

·博硕园地·

肝宝胶囊含药血清对巨噬细胞代谢重编程和Anx A5/PKM2通路的影响

谢风帆¹,胡若莹²,林娜³,范兴¹,黄枚²,陈亚萍²,南丽红^{2*}

(1.福建医科大学孟超肝胆医院,福建福州 350007;

2.福建中医药大学药学院,福建福州 350122;

3.福建省老年医院,福建福州 350003)

摘要: 目的 观察肝宝胶囊(GBC)含药血清对巨噬细胞代谢重编程和膜联蛋白 A5(Anx A5)/丙酮酸激酶 M2(PKM2)通路的影响。方法 24只SD雄性大鼠适应性喂养7 d后,随机分为空白对照组、GBC组和双环醇片组各8只,分别予蒸馏水、1.47g/(kg·d)GBC、200 mg/(kg·d)双环醇片灌胃,制备含药血清。RAW264.7细胞随机分为空白对照组,模型组,1.25%、2.5%、5% GBC含药血清组和双环醇片含药血清组。分别加入:10%空白血清培养基;含10 ng/mL LPS和10 ng/mL IFN- γ 的10%空白血清培养基;含10 ng/mL LPS和10 ng/mL IFN- γ 的1.25%、2.5%、5% GBC含药血清,血清浓度不足10%的用空白血清补齐;含10 ng/mL LPS和10 ng/mL IFN- γ 的10%双环醇片含药血清。检测细胞上清液中白细胞介素1 β (IL-1 β)含量,检测细胞外酸化率(ECAR)、氧消耗率(OCR)、ATP、乳酸脱氢酶(LDH)和乳酸(LD)水平,Western blot检测细胞中Anx A5、PKM2、p-PKM2和缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)蛋白表达水平。结果 与空白对照组比较,模型组细胞上清液中IL-1 β 含量升高($P<0.05$),细胞OCR和ATP水平及Anx A5蛋白表达均下降($P<0.05$),细胞ECAR、LDH、LD水平及HIF-1 α 、p-PKM2蛋白表达均升高($P<0.05$)。与模型组比较,GBC各含药血清组和双环醇片含药血清组细胞上清液中IL-1 β 含量均下降($P<0.05$),细胞OCR、ATP水平均升高($P<0.05$),细胞ECAR、LDH、LD水平及HIF-1 α 、p-PKM2蛋白表达均下降($P<0.05$),2.5%、5% GBC含药血清组和双环醇片含药血清组Anx A5蛋白表达均升高($P<0.05$)。与1.25% GBC含药血清组比较,2.5%含药血清组细胞上清液中IL-1 β 含量较低($P<0.05$),细胞ATP水平较高($P<0.05$),细胞LDH水平较低($P<0.05$);5% GBC含药血清组细胞上清液中IL-1 β 含量较低($P<0.05$),细胞OCR和ATP水平均较高($P<0.05$),细胞ECAR和LDH水平均较低($P<0.05$)。结论 GBC含药血清可能通过调控Anx A5/PKM2通路干预巨噬细胞代谢重编程,抑制巨噬细胞的促炎作用。

关键词: 脂肪肝;肝宝胶囊;Anx A5/PKM2通路;代谢重编程;巨噬细胞

脂肪肝是以肝内脂肪过度堆积为特征的疾病,与代谢紊乱和炎症等密切相关,其患病率逐年上升^[1-2]。肝巨噬细胞在脂肪肝疾病进展中起关键作用^[3-4],其中促炎M1表型巨噬细胞的激活依赖糖酵解快速供能^[5]。研究表明,通过调控膜联蛋白A5(Anx A5)/丙酮酸激酶M2(PKM2)通路可促使巨噬细胞代谢从糖酵解转向氧化磷酸化,实现代谢重编程,从而抑制巨噬细胞引发的炎症反应,为脂肪肝治疗提供了新思路^[6]。

