

虎杖苷通过调节 G0S2 和 ATGL 表达改善 非酒精性脂肪肝病的研究

盛鲁光^{1,2}, 刘丹丹³, 刘维斌³, 雷涛³, 陈清光⁴, 陆灏⁴, 徐碧林^{1,2,3}

(¹ 安徽医科大学上海普陀中心临床学院, 上海 200062; ² 安徽医科大学第五临床医学院, 合肥 230032;

³ 上海中医药大学附属普陀医院内分泌科, 上海 200062;

⁴ 上海中医药大学附属曙光医院内分泌科, 上海 200021)

摘要 目的 本研究旨在探讨虎杖苷(PD)对高脂饮食诱导的非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)小鼠模型及人肝癌细胞系 G2 (HepG2)细胞模型的影响,揭示其潜在分子机制。方法 30 只 6 周龄雄性 SPF 级 C57BL/6J 小鼠,随机分为正常饮食组和高脂饮食组,后者建立 NAFLD 小鼠模型后进一步分为高脂饮食(HFD)组和虎杖苷治疗(PD)组。PD 组灌胃给药 PD 250 mg/(kg·d),为期 10 周,期间监测体重并进行口服葡萄糖和胰岛素耐量测试。实验结束时,通过一系列实验评估 PD 对小鼠肝重、血脂、肝脏脂质积累及肝损伤标志物的影响。通过 qRT-PCR 和 Western blot 法检测 G₀/G₁ 开关基因 2(G0S2)和脂肪三酰甘油脂肪酶(ATGL)的表达,并通过免疫组织化学染色再次验证基因表达。细胞计数试剂盒-8(CCK-8)法评估 PD 对 HepG2 细胞活性的影响,油红 O 染色观察脂质积累,通过 qRT-PCR 和 Western blot 法检测 G0S2 和 ATGL 的表达,并验证了 G0S2 被敲低后脂质积累和基因表达的改变。结果 PD 降低小鼠体重、肝重及血清和肝组织中的天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、三酰甘油(TG)和总胆固醇(TC)水平($P < 0.05$),减轻肝组织病理损伤,降低 G0S2 表达($P < 0.05$),增加 ATGL 表达($P < 0.05$)。在细胞层面,PD 减少脂滴累积,改善脂质代谢,降低 G0S2 表达($P < 0.05$),增加 ATGL 表达($P < 0.05$)。即使在 G0S2 被敲低的细胞中,PD 仍能促进脂肪分解($P < 0.01$)。结论 PD 通过调节 G0S2 和 ATGL 表达促进脂肪分解,减轻高脂饮食诱导的小鼠 NAFLD 模型的代谢紊乱和肝脏损伤,为 NAFLD 治疗提供新策略。

关键词 虎杖苷;非酒精性脂肪肝病;C57BL/6J 小鼠;HepG2 细胞;脂肪分解;G₀/G₁ 开关基因 2;脂肪三酰甘油脂肪酶

中图分类号 R 575.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)10-1847-10

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.10.010

非酒精性脂肪肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一种与代谢紊乱密切相关的慢性肝病,发病率逐年上升,不仅影响肝脏健康,还与心血管疾病及 2 型糖尿病等代谢性疾病相关^[1]。其进展可能导致非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)、肝硬化及肝癌,严重威胁健康。目前美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准的特效药物有限^[1],需进一步研究以探索治疗靶点和策略^[2]。

G₀/G₁ 开关基因 2(G₀/G₁ switch gene 2, G0S2)

是脂质代谢的重要调节因子,通过直接结合三酰甘油脂肪酶(adipose triglyceride lipase, ATGL)抑制其活性,减少脂质分解^[3-4],调控 G0S2 和 ATGL 的表达可能为 NAFLD 治疗提供新策略^[3,5]。虎杖苷(polydatin, PD)是一种存在于虎杖中的天然活性化合物,具有降血糖、抗动脉粥样硬化、调节糖脂代谢和抗炎等多种生物学活性^[6]。既往研究表明,PD 通过降低氧化应激和炎症反应,对于预防和治疗 NASH 及其相关的肝纤维化具有潜在的积极效果。本研究通过建立高脂饮食诱导的小鼠模型和棕榈酸培养的人肝癌细胞系 G2(hepatoma G2, HepG2)细胞模型,探讨 PD 对肝脏脂质代谢的影响及其潜在的机制,验证其是否通过调控 G0S2 和 ATGL 表达促进脂质分解,从而减轻 NAFLD。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与动物 HepG2 细胞购自中国科学院上海细胞库,在含有 10% 胎牛血清(美国 Invitrogen

2025-07-20 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:82074381);上海市卫生健康委员会科研项目(编号:202240309);上海市普陀区卫生健康系统科技创新项目(编号:ptkwsw201911);上海市普陀区卫生健康系统临床特色专科建设计划项目(编号:2020tszk01)

作者简介:盛鲁光,女,硕士研究生;

徐碧林,女,副教授,主任医师,硕士生导师,通信作者, E-mail: xubilin007@126.com

公司)和 100 $\mu\text{g/mL}$ 青链霉素(苏州新赛美生物科技有限公司)的 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司)中培养。实验使用 30 只 6 周龄雄性 SPF 级 C57BL/6J 小鼠,由上海必凯科翼生物科技有限公司提供(合格证编号:20180006043629)。小鼠被安置于受控环境中,光照/黑暗周期为 12 h,温度维持在 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$,湿度控制在 $(55 \pm 10)\%$,并自由获取水和食物。在实验开始前,小鼠进行了为期 1 周的适应性饲养,以确保其适应环境。所有实验操作均严格遵循《中华人民共和国实验动物使用和护理法规》的相关规定,并已获得上海中医药大学附属普陀医院、上海市普陀区中心医院动物伦理委员会的批准(伦理批件号:DWEC-A-202211003)。

1.1.2 主要药品与试剂 PD 购自中国上海融禾医药公司(CAS:27208-80-6),相对分子质量:390.388。对 PD 的分子式进行了鉴定,并通过高效液相色谱法测定了 PD 的纯度($\geq 98\%$)。抗 ATGL 抗体(AT-GL, #2138)、抗 β -actin 抗体 [β -actin (8H10D10) Mouse mAb #3700] 购自美国 Beverly 的 Cell Signaling Technology 公司;抗 GOS2 多克隆抗体(12091-1-AP)购自武汉 Proteintech 公司;山羊抗兔(ab6721)、山羊抗小鼠(ab6728)二抗购自上海艾博抗公司。测定三酰甘油(triglyceride, TG)、非酯化脂肪酸(non-esterified fatty acid, NEFA)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、天门冬氨酸转移酶(aspartate aminotransferase, AST)和丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)含量的试剂盒购自南京建成生物工程研究所。GOS2 siRNA 购自上海佐润生物科技有限公司。Lipofectamine 3000 购自美国 Invitrogen 公司。棕榈酸钠(palmitic acid, PA) (6 mmol/L)和油酸钠(oleic acid, OA) (12 mmol/L) (KC006) 购自西安鲲鹏科技发展有限公司。组织 RNA 纯化试剂盒(脂肪组织专用) (EZB-RN001A)、4 $\times$ EZscript 逆转录混合液(EZB-RT2GQ)、2 $\times$ 彩色 SYBR Green qPCR 预混液(含 ROX2) (A0012-R2) 购自美国 EZBioscience 公司。

