

· 论著 ·

基于细胞铜死亡分析香砂六君子汤减少脾虚高脂血症大鼠肝脏组织脂质沉积的作用机制

刘慧慧¹, 陈含希², 冷雪²

(辽宁中医药大学中西医结合学院 1. 生理与心理学教研室; 2. 生物化学与分子生物学教研室, 沈阳 110847)

摘要 目的 从细胞铜死亡的角度分析中药香砂六君子汤减少脾虚高脂血症大鼠肝脏组织脂质沉积的作用机制。**方法** 将18只健康SD大鼠随机均分为正常组、脾虚高脂血症组、中药组。脾虚高脂血症组和中药组采用游泳力竭和高脂饲料喂养的复合方法造模, 正常组仅给予普通饲料。造模12周后, 中药组进行香砂六君子汤(11.34 g·kg⁻¹)灌胃干预, 正常组与脾虚高脂血症组给予同体积0.9%氯化钠溶液灌胃, 灌胃干预4周后检测各组大鼠血脂指标[总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)], 肝脏脂积变化; PCR Array技术检测与铜死亡相关基因的表达。**结果** 与正常组比较, 脾虚高脂血症组血清中TC、TG、LDL-C水平显著升高($P < 0.01$), HDL-C水平显著降低($P < 0.01$); 脾虚高脂血症组大鼠肝脏脂质沉积明显。与脾虚高脂血症组比较, 中药组TC、TG、LDL-C水平显著降低($P < 0.01$), HDL-C水平显著升高($P < 0.01$); 中药组大鼠肝脏脂质沉积明显减少。PCR Array共检测出11个铜死亡相关基因。与正常组比较, 脾虚高脂血症组肝脏铜死亡差异表达基因7个; 与脾虚高脂血症组比较, 中药组肝脏铜死亡差异表达基因6个; 脾虚高脂血症组与中药组铜死亡共同差异表达基因5个。脾虚高脂血症组与正常组、中药组与脾虚高脂血症组差异表达均发生上调 ≥ 1 倍或下调 ≤ 1 倍的基因3个, 2种比较方法结果取交集, 共同的差异表达基因为*Dld*和*Gls*, 这2个基因均能够调控线粒体铜死亡水平。qPCR验证结果显示, *Dld*基因表达与PCR芯片结果一致。**结论** 肝脏铜死亡相关基因(*Dld*、*Gls*)表达异常可能是血脂代谢异常的潜在机制, 也可能是香砂六君子汤防治脾虚高脂血症的重要作用靶标。

关键词 香砂六君子汤; 脾虚; 高脂血症; 大鼠; 脂肪沉积; 细胞铜死亡

中图分类号 R259 文献标志码 A 文章编号 0258-4646(2024)04-0289-06

网络出版地址 <https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20240408.1006.022>

DOI: 10.12007/j.issn.0258-4646.2024.04.001

Mechanism of Xiangsha Liujunzi decoction in reducing hepatic lipid deposition in rats with spleen-deficiency and hyperlipidemia based on cuproptosis

LIU Huihui¹, CHEN Hanxi², LENG Xue²

(1. Department of Physiology and Psychology, College of Integrated Chinese and Western Medicine, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Integrated Chinese and Western Medicine, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China)

Abstract Objective To investigate the mechanism of Xiangsha Liujunzi decoction in reducing hepatic lipid deposition in rats with spleen-deficiency and hyperlipidemia based on cuproptosis. **Methods** Eighteen healthy Sprague Dawley (SD) rats were randomly divided into normal, spleen-deficiency and hyperlipidemia, and traditional Chinese medicine (TCM) groups. Rats in the spleen-deficiency and hyperlipidemia group and TCM group were subjected to exhaustive swimming combined with a high-fat diet, while the normal group was fed an ordinary diet. After 12 weeks of modeling, rats in the TCM group were gavaged with Xiangsha Liujunzi decoction (11.34 g·kg⁻¹), and the other two groups were gavaged with 0.9% sodium chloride solution in corresponding volume. After 4 weeks of intervention, total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), and liver lipid levels were measured. The mRNA expression levels related to cuproptosis were monitored using a PCR Array. **Results** Compared with levels in the normal group, the serum levels of TC, TG, and LDL-C in the spleen-deficiency and hyperlipidemia group were increased ($P < 0.01$), while HDL-C was decreased ($P < 0.01$). Compared with the spleen-deficiency and hyperlipidemia group, the TCM group showed decreased TC, TG, and LDL-C content ($P < 0.01$), increased HDL-C content ($P < 0.01$), and reduced lipid deposition in the liver. 11 dif-