中医学将脂肪肝归为“肝胀”“肝癖”等范畴,其发生、发展与痰、瘀、湿等因素密切相关,初期为湿、热、痰浊阻滞体内;中期为肝郁脾虚,气虚血瘀;后期多久病及肾,致脾肾阳虚或肝肾阴虚,肝脾肾俱损^[7]。肝宝胶囊(GBC)是福建医科大学孟超肝胆医院院内制剂(批准文号:闽药制字Z04107020),具有清热利湿、消食降脂、润肺化痰之功效,用于治

疗脂肪肝及急、慢性肝炎之肝热积滞证^[8]。前期研究表明,GBC可通过调节多种代谢途径发挥保肝作用^[9]。本研究通过观察GBC含药血清对巨噬细胞代谢方式和Anx A5/PKM2通路的影响,进一步探讨GBC的作用机制。

1 实验材料

1.1 实验动物 5周龄SPF级健康雄性SD大鼠24只,体质量(180 \pm 20)g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2022-0004。动物饲养于福建中医药大学医学实验动物中心,实验动物使用许可证号:SYXK(闽)2023-0004,饲养期间自由摄食饮水。本研究获福建医科大学动物伦理委员会审核批准,审批号:IACUCFJMU2023-Y-0866。

1.2 实验药物 GBC组方:鲜青果2 500 g,虎杖2 000 g,麦芽1 600 g,莱菔子1 250 g,谷芽800 g。经福建医科大学孟超肝胆医院制剂中心制备成胶囊1 000粒(福建医科大学孟超肝胆医院,生产批号:20241003,规格0.34 g/粒)^[8]。准确称取GBC粉末5.88 g,加入40 mL超纯水,充分混匀,配制成浓度

收稿日期:2025-07-02;接受日期:2025-08-25

基金项目:福建省自然科学基金项目(2023J011468);福州市卫生健康科技计划项目(2022-S-wq6);福州市2025年中医专项市级补助资金(003065016)

通信作者:南丽红,E-mail:nlhong1152@163.com

DOI:10.13260/j.cnki.fjtc.2026.02007

为0.147 g/mL的GBC混悬液。双环醇片(北京协和药厂有限公司,生产批号:240605,规格25 mg/片)。取双环醇片32片,总量0.8 g,充分研磨成细粉后,加入40 mL超纯水,振荡混匀,配制成浓度为0.02 g/mL的双环醇片混悬液。

1.3 细胞系 小鼠单核巨噬细胞白血病细胞(RAW264.7),购自赛百慷(上海)生物技术股份有限公司,货号:iCell-m047。

1.4 实验试剂 特级胎牛血清(货号:C04001-500)、青链双抗溶液(货号:C3420-0100)均购自上海道鹏生物科技有限公司;LPS(货号:RPM0001)、IFN- γ (货号:RP01070)均购自武汉爱博泰克生物科技有限公司;乳酸脱氢酶(LDH)测试盒(货号:A020-2)、乳酸(LD)测试盒(货号:A019-2-1)均购自南京建成生物工程研究所;白细胞介素-1 β (IL-1 β)ELISA试剂盒(货号:EK0394)、100 \times 广谱磷酸酶抑制剂混合物(货号:AR1183)、蛋白酶抑制剂PMSF(货号:AR1192)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(货号:AR0146)均购自武汉博士德生物工程有限公司;氧消耗率(OCR)荧光法测试盒(货号:E-BC-F068)、细胞外酸化率(ECAR)荧光法测试盒(货号:E-BC-F069)均购自美国Amresco公司;ATP检测试剂盒(货号:S0026)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(货号:P0010)、Western及IP细胞裂解液(货号:P0013)、SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(5 \times)(货号:P0015L)、SDS-PAGE凝胶快速配制试剂盒(货号:P001AC)均购自上海碧云天生物技术有限公司;Anti-Anx A5 Antibody(货号:CPA3515)、Anti-Beta-actin Antibody(货号:CPA9100)、Goat Anti-Rabbit IgG(H&L)-HRP(货号:CSA2115)、Goat Anti-Mouse IgG(H&L)-HRP(货号:CSA2018)均购自苏州康何欣生物科技有限公司;PKM2 Rabbit pAb(货号:321004)、缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) Rabbit pAb(货号:340462)均购自成都正能生物技术有限责任公司;DMEM培养基(武汉普诺赛生命科技有限公司,货号:PM150210);核蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司,货号:KGB5302-100);Meilunbio[®]飞克特超敏ECL发光液(大连美仑生物科技有限公司,货号:MA0186-1);PKM2(Phospho Tyr105)Rabbit pAb(美国Immunoway公司,货号:YP1444)。

