

熊果酸改善自然衰老大鼠糖脂代谢紊乱与自噬能力的研究

赖 颖^{1,3}, 马 朋³, 姚 玲³, 李海飞^{2,3}, 袁春琳³, 李春莉^{1*}, 王建伟^{3*}

¹重庆医科大学生命科学研究院; ²重庆医科大学基础医学院;

³重庆医科大学中医药防治代谢性疾病重庆市重点实验室,重庆 400016

摘要:为研究熊果酸对自然衰老大鼠糖脂代谢紊乱和自噬功能影响。实验取22月龄SD雄性大鼠25只,随机分为3组,即老年模型组($n=9$),熊果酸低剂量组(UA-L):灌胃给予熊果酸10 mg/kg($n=8$),熊果酸高剂量组(UA-H):灌胃给予熊果酸50 mg/kg($n=8$);另取8只3月龄SD青年大鼠作为青年对照组,均给予常规正常饮食饮水并记录摄食量和体重变化。用酶法和ELISA法检测血浆葡萄糖、甘油三酯和胰岛素并计算HOMA-IR指数,测定肝脏甘油三酯;油红“O”染色观察肝脏脂质沉积情况;Western blot法检测肝脏自噬相关蛋白及线粒体质量相关蛋白的表达。结果显示熊果酸(50 mg/kg)并不影响大鼠食物摄入量、体质量,但是逆转了老年大鼠血浆甘油三酯、胰岛素和HOMA-IR的升高,降低了肝质量、肝脏TG含量、改善了肝脏脂质沉积($P < 0.05$),与此同时老年大鼠肝脏自噬相关蛋白LC3B/3A,Beclin1和线粒体质量控制蛋白PGC-1 α ,Drp1的表达显著升高,但对P62,Pink1的表达无影响。根据以上实验结果推测熊果酸可以提高胰岛素敏感性,改善老年大鼠脂肪肝,增强肝细胞自噬,提高线粒体质量。

关键词:熊果酸;糖脂代谢紊乱;自噬;线粒体质量;老年鼠

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)5-0858-06

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.5.019

Ursolic acid improves age-related glycolipid metabolism disorder and autophagy in rats

LAI Ying^{1,3}, MA Peng³, YAO Ling³, LI Hai-fei^{2,3}, YUAN Chun-lin³, LI Chun-li^{1*}, WANG Jian-wei^{3*}

¹Faculty of Life Sciences, Chongqing Medical University;

²Faculty of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University;

³Chongqing Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine for Prevention and Cure of Metabolic Diseases, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: This study aims to investigate the effect of ursolic acid (UA) on glycolipid metabolism disorder and hepatic autophagy in naturally ageing rats. Twenty-five male aging rats were divided randomly into three groups: the natural aging rat group (Aging, $n=9$), the aging rats supplemented with ursolic acid at 10 mg/kg (UA-L, $n=8$) and 50 mg/kg (UA-H, $n=8$) for 7 weeks. Eight young rats were randomly selected as the young normal group (Young, $n=8$). Enzymatical method and ELISA were used for the examination of plasma glucose, triglycerides, insulin concentrations and HOMA-IR index was calculated; Liver triglycerides were measured by enzymatical method; Liver lipid deposition was observed by Oil Red "O" staining; The autophagy-related proteins and mitochondrial quality proteins were analysed by Western blot. Results showed that treatment with UA (50 mg/kg, once daily, by oral gavage) could attenuate age-associated high plasma TG and insulin concentration under fasting conditions as well as suppress the increase in the HOMA-IR index, which suggests there is an improvement of systemic insulin sensitivity. Moreover, liver weight and hepatic triglyceride content were also decreased. Attenuation of the increased Oil Red O staining area was evident on histological examination of liver in UA (50 mg/kg)-treated rats. Importantly, UA (50 mg/kg) administration reversed the decreased expressions of autophagy-related proteins LC3B/3A, Beclin1 and mitochondrial quality proteins PGC-1 α , Drp1 in aging rats, although P62, Pink1 remained unchanged. The results suggest that UA

may attenuate systematic insulin resistance and hepatic lipid deposition, enhance hepatic autophagy, improve mitochondrial quality in aging rats.