基金项目: 国家自然科学基金(82104552); 辽宁省教育厅基本科研项目(JYTMS20231822)

作者简介: 刘慧慧(1981-), 女, 副教授, 博士。

通信作者: 冷雪, E-mail: 290404025@qq.com

收稿日期: 2023-07-24

网络出版时间: 2024-04-10 21:39:03

ferentially expressed genes related to cuproptosis were detected using a PCR Array assay. Seven differentially expressed genes related to cuproptosis were found in the livers of the spleen-deficiency and hyperlipidemia group compared to those in the normal group; meanwhile, six differentially expressed genes were found in the TCM group compared with those in the spleen-deficiency and hyperlipidemia group. Five codifferentially expressed genes were identified among the abovementioned genes. Furthermore, three differentially expressed genes were found between the two paired comparison groups (≥ 1 fold or ≤ 1 fold), and then *Dld* and *Gls* were screened out, which could regulate mitochondrial cuproptosis. The expression levels of *Dld* and *Gls* were verified by qPCR, which were consistent with our PCR Array.

Conclusion Abnormal expression of *Dld* and *Gls* related to cuproptosis in the liver may be a potential mechanism of abnormal lipid metabolism, and may be an important target of Xuanxiangsha Liujuanzi decoction in the treatment of spleen-deficiency and hyperlipidemia.

Keywords Xiangsha Liujuanzi decoction; spleen-deficiency; hyperlipidemia; rat; lipid deposition; cuproptosis

血脂异常是动脉粥样硬化疾病、冠状动脉粥样硬化性心脏病等心脑血管疾病发生的独立危险因素之一。血脂含义与中医“膏脂”类似,类属津液^[1],多由脾胃运化的水谷精微所化生。中医认为脾主运化功能,一旦脾失健运,水谷精微运化失衡,则津液失于输布,滞留血中,导致高脂血症^[2]。肝脏是参与调节全身糖脂代谢的关键作用器官^[3]。早期研究^[4-5]发现铜与血脂代谢关系密切,同时铜代谢异常则导致肥胖。研究^[6]显示肥胖患者血清中铜水平升高,表明铜与脂肪积累有关。此外,高水平铜会通过影响脂质代谢及炎症反应参与动脉粥样硬化性心血管疾病的形成和发展^[7]。LIU等^[8]研究发现铜代谢异常会导致肝脏HepG2细胞脂质代谢信号传导紊乱。而最新的研究^[9-10]发现了一种新的细胞死亡方式——铜死亡,其代表性相关基因中铁氧还蛋白1(ferredoxin1, FDX1)与脂肪酸氧化代谢存在一定的关联性。课题组前期研究^[11]证实香砂六君子汤可以缓解脾虚高脂血症大鼠肝脏脂质沉积的作用,本研究在前期基础上,从肝脏细胞铜死亡角度探讨香砂六君子汤减少脾虚高脂血症大鼠肝脏组织脂质沉积的作用机制,旨在丰富脾主运化理论科学内涵,为“从脾论治”脂代谢异常类疾病提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与主要试剂、仪器

健康SPF级SD大鼠18只,体重180~220 g,购于辽宁长生生物技术股份有限公司[质量合格证:SCXK(辽)2020-0001],饲养于辽宁中医药大学动物实验室[SYXK(辽)2019-0004]。本研究获得辽宁中医药大学实验动物伦理委员会批准(批准编号:21000042022008)。

