

网络出版时间：网络出版地址：

AdipoRon 通过调节脂质代谢和重塑巨噬细胞表型改善肝纤维化的功能研究

王海昆,姚 萍,杨 涛,席利力

(新疆医科大学第一附属医院消化科,乌鲁木齐 830054)

摘要 **目的** 探究脂联素受体激动剂 AdipoRon 治疗四氯化碳 (CCl₄) 诱导的小鼠肝纤维化模型中的作用及其机制。**方法** 40 只小鼠随机分为对照组、模型组、低剂量 AdipoRon 组、高剂量 AdipoRon 组,每组 10 只。腹腔注射 CCl₄ 溶液诱导小鼠肝纤维化。低/高剂量 AdipoRon 组在模型组的基础上,分别给予 100 mg/kg、200 mg/kg AdipoRon 灌胃。生化法检测血清谷草转氨酶 (AST) 和丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 活性。HE 染色、Masson 染色及天狼猩红染色观察小鼠肝组织病理学变化。Western blot 法检测小鼠肝组织胶原蛋白 I (Collagen I)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、基质金属蛋白酶-1 (MMP-1) 及基质金属蛋白酶组织抑制剂-1 (TIMP-1) 蛋白的表达水平。油红 O 染色观察小鼠肝脏脂肪沉积情况。免疫荧光检测肝内巨噬细胞标志物 CD68 + 诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) + 标记的 M1 型巨噬细胞所占百分比 (%)。RT-qPCR 检测小鼠肝组织中脂质合成相关基因脂肪酸合成酶 (Fasn)、硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 (Scd1)、白细胞分化抗原 36 (Cd36)、脂质分解基因过氧化物酶体增殖物激活受体 α (Ppar α) 和肉碱棕榈酰转移酶 1 α (Cpt1 α) 的表达,以及 M1 型巨噬细胞相关基因白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 与 M2 型巨噬细胞相关基因精氨酸酶 1 (Arg1)、巨噬细胞选择性活化标志物 (Ym-1) 的表达。**结果** 与模型组比较,低、高剂量 AdipoRon 组小鼠血清中 ALT、AST 活力显著降低 ($P < 0.05$);肝组织结构受损、肝细胞变性炎症细胞浸润情况均得到改善,胶原纤维沉积也明显减少;肝组织中 Collagen I、 α -SMA 和 TIMP-1 蛋白相对表达量显著下调 ($P < 0.05$),MMP-1 蛋白相对表达量显著上调 ($P < 0.05$);肝内脂肪沉积明显减少;Fasn、Scd1、Cd36 mRNA 相对表达量显著下调 ($P < 0.05$),Ppar α 和 Cpt1 α mRNA 相对表达量显著上调 ($P < 0.05$),CD68 + iNOS + 标记的 M1 型巨噬细胞比例显著减少 ($P < 0.05$),IL-6 和 TNF- α mRNA 相对表达量显著下调 ($P < 0.05$),Arg1 和 Ym-1 mRNA 相对表达量显著上调 ($P < 0.05$)。此外,高剂量 AdipoRon 组对各指标的改善效果要优于低剂量 AdipoRon 组 ($P < 0.05$)。**结论** AdipoRon 具有改善 CCl₄-诱导的肝纤维化小鼠的脂质代谢紊乱,抑制肝内巨噬细胞向 M1 型极化,从而改善肝纤维化的作用。

关键词 肝纤维化;脂联素受体激动剂 AdipoRon;肝脏功能;脂质代谢;巨噬细胞极化;CCl₄-诱导的肝纤维化小鼠模型

中图分类号 R 33;R 364.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)04-0656-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.04.010

肝纤维化是一个严重的全球疾病负担,其特征是肝脏中细胞外基质的过度沉积和肝脏结构紊乱,最终导致肝硬化、肝细胞肝癌等终末期肝病^[1]。造成肝纤维化的病因诸多,如病毒性肝炎、酒精肝、脂肪肝和自身免疫性疾病等。脂质代谢紊乱是肝纤维化的重要标志之一^[2]。因此,改善脂质代谢紊乱或许是一个有效的抗肝纤维化的治疗策略。

