

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.05.004

## Nrf2 激动剂 CDDO-Im 对高脂饮食诱导的肥胖小鼠肝脏脂肪变性的影响\*

翟小莹<sup>1</sup> 赵琳<sup>1</sup> 夏煜栋<sup>2</sup> 木尼拉·吐尔孙<sup>1</sup> 焦谊<sup>1Δ</sup>

(1 省部共建中亚高发病因与防治国家重点实验室,新疆医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室

新疆地方病分子生物学重点实验室 新疆 乌鲁木齐 830000;

2 华中科技大学同济医学院附属同济医院心血管内科 湖北 武汉 430030)

**摘要 目的:**探究 Nrf2 激动剂 CDDO-Im 对高脂饮食诱导的肥胖小鼠肝脏脂肪变性的作用。**方法:**33 只雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为两组:一组 16 只饲喂普通饲料,另一组 17 只饲喂高脂饲料建立肥胖模型。造模成功后将小鼠随机分成四组:普通饲料溶剂对照组(Control ND 组)、普通饲料 Nrf2 激动剂组(Nrf2(+) ND 组)、高脂饲料溶剂对照组(Control HFD 组)和高脂饲料 Nrf2 激动剂组(Nrf2(+) HFD 组)。分别给予 Nrf2 激动剂 CDDO-Im 和等体积溶剂灌胃干预 6 周后,检测各组小鼠血清甘油三酯(TG)、总胆固醇(T-CHO)和低密度脂蛋白-胆固醇(LDL-C)。苏木素-伊红(HE)染色观察肝脏组织形态学变化。RT-qPCR 检测肝脏 Nrf2 下游抗氧化基因 *Nqo1*、*Ho1* 和 *Gclc* 的 mRNA 表达水平,Western Blot 检测肝脏 NQO1、HO-1 和 GCLC 的蛋白表达水平。**结果:**与正常小鼠相比,肥胖小鼠的体重、TG 和 LDL-C 升高( $P<0.05$ ),肝脏脂肪变性增加,GCLC 的蛋白表达水平降低( $P<0.05$ )。在肥胖小鼠中,与溶剂对照组相比,Nrf2 激动剂组小鼠的体重、血清 TG 降低( $P<0.05$ ),肝脏脂肪变性减轻,*Nqo1* 和 *Gclc* 的 mRNA 表达水平升高( $P<0.05$ ),NQO1 和 GCLC 的蛋白表达水平升高( $P<0.05$ )。**结论:** Nrf2 激动剂 CDDO-Im 可改善高脂饮食诱导的肥胖小鼠肝脏脂肪变性,可能与 Nrf2 激动剂 CDDO-Im 激活抗氧化基因的表达来减轻肝细胞氧化应激有关。

**关键词:**肥胖;肝脂肪变性;核因子 E2 相关因子 2;氧化应激**中图分类号:**R-33;R589.2;R575.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2024)05-822-06

## The Impact of the Nrf2 Activator CDDO-Im on Hepatic Steatosis in High-fat Diet-induced Obese Mice\*

ZHAI Xiao-ying<sup>1</sup>, ZHAO Lin<sup>1</sup>, XIA Yu-dong<sup>2</sup>, Munila·Tuersun<sup>1</sup>, JIAO Yi<sup>1Δ</sup>

(1 State Key Laboratory of Pathogenesis, Prevention and Treatment of High Incidence Diseases in Central Asia; Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Xinjiang Medical University; Xinjiang Key Laboratory of Molecular Biology for Endemic Diseases, Urumqi, Xinjiang, 830000, China; 2 Division of Cardiology, Department of Internal Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei, 430030, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the effects of the Nrf2 activator CDDO-Im on hepatic steatosis in high-fat diet-induced obese mice. **Methods:** Thirty-three male C57BL/6J mice were randomly divided into two groups: one group of 16 mice was fed a normal diet, while the other group of 17 mice was fed a high-fat diet to establish an obesity model. After successful modeling, the mice were randomly divided into four groups: normal diet solvent control group (Control ND group), normal diet Nrf2 activator group (Nrf2(+) ND group), high-fat diet solvent control group (Control HFD group), and high-fat diet Nrf2 activator group (Nrf2(+) HFD group). Nrf2 activator CDDO-Im and an equal volume of solvent were administered by gavage for 6 weeks, and the serum triglycerides (TG), total cholesterol (T-CHO), and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels were measured in all groups. Hematoxylin-eosin (HE) staining was performed to observe the morphological changes in liver tissues. RT-qPCR was used to detect the mRNA expression levels of liver Nrf2 downstream antioxidant genes *Nqo1*, *Ho1*, and *Gclc*, while Western Blot was used to assess the protein expression levels of NQO1, HO-1, and GCLC in the liver. **Results:** Compared with that in the normal mice, body weight, TG, LDL-C and hepatic steatosis in obese mice increased ( $P<0.05$ ), while protein expression of GCLC decreased ( $P<0.05$ ). In obese mice, compared with that in the solvent control group, body weight, serum TG levels and hepatic steatosis of mice in the Nrf2 activator group reduced ( $P<0.05$ ), mRNA expression levels of *Nqo1* and *Gclc* increased ( $P<0.05$ ), and protein expression levels of NQO1 and GCLC elevated ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** The Nrf2 activator CDDO-Im can ameliorate hepatic steatosis in high-fat diet-induced obese mice, and its mechanism may be through upregulating the expression of antioxidant genes, thus inhibits hepatic oxidative stress.