1.5 主要仪器 迷你掌中离心机(型号:LX-500)、摇床(型号:ZD9550)、干式恒温器(型号:GL-1800)均购自海门其林贝尔仪器制造有限公司;化学发光成像系统(型号:ChemiDoc XRS+)、基础电泳仪电源(型号:PowerPAC Basic)、垂直电泳槽(型号:Mini-PROTEAT Tetra)均购自美国BioRad公司;低速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司,型号:

KDC-12);电热恒温培养箱(上海一恒科技有限公司,型号:DHP-9052);体视显微镜(重庆奥特光学仪器有限公司,型号:SZ760);多功能酶标仪(瑞士TECAN公司,型号:Infinite 200 PRO);高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司,型号:Centrifuge 5418);旋转混匀器(美国OHAUS公司,型号:VXMPAL);MiliQ超纯水系统(德国MERCK公司,型号:ZR0001600);CO₂培养箱(美国Thermo-Scientific公司,型号:Forma371);倒置荧光显微镜(德国Leica公司,型号:DMi8);Zeiss倒置显微镜(德国Carl Zeiss Microscopy GmbH公司,型号:Axiocam 208 color);全自动细胞计数仪(深圳博大博聚科技有限公司,型号:JSY-SC-021H)。

2 实验方法

2.1 含药血清的制备 24只SD雄性大鼠适应性喂养7 d后,随机分为空白对照组、GBC组和双环醇片组,每组8只。GBC组给药剂量按人(体质量70 kg)与大鼠体表面积折算的等效剂量换算,并参照前期研究^[9-10],给药量为1.47 g/(kg·d),即灌胃浓度为0.147 g/mL的GBC混悬液10 mL/(kg·d)。双环醇片组给药量为200 mg/(kg·d)^[11],即灌胃浓度为0.02 g/mL的双环醇片混悬液10 mL/(kg·d)。空白组灌胃等体积蒸馏水。1次/d,连续灌胃7 d。末次给药2 h后,予以戊巴比妥钠(60 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠,腹主动脉采血,并在冰上静置3 h后,3 500 r/min离心15 min,取上清,0.22 μ m过滤,60 $^{\circ}$ C水浴灭活15 min,于-20 $^{\circ}$ C冰箱中保存备用。

2.2 LPS和IFN- γ 配制

2.2.1 LPS母液配制 将规格为10 mg的LPS粉末溶于1 mL含10%空白血清的DMEM完全培养基中,得到浓度为10 mg/mL的原液。取上述原液1 μ L,加入1 mL含10%空白血清的DMEM完全培养基,制备成浓度为10 μ g/mL的LPS母液。混匀后无菌过滤并分装,于-80 $^{\circ}$ C长期保存。使用前室温解冻,以完全培养基稀释至所需浓度。

2.2.2 IFN- γ 母液配制 将规格为100 μ g的IFN- γ 冻干粉溶解于10 mL含10%空白血清的DMEM完全培养基中,制备成浓度为10 μ g/mL的IFN- γ 母液。混匀后无菌过滤并分装,于-80 $^{\circ}$ C长期保存。使用前室温解冻,以完全培养基稀释至所需浓度。