肝巨噬细胞由肝脏驻留 Kupffer 细胞和募集的单核细胞来源巨噬细胞组成,是调节肝脏炎症反应的关键介质。另外,肝巨噬细胞的积累和表型极化

是肝纤维化患者疾病进展的标志性特征^[3]。脂联素是一种由脂肪细胞分泌的激素,通过脂联素受体 1 (adiponectin receptor 1, AdipoR1) 信号传导机制参与糖尿病、高血压、冠心病、代谢综合征等多种疾病的病理生理过程^[4]。脂联素受体激动剂 AdipoRon 是脂联素的类似物,具有激活 AdipoR1 和抗炎、抗脂质毒性的作用^[5]。但目前对 AdipoRon 是否具有拮抗肝纤维化中脂质代谢异常和巨噬细胞表型极化的作用尚不清楚。该研究拟通过建立 CCl₄ 诱导的肝纤维化小鼠模型,探讨和进一步明确 AdipoRon 对抗肝纤维化的治疗机制,为其应用于临床提供动物实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雄性 C57BL/6 小鼠由新疆医科

2024-12-09 接收

基金项目:新疆维吾尔自治区科技支疆项目(编号:2022E02044)

作者简介:王海昆,男,主治医师;

席利力,男,副主任医师,硕士,通信作者, E-mail:

630434374@qq.com

大学实验动物中心提供,6~8 周龄,体质量 18~23 g,饲养在 SPF 级环境中,环境温度为 23~25 ℃,配备 12 h/12 h 光照/黑暗循环,小鼠可自由饮食饮水。所有小鼠待饲养 1 周适应环境后进行实验。本研究动物实验均经新疆医科大学伦理委员会审核批准,伦理号为 20211015-81。

1.1.2 主要试剂 AdipoRon 和 CCl_4 购自美国 Sigma 公司,谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) 和丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 活性检测试剂盒购自上海江莱生物科技有限公司,HE 染色试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,Masson 染色试剂盒和天狼猩红染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司,油红 O 染色试剂盒、RIPA 裂解液及 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染液购自上海碧云天生物技术股份有限公司,动物组织总 RNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技公司,反转录和荧光定量检测试剂盒购自日本 Takara 公司,胶原蛋白 I (Collagen I)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA)、基质金属蛋白酶-1 (matrix metalloproteinase-1, MMP-1)、基质金属蛋白酶组织抑制剂-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases-1, TIMP-1)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、巨噬细胞标志物 CD68、诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 等抗体购自英国 Abcam 公司,辣根过氧化物酶偶联的抗体和异硫氰酸荧光素偶联的抗体购自美国 Proteintech 公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组与处理 将 40 只小鼠按随机数表法分为对照组、模型组、低剂量 AdipoRon (L-AdipoRon) 组、高剂量 AdipoRon (H-AdipoRon) 组,共 4 组,每组 10 只。将 CCl_4 溶解在玉米油中制成溶液,将 AdipoRon 溶解在二甲基亚砷中制成溶液。模型组、L-AdipoRon 组及 H-AdipoRon 组的小鼠均腹腔注射 CCl_4 溶液,剂量为 5 ml/kg,每周 2 次,连续 5 周以诱导肝纤维化,对照组同时腹腔注射等量玉米油^[6]。诱导结束 24 h 后, L-AdipoRon 和 H-AdipoRon 组的小鼠分别按照 100 mg/kg、200 mg/kg 的剂量灌胃 AdipoRon 溶液,每周 2 次,连续 2 周,对照组和模型组同时灌胃等量二甲基亚砷。

1.2.2 血清生化指标检测 末次给药 24 h 后,各组小鼠通过眼眶取血,分离血清,根据 AST、ALT 试剂盒说明书操作,检测各组血清样本中 AST 和 ALT

的活力。

1.2.3 HE 染色、Masson 染色、天狼猩红染色和油红 O 染色 采血后处死各组小鼠,摘取肝组织,将肝组织制成常规石蜡切片。分别使用 HE 染色液套装试剂盒、Masson 染色液套装试剂盒、天狼猩红染色液套装试剂盒和油红 O 染色液套装试剂盒进行染色,具体染色步骤按照说明书的指导进行。光学显微镜下镜检、拍照和进行组织病理学分析。