1.1.3 主要仪器 高速冷冻离心机购自德国 Eppendorf 公司;病理组织包埋机购自德国 Leica 公司;实时荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司;多功能酶标仪、垂直电泳仪均购自美国 BIO-RAD 公司;血糖仪购自美国 Abbott 公司;BioRad 成像系统、mage Lab Software 购自美国 BioRad 公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠 NAFLD 模型建立和分组 7 周龄、体

质量(body weight, BW) 约 20 g 的 C57BL/6 小鼠在 SPF 级培养环境中饲养,随机分为正常饮食组(ND, $n = 10$)和高脂饮食组(high-fat diet, HFD) ($n = 20$), ND 组连续饲喂正常饲料, HFD 组连续饲喂高脂肪饲料,该饲料的热量组成为 60% 脂肪、20% 碳水化合物和 20% 蛋白质。基于文献^[7]报道,模型组小鼠 BW 和肝脏质量从第 4 周和第 8 周开始高于正常组($P < 0.05$), ALT 在第 8 周增高($P < 0.05$),血清总胆固醇和低密度脂蛋白均高于正常组($P < 0.05$),故 HFD 组小鼠在饲养 8 周后随机分为 HFD 组($n = 10$)和 PD 治疗(PD)组($n = 10$)。其中, PD 组灌胃 PD[250 mg/(kg $\cdot$ d)]^[8],其余两组灌胃等量生理盐水,均持续 10 周。实验结束时,使用戊巴比妥钠安乐死小鼠。随后,收集小鼠肝脏组织保存在 -80°C 的冻存管中或固定在 4% 多聚甲醛固定液中,以进行后续实验。所有小鼠的 BW 每周记录,并通过称量剩余饲料计算周进食量。

1.2.2 细胞分组与处理 为了在体外重建脂质积累,用 0.25 mmol/L PA 建立 HepG2 细胞模型。在体外实验中, HepG2 细胞按每孔 1×10^5 个细胞的比例接种在 6 孔培养板中,并在处理前培养至 70% 的细胞融合度。细胞被分为多个实验组:对照(Con)组、模型(Model)组、溶剂对照(DMSO)组、PA + 10 $\mu\text{mol/L}$ PD 组、PA + 20 $\mu\text{mol/L}$ PD 组和 PA + 40 $\mu\text{mol/L}$ PD 组。除 Con 组外,其余各组的 HepG2 细胞均暴露于 0.25 mmol/L 的 PA 环境中。经过 48 h 的培养后,收集细胞和培养基样本,并进行油红染色进行定性和定量分析。

为了进一步观察 GOS2 基因敲低后 PD 对 HepG2 细胞脂质积累的影响,使用 Lipofectamine 3000 转染靶向 GOS2 siRNA (50 nmol/L),转染 24 h 后用于后续实验。又设立了空载体对照(Si-Con)组:对照(Negative control, NC-Con)组、模型(NC-Model)组、PD (40 $\mu\text{mol/L}$, NC-Polydatin)组以及 GOS2 siRNA 转染(Si-GOS2)组:对照(Si-Con)组、模型(Si-Model)组、PD (40 $\mu\text{mol/L}$) (Si-Polydatin)组。

1.2.3 口服糖耐量试验(oral glucose tolerance test, OGTT)和胰岛素耐量实验(insulin tolerance test, ITT) 在给药第 8 周完成 OGTT。小鼠在禁食 12 h 后灌胃葡萄糖(1 g/kg)。并在 0、30、60、90、120 min 不同时间点用血糖仪在小鼠尾尖采血测量血糖,计算葡萄糖曲线下面积(area under the curve, AUC)。

在给药第 9 周完成 ITT。于上午 9 点将小鼠换入干净的笼子禁食,禁食 5 h 后腹腔注射胰岛素

(0.75 U/kg)。并在规定时间内(0、30、60、90、120 min)在小鼠尾尖采血测量血糖,计算 AUC。

1.2.4 细胞实验分析

1.2.4.1 细胞活力分析 按照 CCK-8 试剂盒制造商的说明,将 HepG2 细胞(1×10^4)接种于 96 孔板,每组设置 5 个平行重复。细胞用不同浓度的 PD(0 ~ 160 $\mu\text{mol/L}$)孵育 24、48 h 后,采用 CCK-8 法测定细胞活力。在含 90 μL 培养基的孔中加入 CCK-8 溶液(10 μL),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 ~ 5 h。在 450 nm 处用酶标仪测量吸光度(optical density, OD)值,并利用实验孔与对照孔之间的 OD 值之比表示细胞活力。

1.2.4.2 油红染色与定量分析 不同组细胞,除了 Con 组外,在 PA 和 OA 诱导培养 48 h 后,用 4% 多聚甲醛固定液在室温下固定 15 min,维持细胞的形态结构。PBS 洗涤后,细胞在室温下进行 20 min 的油红 O 染色,使细胞内的脂滴清晰地显现出来。在显微镜下收集图像(LEICA DFC450C 显微镜摄像机)。为了进一步实现脂滴含量的定量评估,用异丙醇萃取细胞中的油红染液,酶标仪检测 450 nm 波长下的 OD 值。

1.2.5 生化指标分析 HepG2 细胞、肝脏组织和血清中 TC、TG 的含量,肝脏组织和血清中 AST 和 ALT 含量,以及细胞培养基中游离脂肪酸的含量使用试剂盒检测。实验步骤按照制造商提供的说明书进行。采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,细胞内和组织内的 TC 和 TG 含量以 mmol/g prot 表示。

1.2.6 组织病理学检查 实验结束时,固定一部分肝脏组织,在不同浓度的酒精中脱水,制成石蜡样品。将样品切成 5 μm 切片,进行 HE 染色。并用光学显微镜拍摄图像,使用 Image J 对组织学图像进行量化分析,根据肝切片组织学定义 NAFLD 活动性评分系统量化 HE 染色肝切片中的 NAFLD^[9]。

还进行了免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)染色,G0S2 染色时,取肝组织石蜡切片(5 μm),脱蜡至水,滴加 5% BSA 封闭液 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,然后用 G0S2 抗体(1 : 150)孵育,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下过夜。第 2 天,切片用滴加生物素标记山羊抗兔 IgG,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,并用 DAB 显色。

1.2.7 qRT-PCR 分析 用组织 RNA 纯化试剂盒(脂肪组织专用)提取肝组织和细胞内总 RNA,然后用 4 $\times$ EZscript 逆转录混合液将其逆转录为 cDNA。除此之外,参照 2 $\times$ 彩色 SYBR Green qPCR 预混液(含 ROX2)的试剂说明书完成实验。PCR 引物如表 1 所示。