2.3 分组、模型制备与给药 取生长状态良好的RAW264.7细胞分别以5 000个/孔接种于96孔细胞培养板或1 \times 10⁵个/孔接种6孔细胞培养板。随机分为空白对照组,模型组,1.25%、2.5%、5% GBC含药血清组和双环醇片含药血清组。空白对照组:加入10%空白血清培养基;模型组:加入含10 ng/mL LPS和10 ng/mL IFN- γ 的10%空白血清培养基;1.25%、2.5%、5% GBC含药血清组:分别加入含10 ng/mL LPS

和 10 ng/mL IFN- γ 的 1.25%、2.5%、5% GBC 含药血清,血清浓度不足 10% 的用空白血清补齐;双环醇片含药血清组:加入含 10 ng/mL LPS 和 10 ng/mL IFN- γ 的 10% 双环醇片含药血清。每组设 3 个复孔,置于 CO₂ 培养箱中,以 37 °C、5% CO₂、pH 7.2~7.4 为条件培养 24 h。

2.4 指标检测

2.4.1 细胞上清液中 IL-1 β 含量 RAW264.7 细胞接种于 6 孔细胞培养板,按“2.3”项下分组干预 24 h 后,收集上清,4 °C 下 5 000 r/min 离心 20 min,将上清转移至新的离心管中,严格按照 ELISA 试剂盒说明书操作,检测细胞上清液中 IL-1 β 的含量。

2.4.2 细胞 ECAR 水平 RAW264.7 细胞接种于黑色透底 96 孔板细胞培养板,按“2.3”项下分组干预 24 h 后,吸出培养基,严格按 ECAR 荧光法试剂盒说明书操作,每孔加入 100 μ L 试剂一,37 °C 孵育 30 min 后,每孔加入 100 μ L 工作液,荧光酶标仪于激发波长 490 nm,发射波长 535 nm 检测各孔荧光值,每隔 2~3 min 检测 1 次,持续 120 min,按照荧光值(F)与时间(min)绘制曲线,选择线性段进行计算。T₁ 时检测各孔的荧光值为 F₁,T₂ 时检测各孔的荧光值为 F₂。 $\Delta F_{\text{测定}}$:测定孔变化荧光值,即 F₁-F₂; $\Delta F_{\text{空白}}$:空白孔变化荧光值,即 F₁-F₂; ΔT :荧光值变化时间 T₂-T₁。计算公式为:

$$\text{ECAR 值} = (\Delta F_{\text{测定}} - \Delta F_{\text{空白}}) / \Delta T。$$

2.4.3 细胞 OCR 水平 RAW264.7 细胞接种于黑色透底 96 孔板细胞培养板,按“2.3”项下分组干预 24 h 后,吸出培养基,严格按照 OCR 荧光法试剂盒说明书操作,每孔加入 100 μ L 工作液,37 °C 孵育 30 min 后,使用酶标仪动力学模式,设置激发波长 405 nm,发射波长 675 nm 检测各孔荧光值,每隔 2 min 检测 1 次,持续检测 90 min,按照荧光值(F)与时间(min)绘制曲线,选择线性段进行计算。计算方法同 ECAR 值。

2.4.4 细胞 ATP 水平 RAW264.7 细胞接种于 6 孔细胞培养板,按“2.3”项下分组干预 24 h 后,吸出培养基,每孔加入 200 μ L 细胞裂解液,反复吹打,充分裂解后,4 °C 12 000 r/min 离心 5 min,取上清,严格按照 ATP 检测试剂盒说明书操作,检测细胞中 ATP 水平。

2.4.5 细胞 LDH 水平 RAW264.7 细胞接种于 6 孔细胞培养板,按“2.3”项下分组干预 24 h 后,收集细胞,加入 0.3 mL PBS 冰水浴超声破碎后,4 °C 下 4 000 r/min 离心 10 min,取上清液,严格按照 LDH 试剂盒说明书操作,检测细胞中 LDH 水平。