1.2.4 Western blot 法 称取适量小鼠肝组织,剪碎并加入 RIPA 缓冲液,裂解得到总蛋白。BCA 法测定总蛋白浓度。通过凝胶电泳分离变性后的蛋白,采用半干电转印法将 PAGE 中的总蛋白转印至 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h。将膜与稀释的 Collagen I、 α -SMA、MMP-1、TIMP-1 抗体 (1:1 000) 共置于 4 ℃ 下孵育过夜,以 GAPDH 抗体作为内参。次日,加入相应偶联的二抗 (1:5 000),室温下继续与膜共孵育 1 h,避光显影。Image J 软件分析各泳道的蛋白条带灰度值。

1.2.5 RT-qPCR 实验 称取适量小鼠肝组织,根据说明书用 TRIzol 法提取总 RNA。按照反转录试剂盒操作,将 RNA 通过逆转录合成 cDNA。配置好 RT-qPCR 反应体系,设置扩增条件:95 ℃ 变性 10 min;进入循环 95 ℃ 变性 20 s、60 ℃ 退火 20 s、72 ℃ 延伸 15 s,交替循环 40 次。以 β -actin 作为内参基因,根据各组 CT 值,采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算各组目的基因的 mRNA 表达水平。通过 Premier 5.0 软件设计引物,序列见表 1。

1.2.6 免疫荧光 取制备的肝组织冰冻切片,微波炉高温加热进行抗原修复 10 min。加入 0.3% TritonX-100 孵育 10 min,加入 5% 山羊血清室温封闭 1 h。将稀释的 CD68 抗体 (1:200) 与 iNOS 抗体 (1:200) 滴在切片上进行标记,4 ℃ 下孵育过夜。次日,加入荧光标记的二抗 (1:500),室温下避光孵育 1 h。DAPI 复染,抗荧光淬灭封片剂。荧光显微镜下观察肝组织荧光染色情况并拍照,计数 CD68 + iNOS + 阳性细胞数目,即 M1 型巨噬细胞,统计 CD68 + iNOS + 阳性细胞所占百分比 (%)。CD68 + iNOS + 阳性细胞所占百分比 (%) = CD68 + iNOS + 阳性细胞数目/总细胞数目 $\times$ 100%。

1.3 统计学处理 应用 GraphPad v8 软件进行统计学分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析进行多组数据差异比较,事后 Turkey's 检验进行组间两两差异比较。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

表 1 RT-qPCR 引物序列
Tab. 1 Sequences of RT-qPCR primers

Gene	Primer sequences(5'-3')
Fatty acid synthase(Fasn)	F:GGAGGTGGTGATAGCCGCTAT R:TGGGTAATCCATAGAGCCAG
Stearoyl-coa desaturase-1(Scd1)	F:TCATAATTCCGACGTGGCT R:CCCAGAAATACCAGGCACAA
Cluster of differentiation 36(Cd36)	F:GACTGGGACCATGTGTGATGA R:AAGGCCATCTCTACCATGCC
Peroxisome-proliferator-activated receptor α(Pparα)	F:AGAGCCCCATCTGCTCTCTC R:ACTGGTAGTCTGCAAAACCAAA
Carnitinepalmityltransferase1α(Cpt1α)	F:AGGACCCTGAGGCATCTATT R:ATGACCTCTGGCATTCTCC
Interleukin-6(IL-6)	F:TAGTCCTCTACCCCAATTTC R:TGGTCCTTAGCCACTCCTTC
Tumor necrosis factor-α(TNF-α)	F:CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA R:TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC
Arginase 1(Arg1)	F:TCATGGAAAGTGAACCAACTCTTG R:TCAGTCCCTGGCTTATGTTACC
Chil3 chitinase-like 3(Ym-1)	F:GGATGGCTACTCTGGAGAAA R:AGAAGGGTCACTCAGGATAA
B-actin)	F:GCATTGCTGACAGGATGCAG R:CCTGCTTGCTGATCCACATC