**Key words:** Obesity; Hepatic steatosis; Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2; Oxidative stress**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; R589.2; R575.5 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2024)05-822-06

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(82260178);新疆维吾尔自治区"天山创新团队计划"项目(2022D14009)

作者简介:翟小莹,女,硕士研究生,主要研究方向:肥胖引发肝脏脂肪代谢障碍的分子机制和药物干预,E-mail: 1259657133@qq.com

Δ 通讯作者:焦谊,女,教授,博士,主要研究方向:糖脂代谢的时空网络调控及相关疾病基础与转化研究,E-mail: jymiranda@xjmu.edu.cn

(收稿日期:2023-09-26 接受日期:2023-10-20)

## 前言

肥胖症 (Obesity) 是机体脂肪总量过多和 (或) 分布异常导致体重过度增加的慢性代谢性疾病<sup>[1]</sup>。肥胖可引起糖尿病、高血压、非酒精性脂肪肝病 (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD) 等一系列合并症, 其中, 由肥胖导致的 NAFLD 已成为严重威胁人类健康的慢性肝病<sup>[2]</sup>。NAFLD 在人群中的发生率为 15%~30%, 而在肥胖者中则上升到 58%, 已经成为世界上最常见的肝病<sup>[3]</sup>。NAFLD 首先表现为肝的脂肪变性, 多余的脂质以脂滴的形式储存在肝脏中, 如得不到有效治疗可发展为非酒精性肝炎 (Non-Alcoholic Steatohepatitis, NASH)<sup>[4]</sup>和肝纤维化, 进一步恶化肝功能<sup>[5]</sup>, 同时还可能并发胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 和糖尿病<sup>[6]</sup>。脂质过氧化反应和氧化应激是导致肝的脂质沉积逐渐演变为肝炎和肝纤维化的主要原因之一<sup>[7,8]</sup>。核因子相关因子 2 (Nuclear Factor E2 Related Factors, Nrf2) 是体内一种重要的激活抗氧化基因的转录因子, 其下游靶基因主要有 NAD(P)H: 醌氧化还原酶 1 [NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1, NQO1], 血红素加氧酶 1 (heme oxygenase 1, HO1) 和谷氨酰胺半胱氨酸连接酶催化亚基 (glutamate-cysteine ligase catalytic subunit, GCLC)。Nrf2 信号通路在应对氧化应激和脂质过氧化过程中发挥着核心作用<sup>[9-11]</sup>。近年来研究发现, Nrf2 敲除小鼠在接受高脂饮食后表现出相对于野生型小鼠更严重的肝脂肪变性和肝纤维化<sup>[12]</sup>。肝脏特异性激活 Nrf2 可改善肝纤维化, 抑制肝脏肿瘤发生<sup>[13]</sup>。CDDO-Imidazolide (CDDO-Im) 是一种人工合成的三萜类化合物, 可作为 Nrf2 的有效激活剂<sup>[14]</sup>, 在神经缺血损伤<sup>[15]</sup>、脓毒症<sup>[16]</sup>、肾缺血再灌注损伤<sup>[17]</sup>、急性肺损伤<sup>[18]</sup>等疾病模型中均表现出保护作用。但目前尚不清楚 CDDO-Im 是否可以改善高脂饮食诱导的肝脏脂肪变性及其作用机制。因此, 本研究旨在探讨通过 CDDO-Im 激活 Nrf2 对高脂饮食诱导的肥胖小鼠肝脏脂肪变性的影响, 为临床防治 NAFLD 提供新思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

6 周龄雄性野生型 C57BL/6J 小鼠 33 只, 购自维通利华实验动物技术有限公司, 饲养于新疆医科大学动物实验中心 SPF 级实验室, 实验单位使用许可证: SYXK (新) 2018-0003。实验前小鼠进行一周适应性饲养, 饲喂标准小鼠饲料, 自由摄食与饮水, 环境温度 (22±3)℃, 动物湿度 50%±5%, 每天光照与黑夜时间各为 12 小时。所有实验动物均已通过伦理审查委员会批准。

### 1.2 主要试剂和仪器

高脂饲料 (Research Diets, 美国); CDDO-Im (MCE, 美国); DMSO (Sigma, 美国); 苏木素、伊红 (索莱宝, 中国); TG、T-CHO、LDL-C 检测试剂盒 (南京建成, 中国); Anti-NQO1 抗体 (Proteintech, 美国); Anti-HO-1 抗体 (Proteintech, 美国); Anti-GCLC 抗体 (Proteintech, 美国); Anti-β-Actin 抗体 (Proteintech, 美国); BCA 蛋白定量试剂盒 (Thermo, 美国); 逆转录试剂盒 (Takara, 日本); qPCR 试剂盒 (Qiagen, 德国); 蛋白电泳、电转设备 (BIO-RAD, 美国); Nanodrop One (Thermo, 美国); 实时荧光定量 PCR 热循环仪 (ABI, 美国), 光学显微镜 (Leica, 德国)。

### 1.3 C57BL/6J 小鼠肥胖模型的建立及分组

33 只 6 周龄雄性野生型 C57BL/6J 小鼠随机分成两组: 普通饲料组 16 只, 高脂饲料组 17 只。普通饲料 (normal diet, ND) 组成: 10% 脂肪、20% 蛋白质和 70% 碳水化合物。高脂饲料 (high-fat diet, HFD) 组成: 60% 脂肪、20% 蛋白质和 20% 碳水化合物。每周测一次体重, 饲喂高脂饲料的小鼠体重超过饲喂普通饲料小鼠体重的 20% 即视为肥胖模型建立成功。造模完成的高脂饲料组和普通饲料组小鼠随机分组, 分别设置溶剂对照组和 Nrf2 激动剂组, 分为 ND Control (8 只)、ND Nrf2 (+) (8 只)、HFD Control (9 只)、HFD Nrf2 (+) (8 只)。其中 ND Nrf2 (+) 组和 HFD Nrf2 (+) 组每隔一天通过灌胃的方式给予 Nrf2 激动剂 CDDO-Im (剂量: 30 μmol/kg)。对照组给予等体积的溶剂。每周记录小鼠体重。药物干预 6 周后, 将小鼠麻醉后眼眶静脉取血, 颈椎脱臼法处死小鼠后取肝脏组织标本, 一部分液氮速冻后置于 -80℃ 冰箱保存用于 Western blot 及 RT-qPCR, 另一部分置于 4% 多聚甲醛固定后用于 HE 染色。