2.4.6 细胞 LD 水平 RAW264.7 细胞接种于 6 孔细胞培养板,按“2.3”项下分组干预 24 h 后,收集细胞,用 PBS 清洗 1~2 次,4 °C 下 1 000 r/min 离心 5 min,

收集沉淀细胞,加入 0.5 mL PBS 重悬细胞,手动研磨破碎后,4 °C 下 4 000 r/min 离心 10 min,取上清液,严格按照 LD 试剂盒说明书操作,检测细胞中 LD 水平。

2.4.7 Western blot 检测细胞中 Anx A5、PKM2、p-PKM2 和 HIF-1 α 蛋白表达水平 RAW264.7 细胞接种于 6 孔细胞培养板,按“2.3”项下分组干预 24 h 后,收集细胞并加入细胞裂解液,置于冰上裂解 30 min,4 °C 下 12 000 r/min 离心 15 min,收集上清液,测定蛋白浓度,蛋白变性后 10% SDS-PAGE 胶电泳,转膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,加入一抗 Anx A5(1:500)、PKM2(1:500)、p-PKM2(1:500)、HIF-1 α (1:500),4 °C 孵育过夜。次日除去一抗后,室温加入二抗(1:3 000)孵育 70 min。滴加 ECL 化学发光显影液显影并采集图像,用 Image Lab 6.0 软件分析条带灰度值。以 β -actin 作为内参,计算目的蛋白的相对表达量。

2.5 统计学方法 使用 SPSS 24.0 软件进行统计分析。计量资料符合正态分布以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析。方差齐时,两两比较采用 LSD-*t* 法;方差不齐时,两两比较采用 Games-Howell。*P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 6 组细胞上清液中 IL-1 β 含量比较 见表 1。

表 1 6 组细胞上清液中 IL-1 β 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	IL-1 β /(pg/mL)
空白对照组	4	7.43 \pm 0.47
模型组	4	12.81 \pm 0.91 ¹⁾
1.25%GBC 含药血清组	4	11.23 \pm 0.90 ²⁾
2.5%GBC 含药血清组	4	9.07 \pm 0.64 ²⁾³⁾
5%GBC 含药血清组	4	8.37 \pm 0.39 ²⁾³⁾
双环醇片含药血清组	4	7.64 \pm 0.64 ²⁾³⁾⁴⁾

注:与空白对照组比较,1) *P* < 0.05;与模型组比较,2) *P* < 0.05;与 1.25% GBC 含药血清组比较,3) *P* < 0.05;与 2.5% GBC 含药血清组比较,4) *P* < 0.05。

3.2 6 组细胞 OCR 和 ATP 水平比较 见表 2。

表 2 6 组细胞 OCR 和 ATP 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	OCR/ (FU/min)	ATP/ (nmol/mg)
空白对照组	5	1.21 \pm 0.28	3.38 \pm 0.12
模型组	5	0.45 \pm 0.11 ¹⁾	0.93 \pm 0.15 ¹⁾
1.25%GBC 含药血清组	5	0.70 \pm 0.14 ²⁾	1.24 \pm 0.08 ²⁾
2.5%GBC 含药血清组	5	0.77 \pm 0.16 ²⁾	1.97 \pm 0.18 ²⁾³⁾
5%GBC 含药血清组	5	0.95 \pm 0.18 ²⁾³⁾	2.77 \pm 0.24 ²⁾³⁾⁴⁾
双环醇片含药血清组	5	1.02 \pm 0.17 ²⁾³⁾⁴⁾	2.74 \pm 0.11 ²⁾³⁾⁴⁾

