔

注射 10% CCl_4 诱导肝损伤模型^[7],剂量为 2 mL/kg,2 d 1 次,每周连续 3 次,共连续 2 周;正常对照组和 CMCS 对照组于相同时间点腹腔注射等体积橄榄油。

1.2.2 给药干预

自造模之日起,小鼠腹腔注射 10% CCl_4 溶液 6 h 后 CMCS 对照组、CMCS 1.5 g/kg 组、CMCS 3.0 g/kg 组均予 CMCS 灌胃,剂量分别为 3.0 g/kg、1.5 g/kg 和 3.0 g/kg,每天 1 次,每周连续 7 次,共连续 2 周。正常对照组与模型对照组均于相同时间点予等体积双蒸水灌胃。所有小鼠于最后一次给药 24 h 后腹腔注射 3%戊巴比妥钠溶液麻醉,剂量为 30 mg/kg,下腔静脉取血,收集血清和肝组织,用于检测。

1.2.3 小鼠一般情况观察

观察并记录各组小鼠体重、肝重和脾重、饮食饮水、行动及毛色及其他异常变化等情况。

1.2.4 血清肝功能检测

血清 ALT、AST、TBil 含量,均按试剂盒说明书操作。

1.2.5 肝组织病理检测

肝组织经中性甲醛缓冲液固定,乙醇梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片,厚度为 4 μm 。HE 染色和天狼星红染色分别观察肝炎症和胶原沉积情况^[8]。

1.2.6 肝组织羟脯氨酸(Hyp)检测

参照 Jamall's 盐酸水解法^[9]测定肝组织 Hyp 含量:冰上称取 100 mg 湿肝,置于浓盐酸中 105 °C 水解 18 h;过滤水解液并吸取 100 μL 置于 40 °C 烘干至粉末状;取 Hyp 标准品 0 ~ 1.6 μg 设为标准曲线,经氯胺 T 溶液、25% 对二甲基氨基苯甲醛和 27.3%高氯酸的异丙醇溶液反应,50 °C 水浴 1.5 h,558 nm 测定吸收值;计算标准曲线,并按标准曲线公式计算肝组织 Hyp 含量。

1.2.7 肝组织炎症因子检测

提取肝组织总蛋白,试剂盒检测蛋白浓度。采用微量样本多指标流式蛋白定量技术(CBA)、检测肝组织白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-10(IL-10)、单核趋化蛋白-1(MCP-1)、干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子(TNF)及白细胞介素-12p70(IL-12p70)表达。

1.2.8 RT-qPCR 检测

采用 TRIzol 法提取小鼠肝组织总 RNA,逆转录

为 cDNA 模板,并按照说明书进行 PCR 扩增。反应条件:95 ℃、30 s;95 ℃、5 s,60 ℃、34 s,40 个循环;95 ℃、15 s,60 ℃、1 min,95 ℃、15 s。各组均设 3 个

复孔,选用 β -actin 作为内参基因,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组样本 mRNA 的相对表达量。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列(5'-3')
Table 1 RT-qPCR primer sequence(5'-3')

基因名称 Gene name	上游 Forward	下游 Reverse
<i>Prkaa1</i>	GAGTGTTCGGAGGAGGAGGTC	CTGTTGTCTATGATGAGGTGGTAGG
<i>Prkaa2</i>	GATGAGGTGGTGAGCAGAGG	AGCCAGTGAGAGAGCCAGAAAG
<i>Lkb1</i>	GACACCTTCATCCACCGCATC	TCCAGCACCTCCTTCACCTTG
<i>p53</i>	TGAACCGCCGACCTATCCTTAC	GCACAAACACGAACCTCAAAGC
<i>β-actin</i>	TGACGAGGCCAGACGAAGA	ATGGG ACAGTGTGGGTGAC