表 1 引物序列

Tab.1 Primer sequences

Gene	Primer sequences(5'-3')	Length(bp)
Homo G0S2	F:GTGCAGCACTGCATTGTTCAT	20
	R:TCCTTCCTCCCTAGTGCAAA	20
Homo ATGL	F:CAGGACAGCTCCACCAACAT	20
	R:TTGGAGAGCGGTAGAGGTT	20
Homo β -actin	F:CTCACCATGGATGATGATATCGC	23
	R:CCACATAGGAATCCTTCTGACC	22
Mus G0S2	F:GCCACCGAATCCAGAACTGA	20
	R:TTGATTGCTCGCAGACGCTA	20
Mus ATGL	F:ATGTTCCCGAGGGAGACCAA	21
	R:GAGGCTCCGTAGATGTGAGTG	20
Mus β -actin	F:GGCTGTATTCCCTCCATCG	20
	R:CCAGTTGCTAACAAATGCCATGT	22

1.2.8 免疫印迹实验 肝组织和 HepG2 细胞在 RIPA 裂解液中裂解。用 BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度。将等量蛋白在(4 ~ 20)% SDS-PAGE,使用 MOPS-SDS Running Buffer(1 $\times$)进行电泳,电压设置为 160 ~ 180 V。电泳后,在冰水浴中使用 90 V,100 min 的条件,将蛋白转移到 0.45 μm PVDF 膜上,转膜缓冲液使用的是 Tris-Glycine Transfer Buffer(1 $\times$),其中含有 20 % 甲醇。室温下用 5% BSA 封闭 2 h。然后与抗 G0S2、ATGL、 β -actin 的一抗(1 : 1 000)在 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。然后用辣根过氧化物酶(HRP)偶联的二级抗兔或小鼠抗体孵育。使用极超敏 ECL 试剂盒在 BioRad 成像系统检测免疫信号,并使用 Image Lab Software 定量分析。

1.3 统计学处理 使用 GraphPad Prism 9.0 软件分析各组实验数据差异,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PD 对 HFD 喂养小鼠的代谢紊乱的影响 动物实验的时间表如图 1A 所示。高脂饲养组小鼠体质量从第 3 周开始高于正常组小鼠($P < 0.05$),见图 1B。PD 给药 8 周后,与 HFD 组小鼠相比,小鼠体质量明显减轻($P < 0.01$),见图 1C。此外,PD 可以降低 OGTT 和 ITT 0、15、30、60、90 min 的血糖和 AUC ($F_{\text{OGTT}} = 13.44$, $F_{\text{ITT}} = 13.42$, $P < 0.05$),见图 1D ~ 1G。同样,PD 也降低了血清 TC 和 TG 的水平($P < 0.05$),见图 1J、1K。实验在给药 PD 后,HFD 组和 PD 组食量无明显差异的前提下进行,见图 1L。

2.2 PD 对 HFD 喂养小鼠肝脏脂质蓄积的影响 与 ND 组小鼠相比,HFD 组小鼠肝脏体积变大,角度变钝,肝脏质量显著增加;肝组织 HE 染色显示,

HFD 组小鼠脂滴累积(白色空泡)增多($P < 0.01$),炎症细胞浸润(蓝箭头)增加($P < 0.01$),肝脏组织 TG、TC 含量增加($P < 0.01$)。与 HFD 组相比,PD 组小鼠的肝脏质量(LW)和肝脏质量与体质量比(liver weight to body weight ratio,LW/BW)显著降低($F_{LW} = 19.03, F_{LW/BW} = 7.26, P < 0.01$),见图 1H、1I;进食量无明显差别($F = 1.20, P > 0.05$),见图 1F;肝组织脂滴累积减少($F = 41.55, P < 0.01$),炎症细胞浸润改善($P < 0.01$),见图 2A–2C;肝脏组织 TG、TC 含量减低($F_{TG} = 139.1, F_{TC} = 24.16, P < 0.01$),见图 2H、2I。

2.3 PD 对 HFD 喂养小鼠肝损伤的影响 与 ND

组相比,HFD 组小鼠血清 ALT 和 AST 含量增加,提示肝细胞受损,PD 组小鼠给药后,ALT 和 AST 含量降低($F_{ALT} = 11.18, F_{AST} = 9.94, P < 0.05$),见图 2D、2E。另外,在小鼠肝脏组织中,ALT 和 AST 的变化趋势与血清中一致,见图 2F、2G。结合肝脏病理切片的 HE 染色观察,进一步证实了 PD 对肝脏具有保护作用。

2.4 PD 对小鼠肝组织 G0S2/ATGL 基因表达的影响 与 ND 组小鼠相比,HFD 组小鼠的肝组织中,ATGL 蛋白和 mRNA 的表达下调($P < 0.05$),PD 组小鼠给药后,ATGL 表达水平上升($F = 43.07, P < 0.05$),见图 2N、2J、2L。与 ND 组相比,HFD 组小鼠