### 1.4 生化指标检测

将从小鼠眼眶静脉收集到的血液室温静置 30 min, 随后 3000 rpm 离心 20 min 后取血清, 用生化试剂盒测定血清甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (T-CHO) 和低密度脂蛋白 - 胆固醇 (LDL-C), 具体步骤根据试剂盒使用说明书进行。

### 1.5 组织脱水、包埋、切片和 HE 染色

肝脏石蜡切片置于二甲苯中, 浸泡 30 min 脱蜡, 后梯度乙醇水化。苏木素染色 5 min, 自来水冲洗 3 遍, 1% 盐酸酒精分化 5 s, 氨水返蓝 15 s, 自来水冲洗, 伊红染色 5 min, 自来水冲洗, 90% 乙醇脱水 1 min, 95% 乙醇脱水 4 min, 100% 乙醇脱水 4 min, 二甲苯透明 6 min。中性树胶封片。Leica 光学显微镜下观察切片, 并采集图像。

### 1.6 RT-qPCR 检测 *Nqo1*、*Ho1* 和 *Gclc* 的 mRNA 表达水平

在小鼠肝脏组织中加入 TRIzol 和研磨珠匀浆, 12000 rpm 离心 10 min, 再经过氯仿抽提, 异丙醇沉淀, 75% 乙醇洗涤, 最终获得肝脏组织总 RNA, Nanodrop One 测定各样本 RNA 浓度并定量。以 1 μg RNA 为模板, 用逆转录试剂盒配好逆转录反应体系后在 PCR 仪中进行逆转录。取稀释 10 倍的 1 μL cDNA 为模板, 配置为总体积 10 μL 的 PCR 反应体系进行扩增。反应体系为: 2×SYBR Green PCR Master Mix 5 μL, QN ROX Reference Dye 1 μL, 上游引物 0.7 μL, 下游引物 0.7 μL, 无酶水 1.6 μL, cDNA 1 μL。反应条件为: 95℃ 2 min, 95℃ 5 s, 60℃ 30 s, 95℃ 15 s, 共 40 个循环。对每个样本分别做两个复孔, 目的基因的相对表达量通过 (RQ)=2<sup>-ΔΔCt</sup> 完成统计。使用 IDT 网站 (<https://www.idtdna.com/>) 引物设计工具进行引物设计, 所有引物均由上海生工生物合成。

### 1.7 Western blot 检测 NQO1、HO-1 和 GCLC 的蛋白表达水平

在小鼠肝脏组织中加入 RIPA 裂解液和研磨珠匀浆, 超声破碎后离心, 提取蛋白。用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度后定量 10 μg 蛋白。根据蛋白浓度和体积, 加入相应纯水, 使蛋白样品浓度配置成相同浓度后, 加入相同体积的 4×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液。将制备好的样品放置在金属浴 100℃ 加热 10 分钟。根据目的蛋白的分子量选择配置适合的分离胶, 随后进行蛋白电泳及转膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h。按照 1:5000 的浓

表 1 引物序列  
Table 1 Primer Sequences

| Gene name (Reference sequences)  | Primer sequences (5'→3') |
|----------------------------------|--------------------------|
| <i>Gapdh</i> -F (NM_001289726.2) | ACCTCAACTACATGGTCTACA    |
| <i>Gapdh</i> -R (NM_001289726.2) | CTTCCCATTTCTCGGCCTTG     |
| <i>Nqo1</i> -F (NM_008706.5)     | GCTGCAGACCTGGTGATATT     |
| <i>Nqo1</i> -R (NM_008706.5)     | ACTCTCTCAAACCAGCCTTTC    |
| <i>Ho1</i> -F (NM_010442.2)      | AAGCCGAGAATGCTGAGTTCA    |
| <i>Ho1</i> -R (NM_010442.2)      | GCCGTGTAGATATGGTACAAGGA  |
| <i>Gclc</i> -F (NM_010295.2)     | CCTCCTCCTCCAAACTCAGATA   |
| <i>Gclc</i> -R (NM_010295.2)     | GCAGTACCACGAATACCACATAG  |

度配置  $\beta$ -Actin 一抗,1:1000 的浓度配置 NQO1、HO-1 和 GCLC 一抗。将条带放置 4℃ 孵育一抗 7 h,使用 TBST 洗膜 3 次 10 min 后室温孵育二抗 1h,TBST 洗膜 3 次 10 min 后滴加超敏发光液曝光,观察条带上目的蛋白的表达情况并用 ImageJ 软件进行相对定量分析。

## 1.8 统计学分析

使用 Graphpad Prism 9 进行数据处理和统计学分析并作图。数据表示为平均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )。两组之间均数比较采用两独立样本 t 检验,多组之间均数比较采用单因素方差分析。当  $P<0.05$  时,认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