主要试剂包括甘油三酯(triglyceride, TG)、总

胆固醇(total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)检测试剂盒(单试剂GPO-PAP法)(南京建成生物工程研究所,批号:A110-1-1、A111-1-1、A113-1-1、A112-1-1),改良油红O染色试剂盒(C0158S)、TRIzol(总RNA抽提试剂,R0016)、DEPC水(R0021)、BeyoRT™ II cDNA合成试剂盒(D7170M,上海碧云天生物技术有限公司),RT MasterMix(N117,南京建成生物工程研究所),大鼠铜死亡PCR Array试剂盒(wc-mRNA0359-R;上海沃吉基因科技有限公司)。香砂六君子汤由木香6 g、砂仁3 g、党参12 g、茯苓12 g、白术12 g、法半夏6 g、陈皮6 g、炙甘草6 g组成,由辽宁中医药大学附属医院提供。主要仪器包括precipoint M8数字扫描显微成像系统(德国Proteintech公司)、多功能全波长酶标仪(MD,美国Molecular Devices公司)、7500实时荧光定量PCR仪(美国Applied Biosystems公司)、nanodrop 2000超微量紫外分光光度计(德国赛默飞公司)。

1.2 动物造模、分组与取材

18只健康SD大鼠适应性喂养1周后随机均分为正常组、脾虚高脂血症组、中药组,每组6只。正常组给予普通饲料,脾虚高脂血症组与中药组采用游泳力竭和高脂饲料(1.5%胆固醇、1%胆盐、3%猪油、3%花生油、5%蛋黄粉、86.5%普通饲料)喂养的复合方法造模。造模12周后灌胃干预,中药组香砂六君子汤($11.34 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)灌胃,正常组和脾虚高脂血症组同体积的0.9%氯化钠溶液灌胃,持续4周。然后大鼠麻醉抽血(3~5 mL),3 000 r/min 15 min离心后取上清放入EP管内,-80 ℃保存;另取大鼠部分肝脏放入EP管内,-80 ℃保存,部分肝脏放入4%多聚甲醛固定液中室温保存。

1.3 方法

1.3.1 血脂检测:按照血脂检测试剂盒说明书进行检测,上样后37 °C孵育 10 min, TG检测酶标仪波长546 nm, TC酶标仪波长500 nm、LDL-C酶标仪波长600 nm、HDL-C酶标仪波长600 nm,根据试剂盒说明书计算各指标水平(mmol/L)。

1.3.2 油红染色O检测脂质沉积:肝脏冰冻切片(6 μm)适量染色洗涤20 s,然后吸掉染色洗涤液,滴加改良油红O染色液染色20 min,去除油红O,继续加入染色洗涤液放置30 s,然后去除染色洗涤液浸入蒸馏水中置于摇床洗涤20 s。光镜下观察各组大鼠肝组织脂质沉积情况。

1.3.3 PCR Array检测肝脏铜死亡相关基因表达:取肝脏组织进行常规RNA提取,紫外分光光度计测定260 nm及280 nm吸光度(optical density, OD)值,计算RNA的浓度和纯度。取0.5 μg RNA按照PCR Array试剂盒说明书进行操作。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算基因表达量。

1.3.4 荧光定量qPCR验证基因表达:使用Primer5软件设计扩增基因引物,引物序列:*DLD*,正向5'-GACGCCCTTTACGCAGAAT-3',反向5'-GACCAGCAACCACATCTCCA-3';*GLS*,正向5'-GTCTGGAGGGAAGGTTGCTG-3',反向5'-ATGCCTTTGCCCATCTAC

GG-3'。按照WCGENE mRNA cDNA 合成试剂盒及WCGENE mRNA qPCR试剂盒进行操作,采用2步法,qPCR反应条件95 °C预变性 30 s,循环扩增40个循环(95 °C 5 s→60 °C 30 s→95 °C 15 s→60 °C 1 min→95 °C 15 s),采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因的相对表达量。