Key words: ursolic acid; autophagy; glycolipid metabolism disorder; mitochondrial quality; aging rats

伴随生物分子、组织细胞及器官的慢性持续性损伤和功能减退,衰老机体易受疾病侵害而加速死亡^[1,2]。早有文献报道在机体衰老过程中胰岛素抵抗和脂质异位沉积等代谢综合症的发生率明显上升,而胰岛素抵抗又被认为是促使肝脏形成脂肪肝的关键因素之一,可促进脂质代谢紊乱,促使过多的游离脂肪酸向肝细胞聚集,进一步加重肝细胞脂肪变,过多游离脂肪酸亦可损伤线粒体,并造成氧化应激,产生大量氧自由基,且脂质沉积和胰岛素抵抗都与自噬有着密切关系^[3]。增强自噬可减轻肝脏胰岛素抵抗,降解肝脏内脂滴,减轻炎症反应,改善肝脏糖脂代谢紊乱^[4,5]。自噬已成为当前衰老相关研究的潜在突破点,寻找能够通过增强自噬改善衰老相关代谢紊乱的抗衰老药物已成为现代研究的热点。

熊果酸(ursolic acid)是一种广泛存在于天然植物中的五环三萜类化合物,现已证实熊果酸具有抗炎、抗氧化、降糖、改善胰岛素抵抗、调脂、抗肥胖、抗动脉粥样硬化等药理作用,且几乎无其他毒副反应,有望成为抗代谢综合征新药^[6,7]。同时近年有文献报道熊果酸能够增强自噬改善肌萎缩,提高代谢敏感蛋白水平进而延缓细胞衰老^[8],亦有文献报道其可以减少脂质沉积从而改善脂肪肝^[9]。本研究主要从自噬角度出发,观察熊果酸对自然衰老大鼠胰岛素敏感性和肝脏甘油三酯沉积的改善作用及其对自噬相关蛋白的影响。

1 材料与方法

1.1 动物实验

SD 大鼠,雄性,SPF 级,青年大鼠 3 月龄体质量 210~230 g,老年大鼠 22 月龄 440~550 g,重庆医科大学实验动物中心提供,动物生产许可证号:SCXK(渝)2015007,常规饲养,实验室温度 21.1 ℃,相对湿度 55.5%,12 h 明暗交替,自由饮水,经适应性喂养 1 周后开始实验。

1.2 药品及试剂

熊果酸由京都大学 Pharmafood 研究所馈赠;阿拉伯胶购自上海生物工程有限公司,批号:MC0124B1013J;甘油三酯(TG)和葡萄糖试剂盒购自南京建成生物工程研究所;胰岛素测定试剂盒购

自日本森永生科学研究所;油红“O”染色试剂购自德国 Sigma 公司;LC3A/3B 抗体、P62 抗体、Beclin1 抗体、Drp1 抗体、PGC-1α 抗体、Pink1 抗体购自 Cell Signaling Technology;羊抗兔 IgG 购自博士德生物工程有限公司。

1.3 仪器

匀浆机,德国 IAK;酶标仪,日本 SANYO 公司;电泳仪,美国 Bio-Rad 公司;光学显微镜,日本 Olympus 公司。

1.4 分组、模型复制及给药

取 22 月龄 SD 雄性大鼠 25 只,适应性喂养 7 天后,按平均体质量、禁食状态下血浆葡萄糖、甘油三酯随机分为 3 组,即老年模型组(9 只),熊果酸高、低剂量组(50, 10 mg/kg)(各 8 只),另取 8 只 3 月龄 SD 雄性大鼠作为青年对照组,每组均给予正常饮食能水,每两天记录摄食量,每三天记录大鼠体重。青年对照组和老年模型组分别给予 5% 阿拉伯胶灌胃,熊果酸组分别将药物溶于 5% 阿拉伯胶中,按照 5 mL/kg 灌胃,每日给药 1 次,连续 7 周,于实验第 7 周末称重并处死大鼠,取肝脏称质量,-80 ℃ 冻存,用于各项指标分析检测。