表 2 第 0,14,19,20 周小鼠体重( $\bar{x}\pm s$ , g)  
Table 2 Mouse body weight at weeks 0, 14, 19, and 20 ( $\bar{x}\pm s$ , g)

|             | Week 0           | Week 14                       | Week 19                       | Week 20                       |
|-------------|------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| ND Control  | 21.03 $\pm$ 1.27 | 30.63 $\pm$ 1.97              | 30.28 $\pm$ 3.13              | 29.53 $\pm$ 2.32              |
| ND Nrf2(+)  | 21.53 $\pm$ 0.74 | 30.73 $\pm$ 1.53              | 30.73 $\pm$ 1.31              | 30.38 $\pm$ 1.32              |
| HFD Control | 21.28 $\pm$ 0.66 | 46.29 $\pm$ 5.57 <sup>#</sup> | 46.67 $\pm$ 4.12              | 45.78 $\pm$ 3.87              |
| HFD Nrf2(+) | 21.36 $\pm$ 0.74 | 45.51 $\pm$ 5.86              | 40.57 $\pm$ 4.98 <sup>*</sup> | 40.14 $\pm$ 4.64 <sup>*</sup> |

Note: <sup>#</sup> indicates comparison with the ND Control group,  $P<0.05$ ; <sup>\*</sup> indicates comparison with the HFD Control group,  $P<0.05$ .

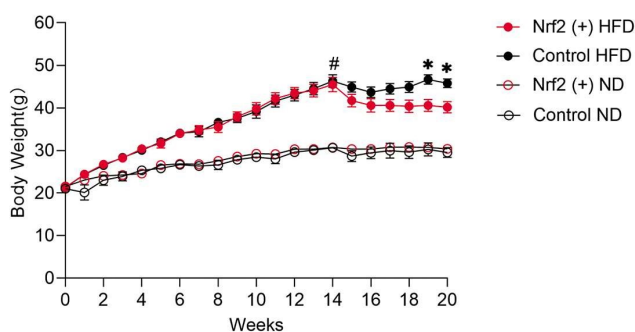


图 1 第 0-20 周小鼠体重变化

Fig. 1 Changes in mouse body weight from Week 0 to Week 20

注: # 表示与 ND Control 组比较,  $P<0.05$ ; \* 表示与 HFD Control 组比较,  $P<0.05$ 。

Note: # indicates comparison with the ND Control group,  $P<0.05$ ; \* indicates comparison with the HFD Control group,  $P<0.05$ .

## 2.1 Nrf2 激动剂对肥胖小鼠体重的影响

分别用普通饲料和高脂饲料喂养小鼠 14 周,每周测量小鼠体重,14 周时进行小鼠体重的统计分析。高脂饮食组小鼠体重较 ND 组升高超过 20%,证明肥胖模型造模成功(表 2,图 1)。随后利用 Nrf2 激动剂 CDDO-Im 及其溶剂分别灌胃干预普通小鼠和肥胖小鼠 6 周,持续监测体重。结果显示,在普通饲料喂养的小鼠中,与溶剂对照组相比,Nrf2 激动剂组小鼠体重没有出现明显的改变。而在第 19 周和第 20 周时,Nrf2 激动剂干预显著降低了肥胖小鼠体重,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )(表 2,图 1)。

## 2.2 Nrf2 激动剂对肥胖小鼠血脂水平的影响

为了评估 Nrf2 激动剂对肥胖小鼠血脂水平的影响,本研究利用生化试剂盒检测了小鼠血清 TG、TC 和 LDL-C 的水平。结果显示,与普通小鼠比较,肥胖小鼠血清 TG 和 LDL-C 水平明显升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ )(表 3,图 2)。在肥胖小鼠中,与溶剂对照组相比,Nrf2 激动剂组小鼠血清 TG 水平降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ )(表 3,图 2)。

## 2.3 Nrf2 激动剂对肥胖小鼠肝脏组织形态学的影响

为探究 Nrf2 激动剂对肥胖小鼠肝脏组织形态学的影响,本研究对小鼠肝脏组织进行了 HE 染色,结果显示,与普通小鼠相比,肥胖小鼠肝细胞表现出肿胀和排列混乱,同时胞浆内脂肪空泡积聚,证明肥胖小鼠出现肝细胞脂肪变性。用 Nrf2 激动剂 CDDO-Im 干预肥胖小鼠后,发现肝细胞中脂滴的数量明显减少、肿胀度明显减轻(图 3)。

表 3 第 20 周小鼠血脂水平( $\bar{x}\pm s$ , mmol/L)Table 3 Blood lipid levels in mice at Week 20 ( $\bar{x}\pm s$ , mmol/L)

|             | TG                     | T-CHO     | LDL-C                  |
|-------------|------------------------|-----------|------------------------|
| ND Control  | 1.02±0.18              | 0.09±0.01 | 2.23±0.11              |
| ND Nrf2(+)  | 0.95±0.12              | 0.09±0.01 | 2.13±0.28              |
| HFD Control | 2.22±0.24 <sup>#</sup> | 0.13±0.01 | 4.84±1.17 <sup>#</sup> |
| HFD Nrf2(+) | 1.78±0.13*             | 0.15±0.03 | 4.58±1.02              |

Note: <sup>#</sup> indicates comparison with the ND Control group,  $P<0.05$ ; \* indicates comparison with the HFD Control group,  $P<0.05$ .