注:与空白对照组比较,1) *P* < 0.05;与模型组比较,2) *P* < 0.05;与 1.25% GBC 含药血清组比较,3) *P* < 0.05;与 2.5% GBC 含药血清组比较,4) *P* < 0.05。

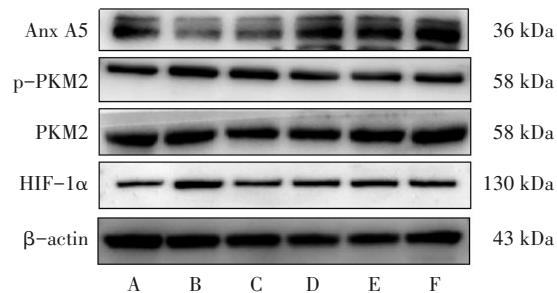
3.3 6 组细胞 Anx A5/PKM2 通路相关蛋白表达水平比较 见表 3 和图 1。

3.4 6 组细胞 ECAR、LDH 和 LD 水平比较 见表 4。

表 3 6 组细胞 Anx A5/PKM2 通路相关蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Anx A5/ β -actin	p-PKM2/PKM2	HIF-1 α / β -actin
空白对照组	4	1.00 \pm 0.19	1.00 \pm 0.18	1.00 \pm 0.23
模型组	4	0.63 \pm 0.21 ¹⁾	1.36 \pm 0.14 ¹⁾	1.89 \pm 0.26 ¹⁾
1.25%GBC 含药血清组	4	0.84 \pm 0.26	1.11 \pm 0.15 ²⁾	1.30 \pm 0.43 ²⁾
2.5%GBC 含药血清组	4	1.02 \pm 0.10 ²⁾	1.00 \pm 0.22 ²⁾	1.34 \pm 0.27 ²⁾
5%GBC 含药血清组	4	1.04 \pm 0.28 ²⁾	0.91 \pm 0.09 ²⁾	1.33 \pm 0.20 ²⁾
双环醇片含药血清组	4	1.03 \pm 0.15 ²⁾	0.98 \pm 0.16 ²⁾	1.38 \pm 0.29 ²⁾

注:与空白对照组比较,1) $P < 0.05$;与模型组比较,2) $P < 0.05$ 。



注:A 空白对照组;B 模型组;C 1.25%GBC 含药血清组;D 2.5%GBC 含药血清组;E 5%GBC 含药血清组;F 双环醇片含药血清组。

图 1 6 组细胞 Anx A5/PKM2 通路相关蛋白条带图

表 4 6 组细胞 ECAR、LDH 和 LD 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	ECAR/(FU/min)	LDH/(U/L)	LD/(mmol/gprot)
空白对照组	5	4.64 \pm 0.63	208.76 \pm 75.60	0.11 \pm 0.02
模型组	5	26.51 \pm 6.75 ¹⁾	658.75 \pm 36.39 ¹⁾	0.28 \pm 0.10 ¹⁾
1.25%GBC 含药血清组	5	19.55 \pm 5.72 ²⁾	580.48 \pm 18.65 ²⁾	0.19 \pm 0.03 ²⁾
2.5%GBC 含药血清组	5	14.75 \pm 3.57 ²⁾	408.47 \pm 65.21 ²⁾³⁾	0.20 \pm 0.02 ²⁾
5%GBC 含药血清组	5	9.54 \pm 2.57 ²⁾³⁾	369.38 \pm 41.72 ²⁾³⁾	0.16 \pm 0.04 ²⁾
双环醇片含药血清组	5	8.21 \pm 3.11 ²⁾³⁾⁴⁾	545.78 \pm 44.82 ²⁾⁴⁾⁵⁾	0.16 \pm 0.04 ²⁾

注:与空白对照组比较,1) $P < 0.05$;与模型组比较,2) $P < 0.05$;与 1.25% GBC 含药血清组比较,3) $P < 0.05$;与 2.5% GBC 含药血清组比较,4) $P < 0.05$;与 5% GBC 含药血清组比较,5) $P < 0.05$ 。