1.4 统计学分析

应用SPSS 21.0软件进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用ANOVA单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 香砂六君子汤对大鼠血脂水平影响

与正常组比较,脾虚高脂血症组大鼠血清TG、TC、LDL-C水平显著升高,HDL-C水平显著降低(均 $P < 0.01$)。与脾虚高脂血症组比较,中药组TG、TC、LDL-C水平显著降低,HDL-C水平显著升高(均 $P < 0.01$),见表1。

2.2 香砂六君子汤对大鼠肝脏脂质沉积影响

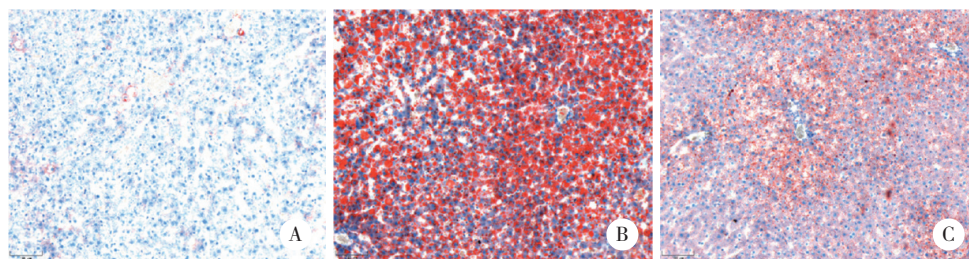
与正常组比较,脾虚高脂血症组大鼠肝细胞脂质沉积明显,出现大量脂滴,细胞空隙较大。与脾虚高脂血症大鼠比较,中药组肝细胞脂质沉积明显减弱,脂滴数量减少,细胞排列紧密程度增加,见图1。

表1 各组大鼠血清血脂含量($\bar{x} \pm s$, mmol · L⁻¹)

Tab.1 Serum lipid content of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, mmol · L⁻¹)

Group	n	TG	TC	HDL-C	LDL-C
Control	6	1.32 ± 0.01	0.49 ± 0.01	1.41 ± 0.02	1.40 ± 0.04
SDH	6	1.59 ± 0.03 ¹⁾	0.74 ± 0.03 ¹⁾	0.85 ± 0.11 ¹⁾	1.88 ± 0.04 ¹⁾
TCM	6	1.37 ± 0.01 ²⁾	0.55 ± 0.01 ²⁾	1.13 ± 0.03 ²⁾	1.57 ± 0.06 ²⁾

1) $P < 0.01$ vs. control group; 2) $P < 0.01$ vs. SDH group. SDH, spleen-deficiency and hyperlipidemia; TCM, traditional Chinese medicine.



A, control group; B, spleen-deficiency and hyperlipidemia group; C, TCM group.

图1 各组大鼠肝脏油红O染色形态学变化 ×400

Fig.1 Morphological changes in liver oil red O staining in each group ×400

2.3 各组大鼠肝脏组织铜死亡相关基因检测结果

PCR Array检测结果显示,共检测出11个铜死亡相关基因。与正常组比较,脾虚高脂血症组的差异表达基因为*Atp7b*、*Dlat*、*Dld*、*Gls*、*Lias*、*Pdha1*、*Slc31a1* (均 $P < 0.05$);与脾虚高脂血症组比较,中药组的差异表达基因为*Dld*、*Fdx1*、*Gls*、*Lias*、*Pdha1*、

Slc31a1 (均 $P < 0.05$)。2个比较组中共同的差异表达基因为*Dld*、*Gls*、*Lias*、*Pdha1*、*Slc31a1*。此外,正常组与脾虚高脂血症组、脾虚高脂血症与中药组之间比较,表达倍数均上调 ≥ 1 倍或下调 ≤ 1 倍的基因为*Cdkn2a*、*Dld*、*Gls*。2种比较结果取交集,共同的差异表达基因为*Dld*、*Gls*。见表2、图2。