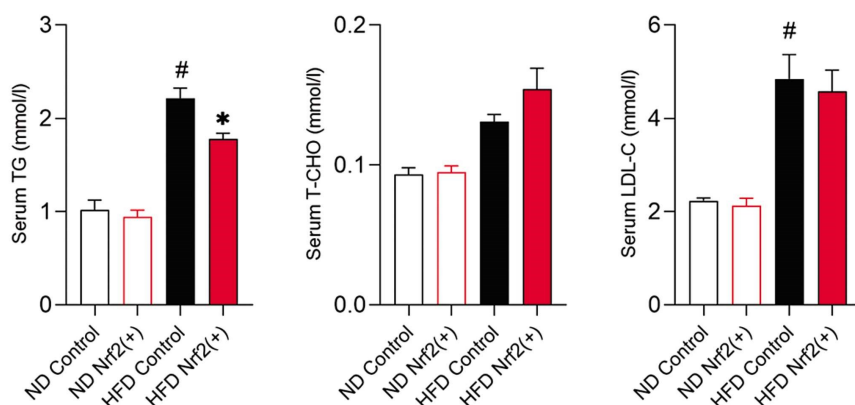


图 2 第 20 周小鼠血脂水平

Fig. 2 Blood lipid levels in mice at Week 20

注: <sup>#</sup> 表示与 ND Control 组比较,  $P<0.05$ ; \* 表示与 HFD Control 组比较,  $P<0.05$ 。

Note: <sup>#</sup> indicates comparison with the ND Control group,  $P<0.05$ ; \* indicates comparison with the HFD Control group,  $P<0.05$ .

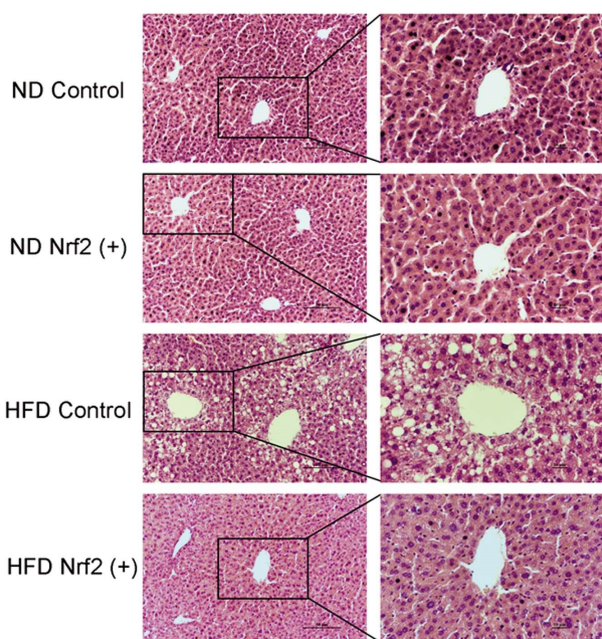


图 3 小鼠肝脏组织 HE 染色(100×)

Fig. 3 Histological staining of mouse liver tissues (100x magnification)

#### 2.4 Nrf2 激动剂对肥胖小鼠肝脏抗氧化基因 mRNA 表达水平的影响

Nqo1、Ho1 和 Gclc 是 Nrf2 下游发挥抗氧化功能的关键基因。RT-qPCR 结果表明,在肥胖小鼠中,与溶剂对照组相比, Nrf2 激动剂组小鼠 Nqo1 和 Gclc 的 mRNA 表达水平明显上调,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),但在普通小鼠中未观察到此

效应(表 4,图 4)。

#### 2.5 Nrf2 激动剂对肥胖小鼠肝脏抗氧化基因蛋白表达量的影响

利用 Western blot 分析 Nrf2 激动剂对肥胖小鼠肝脏抗氧化基因蛋白表达量的影响。结果表明,在普通小鼠和肥胖小鼠中,与溶剂对照组比较, Nrf2 激动剂均显著上调了 NQO1 和 GCLC 的蛋白表达水平,差异有统计学意义( $P<0.05$ )(图 5)。说明经 CDDO-Im 干预后, Nrf2 激活下游抗氧化基因表达,增强了肝脏的抗氧化应激能力。

### 3 讨论

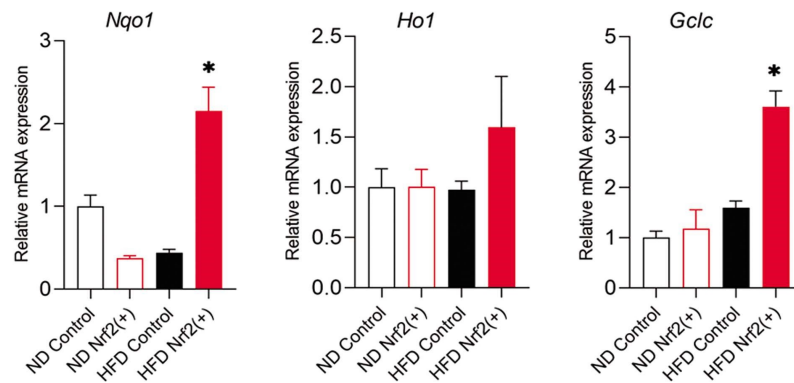
随着社会经济的发展、生活方式的改变,肥胖已成为全球最常见的慢性代谢性疾病之一<sup>[19]</sup>。肥胖时机体多余的脂质异位沉积在肝脏中,进而导致 NAFLD, NAFLD 是一种严重威胁人类健康的慢性肝病,常常并发胰岛素抵抗和 2 型糖尿病<sup>[20,21]</sup>。直至目前临床仍无有效药物治疗 NAFLD, 且其发病机制仍未完全阐明。然而,关于 NAFLD 发病机制的“二次打击”假说一直广泛被认可,其中“第一次打击”,即脂肪变性,是肥胖和胰岛素抵抗引起的肝脏脂质持续积累<sup>[22]</sup>。

由于脂质稳态失调与氧化应激密切相关,因此肥胖诱导的氧化应激对 NAFLD 的发生发展至关重要。Nrf2 诱导抗氧化基因表达被认为是机体重要的抗氧化防御机制<sup>[23]</sup>。由于其抗氧化作用, Nrf2 在脂质积累及其介导的肝损伤中可能发挥重要作用。Okada 等人报道 Nrf2 缺失加速了高脂诱导肥胖小鼠脂肪性肝炎的进展,这表明 Nrf2 在 NAFLD 中发挥重要作用, Nrf2 可能是 NAFLD 发病中的关键保护因子<sup>[24]</sup>。CDDO-Im 是一种人