2 结果

2.1 各组小鼠肝功能相关指标检测结果 与对照组比较,模型组小鼠血清中 ALT、AST 活力显著升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,低、高剂量 AdipoRon 组小鼠血清中 ALT、AST 活力显著降低 ($P < 0.05$);与低剂量 AdipoRon 组比较,高剂量 AdipoRon 组小鼠血清中 ALT、AST 活力进一步降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.2 各组小鼠肝组织病理学变化比较 对照组小鼠肝组织结构清晰完整,肝细胞形态与大小均匀,未见明显病变。模型组小鼠肝组织中肝小叶结构受损,肝细胞变性且排列紊乱,有明显的炎症细胞浸润。与模型组比较,低、高剂量 AdipoRon 组小鼠肝组织结构受损、肝细胞变性炎症细胞浸润情况均

表 2 各组小鼠血清 ALT 与 AST 水平测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Tab. 2 Results of serum ALT and AST levels in
each group of mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Groups	ALT (U/L)	AST (U/L)
Control	92.6 ± 3.5	47.2 ± 2.1
Model	327.4 ± 8.2 *	258.3 ± 11.2 *
L-AdipoRon	263.1 ± 5.3 *#	187.6 ± 7.4 *#
H-AdipoRon	157.6 ± 4.8 *#&	88.7 ± 2.6 *#&
F value	3 382.0	1 908.0
P value	<0.000 1	<0.000 1

* $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs Model group; & $P < 0.05$ vs L-AdipoRon group.

得到改善,且高剂量 AdipoRon 组的病理改善结果更佳。见图 1。

此外,与对照组比较,模型组小鼠肝汇管区及小叶间有大量胶原纤维沉积。与模型组比较,低、高剂量 AdipoRon 组小鼠肝汇管区及小叶间的胶原纤维沉积明显减少,且高剂量 AdipoRon 组未见明显的胶原纤维沉积现象。见图 2。

2.3 各组小鼠肝组织中纤维化相关蛋白表达比较

与对照组比较,模型组小鼠肝组织中 Collagen I、α-SMA 和 TIMP-1 蛋白相对表达量显著上调 ($P < 0.05$), MMP-1 蛋白相对表达量显著下调 ($P < 0.05$)。与模型组比较,低、高剂量 AdipoRon 组肝组织中 Collagen I、α-SMA 和 TIMP-1 蛋白相对表达量显著下调 ($P < 0.05$), MMP-1 蛋白相对表达量显著上调 ($P < 0.05$)。此外,高剂量 AdipoRon 组肝组织中 Collagen I、α-SMA 和 TIMP-1 蛋白相对表达量显著高于低剂量 AdipoRon 组 ($P < 0.05$),且 MMP-1 蛋白相对表达量显著低于低剂量 AdipoRon 组 ($P < 0.05$)。见图 3 和表 3。

2.4 各组小鼠肝脏脂滴沉积情况比较

与对照组比较,模型组小鼠肝内可见明显的脂滴沉积;与模型组比较,低、高剂量 AdipoRon 组肝内脂滴沉积明显减少,且高剂量 AdipoRon 组还要少于低剂量 AdipoRon 组。见图 4。