表2 各组铜死亡相关基因表达比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Tab.2 Expression of cuproptosis-related genes in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Group	<i>Atp7b</i>	<i>Dlat</i>	<i>Dld</i>	<i>Fdx1</i>	<i>Gls</i>	<i>Lias</i>
Control	0.050 ± 0.001	0.068 ± 0.003	0.415 ± 0.016	1.843 ± 0.104	0.011 ± 0.003	0.051 ± 0.004
SDH	0.042 ± 0.004 ¹⁾	0.085 ± 0.002 ²⁾	0.213 ± 0.013 ³⁾	2.076 ± 0.165	0.022 ± 0.003 ¹⁾	0.059 ± 0.003 ¹⁾
TCM	0.035 ± 0.005	0.090 ± 0.008	0.557 ± 0.012 ⁴⁾	2.734 ± 0.034 ⁵⁾	0.008 ± 0.001 ⁵⁾	0.045 ± 0.001 ⁵⁾
Group	<i>Lipt1</i>	<i>Mtf1</i>	<i>Pdha1</i>	<i>Pdhb</i>	<i>Slc31a1</i>	
Control	0.005 ± 0.000	0.050 ± 0.006	0.150 ± 0.002	0.357 ± 0.042	0.320 ± 0.008	
SDH	0.004 ± 0.001	0.043 ± 0.002	0.123 ± 0.001 ³⁾	0.459 ± 0.073	0.415 ± 0.023 ²⁾	
TCM	0.004 ± 0.001	0.043 ± 0.002	0.204 ± 0.011 ⁴⁾	0.393 ± 0.014	0.353 ± 0.013 ⁶⁾	

1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$, 3) $P < 0.001$, vs. control group; 4) $P < 0.001$, 5) $P < 0.01$, 6) $P < 0.05$, vs. SDH group. SDH, spleen-deficiency and hyperlipidemia; TCM, traditional Chinese medicine.



A, control group vs. spleen-deficiency and hyperlipidemia group; B, spleen-deficiency and hyperlipidemia group vs. TCM group.

图2 大鼠铜死亡相关基因相对表达倍数比较(fold 值)

Fig.2 Relative expression multiples of cuproptosis-related genes in rats (fold value)

2.4 荧光定量qPCR验证结果

结果显示,与正常组比较,脾虚高脂血症组*Dld* mRNA表达降低 ($P < 0.01$);与脾虚高脂血症组比较,中药组*Dld* mRNA表达升高 ($P < 0.01$)且与芯片结果

一致。与正常组比较,脾虚高脂血症组*Gls* mRNA表达升高 ($P < 0.05$);与脾虚高脂血症组比较,中药组*Gls* mRNA表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$),与芯片结果不一致,见表3。

表3 各组大鼠肝脏*Dld*、*Gls* mRNA表达比较
Tab.3 mRNA expression levels of *Dld* and *Gls* in liver of rats in each group

Group	n	<i>Dld</i> mRNA	<i>Gls</i> mRNA
Control	3	1.000 ± 0.030	0.008 ± 0.001
SDH	3	0.330 ± 0.033 ¹⁾	0.015 ± 0.003 ²⁾
TCM	3	0.570 ± 0.016 ³⁾	0.016 ± 0.002

1) $P < 0.01$, 2) $P < 0.05$ vs. control group; 3) $P < 0.01$ vs. SDH group. SDH, spleen-deficiency and hyperlipidemia; TCM, traditional Chinese medicine.