1.5 生化学指标检测

实验第 6 周末,所有大鼠禁食过夜,麻醉后于眼眶后静脉丛取血,采用肝素钠抗凝,4 ℃,3 000 rpm,离心 15 min,取血浆放入-20 ℃ 冰箱中冻存备用,使用试剂盒测定血浆葡萄糖、甘油三酯、胰岛素并计算 HOMA-IR 指数,具体操作严格按照说明书进行。

1.6 肝脏 TG 检测

称取适量(50~60 mg)肝脏组织,按照组织:异丙醇 = 100 mg:2 mL 比例加入异丙醇,匀浆,4 ℃ 过夜,离心(3 000 rpm,4 ℃,15 min),取上清,测定 TG 含量,具体操作严格按照说明书进行。

1.7 油红“O”染色

取适量 4% 多聚甲醛固定的肝脏组织,流水冲去多聚甲醛溶液,OCT 包埋,冰冻切片 8 μm 厚度,室温晾干后用于油红“O”染色。在光学显微镜(BX-51,日本 Olympus 公司)下观察脂滴沉积情况,并拍照(×400 倍)。

1.8 Western blot 检测蛋白表达

全蛋白提取试剂盒提取肝脏总蛋白,BCA 蛋白

浓度测定试剂盒检测蛋白浓度。制备 10% 分离胶, 5% 浓缩胶, SDS-PAGE 电泳, 上样量为 50 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$, 250 mA 恒流电转, 用 5% 脱脂牛奶封闭 1h, 分别加入 LC3A/3B, Beclin1, P62, PGC-1 α , Drp1, Pink1 抗体, 4 °C 摆床孵育过夜, TBST 5 × 10 min 洗膜后加二抗(室温孵育 2 h), ECL 发光, Image J 分析测定各条带的灰度值, 内参采用 GAPDH。

1.9 统计学处理方法

运用 Stat View 软件进行统计学分析, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用方差分析, 两两比较采用 S-N-K 检验。结果 $P < 0.05$ 表示有统计学差

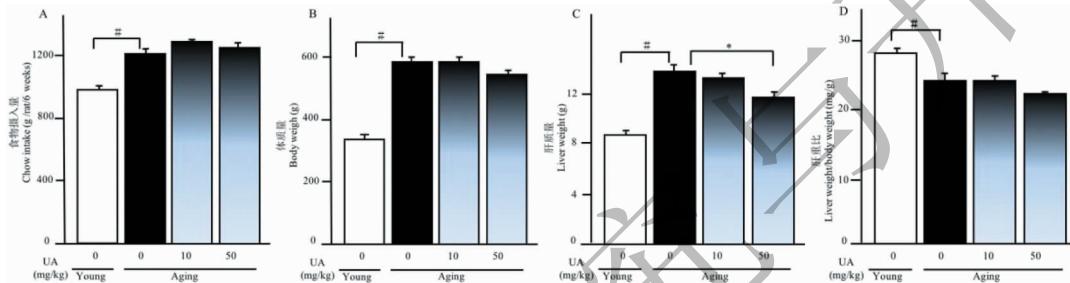


图 1 熊果酸对各组大鼠一般参数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8/9/8/8$)

Fig. 1 General parameters of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 8/9/8/8$)

注: 食物摄入量(A), 体质量(B), 肝质量(C) 和肝重比(D)。^{*} $P < 0.05$ 代表与青年对照组比较具有统计学差异,

* $P < 0.05$ 代表与老年模型组比较具有统计学差异。

Note: Chow intake (A), body weight (B), liver weight (C) and liver weight/body weight ratio (D) in rats.