1.3 统计学分析

使用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析,计量资料以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示;采用单因素方差分析进行,符合正态分布时采用 LSD 进行两两比较;若不符合正态分布则采用 Mann-Whitney 秩和检验; $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 对小鼠一般生物学特征的影响

与正常对照组小鼠相比,CMCS 对照组小鼠无显著性差异; CCl_4 染毒小鼠欠活泼,肝/体比和脾/体比均明显升高($P < 0.05$)。与模型对照组相比,CMCS 1.5 g/kg 组、CMCS 3.0 g/kg 组小鼠肝/体比和脾/体比均明显降低($P < 0.05, P < 0.01$)。与 CMCS 1.5 g/kg 组相比,CMCS 3.0 g/kg 组肝/体比和脾/体比均无明显统计学意义(见表 2)。

表 2 各组小鼠肝/体比、脾/体比的比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Comparison of liver/body ratio and spleen/body ratio of mice in each group($\bar{x} \pm s, n = 8$)

分组 Groups	肝/体比/% Liver/body ratio/%	脾/体比/% Spleen/body ratio/%
正常对照组 Normal control group	4.13 $\pm$ 0.76	4.65 $\pm$ 1.10
CMCS 对照组 CMCS control group	4.72 $\pm$ 0.59	4.92 $\pm$ 1.74
模型对照组 Model control group	5.96 $\pm$ 0.37 [*]	5.30 $\pm$ 0.50 [*]
CMCS 1.5 g/kg 组 CMCS 1.5 g/kg group	5.09 $\pm$ 0.64 [#]	4.15 $\pm$ 0.40 ^{##}
CMCS 3.0 g/kg 组 CMCS 3.0 g/kg group	4.93 $\pm$ 0.72 [#]	4.06 $\pm$ 0.54 ^{##}

注:与正常对照组相比,* $P < 0.05$;与模型对照组相比,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。(下图/表同)

Note. Compared with normal control group, * $P < 0.05$. Compared with model control group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$. (The same in the following figures and tables)

2.2 对血清肝功能水平的影响

与正常对照组相比,CMCS 对照组血清肝功能水平无统计学意义;模型对照组血清 ALT、AST、TBil 水平明显上升($P < 0.01$)。与模型对照组相比,CMCS 1.5 g/kg 组、CMCS 3.0 g/kg 组,血清 ALT、AST、TBil 水平明显下降($P < 0.01$)。与 CMCS 1.5 g/kg 组相比,CMCS 3.0 g/kg 组血清 ALT 无明显统计学意义,血清 AST、TBil 水平明显下降($P < 0.05$)(见表 3)。

2.3 对肝组织 Hyp 水平的影响

与正常对照组相比,CMCS 对照组肝组织 Hyp 水平无统计学意义;模型对照组肝组织 Hyp 水平明显上升($P < 0.01$)。与模型对照组相比,CMCS 1.5 g/kg 组及 CMCS 3.0 g/kg 组肝组织 Hyp 水平明显下降($P < 0.01$)。与 CMCS 1.5 g/kg 组相比,CMCS 3.0 g/kg 组肝组织 Hyp 水平下降($P < 0.05$)(见表 4)。

2.4 对肝组织炎症因子水平的影响

与正常对照组相比,CMCS 对照组小鼠肝组织炎症因子水平无明显差异;模型对照组肝 IL-6、MCP-1、IFN- γ 、TNF 水平均不同程度升高,IL-10、IL-12p70 水平均明显下降($P < 0.01$)。与模型对照组相比,CMCS 1.5 g/kg 和 3.0 g/kg 组肝组织 IL-6、MCP-1、TNF 水平均不同程度下降($P < 0.01, P < 0.05$),肝组织 IL-10、IL-12p70 明显升高($P < 0.01, P < 0.05$)。与 CMCS 1.5 g/kg 组相比,CMCS 3.0 g/kg 组肝组织 IL-6、MCP-1、TNF 水平降低($P < 0.01$),IL-10 水平升高($P < 0.01$)(见表 5)。