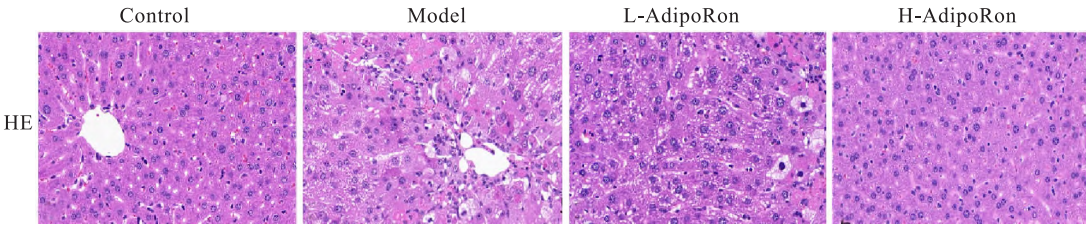


图 1 各组小鼠肝组织病理学观察 HE × 200

Fig. 1 Histopathological analysis of mice liver in each group HE × 200

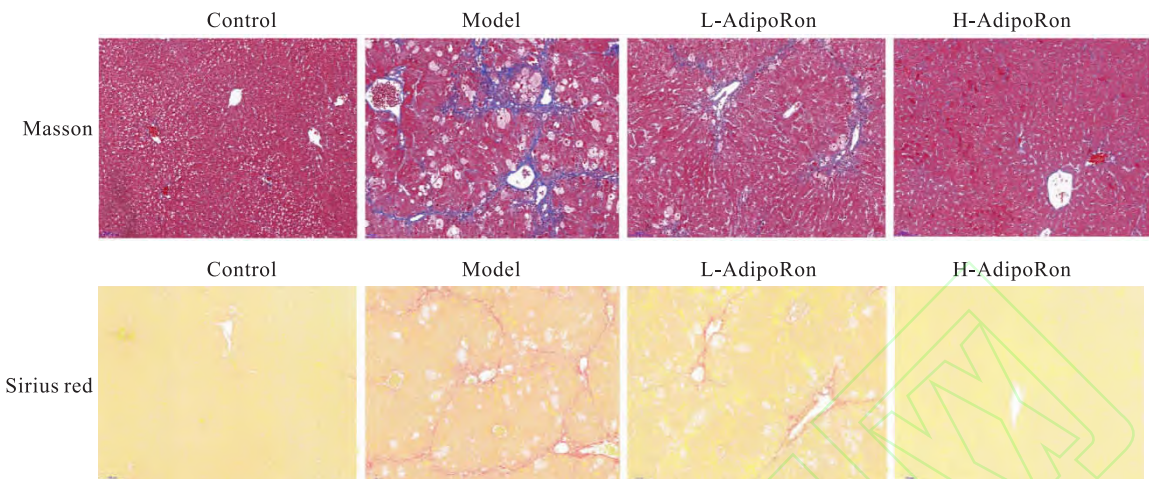


图2 各组小鼠肾组织纤维化程度染色 ×100

Fig. 2 Staining of the renal tissues fibrosis in each group of mice ×100

Upper line: Masson staining; Lower line: Sirius red staining.

表3 各组小鼠肝组织 Collagen I、α-SMA、MMP-1 及 TIMP-1 蛋白相对表达水平测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 3 Determination of relative protein expression levels of Collagen I, α-SMA, MMP-1 and TIMP-1 in mice liver tissues of each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Groups	Collagen I	α-SMA	MMP-1	TIMP-1
Control	0.72 ± 0.07	0.22 ± 0.03	1.23 ± 0.11	0.36 ± 0.02
Model	1.44 ± 0.10 *	1.14 ± 0.06 *	0.33 ± 0.04 *	1.27 ± 0.13 *
L-AdipoRon	1.02 ± 0.08 *#	0.82 ± 0.05 *#	0.46 ± 0.03 *#	1.04 ± 0.10 *
H-AdipoRon	0.70 ± 0.06 ^{#&}	0.47 ± 0.04 ^{*#&}	0.91 ± 0.07 ^{*#&}	0.46 ± 0.05 ^{#&}
F value	192.1	753.0	352.3	262.4
P value	< 0.000 1	< 0.000 1	< 0.000 1	< 0.000 1

* $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs Model group; & $P < 0.05$ vs L-AdipoRon group.

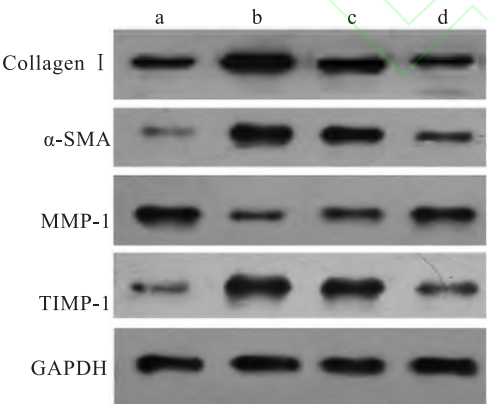


图3 各组小鼠肝组织 Collagen I、α-SMA、MMP-1 及 TIMP-1 蛋白表达

Fig. 3 Protein expression levels of Collagen I, α-SMA, MMP-1 and TIMP-1 in mice liver tissues of each group

a: Control group; b: Model group; c: L-AdipoRon group; d: H-AdipoRon group.