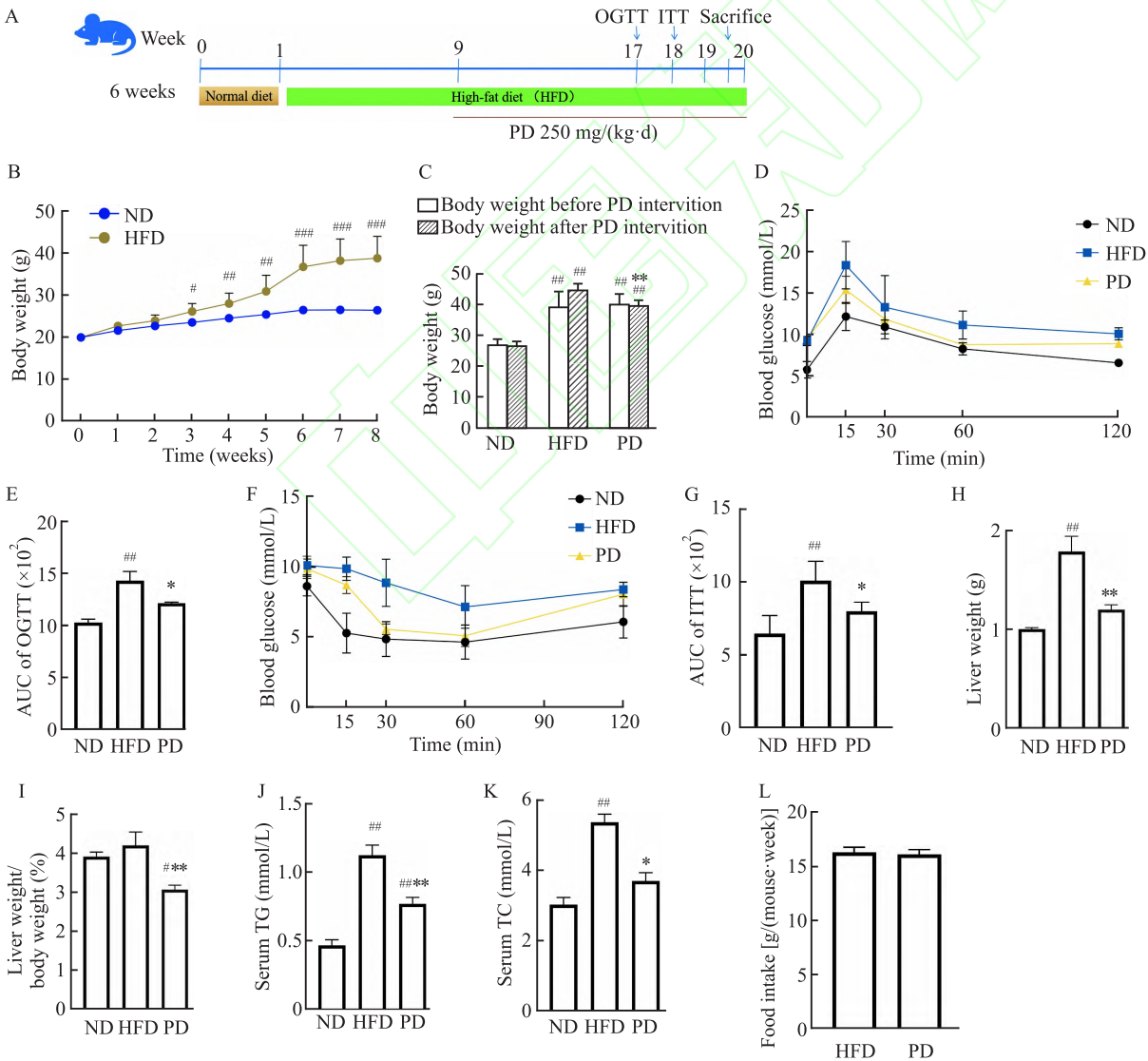


图 1 各组小鼠的代谢参数

Fig.1 Metabolic parameters of mice in each group

A: Experimental setup and drug intervention; B: Body weight changes ($n = 8-16$); C: Body weight ($n = 5$); D, E: OGTT and AUC ($n = 5$); F, G: ITT and AUC ($n = 5$); H, I: Liver weight and LW/BW ($n = 5$); J, K: Serum TG and TC ($n = 5$); L: Food intake in the two groups; $^*P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$, $^{###}P < 0.001$ vs ND group; $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ vs HFD group.

肝组织 GOS2 蛋白和 mRNA 的表达水平增加,而 PD 组的表达水平低于 HFD 组 ($F = 17.75, P < 0.05$), 见图 2M、2N、2K。观察 200 倍镜下 IHC(棕色)染色

的 GOS2 的表达,与 ND 组相比,HFD 组肝组织中 GOS2 的表达增加,PD 组 GOS2 表达较 HFD 组减少, 见图 2A。

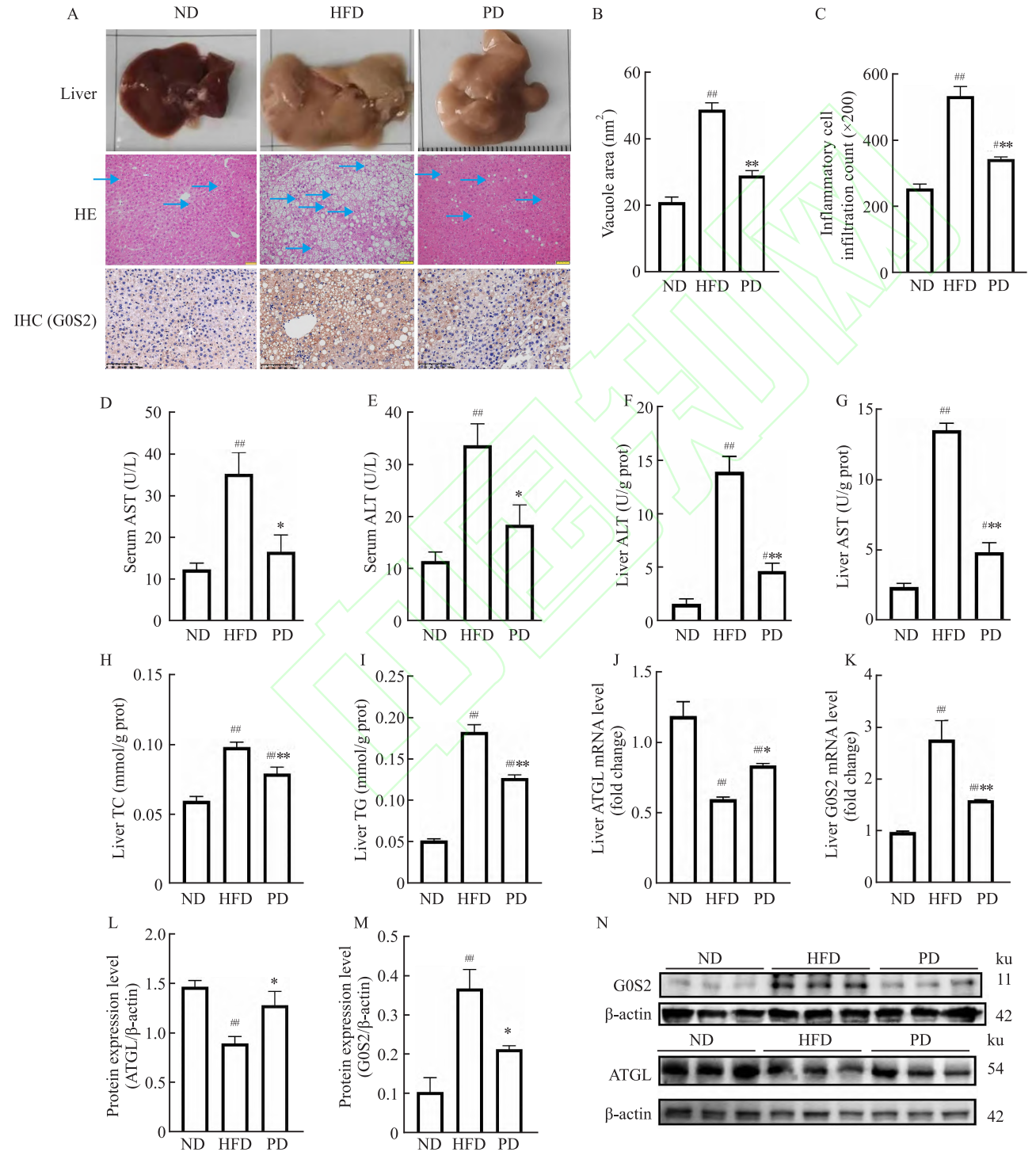


图2 PD缓解HFD所致小鼠NAFLD的机制研究

Fig. 2 Mechanistic study of PD in alleviating NAFLD induced by HFD in mice

A: Representative images of liver tissue, representative images of HE staining (blue arrows; inflammatory cell infiltration) and GOS2-positive cell IHC staining ($\times 200, n = 6$); B: Quantitative evaluation of liver fat vacuole area ($n = 3$); C: Quantitative evaluation of inflammatory cell count ($n = 3$); D, E: serum AST and ALT ($n = 5$); F, G: Liver tissue ALT and AST ($n = 5$); H, I: Liver tissue TC and TG ($n = 5$); J, K: ATGL and GOS2 mRNA expression ($n = 4$); L, M, N: ATGL and GOS2 protein expression ($n = 3$); # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs ND group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs HFD group.