4 讨论

作为肝病发展的初期阶段,脂肪肝的进展与促炎的 M1 型巨噬细胞密切相关^[12],该过程伴随代谢重编程的发生,即细胞通过改变代谢模式以适应能量需求。M1 型巨噬细胞可表现为糖酵解增强和氧化磷酸化减弱,糖酵解快速生成的 ATP 可促进巨噬细胞极化,从而增强炎症反应^[13]。LDH 是糖酵解途径的关键酶之一,其催化丙酮酸转化为 LD,LD 被细胞膜泵排到细胞外环境中,会导致细胞外环境的酸化,通过检测 ECAR、LDH、LD 可以评估细胞糖酵解代谢水平^[14]。氧化磷酸化过程需消耗氧气来产生 ATP,与糖酵解相比,其生成 ATP 的过程具有低速高效的特点,其消耗 1 分子葡萄糖可产生 30~32 个 ATP,通过检测 OCR 和 ATP 可以评估细胞氧化磷酸化水平^[15]。本研究结果显示,模型组巨噬

细胞 ECAR、LDH、LD 水平均升高,OCR 和 ATP 水平均降低,细胞上清液中 IL-1 β 含量升高,表明经 LPS 和 IFN- γ 干预后,巨噬细胞以糖酵解为主要代谢方式,炎症反应增强。各含药血清干预组细胞 ECAR、LDH、LD 水平均降低,OCR、ATP 水平均提高,细胞上清液中 IL-1 β 含量降低,提示经 GBC 和双环醇片含药血清干预后,细胞不再以糖酵解进行主要产能,而是代谢重编程为氧化磷酸化来产生 ATP 进行供能,炎症反应减轻。且 2.5%、5%GBC 含药血清组与 1.25%GBC 含药血清组的多项指标存在显著性差异,表明 GBC 对巨噬细胞代谢的影响存在一定的剂量依赖性。与常用的保肝药物双环醇片含药血清组比较,5%GBC 含药血清组对 LDH 活性的抑制作用更强,其余各指标差异无统计学意义,两者对巨噬细胞代谢的影响相当。

Anx A5 是一种广泛分布的内源性膜联蛋白,可调节炎症反应^[5,16]。PKM2 是丙酮酸激酶的一种亚型,其二聚体形式可促进糖酵解^[17-18]。Anx A5 通过 ASP101、LEU104 和 ARG106 位点直接与 PKM2 结合,抑制其 Y105 磷酸化,促进 PKM2 四聚体形成,从而减少 PKM2 二聚体形式。而二聚体形式的 PKM2 能够与 HIF-1 α 结合,促进 LDH、葡萄糖转运体等糖酵解关键基因的转录,增强糖酵解^[19]。因此,抑制 PKM2 和 HIF-1 α 相互作用可减弱糖酵解,降低 LPS 诱导的 IL-1 β 等促炎因子产生,对推动巨噬细胞由糖酵解向氧化磷酸化重编程、缓解炎症具有重要作用^[20]。本研究结果显示,模型组巨噬细胞 Anx A5 蛋白表达水平下降,HIF-1 α 和 p-PKM2 蛋白表达水平均升高;各含药血清干预组上述蛋白变化趋势与模型组相反。表明巨噬细胞代谢方式变化与 Anx A5/PKM2 信号通路改变有关,GBC 和双环醇片对巨噬细胞代谢重编程的影响与对 Anx A5/PKM2 信号通路的调控有关。

综上所述,GBC 含药血清可将巨噬细胞糖酵解代谢重编程为氧化磷酸化,从而抑制巨噬细胞的促炎作用,减轻脂肪肝进程中的炎症级联反应,其内在机制可能与对 Anx A5/PKM2 信号通路的调控有关。