2.5 各组小鼠脂质代谢相关基因表达比较 与对照组比较,模型组小鼠肝组织中 Fasn、Scd1、Cd36

mRNA 相对表达量显著上调 ($P < 0.05$), Pparα 和 Cpt1α mRNA 相对表达量显著下调 ($P < 0.05$)。与模型组比较,低、高剂量 AdipoRon 组肝组织中 Fasn、Scd1、Cd36 mRNA 相对表达量均显著下调 ($P < 0.05$),且 Pparα 和 Cpt1α mRNA 相对表达量显著上调 ($P < 0.05$)。与低剂量 AdipoRon 组比较,高剂量 AdipoRon 组肝组织中 Fasn、Scd1、Cd36 mRNA 相对表达量显著下调 ($P < 0.05$),Pparα 和 Cpt1α mRNA 相对表达量显著上调 ($P < 0.05$)。见表4。

2.6 各组小鼠肝内 M1 型巨噬细胞分布情况比较

与对照组比较,模型组小鼠肝内由 CD68 + iNOS + 标记的 M1 型巨噬细胞比例显著增加 ($P < 0.05$)。与模型组比较,低、高剂量 AdipoRon 组小鼠肝内由 CD68 + iNOS + 标记的 M1 型巨噬细胞比例显著减少 ($P < 0.05$)。此外,高剂量 AdipoRon 组小鼠肝内由 CD68 + iNOS + 标记的 M1 型巨噬细胞比例要显著少于低剂量 AdipoRon 组 ($P < 0.05$)。见图5和表5。

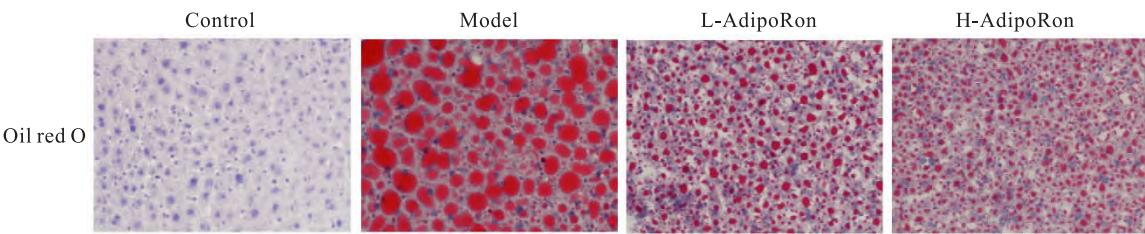


图4 各组小鼠肝脏脂滴沉积染色 油红 O 染色 ×200
Fig. 4 Staining of liver lipid deposition in each group of mice Oil red O staining ×200

表4 各组小鼠肝组织脂质合成基因 Fasn、Scd1、Cd36 与降解基因 Pparα、Cpt1α 相对表达水平测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 4 Relative expression levels of lipid synthesis genes Fasn, Scd1, Cd36 and lipid degradation genes Pparα and Cpt1α in liver tissues of each group of mice($\bar{x} \pm s, n = 10$)					
Groups	Fasn	Scd1	Cd36	Pparα	Cpt1α
Control	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.13
Model	3.27 ± 0.21 *	2.93 ± 0.18 *	2.75 ± 0.16 *	0.27 ± 0.04 *	0.42 ± 0.05 *
L-AdipoRon	2.63 ± 0.18 *#	2.06 ± 0.14 *#	2.18 ± 0.12 *#	0.51 ± 0.06 *#	0.56 ± 0.07 *#
H-AdipoRon	1.44 ± 0.07 *#&	1.35 ± 0.11 *#&	1.27 ± 0.13 *#&	0.82 ± 0.08 *#&	0.74 ± 0.04 *#&
F value	516.8	403.0	414.5	177.4	96.8
P value	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1

* $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs Model group; & $P < 0.05$ vs L-AdipoRon group.