2.5 对肝组织炎症和胶原沉积的影响

正常对照组和 CMCS 对照组肝组织小叶结构完整,肝细胞无变性和坏死,I 型胶原染色无阳性表达。 CCl_4 染毒 2 周后,模型对照组肝炎性细胞浸润明显,汇管区及小叶间胶原沉积,大量肝细胞呈气

表 3 各组小鼠血清肝功能的比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Comparison of serum liver functions of mice in each group($\bar{x} \pm s, n = 8$)

分组 Groups	丙氨酸氨基转移酶/(IU/L) ALT/(IU/L)	天门冬氨酸氨基转移酶/(IU/L) AST/(IU/L)	总胆红素/(μ mol/L) TBil/(μ mol/L)
正常对照组 Normal control group	19.57 $\pm$ 1.02	23.77 $\pm$ 3.78	2.55 $\pm$ 0.42
CMCS 对照组 CMCS control group	17.24 $\pm$ 1.03	25.32 $\pm$ 2.27	2.24 $\pm$ 0.20
模型对照组 Model control group	112.92 $\pm$ 3.60**	149.26 $\pm$ 29.35**	11.37 $\pm$ 0.27**
CMCS 1.5 g/kg 组 CMCS 1.5 g/kg group	95.11 $\pm$ 4.98##	112.52 $\pm$ 4.99##	8.17 $\pm$ 0.34##
CMCS 3.0 g/kg 组 CMCS 3.0 g/kg group	82.10 $\pm$ 13.75##	96.33 $\pm$ 2.59## Δ	7.15 $\pm$ 0.31## Δ

注:与正常对照组相比,** $P < 0.01$;与 CMCS 1.5 g/kg 组相比, $\Delta P < 0.05$ 。(下图/表同)
Note. Compared with normal control group, ** $P < 0.01$. Compared with CMCS 1.5 g/kg group, $\Delta P < 0.05$. (The same in the following figures and tables)

表 4 各组小鼠肝组织 Hyp 含量的比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Comparison of hepatic Hyp content of mice
in each group($\bar{x} \pm s, n = 8$)

分组 Groups	Hyp(g/g 肝组织) Hyp(g/g liver tissue)
正常对照组 Normal control group	137.71 $\pm$ 10.32
CMCS 对照组 CMCS control group	145.41 $\pm$ 13.37
模型对照组 Model control group	521.53 $\pm$ 63.34**
CMCS 1.5 g/kg 组 CMCS 1.5 g/kg group	382.14 $\pm$ 54.04##
CMCS 3.0 g/kg 组 CMCS 3.0 g/kg group	310.87 $\pm$ 24.30## Δ

球样变及坏死,I 型胶原阳性表达增多。与模型对照组相比,CMCS 1.5 g/kg 组和 CMCS 3.0 g/kg 组小鼠肝组织炎症浸润、肝细胞气球样变及坏死、胶原沉积、I 型胶原阳性表达均不同程度减少。与 CMCS 1.5 g/kg 组相比,CMCS 3.0 g/kg 组炎症细胞