3 讨论

本研究结果显示,脾虚高脂血症组大鼠血脂代谢异常,肝脏出现明显的脂质沉积,大量脂滴出现;香砂六君子汤干预后,大鼠血脂代谢指标TG、TC、HDL-C、LDL-C明显改善,肝脏脂质沉积以及脂滴现象明显缓解,与之前研究结果^[11-12]一致。PCR Array检测出11个肝脏铜死亡相关基因。结果显示,与正常组比较,脾虚高脂血症组大鼠肝脏铜死亡相关差异表达基因7个(*Atp7b*、*Dlat*、*Dld*、*Gls*、*Lias*、*Pdha1*、*Slc31a1*);与脾虚高脂血症组比较,中药组铜死亡相关差异表达基因6个(*Dld*、*Fdx1*、*Gls*、*Lias*、*Pdha1*、*Slc31a1*)。其中共同的差异表达基因5个(*Dld*、*Gls*、*Lias*、*Pdha1*、*Slc31a1*)。另外,脾虚高脂血症组与正常组、中药组与脾虚高脂血症组差异表达倍数比较,均发生上调 ≥ 1 倍或下调 ≤ 1 倍的基因共3个(*Cdkn2a*、*Dld*、*Gls*),两种比较结果取交集,共同的差异表达基因为*Dld*、*Gls*。荧光定量qPCR验证结果显示,*Dld* mRNA表达与芯片结果一致。

*Dld*分布于动植物线粒体中,为线粒体二氢硫辛酸脱氢酶,是一种同型二聚体黄素依赖酶,可催化NAD⁺依赖的二氢脂酰胺氧化^[13],在葡萄糖代谢和线粒体ATP的级联生产过程中发挥作用^[14],是线粒体三羧酸(tricarboxylic acid, TCA)循环中重要的物质之一,参与了几个关键的代谢酶复合物(丙酮酸脱氢酶复合物、 α -酮戊二酸脱氢酶复合物、支链-酮酸脱氢酶复合物)和甘氨酸裂解系统的形成^[15]。*Dld*参与生物体的新陈代谢,与多种疾病的发生机制密切相关,研究^[14]表明抑制*Dld*可以缓解糖尿病,作用机制是长期抑制*Dld*可以减弱糖尿病的氧化应激反应;*Dld*可作为2型糖尿病抗氧化应激的保护途径。在秀丽隐杆线虫阿尔茨海默病模型中,可以通过提高全身葡萄糖含量来诱导人Tau蛋白磷

酸化,从而抑制*Dld*活性^[16]。此外,在中风刺激下*Dld*缺陷小鼠模型表现出脑损伤增加^[17]。

传统中医并无“高脂血症”病名,古代的“膏脂”与现代的血脂含义颇为相似^[18-19]。血脂异常发生的病因多与中医“脾”密切相关。脾失健运是血脂代谢异常引起疾病的关键病机^[18-20],可见健脾化痰是防治血脂异常疾病的关键。香砂六君子汤为健脾化痰的经典方剂^[21],同时,课题组前期研究^[11-12]发现香砂六君子汤有改善脾虚高脂血症大鼠血脂代谢异常的疗效。

脾运化水谷功能与线粒体能量转化功能颇为一致,脾主运化的关键是线粒体内的生物氧化过程^[22],水谷精微物质在体内的吸收需要脾将水谷精微化为气、血、精、津液等物质以营养全身,经历的物质代谢转化生成能量的过程与线粒体通过TCA循环进行物质代谢和相互转化的过程一致^[23]。可见脾主运化的细胞生物学基础之一可能是线粒体在体内发挥的物质能量代谢过程^[24],脾主运化在体内的生物基础可体现在线粒体的TCA循环中^[25]。最新研究^[9]发现铜离子可以通过影响线粒体TCA循环,引起脂酰化蛋白的聚集、铁硫簇蛋白发生不稳定性,最终产生蛋白毒性应激反应,从而诱发不依赖细胞凋亡过程的新死亡形式——铜死亡。而铜离子也是心血管疾病、糖尿病等代谢性疾病发病的关键^[26]。

肝脏是参与人体代谢最重要的器官,肝细胞中线粒体占比较多,而线粒体是能量代谢的中心,脾虚的重要病机之一是线粒体功能障碍^[27],依据中医藏象学说,肝脏可归属于中医的脾藏^[28],故脾虚大鼠肝脏常出现严重的线粒体损伤^[29-30]。而铜死亡相关基因均参与了线粒体TCA循环过程,可见新的细胞调节性死亡方式与TCA循环代谢紊乱有关。