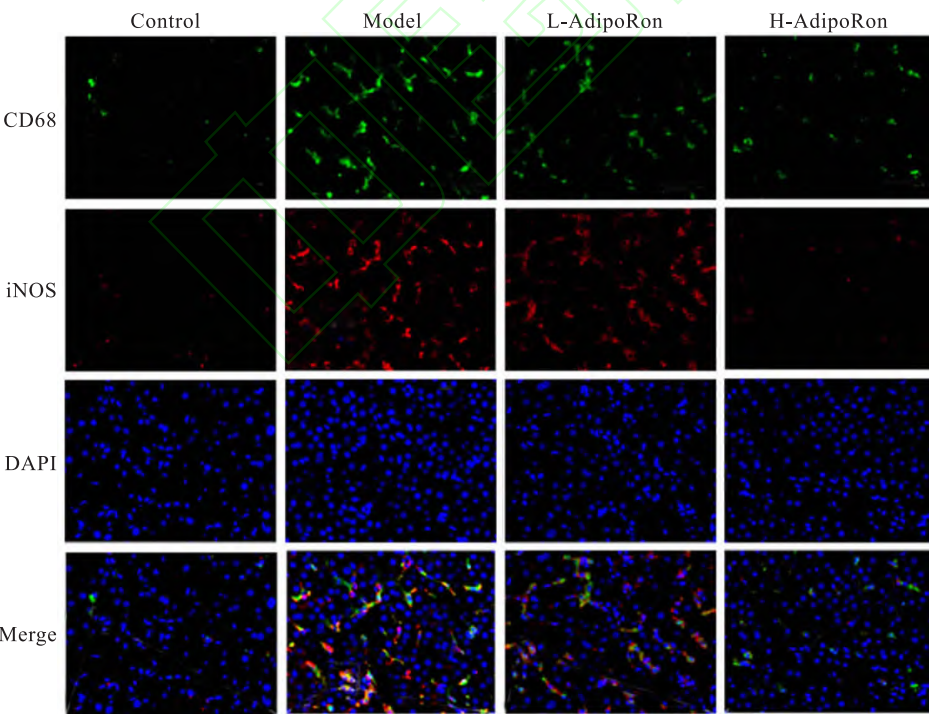


图5 各组小鼠肝内 CD68 + iNOS + 标记的 M1 型巨噬细胞染色 免疫荧光染色 ×100
Fig. 5 CD68 + iNOS + labeled M1-subtype macrophage staining in liver tissues of each group of mice Immunofluorescent staining ×100

2.7 各组小鼠肝内巨噬细胞表型相关基因表达变化 与对照组比较,模型组小鼠肝组织中 M1 型巨噬细胞相关基因 IL-6 和 TNF-α mRNA 相对表达量显著上调 ($P < 0.05$), M2 型巨噬细胞相关基因

Arg1 和 Ym-1 mRNA 相对表达量显著下调 ($P < 0.05$)。与模型组比较,低、高剂量 AdipoRon 组肝组织中 M1 型巨噬细胞相关基因 IL-6 和 TNF-α mRNA 相对表达量均显著下调 ($P < 0.05$), M2 型巨噬细

表 5 各组小鼠肝内 CD68 + iNOS + 标记的 M1 型巨噬细胞所占百分比($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 5 The percentage of CD68 + iNOS + labeled M1-subtype macrophage in liver tissues of each group of mice($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Groups	The percentage of CD68 + and iNOS + positive cells (%)
Control	11.2 ± 1.4
Model	40.6 ± 4.8 *
L-AdipoRon	28.2 ± 2.4 * #
H-AdipoRon	16.8 ± 1.6 * # &
F value	203.6
P value	<0.000 1

* P < 0.05 vs Control group; # P < 0.05 vs Model group; & P < 0.05 vs L-AdipoRon group.