浸润、汇管区和小叶间胶原沉积及 I 型胶原阳性表达均明显减少(见图 1)。

2.6 对肝 AMPK/SirT1 信号通路的影响

免疫组化染色提示,与正常对照组相比,CMCS 对照组小鼠肝 SirT1 表达无显著性差异,主要表达于肝窦间隙;CCl₄ 染毒 2 周后,模型对照组小鼠肝窦间隙 SirT1 表达减少,胶原沉积处 SirT1 表达增多。经 CMCS 干预后,小鼠肝窦间隙 SirT1 表达增多,胶原沉积处 SirT1 表达减少;与 CMCS 1.5 g/kg 组相比,CMCS 3.0 g/kg 组肝窦间隙 SirT1 表达增多(见图 1)。RT-qPCR 检测提示,与正常对照组相比,CMCS 对照组肝 *Prkaa1*、*Prkaa2*、*Lkb1*、*p53* 等 mRNA 表达无显著性差异,模型对照组 *Prkaa1*、*Prkaa2*、*Lkb1* 表达减少,*p53* 表达增多($P < 0.01$)。与模型对照组相比,CMCS 1.5 g/kg 组和 CMCS 3.0 g/kg 组肝组织 *Prkaa1*、*Prkaa2*、*Lkb1* 表达明显增加,*p53* 表达明显减少($P < 0.05$)。与 CMCS 1.5 g/kg

表 5 各组小鼠肝组织炎症因子水平的比较($\bar{x} \pm s, n = 8, \text{pg/mL}$)

Table 5 Comparison of hepatic inflammatory factors of mice in each group($\bar{x} \pm s, n = 8, \text{pg/mL}$)

分组 Groups	IL-6	IL-10	MCP-1	IFN- γ	TNF	IL-12p70
正常对照组 Normal control group	4.08 $\pm$ 0.65	19.14 $\pm$ 3.28	33.39 $\pm$ 4.14	1.16 $\pm$ 0.09	2.61 $\pm$ 0.73	3.56 $\pm$ 0.43
CMCS 对照组 CMCS control group	2.40 $\pm$ 0.24	13.08 $\pm$ 1.36	24.94 $\pm$ 3.35	1.32 $\pm$ 0.22	3.95 $\pm$ 0.62	2.93 $\pm$ 0.52
模型对照组 Model control group	7.15 $\pm$ 1.20**	8.11 $\pm$ 0.60**	1228.03 $\pm$ 329.51**	1.48 $\pm$ 0.23**	26.55 $\pm$ 15.69**	2.20 $\pm$ 0.37**
CMCS 1.5 g/kg 组 CMCS 1.5 g/kg group	3.32 $\pm$ 0.50##	10.72 $\pm$ 1.64##	129.67 $\pm$ 16.84##	1.49 $\pm$ 0.35	8.84 $\pm$ 2.33 [#]	3.87 $\pm$ 1.70 [#]
CMCS 3.0 g/kg 组 CMCS 3.0 g/kg group	1.99 $\pm$ 0.25## $\Delta\Delta$	12.67 $\pm$ 1.22## $\Delta\Delta$	97.80 $\pm$ 7.84## $\Delta\Delta$	1.59 $\pm$ 0.42	3.79 $\pm$ 1.30 [#] $\Delta\Delta$	4.33 $\pm$ 1.19 [#]

注:与 CMCS 1.5 g/kg 组相比, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。(下图同)
Note. Compared with CMCS 1.5 g/kg group, $\Delta\Delta P < 0.01$. (The same in the following figures)