综上所述,肝脏铜死亡相关基因表达异常极有可能是血脂代谢异常的潜在机制,也可能是香砂六

君子汤防治血脂代谢异常的重要作用靶点。脾主运化的正常发挥与线粒体能量代谢的功能正常行使密不可分,随着对铜死亡的进一步认识,未来将更有助于发现铜死亡相关基因与血脂代谢异常类疾病之间的关系及其潜在分子机制,对于明确脾-线粒体关系及铜死亡机制,筛选治疗血脂代谢异常类疾病的相关药物具有一定价值。

参考文献:

- [1] 林巧云. 周仲瑛教授从“痰瘀”辨治高脂血症的临床经验及学术思想研究[D]. 南京:南京中医药大学,2017.
- [2] 马贵萍,章怡祎. 高脂血症的中医药治疗研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2019,17(14):2116-2119. DOI:10.12102/j.issn.1672-1349.2019.14.009.
- [3] 彭斐. 肝脏TETs的糖脂代谢功能研究[D]. 长春:吉林大学,2022.
- [4] AL ANKARI A, NAJIB H, AL HOZAB A. Yolk and serum cholesterol and production traits, as affected by incorporating a supraoptimal amount of copper in the diet of the leghorn hen [J]. Br Poult Sci, 1998, 39(3):393-397. DOI:10.1080/00071669888944.
- [5] LIEN TF, CHEN KL, WU CP, et al. Effects of supplemental copper and chromium on the serum and egg traits of laying hens [J]. Br Poult Sci, 2004, 45(4):535-539. DOI:10.1080/00071660400001082.
- [6] YANG HJ, LIU CN, WOLF RM, et al. Obesity is associated with copper elevation in serum and tissues [J]. Metallomics, 2019, 11(8):1363-1371. DOI:10.1039/c9mt00148d.
- [7] KUNUTSOR SK, DEY RS, LAUKKANEN JA. Circulating serum copper is associated with atherosclerotic cardiovascular disease, but not venous thromboembolism: a prospective cohort study [J]. Pulse, 2021, 9(3/4):109-115. DOI:10.1159/000519906.
- [8] LIU Y, YANG HR, SONG Z, et al. Copper excess in liver HepG2 cells interferes with apoptosis and lipid metabolic signaling at the protein level [J]. Turk J Gastroenterol, 2014, 25(Suppl 1):116-121. DOI:10.5152/tjg.2014.5064.
- [9] TSVETKOV P, COY S, PETROVA B, et al. Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins [J]. Science, 2022, 375(6586):1254-1261. DOI:10.1126/science.abf0529.
- [10] ZHANG ZY, MA YR, GUO XL, et al. FDX1 can impact the prognosis and mediate the metabolism of lung adenocarcinoma [J]. Front Pharmacol, 2021, 12:749134. DOI:10.3389/fphar.2021.749134.
- [11] 王杰,宋因,陈丝,等. 基于肠道菌群调控TMAO/PERK/FOXO1途径探讨香砂六君子汤对脾虚高脂血症大鼠肝脏甘油三酯合成的影响及机制[J]. 时珍国医国药,2022,33(2):286-291. DOI:10.3969/j.issn.1008-0805.2022.02.08.
- [12] 冷雪,曹媛,王莹,等. 香砂六君子汤通过调控miR-182/FOXO1对脾虚高脂血症大鼠肝脏脂质沉积的影响及可能的机制[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2022,24(7):2677-2683.
- [13] FLEMINGER G, DAYAN A. The moonlighting activities of dihydrolipoamide dehydrogenase: biotechnological and biomedical applications [J]. J Mol Recognit, 2021, 34(11):e2924. DOI:10.1002/jmr.2924.