$P < 0.05$ compared with young normal group, * $P < 0.05$ compared with aging group.

2.2 各组大鼠一般生化指标

图 2 所示, 与青年对照组比较, 老年模型组血浆葡萄糖、TG 含量、胰岛素和 HOMA-IR 指数明显升

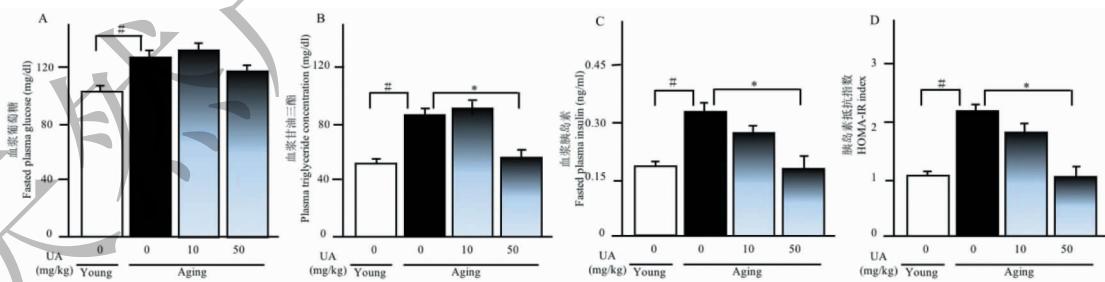


图 2 熊果酸改善老年大鼠血浆胰岛素敏感性 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8/9/8/8$)

Fig. 2 Ursolic acid improves insulin sensitivity in aging rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 8/9/8/8$)

注: 血浆葡萄糖(A), 甘油三酯(B), 胰岛素浓度(C) 和 HOMA-IR(D)。^{*} $P < 0.05$ 代表与青年对照组比较具有统计学差异,

* $P < 0.05$ 代表与老年模型组比较具有统计学差异。

Note: Plasma Glucose (A), plasma triglyceride (B), insulin (C) concentrations, HOMA-IR index (D).

$P < 0.05$ compared with young normal group, * $P < 0.05$ compared with aging group.

2.3 各组大鼠肝脏脂质沉积情况

如图 3 所示, 与青年对照组相比, 老年大鼠肝脏

异, $P > 0.05$ 表示无统计学差异。

2 结果

2.1 各组大鼠一般参数

图 1A 和 1B 结果显示, 与青年对照组比较, 老年模型组大鼠摄食量与体质量显著增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与老年模型组比较, 熊果酸低、高剂量组摄食量和体质量无明显差异 ($P > 0.05$), 体重亦无明显变化。如图 1C 和 1D 所示, 与青年对照组比较, 老年模型组肝质量和肝重比明显增加, 高剂量熊果酸使老年大鼠肝质量降低, 肝重比也有下降的趋势。