表 4 小鼠肝脏组织 *Nqo1*、*Ho1* 和 *Gclc* 的 mRNA 相对表达水平( $\bar{x} \pm s$ )Table 4 Relative mRNA expression levels of *Nqo1*, *Ho1*, and *Gclc* in mouse liver tissues ( $\bar{x} \pm s$ )

|             | <i>Nqo1</i> | <i>Ho1</i> | <i>Gclc</i> |
|-------------|-------------|------------|-------------|
| ND Control  | 1.00±0.13   | 1.00±0.18  | 1.00±0.13   |
| ND Nrf2(+)  | 0.38±0.03   | 1.00±0.17  | 1.18±0.37   |
| HFD Control | 0.44±0.04   | 0.97±0.08  | 1.60±0.13   |
| HFD Nrf2(+) | 2.15±0.29*  | 1.60±0.51  | 3.61±0.31*  |

Note: \* indicates comparison with the HFD Control group,  $P < 0.05$ .

图 4 小鼠肝脏组织 *Nqo1*、*Ho1* 和 *Gclc* 的 mRNA 相对表达水平Fig.4 Relative mRNA expression levels of *Nqo1*, *Ho1*, and *Gclc* in mouse liver tissues

注: \* 表示与 HFD Control 组比较,  $P < 0.05$ 。

Note: \* indicates comparison with the HFD Control group,  $P < 0.05$ .

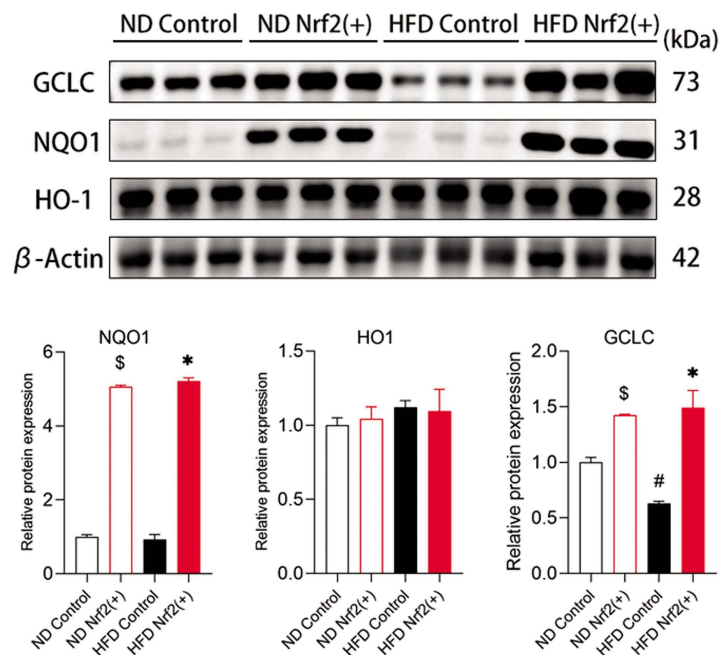


图 5 小鼠肝脏组织 NQO1、HO-1 和 GCLC 的蛋白相对表达量

Fig. 5 Relative protein expression levels of NQO1, HO-1, and GCLC in mouse liver tissues

注: # \$ 表示与 ND Control 组比较,  $P < 0.05$ ; \* 表示与 HFD Control 组比较,  $P < 0.05$ 。

Note: # \$ indicates comparison with the ND Control group,  $P < 0.05$ ; \* indicates comparison with the HFD Control group,  $P < 0.05$ .

工合成的三萜类化合物衍生物, 可与 Nrf2 的抑制因子 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1) 的半胱氨酸残基相互作用, 从而减少 Nrf2 的泛素-蛋白酶体降解并易位进入细胞核<sup>[14]</sup>。本研究发现高脂诱导肥胖小鼠出现

了明显的体重增加, 并伴有严重的血脂异常和肝脏脂肪变性, 使用 CDDO-Im 干预小鼠可显著减轻其体重, 降低血清 TG 水平。HE 染色表明激动 Nrf2 后, 肝脏脂质积聚明显减少, 肝细胞肿胀和排列混乱明显改善。以上结果说明激动 Nrf2 可在一定程

度上对抗 NAFLD 的 " 第一次打击 ", 抑制 NAFLD 的发展。

随着 NAFLD 的进一步进展, 将发生 " 第二次打击 ", 即通过脂质过氧化引起的氧化应激和炎症反应进一步加深肝脏损伤, 引起线粒体功能障碍, 逐渐发展为 NASH<sup>[25]</sup>。细胞氧化应激最重要的特征之一是细胞内大量产生 ROS, 而 ROS 的清除依赖于 Nrf2 介导的抗氧化防御通路<sup>[26,27]</sup>。NQO1、HO-1 和 GCLC 是 Nrf2 下游发挥抗氧化防御功能的关键基因。NQO1 是一种同源二聚体黄素酶, 以 NAD(P)H 为底物, 可将醌还原为对苯二酚, 清除细胞内超氧化物, 从而保护细胞免受氧化应激损害<sup>[28]</sup>。HO1 能够降解血红素, 生成抗氧化产物胆绿素和一氧化碳。在血红素、细胞因子等刺激下, HO1 的表达上调, 以保护正常细胞免受氧化损伤<sup>[29]</sup>。GCLC 是合成谷胱甘肽的限速酶 -- 谷氨酸半胱氨酸连接酶的催化亚基, 在调节亚基 GCLM 的帮助下, GCLC 可有效地调控谷胱甘肽的合成并控制其在细胞内的浓度, 在维持细胞氧化还原稳态中发挥关键作用<sup>[30]</sup>。因此, 为了探讨 Nrf2 减轻肝脂肪变性是否与其抗氧化功能相关, 我们通过 RT-qPCR 和 Western blot 检测了 Nrf2 下游抗氧化基因的表达情况, 结果显示, 与对照组相比, Nrf2 激动剂组中 NQO1 和 GCLC 的表达明显增加, Nrf2 可能通过上调这些基因的表达来发挥对 NAFLD 的保护作用。