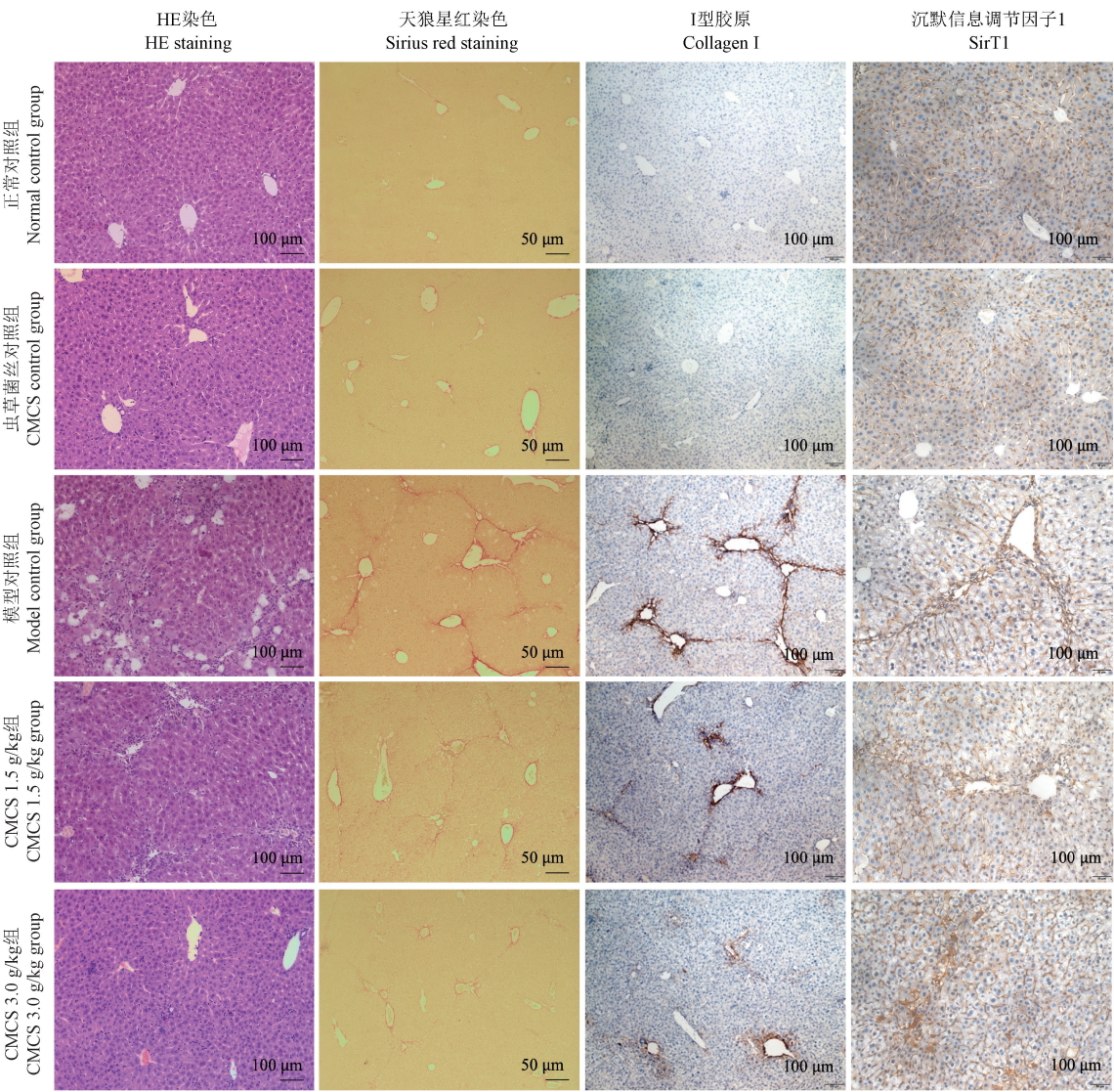


图 1 各组小鼠肝组织炎症、胶原沉积、Collagen I 和 SirT1 表达情况的比较

Figure 1 Comparison of inflammation, collagen deposition, Collagen I and SirT1 expressions in liver tissue of mice in each group

组相比,CMCS 3.0 g/kg 组肝组织 *Prkaa1*、*Prkaa2*、*Lkb1* 表达明显增加($P < 0.01$),*p53* 表达明显减少(见图 2)。

3 讨论

肝纤维化是一种临床上常见的,以肝中细胞外基质的过度积累为特征的慢性肝病。目前临床上针对肝纤维化的用药方案以病因治疗和保肝治疗为主,缺乏直接抗纤维化的有效治疗手段^[10]。CCl₄ 染毒诱导肝纤维化是常用的化学染毒模型之一^[11],CCl₄ 在体内可引发脂质过氧化反应而直接导致肝细胞损伤和坏死^[7];并同时引起肝内自由基增多,激活炎症细胞释放炎性因子如 TNF、IL-6、MCP-1