TG 含量(图 3A)和油红 O 染色面积(图 3B)显著增加($P < 0.05$), 提示随着大鼠年龄的增加其肝脏存

在过量的脂质沉积;与老年模型组比较,熊果酸高剂量组明显改善肝脏 TG 的过量沉积(图 3A-3B),而熊果酸低剂量组没有显著变化。这些结果表明,熊

果酸高剂量组比熊果酸低剂量组具有更显著改善肝脏甘油三酯沉积的作用。

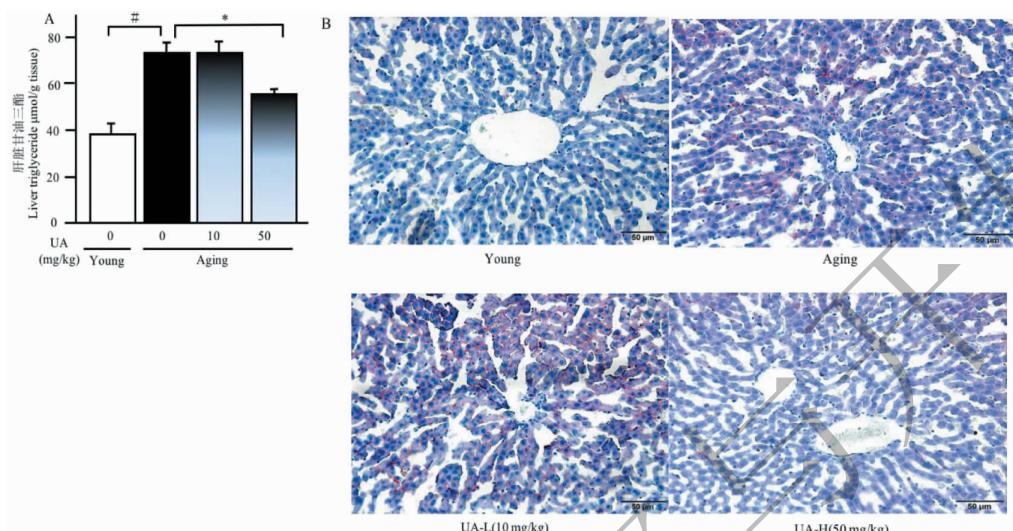


图 3 熊果酸改善老年大鼠肝脏脂质沉积($\bar{x} \pm s$, $n = 8/9/8/8$)

Fig. 3 Ursolic acid alleviates lipid accumulation in liver of aging rats($\bar{x} \pm s$, $n = 8/9/8/8$)

注:肝脏甘油三酯含量(A),油红O染色(比例尺,50μm)(B).#P<0.05 代表与青年对照组比较具有统计学差异,

*P<0.05 代表与老年模型组比较具有统计学差异。

Note: Liver triglyceride content (A), Oil Red O staining area (B). #P < 0.05 compared with young normal group,

* P < 0.05 compared with aging group.

2.4 肝脏自噬相关蛋白的变化

由于熊果酸低剂量组各项指标作用效果均不明显,故在肝脏自噬相关蛋白检测中选取了青年对照组、老年模型组和熊果酸高剂量组。通过 western blot 分析得出结果如图 4,与青年对照组比较,模型

组显著降低了 LC3B/3A 比值及 Beclin1 蛋白的表达($P < 0.05$),熊果酸高剂量组上调了这两种蛋白($P < 0.05$),提示老年大鼠肝脏自噬能力明显降低,而熊果酸高剂量组有效地逆转了这一现象。P62 蛋白在三组间均没有明显变化。

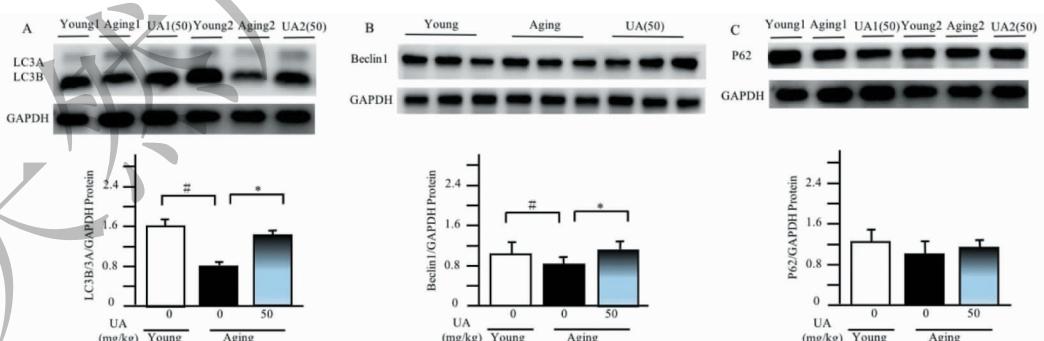


图 4 熊果酸对老年大鼠肝脏自噬的增强作用($\bar{x} \pm s$, $n = 8/9/8/8$)