参考文献

- [1] YIP T C, FAN J G, WONG V W. China's fatty liver crisis: a looming public health emergency [J]. *Gastroenterology*, 2023, 165 (4): 825-827.
- [2] HAN S K, BAIK S K, KIM M Y. Non-alcoholic fatty liver disease: definition and subtypes [J]. *Clin Mol Hepatol*, 2023, 29: S5-S16.
- [3] MANTOVANI A, BISWAS S K, GALDIERO M R, et al. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodeling [J]. *J Pathol*, 2013, 229 (2): 176-185.
- [4] SICA A, MANTOVANI A. Macrophage plasticity and polarization: *in vivo* veritas [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122 (3): 787-795.
- [5] XU F, GUO M M, HUANG W, et al. Annexin A5 regulates hepatic macrophage polarization *via* directly targeting PKM2 and ameliorates NASH [J]. *Redox Biol*, 2020, 36: 101634.
- [6] XU B J, LIU Y, LI N, et al. Lactate and lactylation in macrophage metabolic reprogramming: current progress and outstanding issues [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1395786.
- [7] 赛俊婷,李秀惠.脂肪肝中医证候学研究进展[J].*临床肝胆病杂志*, 2024, 40(10): 1929-1932.
- [8] 孙塘,高依卿,郑秀奇.肝宝胶囊的制备及临床疗效观察[J].*医药产业资讯*, 2005, 2(18): 58-59.
- [9] 范兴,蔡杏栗,杨成梓,等.基于代谢组学研究肝宝胶囊治疗非酒精性脂肪肝大鼠的作用机制[J].*中成药*, 2021, 43(3): 635-642.
- [10] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理学实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2002: 1861.
- [11] LI H, LIU N N, LI J R, et al. Bicyclol ameliorates advanced liver diseases in murine models via inhibiting the IL-6/STAT3 signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 150: 113083.
- [12] LOTOWSKA J M, SOBANIEC-LOTOWSKA M E, LEBENSZ-TEJN D M. The role of Kupffer cells in the morphogenesis of nonalcoholic steatohepatitis-ultrastructural findings. The first report in pediatric patients [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2013, 48(3): 352-357.
- [13] GOMES M T R, GUIMARÃES E S, MARINHO F V, et al. STING regulates metabolic reprogramming in macrophages via HIF-1 α during *Brucella* infection [J]. *PLoS Pathog*, 2021, 17 (5): e1009597.
- [14] 黄永林,宋振恒,王明刚,等.糖酵解关键限速酶及其调节因子参与原发性肝癌发生与发展的研究进展[J].*肿瘤*, 2023, 43(11): 895-904.
- [15] LIU Y, XU R Y, GU H Y, et al. Metabolic reprogramming in macrophage responses [J]. *Biomark Res*, 2021, 9(1): 1.
- [16] BOUTER A, CARMEILLE R, GOUNOU C, et al. Review: Annexin-A5 and cell membrane repair [J]. *Placenta*, 2015, 36: S43-S49.
- [17] DODDAPATTAR P, DEV R, GHATGE M, et al. Myeloid cell PKM2 deletion enhances efferocytosis and reduces atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2022, 130(9): 1289-1305.
- [18] QU H D, ZHANG D, LIU J L, et al. Therapeutic targeting of PKM2 ameliorates NASH fibrosis progression in a macrophage-specific and liver-specific manner [J]. *Engineering*, 2024, 41: 189-203.
- [19] LUO W B, SEMENZA G L. Pyruvate kinase M2 regulates glucose metabolism by functioning as a coactivator for hypoxia-inducible factor 1 in cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2011, 2(7): 551-556.
- [20] PALSSON-MCDERMOTT E M, CURTIS A M, GOEL G, et al. Pyruvate kinase M2 regulates HIF-1 α activity and IL-1 β induction and is a critical determinant of the Warburg effect in LPS-activated macrophages [J]. *Cell Metab*, 2015, 21(1): 65-80.