综上所述, Nrf2 可通过抑制脂质积聚来减轻肝损伤, 以阻止 NAFLD 的 " 第一次打击 ", 同时, Nrf2 还可通过激活抗氧化基因的表达来改善肝细胞氧化应激, 从而抵抗 NAFLD 的 " 第二次打击 "。Nrf2 激动剂 CDDO-Im 有望成为临床治疗 NAFLD 的潜在药物。

#### 参考文献(References)

- [1] EGGER G, DIXON J. Beyond obesity and lifestyle: a review of 21st century chronic disease determinants [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 731685.
- [2] HAN S K, BAIK S K, KIM M Y. Non-alcoholic fatty liver disease: Definition and subtypes [J]. *Clinical and molecular hepatology*, 2023, 29(suppl): S5-S16.
- [3] 花荣, 姚琪远. 减重代谢手术对肥胖型非酒精性脂肪肝治疗的意义 [J]. *外科理论与实践*, 2020, 25(05): 373-7.
- [4] HARRISON S A, ALLEN A M, DUBOURG J, et al. Challenges and opportunities in NASH drug development [J]. *Nat Med*, 2023, 29(3): 562-573.
- [5] IOANNOU G N. The Role of Cholesterol in the Pathogenesis of NASH [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2016, 27(2): 84-95.
- [6] 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 (Baltimore, Md)*, 2018, 67(1): 328-357.
- [7] 王瑞龙. 基于 Nrf2/NLRP3 信号通路探讨丹参泽泻汤防治非酒精性脂肪肝的作用及机制 [D]. 河北中医学院, 2021.
- [8] CHEN Z, TIAN R, SHE Z, et al. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 152: 116-141.
- [9] XIA Y, ZHAI X, QIU Y, et al. The Nrf2 in Obesity: A Friend or Foe? [J]. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 2022, 11(10): 2067.
- [10] BAIRD L, YAMAMOTO M. The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2020, 40(13): e00099-20.
- [11] DODSON M, DE LA VEGA M R, CHOLANIAN A B, et al. Modulating NRF2 in Disease: Timing Is Everything [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2019, 59: 555-575.
- [12] SHARMA R S, HARRISON D J, KISIELEWSKI D, et al. Experimental Nonalcoholic Steatohepatitis and Liver Fibrosis Are Ameliorated by Pharmacologic Activation of Nrf2 (NF-E2 p45-Related Factor 2)[J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2018, 5(3): 367-398.
- [13] MOHS A, OTTO T, SCHNEIDER K M, et al. Hepatocyte-specific NRF2 activation controls fibrogenesis and carcinogenesis in steatohepatitis[J]. *J Hepatol*, 2021, 74(3): 638-648.
- [14] LIBY K, HOCK T, YORE M M, et al. The synthetic triterpenoids, CDDO and CDDO-imidazolide, are potent inducers of heme oxygenase-1 and Nrf2/ARE signaling [J]. *Cancer research*, 2005, 65(11): 4789-98.
- [15] ZHANG F, WANG S, ZHANG M, et al. Pharmacological induction of heme oxygenase-1 by a triterpenoid protects neurons against ischemic injury[J]. *Stroke*, 2012, 43(5): 1390-7.
- [16] THIMMULAPPA R K, FUCHS R J, MALHOTRA D, et al. Preclinical evaluation of targeting the Nrf2 pathway by triterpenoids (CDDO-Im and CDDO-Me) for protection from LPS-induced inflammatory response and reactive oxygen species in human peripheral blood mononuclear cells and neutrophils [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2007, 9(11): 1963-70.
- [17] LIU M, REDDY N M, HIGBEE E M, et al. The Nrf2 triterpenoid activator, CDDO-imidazolide, protects kidneys from ischemia-reperfusion injury in mice[J]. *Kidney international*, 2014, 85(1): 134-41.
- [18] REDDY N M, SURYANARAYA V, YATES M S, et al. The triterpenoid CDDO-imidazolide confers potent protection against hyperoxic acute lung injury in mice [J]. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 2009, 180(9): 867-74.
- [19] FRIEDRICH M J. Global Obesity Epidemic Worsening [J]. *JAMA*, 2017, 318(7): 603.
- [20] WHARTON S, LAU D C W, VALLIS M, et al. Obesity in adults: a clinical practice guideline[J]. *CMAJ*, 2020, 192(31): E875-E91.
- [21] HYPPONEN E, MULUGETA A, ZHOU A, et al. A data-driven approach for studying the role of body mass in multiple diseases: a phenome-wide registry-based case-control study in the UK Biobank [J]. *The Lancet Digital Health*, 2019, 1(3): e116-e26.
- [22] PEVERILL W, POWELL L W, SKOEN R. Evolving concepts in the pathogenesis of NASH: beyond steatosis and inflammation [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(5): 8591-638.
- [23] GAO S, DUAN X, WANG X, et al. Curcumin attenuates arsenic-induced hepatic injuries and oxidative stress in experimental mice through activation of Nrf2 pathway, promotion of arsenic methylation and urinary excretion [J]. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 2013, 59: 739-47.