Fig. 4 Ursolic acid enhances autophagy in liver of aging rats($\bar{x} \pm s$, $n = 8/9/8/8$)

注:自噬相关蛋白:LC3A/3B(A),Beclin1(B),P62(C).#P<0.05 代表与青年对照组比较具有统计学差异,

*P<0.05 代表与老年模型组比较具有统计学差异。

Note: Autophagy-related protein: microtubule-associated protein 1 light chain 3 LC3A/3B (A), Beclin1 (B), P62 (C).

#P < 0.05 compared with young normal group, * P < 0.05 compared with aging group.

2.5 肝脏线粒体受损相关蛋白的变化

与青年对照组相比,老年模型组 PGC-1 α , Drp1 蛋白的表达明显下降,给予熊果酸 50 mg/kg 治疗 7

周后,其表达显著升高且具有统计学差异($P < 0.05$)。这一结果提示老年大鼠肝脏线粒体受损,熊果酸可以改善线粒体受损,提高线粒体质量。

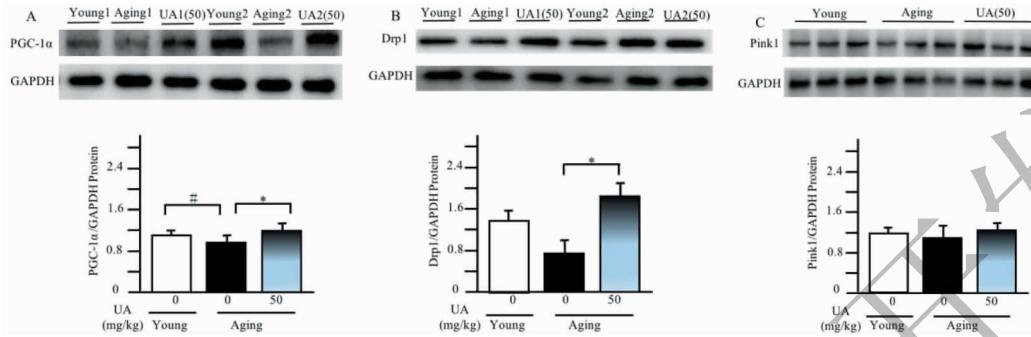


图 5 熊果酸改善老年大鼠肝脏线粒体功能($\bar{x} \pm s$, $n = 8/9/8/8$)

Fig. 5 Ursolic acid ameliorates mitochondria dysfunction in liver of aging rats($\bar{x} \pm s$, $n = 8/9/8/8$)

注:线粒体质量控制相关蛋白:PGC-1 α (A), Drp1 (B), Pink1 (C)。 $^{\#}P < 0.05$ 代表与青年对照组比较具有统计学差异,

$^{*}P < 0.05$ 代表与老年模型组比较具有统计学差异。

Note: Mitochondrial quality control-related proteins: PGC-1 α (A), Drp1 (B), Pink1 (C). $^{\#}P < 0.05$ compared with young normal group,

$^{*}P < 0.05$ compared with aging group.