2.5 PD 对 HepG2 细胞活力的影响 CCK-8 法检测 PD 对 HepG2 细胞活力的影响,结果显示,PD 浓度 $\leq 40\text{ }\mu\text{mol/L}$ 时对 HepG2 细胞活力没有影响($P > 0.05$),见图 3A、3B。如图 3C 所示,在 PA 培养基

中培养 48 h 后,HepG2 细胞活力下降($P < 0.01$)。相较于模型组,80 $\mu\text{mol/L}$ PD 处理组 HepG2 细胞活力降低($P < 0.01$)。因此,在所有细胞实验中,PD 的浓度均为 0 ~ 40 $\mu\text{mol/L}$ 。

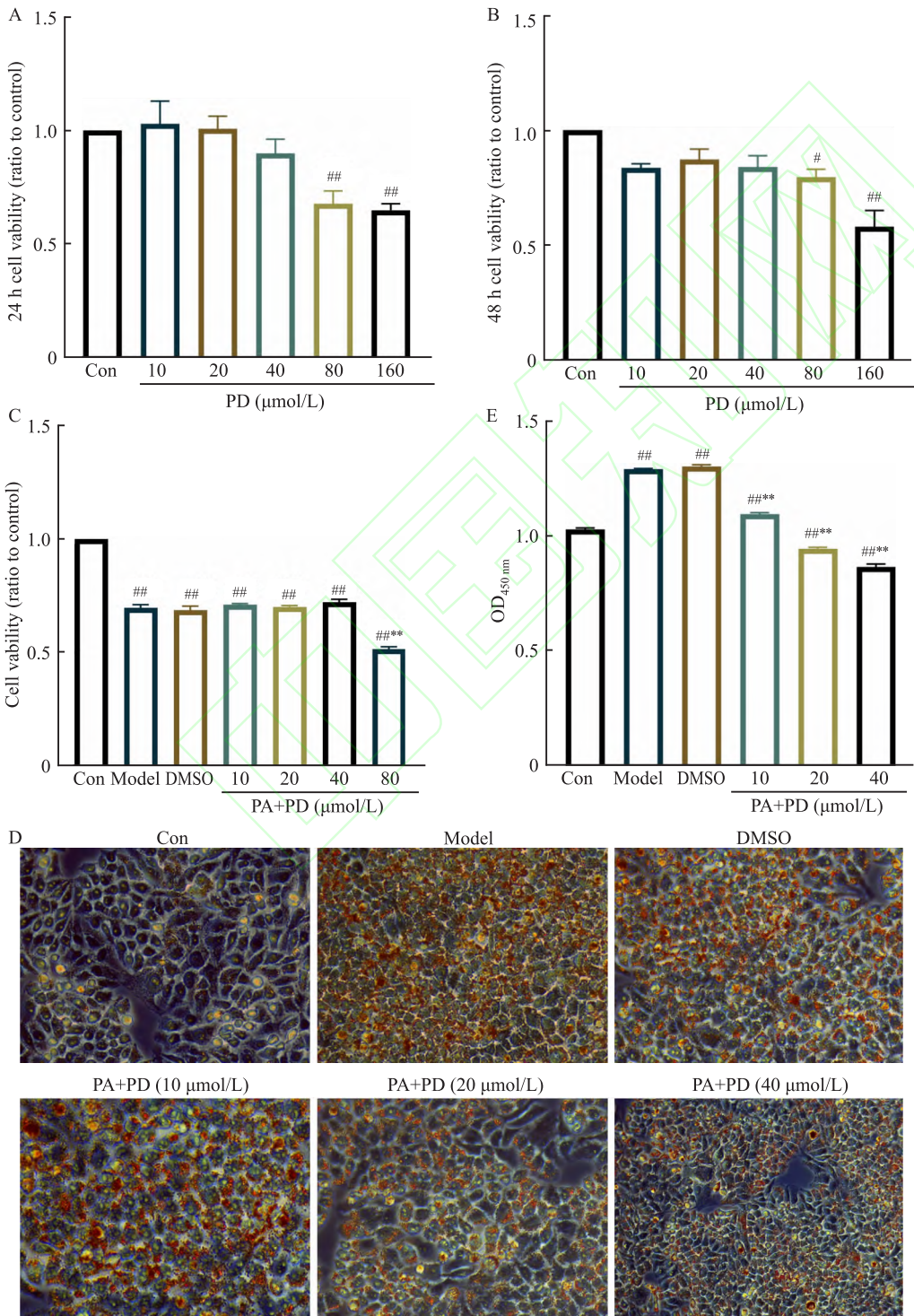


图 3 PD 对 PA 诱导的 HepG2 细胞脂质积累的影响($n = 6$)

Fig. 3 The effects of PD on PA-induced lipid accumulation in HepG2 cells($n = 6$)

A - C; HepG2 cell viability; D; Oil red O staining $\times 200$; E; Quantitative analysis; $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$ vs Con group; $^{***}P < 0.01$ vs Model group.

2.6 PD 对 HepG2 细胞代谢的影响 油红 O 染色结果表明,PD 可以减少 PA 诱导的 HepG2 细胞中的脂质积累 ($P < 0.01$),见图 3D、3E。细胞内和培养基上清液中 TC、TG 含量减少 ($P < 0.05$),见图 4A、4B、4E、4F。上清液培养基内游离脂肪酸含量增加 ($P < 0.05$),见图 4C。PD 的分子式见图 4D。

2.7 PD 对 HepG2 细胞 G0S2/ATGL 基因表达的影响 与 Con 组相比时,Model 组 HepG2 细胞中

G0S2 的 mRNA 和蛋白表达水平上升 ($P < 0.05$),而 ATGL 的 mRNA 和蛋白表达水平则下降 ($P < 0.05$)。与 Model 组相比,PD 组 (10 ~ 40 $\mu\text{mol/L}$) HepG2 细胞 G0S2 的 mRNA 和蛋白表达水平有所降低 ($F = 29.66, P < 0.05$),而 ATGL 的 mRNA 和蛋白表达水平则有所增加 ($F = 20.13, P < 0.05$),见图 4G-4K。