等,进一步加重肝细胞的损伤^[12]。鉴于 CCl₄ 染毒模型可较好地模拟人类肝纤维化的病理机制^[13],参考文献^[7]采用腹腔注射 10% CCl₄ 诱导小鼠肝纤维化模型,同时给予 CMCS 干预治疗 2 周,探讨 CMCS 对 CCl₄ 诱导肝纤维化的作用机制。结果显示,CMCS 能够显著降低肝纤维化小鼠肝/体比,改善血清 ALT、AST、TBil 水平和肝组织 Hyp 含量,减轻肝组织炎症和胶原沉积,且 CMCS 高剂量组效应更为显著。通过 CBA 检测发现,经 CMCS 干预后的 CCl₄ 染毒小鼠肝组织 IL-6、TNF、MCP-1 等促炎因子水平显著下降,IL-10、IL-12p70 等抑炎因子水平不同程度上升,提示 CMCS 有较好的抗炎和抗肝纤维化作用。

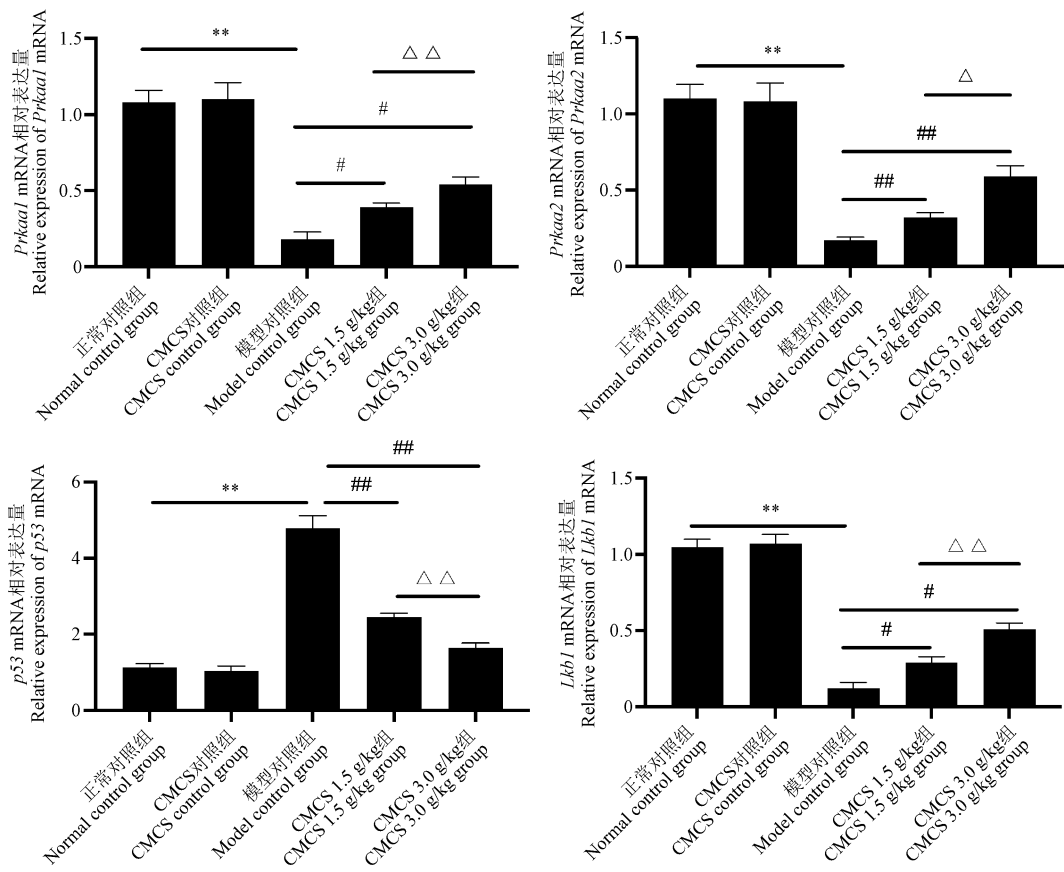


图2 各组小鼠肝组织炎 *Prkaa1*、*Prkaa2*、*p53*、*Lkb1* 的 mRNA 表达的比较

Figure 2 Comparison of *Prkaa1*, *Prkaa2*, *p53* and *Lkb1* mRNA expressions in liver tissue of mice in each group