3 讨论

有研究通过高脂饮食建立了 NAFLD 大鼠模型同时灌胃给予熊果酸进行干预发现熊果酸能有效降低肝脏 TG 沉积,改善高脂饮食所致胰岛素抵抗,对 NAFLD 大鼠肝脏具有保护作用^[10],所以我们猜测熊果酸在自然衰老大鼠中可能具有相同作用。实验结果显示,无论是熊果酸低剂量还是高剂量对老年大鼠的正常饮食能量均没有影响(图 1A ~ B),排除因熊果酸对其摄食的影响而引起各代谢指标变化。文献报道^[11]熊果酸可以降低肝质量与肝重比,但具体机制尚不明确,而我们的实验结果与此一致,即给予熊果酸(50 mg/kg)后明显降低了肝质量,这一现象有待进一步研究。同时与预期结果一致,熊果酸(50 mg/kg)明显降低了血浆胰岛素和 HOMA-IR 指数,改善了老年大鼠胰岛素敏感性的下降;从肝脏 TG 检测与油红 O 染色结果看,在给予熊果酸(50 mg/kg)治疗后肝脏 TG 沉积明显减少,提示在机体老化中逐步出现了甘油三酯沉积和胰岛素抵抗,在给予熊果酸治疗后显著改善了上述不良现象。

通过查阅文献我们发现,自噬可降解肝细胞内的脂滴改善脂肪肝,从而起到对肝脏的保护作用^[12]。自噬发生过程中,微管相关蛋白轻链 3 (LC3)是诱导自噬发生的关键分子,LC3B 是形成自噬体的标志分子,LC3B/LC3A 比值与自噬成正相关,可初步判断自噬的发生^[13]。同时在自噬发生中

Beclin1 的表达水平往往会上升,许多自噬调控蛋白通过与 Beclin1 的不同结构域或氨基酸发生直接或间接结合形成蛋白复合体,进而调控自噬水平^[14]。本次研究结果表明,老年大鼠 LC3B/LC3A 比值显著降低,提示自然衰老过程中肝脏发生自噬的能力减弱,而在给予熊果酸(50 mg/kg)治疗后,其比值明显上升,Beclin1 的结果与 LC3B/LC3A 一致,表明熊果酸可以促进肝自噬的发生。研究显示一个完整的细胞自噬过程包括自噬诱导、自噬体形成及自噬溶酶体的降解。LC3B 与 Beclin1 均是参与自噬体的形成过程,P62 则是作为一种参与多种信号转导的蛋白,可连接 LC3 和泛素化的底物,随后被整合到自噬体中并在自噬溶酶体中被降解,参与自噬体的降解过程,从而形成一个动态的自噬流^[15]。自噬发生时,P62 水平下降;而自噬受抑制时,P62 水平上升。在本次实验中,P62 在老年模型组中下降,用药物干预后有上升趋势,但无统计学差异,故我们考虑熊果酸是否是通过其他途径进行自噬溶酶体的降解从而改善自噬流完成对受损细胞的清除作用,有待进一步研究。

如前言所述,老化机体易发生胰岛素抵抗、脂质代谢紊乱,过多游离脂肪酸可损伤线粒体,并造成氧化应激,产生大量氧自由基,而细胞的自噬机制逐渐减弱,使损伤的线粒体逐渐堆积,最终又加剧衰老,通过线粒体自噬清除受损线粒体能够抑制细胞的衰

老^[16]。所以本次实验我们进一步检测了线粒体质量控制相关蛋白 PGC-1α, Drp1, Pink1 来判断线粒体是否有损伤及熊果酸对其是否有改善作用。PGC-1α 是线粒体生成的关键调控因子, 可增强核受体及相关转录蛋白的转录活性, 刺激线粒体合成和呼吸的发生^[17]。结果显示, 与青年对照组比较, 老年组 PGC-1α 显著降低, 说明线粒体生物发生明显减少, 而熊果酸治疗后逆转了这一结果, 提高了线粒体质量。同时也有研究发现, 和线粒体分裂有关的蛋白质也参与到了线粒体自噬过程中, Drp1 是一种与线粒体分裂有关的蛋白^[18], 其结果与 PGC-1α 一致, 表明老年鼠线粒体动力减弱, 自噬也相应减少, 而用药后有了明显的上升趋势。Pink1 是一种主要存在于线粒体内膜的蛋白激酶, 通过激活 Parkin 这一 E3 泛素蛋白连接酶, 从而使受损线粒体的阴离子电位通道蛋白 VDAC1 泛素化, 从而启动线粒体的降解过程^[19]。本实验结果中 Pink1 并没有明显差异, 提示受损线粒体的清除可能不是通过 Pink1-Parkin 途径发挥作用。