2.8 G0S2 被敲低后 PD 对 HepG2 细胞脂质蓄积

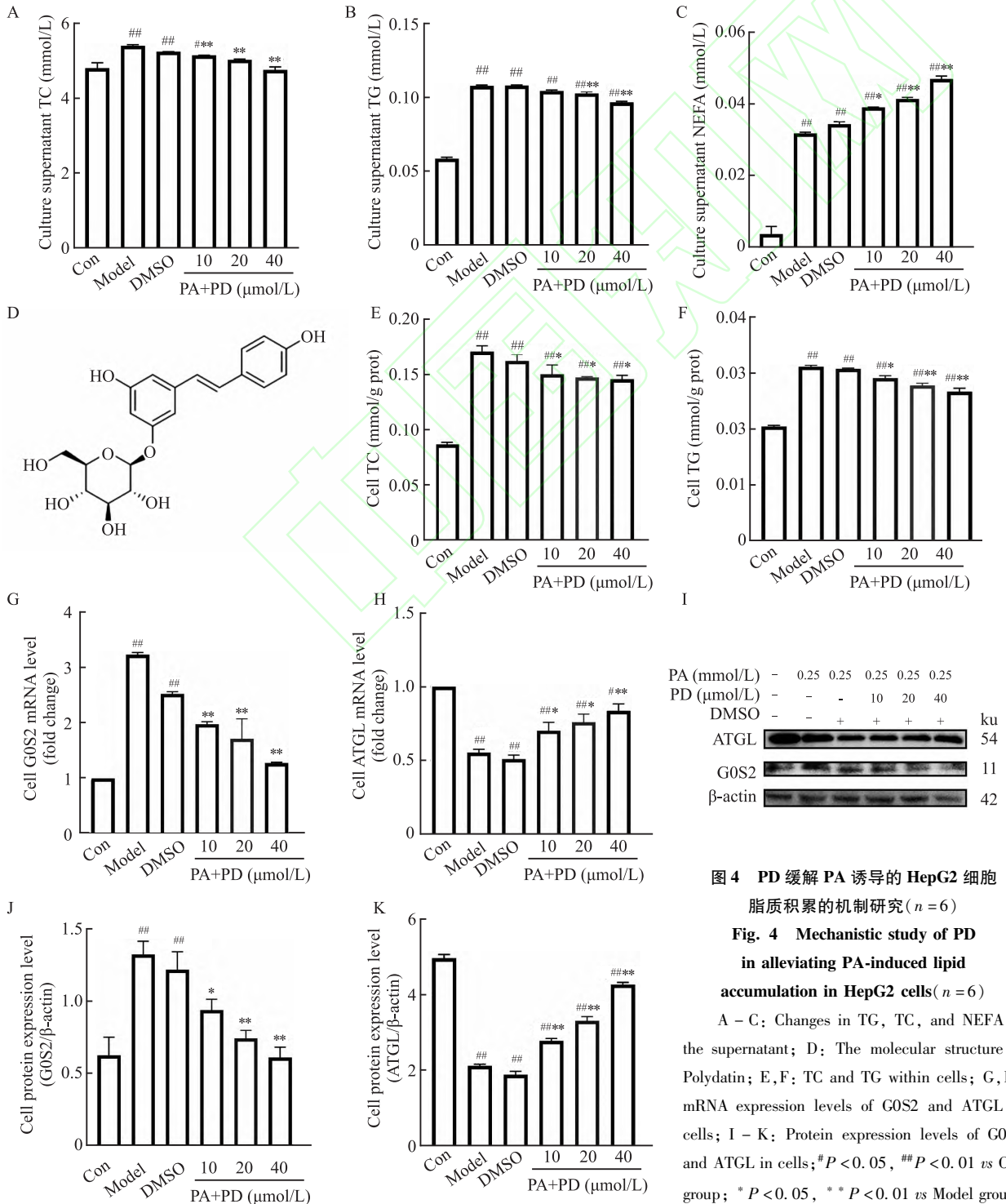


图 4 PD 缓解 PA 诱导的 HepG2 细胞脂质积累的机制研究 ($n = 6$)

Fig. 4 Mechanistic study of PD in alleviating PA-induced lipid accumulation in HepG2 cells ($n = 6$)

A - C: Changes in TG, TC, and NEFA in the supernatant; D: The molecular structure of Polydatin; E, F: TC and TG within cells; G, H: mRNA expression levels of G0S2 and ATGL in cells; I - K: Protein expression levels of G0S2 and ATGL in cells; $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$ vs Con group; $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ vs Model group.

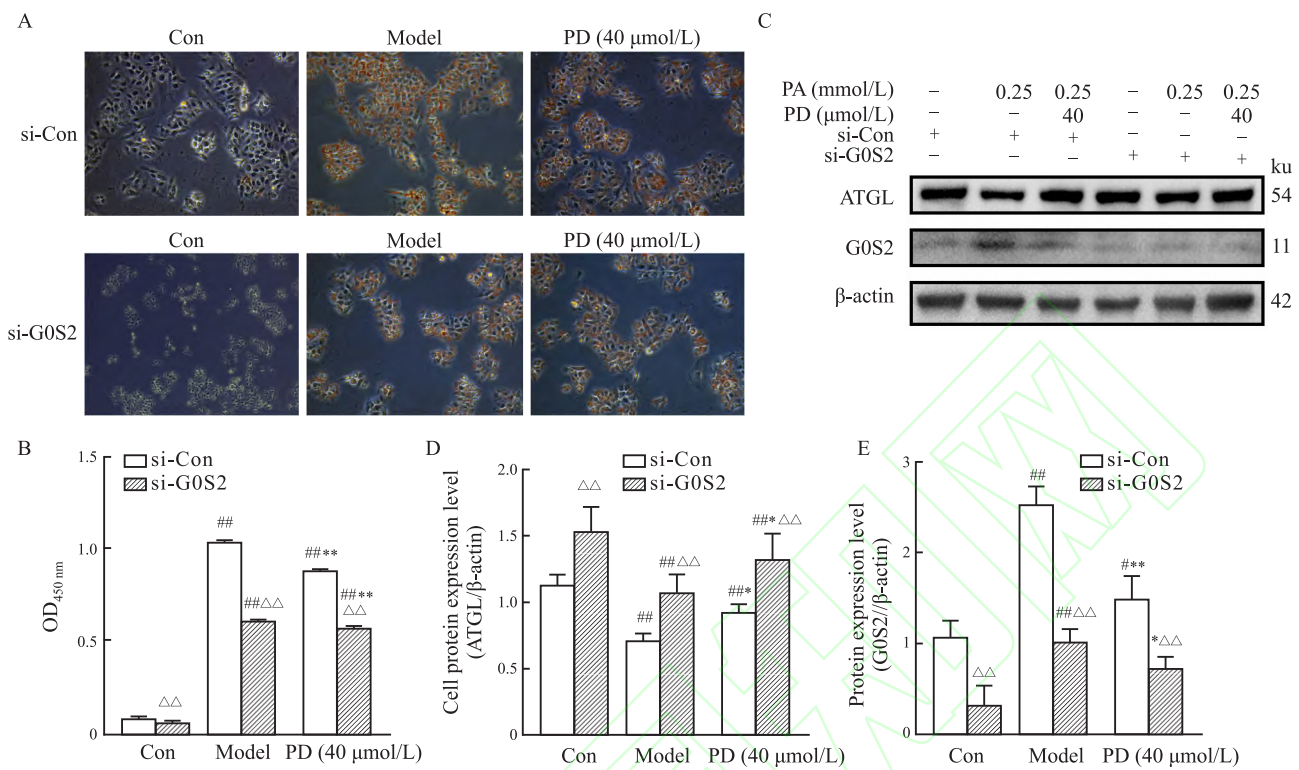


图 5 G0S2 siRNA 转染对 PD 缓解 PA 诱导的 HepG2 细胞的脂质积累的影响($n=6$)

Fig. 5 The effects of G0S2 siRNA transfection on PD's alleviation of PA-induced lipid accumulation in HepG2 cells($n=6$)

A: Oil Red O staining $\times 200$; B: Quantitative analysis; C - E: The effects of G0S2 siRNA transfection on Polydatin's regulation of ATGL and G0S2 protein expression levels in cells; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs Con group; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs Model group; $\Delta\Delta P<0.01$ vs si-Con group.