AMPK 是由 α 、 β 、 γ 共 3 种亚基组成的高度保守的多底物丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是真核生物体内的信号枢纽和细胞能量平衡传感器,与炎症的发生发展密切相关^[14]。AMPK 有 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 两个亚基,分别由腺苷单磷酸活化蛋白激酶 $\alpha 1$ (AMP-activated protein kinase catalytic subunit α -1, *Prkaa1*) 基因和腺苷单磷酸活化蛋白激酶 $\alpha 2$ (AMP-activated protein kinase catalytic subunit α -1, *Prkaa2*) 基因编码^[15],可调控细胞内 AMP/ATP 值而影响机体内能量代谢^[16],在炎症、氧化应激、细胞自噬和线粒体功能障碍等方面发挥重要调节作用^[3]。研究发现,肝激酶 B1(liver kinase B1,LKB1)是 AMPK 上游重要的激酶,可正向调控 AMPK 而下调 I 型胶原转录而抗肝纤维化^[17]。本研究结果显示,与模型对照组相比,CMCS 可显著上调 *Lkb1*、*Prkaa1*、*Prkaa2* 基因表达,并减轻肝组织 I 型胶原表达,提示 CMCS 可能具有通过上调纤维化肝 *Lkb1* 表达而激活 AMPK 的作用。

AMPK 激活后可正向影响下游的 SirT1,进一步催化组蛋白及多种转录因子如 *p53* 的去乙酰化反

应,进而下调促炎基因的表达^[18],因此激活 AMPK/SirT1 信号通路是改善肝炎症和缓解肝纤维化进展的有效途径之一^[19]。此外,两者还相互影响,一方面 AMPK 可激活 SirT1,增强 SirT1 对转录因子的乙酰化水平而促进抗炎效应^[20];另一方面 AMPK 的抗炎效应依赖 SirT1,在 SirT1 敲除后 AMPK 激活剂对促炎因子不再有抑制作用^[21]。本研究发现,与模型对照组相比,CMCS 可促进肝 SirT1 表达,抑制 *p53* 基因表达,且高剂量组效果较优,提示 CMCS 可能具有通过激活 AMPK/SirT1 信号通路提高抗炎能力,从而发挥抗肝纤维化的作用。

综上所述,CMCS 在体内具有一定的抗炎和抗肝纤维化作用,其作用机制与激活 AMPK/SirT1 信号通路相关。但 CMCS 在体外抗肝纤维化的药理机制仍需进一步深入研究,以期为临床肝纤维化提供新的治疗方案。

参 考 文 献(References)

[1] GINÈS P, CASTERA L, LAMMERT F, et al. Population screening for liver fibrosis: Toward early diagnosis and intervention for chronic liver diseases [J]. Hepatology, 2022,