综上所述, 本研究结果表明, 在自然衰老大鼠中出现了胰岛素敏感性降低, 肝脏脂质沉积增加, 线粒体质量损坏, 自噬能力减弱, 而熊果酸能够改善老年大鼠这些不良现象, 提示熊果酸具有改善衰老相关糖脂代谢紊乱和自噬减退的能力。

参考文献

- Olshansky SJ. Ageing: Measuring our narrow strip of life [J]. Nature, 2016, 538:175-176.
- You TH, Wen L, Liu F. Recent advances on active substances of anti-aging and its mechanisms [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2015, 27:1985-1990.
- Mao YQ, Fan XM. Autophagy, a new target for non-alcoholic fatty liver disease therapy [J]. WCJD (世界华人消化杂志), 2015, 23:5107-5112.
- Christian P, Sacco J, Adeli K. Autophagy: emerging roles in lipid homeostasis and metabolic control [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1831:819-824.
- Mellor KM, Bell JR, Ritchie RH, et al. Myocardial insulin resistance, metabolic stress and autophagy in diabetes [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2013, 40(1):56-61.
- Jian L, Gao MJ, Xia X. Ursolic acid attenuate myocardial ischemia reperfusion injury in diabetic rats [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2017, 29:843-848.
- Marisa A, Cagri C, Carla M Sa, et al. Ursolic acid and luteolin-7-glucoside improve lipid profiles and increase liver glycogen content through glycogen synthase kinase-3 [J]. Phytother Res, 2010, 24:220-224.
- Bahrami SA, Bakhtiari N. Ursolic acid regulates aging process through enhancing of metabolic sensor proteins level [J]. Biomed Pharmacother, 2016, 82:8-14.
- Zhang MF, Shen YQ. Research progress on lipidemic regulation and antiobesity effects of oleanolic acid and ursolic acid [J]. Drug Eval Res (药物评价研究), 2015, 38(1):90-97.
- Zhang J, Wu SY, Wang L, et al. Effects of ursolic acid on fat metabolism in high-fat-fed induced insulin resistance rats [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2010, 28:975-978.
- Zeng L, Tang WJ, Yin JJ, et al. Experimental study on improving steatosis of hepatocytes with ursolic acid [J]. Chin Med Mater(中药材), 2015, 38:1049-1052.
- Liu K, Czaja MJ. Regulation of lipid stores and metabolism by lipophagy [J]. Cell Death & Differentiation, 2013, 20(1):3-11.
- Feng Y, He D, Yao Z, et al. The machinery of macroautophagy [J]. Cell Res, 2014, 24(1):24-41.
- Sahni S, Merlot AM, et al. Gene of the month: BECN1 [J]. J Clin Pathol, 2014, 67:656-660.
- Duran A, Amanchy R, Linares JF, et al. P62 is a key regulator of nutrient sensing in the mTORC1 pathway [J]. Molecular Cell, 2011, 44:134-146.
- Zhu YS, Liu JL. Cell autophagy and mitochondrial quality control with healthy aging [J]. Prog Biochem Biophys (生物化学与生物物理进展), 2014, 41:247-256.
- Fige MT, Osiewacz HD, Reichert AS. Quality control of mitochondria during aging: is there a good and a badside of mitochondrial dynamics [J]. Bioessays, 2013, 35:314-322.
- Yang CC, Chen D, Lee SS, et al. The dynamin-related protein DRP-1 and the insulin signaling pathway cooperate to modulate *Caenorhabditis elegans* longevity [J]. Aging Cell, 2011, 10:724-728.
- Vives-Bauza C, Zhou C, Huang Y, et al. PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107:378-383.