的影响 转染 G0S2 siRNA 24 h 后的 HepG2 细胞与 PA 和 PD 共孵育 48 h。与 si-Con 组相比,敲低 G0S2 后,细胞内的脂质蓄积显著减少($P<0.01$),这一现象通过油红 O 染色在显微镜下观察得到直观体现,并通过异丙醇提取后的酶标仪定量分析得到了进一步的验证。进一步的研究表明,在 G0S2 被敲低的 HepG2 细胞中,PD 依然能够有效促进脂肪分解,见图 5A、5B。Western blot 实验结果表明,G0S2 的敲低对 ATGL 蛋白表达的抑制作用有所减弱($P<0.01$),导致 ATGL 蛋白表达水平相对增加,但 PD 依然能够增加 ATGL 的表达水平,见图 5C - 5E。

3 讨论

NAFLD 已成为全球最常见的慢性肝病,影响了约 25% 的人口。NAFLD 的发病机制复杂,与胰岛素抵抗、脂质代谢紊乱以及慢性炎症^[10]等因素密切相关。尽管目前尚无特效药物针对 NAFLD,生活方式的改变,如体质量管理和饮食调整^[11],仍被推荐为主要干预措施。因此,深入理解 NAFLD 的发病机制及寻找新的治疗靶点显得尤为重要。本研究通过多种实验方法,验证了 PD 能够显著改善脂质代谢紊

乱,降低肝脏脂肪含量,并调节 G0S2 和 ATGL 的表达,从而促进 NAFLD 的缓解,这与之前的研究^[12-13]结果相似。

在本实验中,与模型组相比,PD 组小鼠的体质量和肝脏湿重显著降低;血清中的 AST、ALT、TG 和 TC 水平也显著下降;病理学观察进一步证实了其疗效,表现为肝组织脂泡面积减小和炎细胞浸润减轻,这些结果表明 PD 能够通过改善肝脏的脂肪变性和炎症状态来减轻肝脏损伤,并改善脂质代谢。有研究^[14]也指出,PD 可能通过减少肝脏中 TNF- α 的表达、降低脂质过氧化水平和抑制脂肪合成,保护高脂饮食诱导的肝脂肪变性^[15]。OGTT 和 ITT 实验结果表明,PD 组小鼠各时间点的血糖水平和曲线下面积均降低,表明其能够缓解高脂饮食引起的胰岛素抵抗。既往研究^[16]表明,PD 通过调节胰岛素受体底物 2(IRS-2)和 AKT 信号通路,有效保护肝脏,预防脂肪肝和胰岛素抵抗。

基因表达方面,PD 组小鼠肝组织中 G0S2 mRNA 和蛋白表达显著下降,而 ATGL 显著升高。肝组织切片免疫组化显示 G0S2 表达减少,再次验证了其调节作用。在细胞实验中,PD 处理的 HepG2 细

胞脂滴减少,脂质代谢明显改善,G0S2 表达下降,而 ATGL 表达升高,表明 PD 可能通过促进脂质分解来改善细胞的脂质代谢。有研究^[17]表明 G0S2 在能量代谢和产热中发挥关键作用,PD 在 G0S2 被敲低的 HepG2 细胞中,仍能促进脂肪分解,且对 ATGL 表达的影响减弱。这一结果显示,PD 不仅能够通过降低 G0S2 的表达,减少对 ATGL 的抑制作用,从而增加脂肪分解,还能够通过独立于 G0S2 的途径来调节 ATGL 的表达,促进脂肪分解。这些结果支持 PD 作为 NAFLD 治疗药物的潜力,并为其在其他代谢疾病中的应用提供了基础^[12]。此外,这提示 PD 可能通过多条信号通路来干预 NAFLD 的发生和发展^[18]。未来的研究可以进一步探讨 PD 对其他信号通路的影响,以及这些通路在脂肪代谢、胰岛素抵抗和炎症中的作用,为 NAFLD 的治疗提供更全面的理解。本研究的局限性主要体现在样本量相对较小以及缺乏临床验证。因此,未来研究应考虑扩大样本规模,并结合临床试验,以确认 PD 在 NAFLD 治疗中的有效性和安全性。同时,深入探讨其作用机制及在其他代谢疾病中的潜在应用也将是重要的研究方向。

综上所述,本研究揭示了 PD 通过调节 G0S2 和 ATGL 的表达,显著减轻高脂饮食诱导的 NAFLD 小鼠的代谢紊乱和脂质积累。这一研究不仅丰富了对 NAFLD 发病机制的理解,也为开发新的治疗策略提供了理论基础。未来的研究应进一步验证 PD 的临床应用潜力及其在其他代谢疾病中的作用,以期对相关疾病的治疗提供新的思路和方法。