- 75(1): 219–228.
- [2] KESHK W A, SOLIMAN N A, ALI D A, et al. Mechanistic evaluation of AMPK/SIRT1/FXR signaling axis, inflammation, and redox status in thioacetamide-induced liver cirrhosis: The role of *Cichorium intybus* linn (chicory)-supplemented diet [J]. J Food Biochem, 2019, 43(8): e12938.
- [3] CHEN B, ZHU H. AMPK: A Bridge between Inflammation and Metabolism [J]. JSM Atherosclerosis, 2016, 1(2): 1008–1016.
- [4] CAO Y, XUE Y, XUE L, et al. Hepatic menin recruits SIRT1 to control liver steatosis through histone deacetylation [J]. J Hepatol, 2013, 59(6): 1299–1306.
- [5] 沈晓云, 李兆兰, 田军. 冬虫夏草与虫草菌丝有效成分分析比较 [J]. 山西大学学报 (自然科学版), 1998, 21(1): 82–87.
- SHEN X Y, LI Z L, TIAN J. Chemical component comparison between cordyceps sinensis and mycelia of cordyceps sinensis [J]. J Shanxi Univ (Nat Sci Ed), 1998, 21(1): 82–87.
- [6] PENG Y, HUANG K, SHEN L, et al. Cultured *Mycelium Cordyceps sinensis* alleviates CCl₄-induced liver inflammation and fibrosis in mice by activating hepatic natural killer cells [J]. Acta Pharmacol Sin, 2016, 37(2): 204–216.
- [7] RADAIEVA S, SUN R, JARUGA B, et al. Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners [J]. Gastroenterology, 2006, 130(2): 435–452.
- [8] BRUNT E M. Grading and staging the histopathological lesions of chronic hepatitis: the Knodell histology activity index and beyond [J]. Hepatology, 2000, 31(1): 241–246.
- [9] JAMALL I S, FINELLI V N, QUE HEE S S. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues [J]. Anal Biochem, 1981, 112(1): 70–75.
- [10] KISSELEVA T, BRENNER D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 18(3): 151–166.
- [11] WEBER L W, BOLL M, STAMPFL A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model [J]. Crit Rev Toxicol, 2003, 33(2): 105–136.
- [12] WIEST R, LAWSON M, GEUKING M. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis [J]. J Hepatol, 2014, 60(1): 197–209.
- [13] 陶艳艳, 陈高峰, 刘成海. 常用急性肝损伤动物模型评价及其在中药药理研究中的应用 [J]. 上海中医药杂志, 2019, 53(11): 12–19, 11.
- TAO Y Y, CHEN G F, LIU C H. Evaluation of animal models of acute liver injury and its application in pharmacology of traditional Chinese medicine [J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2019, 53(11): 12–19, 11.
- [14] HARDIE D G, SCHAEFFER B E, BRUNET A. AMPK: an energy-sensing pathway with multiple inputs and outputs [J]. Trends Cell Biol, 2016, 26(3): 190–201.
- [15] DRANCHAK P K, EKENSTEDT K J, VALBERG S J, et al. Chromosomal assignments for the equine AMPK family genes [J]. Anim Genet, 2006, 37(3): 293–294.
- [16] APOORV T S, KARTHIK C, BABU P P. AMP-activated protein kinase (AMPK) is decreased in the mouse brain during experimental cerebral malaria [J]. Neurosci Lett, 2018, 662: 290–294.
- [17] BAI T, YANG Y, WU Y L, et al. Thymoquinone alleviates thioacetamide-induced hepatic fibrosis and inflammation by activating LKB1-AMPK signaling pathway in mice [J]. Int Immunopharmacol, 2014, 19(2): 351–357.
- [18] YI J, LUO J. SIRT1 and p53, effect on cancer, senescence and beyond [J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1804(8): 1684–1689.
- [19] RUDERMAN N B, XU X J, NELSON L, et al. AMPK and SIRT1: a long-standing partnership? [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010, 298(4): E751–E760.
- [20] YANG Z, KAHN B B, SHI H, et al. Macrophage α 1AMP-activated protein kinase (α 1AMPK) antagonizes fatty acid-induced inflammation through SIRT1 [J]. J Biol Chem, 2010, 285(25): 19051–19059.
- [21] YANG Z, WANG X, HE Y, et al. The full capacity of AICAR to reduce obesity-induced inflammation and insulin resistance requires myeloid SIRT1 [J]. PLoS One, 2012, 7(11): e49935.

[收稿日期] 2023–12–20