- [14] YANG XJ, SONG J, YAN LJ. Chronic inhibition of mitochondrial dihydrolipoamide dehydrogenase (DLDH) as an approach to managing diabetic oxidative stress [J]. Antioxidants, 2019, 8(2):32. DOI:10.3390/antiox8020032.
- [15] YAN LJ, WANG YC. Roles of dihydrolipoamide dehydrogenase in health and disease [J]. Antioxid Redox Signal, 2023, 39(10/12):794-806. DOI:10.1089/ars.2022.0181.
- [16] AHMAD W. Dihydrolipoamide dehydrogenase suppression induces human tau phosphorylation by increasing whole body glucose levels in a *C. elegans* model of Alzheimer's Disease [J]. Exp Brain Res, 2018, 236(11):2857-2866. DOI:10.1007/s00221-018-5341-0.
- [17] LI RR, LUO XT, WU JZ, et al. Mitochondrial dihydrolipoamide dehydrogenase is upregulated in response to intermittent hypoxic preconditioning [J]. Int J Med Sci, 2015, 12(5):432-440. DOI:10.7150/ijms.11402.
- [18] 乔军华,盖国海,乔红曼,等. 高脂血症中医病机及治疗刍议[J]. 中医临床研究,2015,7(14):145-147. DOI:10.3969/j.issn.1674-7860.2015.14.080.
- [19] 严红梅. “脾失运化,痰浊内生”与高脂血症形成的相关性[J]. 内蒙古中医药,2014,33(12):156. DOI:10.16040/j.cnki.cn15-1101.2014.12.024.
- [20] 李维娜,冯玲. 高脂血症从脾论治探幽[J]. 世界中西医结合杂志,2017,12(4):577-580. DOI:10.13935/j.cnki.sjzx.170435.
- [21] 吕美君,贾连群,王志丹,等. 香砂六君子汤的文献分析研究[J]. 中华中医药学刊,2016,34(7):1620-1623. DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2016.07.023.
- [22] 戴娜,何兰,胡晶,等. “脾主肌肉”的理论探讨及其临床意义[J]. 中医杂志,2018,59(2):95-99. DOI:10.13288/j.11-2166/r.2018.02.002.
- [23] 黄杨玲,陈巍. 基于脾主运化理论探讨线粒体呼吸链功能在妊娠期SCH后代脑损伤中的作用机制[J]. 湖南中医杂志,2023,39(11):108-111. DOI:10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2023.11.029.
- [24] 刘羽茜,刘悦,孙宇衡,等. 基于脾脏象理论探讨脾与线粒体相关性[J]. 中华中医药学刊,2019,37(6):1362-1364. DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2019.06.020.
- [25] 杨旭,王琦越,刘渊,等. 从“脾主化”角度探讨湿阻中焦证大鼠线粒体能量代谢路径的影响及平胃散的干预作用[J]. 时珍国医国药,2019,30(6):1305-1308. DOI:10.3969/j.issn.1008-0805.2019.06.008.
- [26] 于燕,李惠玲. 铜代谢及其相关疾病研究进展[J]. 环境与健康杂志,2018,35(3):272-276. DOI:10.16241/j.cnki.1001-5914.2018.03.023.
- [27] 杜敏,陶丽宇,冯晓腾,等. 基于线粒体能量代谢障碍探讨从脾论治“双心疾病”的机制[J]. 北京中医药大学学报,2021,44(9):860-864. DOI:10.3969/j.issn.1006-2157.2021.09.015.
- [28] 徐杨,张启明,王义国. 肝脏的中医藏象归属[J]. 中医学报,2020,35(7):1397-1400. DOI:10.16368/j.issn.1674-8999.2020.07.312.
- [29] 宋雅芳,王汝俊,刘友章,等. 健脾益气中药对脾虚大鼠肝组织线粒体功能的影响[J]. 中药新药与临床药理,2009,20(5):423-426. DOI:10.19378/j.issn.1003-9783.2009.05.007.
- [30] 胡玉洁,胡喻,刘鹏,等. 茵陈四苓颗粒联合骨髓间充质干细胞移植对急性肝衰竭大鼠肝脏线粒体呼吸链复合物和ATP活性的影响研究[J]. 云南中医中药杂志,2022,43(8):77-84. DOI:10.16254/j.cnki.53-1120/r.2022.08.011.

(编辑 武玉欣)