参考文献

- [1] Powell E E, Wong V W, Rinella M. Non-alcoholic fatty liver disease[J]. Lancet, 2021, 397(10290): 2212–24. doi:10.1016/S0140-6736(20)32511-3.
- [2] Loomba R, Friedman S L, Shulman G I. Mechanisms and disease consequences of nonalcoholic fatty liver disease[J]. Cell, 2021, 184(10): 2537–64. doi:10.1016/j.cell.2021.04.015.
- [3] Nielsen T S, Møller N. Adipose triglyceride lipase and G₀/G₁ switch gene 2: approaching proof of concept[J]. Diabetes, 2014, 63(3): 847–9. doi:10.2337/db13-1838.
- [4] Yang X, Lu X, Lombès M, et al. The G(0)/G(1) switch gene 2 regulates adipose lipolysis through association with adipose triglyceride lipase[J]. Cell Metab, 2010, 11(3): 194–205. doi:10.1016/j.cmet.2010.02.003.
- [5] Jaeger D, Schoiswohl G, Hofer P, et al. Fasting-induced G₀/G₁ switch gene 2 and FGF21 expression in the liver are under regulation of adipose tissue derived fatty acids[J]. J Hepatol, 2015, 63(2): 437–45. doi:10.1016/j.jhep.2015.02.035.
- [6] Luo J, Chen S, Wang L, et al. Pharmacological effects of polydatin in the treatment of metabolic diseases: a review[J]. Phytomedicine, 2022, 102: 154161. doi:10.1016/j.phymed.2022.154161.
- [7] 江云,高月求,朱明清,等. C57BL/6 小鼠非酒精性脂肪肝模型的建立研究[J]. 蚌埠医学院学报, 2018, 43(5): 573–6. doi:10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2018.05.003.
- [7] Jiang Y, Gao Y Q, Zhu M Q, et al. Establishment of the nonalcoholic fatty liver disease model in C57BL/6 mice[J]. J Bengbu Med Coll, 2018, 43(5): 573–6. doi:10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2018.05.003.
- [8] 张霖,陈育尧,孙学刚,等. 虎杖苷对非酒精性脂肪肝大鼠保护作用及机制研究[J]. 陕西中医, 2010, 31(6): 756–8. doi:10.3969/j.issn.1000-7369.2010.06.079.
- [8] Zhang L, Chen Y Y, Sun X G, et al. Protective effect and mechanism of polydatin on nonalcoholic fatty liver in rats[J]. Shaanxi J Tradit Chin Med, 2010, 31(6): 756–8. doi:10.3969/j.issn.1000-7369.2010.06.079.
- [9] Kleiner D E, Brunt E M, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease[J]. Hepatology, 2005, 41(6): 1313–21. doi:10.1002/hep.20701.
- [10] Herrero-Cervera A, Soehnlein O, Kenne E. Neutrophils in chronic inflammatory diseases[J]. Cell Mol Immunol, 2022, 19(2): 177–91. doi:10.1038/s41423-021-00832-3.
- [11] 李婉丽,戚雪平,丛淑琪,等. 粪菌移植调节肠源性雌激素及其代谢物组成与非酒精性脂肪性肝病相关性研究[J]. 安徽医科大学学报, 2025(8): 1423–31. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.08.009.
- [11] Li W L, Qi X P, Cong S Q, et al. Study on the correlation between fecal bacteria transplantation and nonalcoholic fatty liver disease by regulating the composition of enterogenous estrogen and its metabolites[J]. Acta Univ Med Anhui, 2025(8): 1423–31. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.08.009.
- [12] Tang M C, Cheng L, Qiu L, et al. Efficacy of Tiopronin in treatment of severe non-alcoholic fatty liver disease[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2014, 18(2): 160–4.
- [13] Kanda T, Matsuoka S, Yamazaki M, et al. Apoptosis and non-alcoholic fatty liver diseases[J]. World J Gastroenterol, 2018, 24(25): 2661–72. doi:10.3748/wjg.v24.i25.2661.
- [14] Zhang J, Tan Y, Yao F, et al. Polydatin alleviates non-alcoholic fatty liver disease in rats by inhibiting the expression of TNF- α and SREBP-1c[J]. Mol Med Rep, 2012, 6(4): 815–20. doi:10.3892/mmr.2012.1015.
- [15] 王海燕,张宇新,朱丽,等. miR-122-5p、miR-143-3p 及炎症因子 IL-6、IL-10 在双酚 A 和高脂饮食诱导的小鼠非酒精性脂肪性肝病中的表达及意义[J]. 安徽医科大学学报, 2024, 59(10): 1769–76, 1784. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.10.011.
- [15] Wang H Y, Zhang Y X, Zhu L, et al. Expression and significance of miR-122-5p, miR-143-3p and inflammatory factors IL-6 and IL-10 in mice with nonalcoholic fatty liver disease induced by bisphenol A and high-fat diet[J]. Acta Univ Med Anhui, 2024, 59

(10): 1769 – 76, 1784. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000 – 1492.2024.10.011.

- [16] Zhang Q, Tan Y, Zhang N, et al. Polydatin supplementation ameliorates diet-induced development of insulin resistance and hepatic steatosis in rats[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(1): 603 – 10. doi:10.3892/mmr.2014.2708.
- [17] El-Asaad W, El-Kouhen K, Mohammad A H, et al. Deletion of the gene encoding G0/G1 switch protein 2 (G0s2) alleviates

high-fat-diet-induced weight gain and insulin resistance, and promotes browning of white adipose tissue in mice[J]. *Diabetologia*, 2015, 58(1): 149 – 57. doi:10.1007/s00125-014-3429-z.

- [18] Fang T, Wang H, Pan X, et al. Mouse models of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): pathomechanisms and pharmacotherapies[J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(15): 5681 – 97. doi:10.7150/ijbs.65044.

Experimental study on the improvement of non-alcoholic fatty liver disease by regulating G0S2 and ATGL expression with polydatin

Sheng Luguang^{1,2}, Liu Dandan³, Liu Weibin³, Lei Tao³, Chen Qingguang⁴, Lu Hao⁴, Xu Bilin^{1,2,3}

(¹Shanghai Putuo Central School of Clinical Medicine, Anhui Medical University, Shanghai 200062;

²The Fifth School of Clinical Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032; ³Dept of Endocrinology, Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062; ⁴Dept of Endocrinology, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200021)

Abstract Objective To investigate the effects of polydatin on a high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) mouse model and hepatoma G2 (HepG2) cell model, and to reveal its potential molecular mechanisms. **Methods** Thirty 6-week-old male SPF C57BL/6J mice were randomly divided into a normal diet group and a high-fat diet group. After the NAFLD mouse model was established in the high-fat diet group, they were further divided into a model group and a polydatin treatment group. The polydatin treatment group was administered polydatin by gavage at a dose of 250 mg/(kg · d) for 10 weeks, during which body weight was monitored and oral glucose and insulin tolerance tests were performed. At the end of the experiment, a series of tests to evaluate the effects of polydatin on mouse liver weight, blood lipids, liver lipid accumulation, and liver injury markers were performed. The expression of G₀/G₁ switch gene 2 (G0S2) and adipose triglyceride lipase (ATGL) was measured by qRT-PCR and Western blot, and gene expression was further verified using immunohistochemical staining. The effects of polydatin on HepG2 cell activity was assessed by CCK-8 assay, lipid accumulation was observed by oil red O staining, and the expression of G0S2 and ATGL was detected by qRT-PCR and Western blot. **Results** Polydatin significantly reduced the body weight, liver weight, and serum and liver tissue levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), triglyceride (TG), and total cholesterol (TC) in mice ($P < 0.05$), alleviated pathological liver damage, decreased G0S2 expression ($P < 0.05$), and increased ATGL expression ($P < 0.05$). At the cellular level, polydatin reduced lipid droplet accumulation, improved lipid metabolism, decreased G0S2 expression ($P < 0.05$), and increased ATGL expression ($P < 0.05$). Even in cells with knockdown of G0S2, polydatin still promoted fat decomposition ($P < 0.01$). **Conclusion** Polydatin promotes hepatic fat breakdown by regulating the expression of G0S2 and ATGL, helping to alleviate metabolic disorders and liver damage in the NAFLD mouse model caused by a high-fat diet, offering a new strategy for treating NAFLD.

Key words polydatin; non-alcoholic fatty liver disease; C57BL/6J mice; HepG2 cells; fat decomposition; G₀/G₁ switch gene 2; adipose triglyceride lipase

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82074381); Scientific Research Project of Shanghai Health Commission (No. 202240309); Technology Innovation Project of Shanghai Putuo District Health System (No. ptkwws201911); Clinical Specialty Project of Shanghai Putuo District Health System (No. 2020tszk01)

Corresponding author Xu Bilin, E-mail: xubilin007@126.com