- 519-521, 522.
- [11] 李晓乾, 孔新兴, 王宝艳, 等. 高血压性脑出血发病的相关因素分析[J]. 广西医学, 2016, 38(1): 43-46, 49.
- [12] Xu S, Du B, Shan A, et al. The risk factors for the postoperative pulmonary infection in patients with hypertensive cerebral hemorrhage: A retrospective analysis[J]. Medicine (Baltimore), 2020, 99(51): e23544.
- [13] 谢乐辉, 邱平华, 李汉城, 等. 微创置管引流治疗高血压性脑出血 70 例疗效观察[J]. 海南医学, 2016, 27(8): 1315-1317.
- [14] 姜海鹏, 张凯, 王广斌, 等. 早期康复联合高压氧对急诊微创术后高血压脑出血患者神经功能恢复及预后的影响[J]. 中华航海医学与高气压医学杂志, 2021, 28(4): 445-449.
- [15] 梁洪金, 于代华, 贾卫红, 等. 早期高压氧治疗对高血压脑出血患者的影响[J]. 神经损伤与功能重建, 2022, 17(11): 663-665.
- [16] 李延萍, 景蓉, 李水清, 等. 早期肢体康复训练对高血压脑出血偏瘫患者神经功能恢复的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2015, 13(6): 844-846.
- [17] 陈游, 文擘彬, 戴携, 等. 阶段性康复训练联合心理认知疗法在高血压脑出血偏瘫患者中的应用效果分析 [J]. 现代生物医学进展, 2022, 22(12): 2392-2396.
- [18] 王首杰, 蔡青, 秦怀洲, 等. 微创钻孔引流术对高血压脑出血病人脑血流参数和血清神经功能指标的影响 [J]. 实用老年医学, 2020, 34(3): 237-240, 245.
- [19] 刘俊. 三维立体定向引导神经内镜治疗对高血压脑出血患者氧供氧耗平衡及脑血流的影响观察 [J]. 中国医学创新, 2021, 18(29): 6-9.
- [20] 刘亚峰, 王一芳, 王青, 等. 微创碎吸引流联合高压氧治疗对高血压脑出血患者炎症因子及脑血管动力学的影响[J]. 中华航海医学与高气压医学杂志, 2021, 28(4): 437-441.
- [21] 刘伟, 王映晨, 刘月伟, 等. 早期康复联合高压氧治疗对高血压脑出血患者神经功能及预后的影响[J]. 中国临床医生杂志, 2021, 49(7): 797-799.
- [22] 井奚月, 王博, 乔婕, 等. 中青年高血压脑出血临床诊断与治疗分析[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2022, 22(10): 857-864.
- [23] 殷坚, 潘波, 廖君, 等. 血浆及脑脊液中 ET-1 和 NO 水平在高血压脑出血患者中的变化及意义 [J]. 解放军预防医学杂志, 2017, 35(11): 1406-1408.
- [24] 吴建龙, 张艳利, 乔建勇, 等. 高血压脑出血血肿周围脑组织中 TNF- $\alpha$ 、VEGF 以及 ET-1 的表达及其意义 [J]. 中华神经外科杂志, 2017, 33(5): 498-501.
- [25] 高继英, 石代乐, 高晓玲, 等. 高血压脑出血术后应用高压氧治疗对患者血清 MMP-9、ICAM-1、NSE、hs-CRP 水平的影响 [J]. 山东医药, 2019, 59(14): 80-82.
- [26] 张利青, 郑高, 宋大刚. 高血压脑出血 IL-6、S100 $\beta$ 、NSE 水平变化及与患者预后的相关性分析[J]. 浙江临床医学, 2022, 24(9): 1358-1360.
- [27] 任长安, 鲁永杨, 汪文娟, 等. 血清泛素羧基末端水解酶 L1、基质金属蛋白酶-9 与高血压脑出血患者神经损伤及预后的关系[J]. 中国临床医生杂志, 2022, 50(2): 169-171.
- [28] 李爱军. 胶质纤维酸性蛋白在脑缺血和脑出血鉴别诊断中的价值 [J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(19): 2386-2389, 2406.
- [29] 龚明, 刘金辉, 廖昆, 等. 早期高压氧联合康复治疗对老年高血压脑出血患者神经功能恢复及预后的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(8): 1921-1923.

(上接第 827 页)

- [24] OKADA K, WARABI E, SUGIMOTO H, et al. Deletion of Nrf2 leads to rapid progression of steatohepatitis in mice fed atherogenic plus high-fat diet[J]. Journal of gastroenterology, 2013, 48(5): 620-32.
- [25] REJA M, MAKAR M, VISARIA A, et al. Increased serum selenium levels are associated with reduced risk of advanced liver fibrosis and all-cause mortality in NAFLD patients: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) III[J]. Annals of hepatology, 2020, 19(6): 635-40.
- [26] SCHIEBER M, CHANDEL S, NAVDEEP. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress[J]. Current Biology, 2014, 24(10): R453-R62.
- [27] KOVAC S, ANGELOVA P R, HOLMSTROM K M, et al. Nrf2 regulates ROS production by mitochondria and NADPH oxidase[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1850(4): 794-801.
- [28] ROSS D, SIEGEL D. The diverse functionality of NQO1 and its roles in redox control[J]. Redox Biol, 2021, 41: 101950.
- [29] GOZZELINO R, JENEY V, SOARES M P. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2010, 50: 323-54.
- [30] FRANKLIN C C, BACKOS D S, MOHAR I, et al. Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase [J]. Molecular aspects of medicine, 2009, 30(1-2): 86-98.