表 6 各组小鼠肾组织 M1/M2 型巨噬细胞相关基因表达测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 6 Determination of relative expression levels of M1/M2 macrophage related gene in renal tissues of each group of mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Groups	IL-6	TNF- α	Arg1	Ym-1
Control	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.06
Model	2.87 ± 0.24 *	3.26 ± 0.28 *	0.32 ± 0.04 *	0.48 ± 0.05 *
L-AdipoRon	2.22 ± 0.16 * #	2.78 ± 0.22 * #	0.54 ± 0.06 * #	0.62 ± 0.04 * #
H-AdipoRon	1.56 ± 0.12 * # &	1.72 ± 0.17 * # &	0.88 ± 0.05 * # &	0.76 ± 0.10 * # &
F value	256.0	257.5	196.3	111.1
P value	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1

* P < 0.05 vs Control group; # P < 0.05 vs Model group; & P < 0.05 vs L-AdipoRon group.

外基质沉积增加,促进肝纤维化的发展^[7]。MMP 是参与细胞外基质重塑的蛋白水解酶家族,能够降解胶原蛋白,而 TIMP-1 是 MMP-1 的主要抑制物,能调节 MMP-1 活性,在细胞外基质合成和降解的平衡中起着重要作用^[8]。在本实验中,经过 CCl₄ 诱导的小鼠血清中肝功能损伤指标 ALT 和 AST 活力升高,肝组织结构受损,可见大量胶原纤维沉积,肝组织中 Collagen I、 α -SMA 和 TIMP-1 蛋白表达上调,MMP-1 蛋白表达下调。以上结果均表明肝纤维化小鼠模型构建成功。

目前,关于 AdipoRon 能够抑制组织纤维化已有报道。例如,AdipoRon 通过促进自噬改善脱氧皮质酮醋酸酯盐诱导的急性盐敏感性高血压小鼠模型的肾纤维化^[9]。在新西兰白兔关节纤维化模型中,AdipoRon 治疗不仅能够改善纤维化现象,而且无不良反应,安全性较好^[10]。本研究结果显示,AdipoRon 能够降低肝纤维化小鼠血清中 ALT、AST 活性,改善肝组织结构损伤、肝细胞变性炎症细胞浸润等病理现象,减少胶原纤维沉积,并抑制肝组织中 Collagen I、 α -SMA 和 TIMP-1 蛋白的表达,提高 MMP-1 蛋白的表达。结果显示,AdipoRon 能够改善 CCl₄ 诱导的肝纤维化,对肝脏发挥保护作用。

胞相关基因 Arg1 和 Ym-1 mRNA 相对表达量均显著上调 ($P < 0.05$)。同时,与低剂量 AdipoRon 组比较,高剂量 AdipoRon 组肝组织中 M1 型巨噬细胞相关基因 IL-6 和 TNF- α mRNA 相对表达量显著下调 ($P < 0.05$),M2 型巨噬细胞相关基因 Arg1 和 Ym-1 mRNA 相对表达量显著上调 ($P < 0.05$)。见表 6。

3 讨论

在肝纤维化过程中,持续的肝细胞损伤和炎症反应会激活肝星状细胞,使其过度产生胶原蛋白,合成大量细胞外基质并高表达 α -SMA,从而导致细胞

肝脏在调节脂肪生成、吸收、消化、分解与运输过程中都具有重要作用。当肝细胞中脂质积累过多时会发生肝脂肪变性,导致脂质代谢紊乱,引起大量肝细胞死亡,从而引发促炎和促纤维化反应,增加患肝硬化的风险^[11]。研究^[12]表明,AdipoRon 通过促进自噬缓解非酯化脂肪酸诱导的牛肝细胞中脂质积累和线粒体功能障碍。此外,在射血分数保留的心力衰竭小鼠模型中,AdipoRon 能够促进心肌细胞内脂肪酸氧化,抑制心肌纤维化^[13]。本实验结果显示,AdipoRon 治疗的肝纤维化小鼠肝内脂滴沉积减少,肝组织中脂质合成基因 Fasn、Scd1、Cd36 表达上调,且脂质分解基因 Ppar α 和 Cpt1 α 表达上调,CCl₄-诱导的肝纤维化小鼠模型肝细胞脂质代谢紊乱得到缓解。由此推测,AdipoRon 可能通过调节脂质代谢趋于稳态改善肝纤维化。

肝细胞中脂质沉积诱导的脂毒性损伤会促进肝内释放损伤相关分子模式,激活先天性和适应性免疫细胞,包括巨噬细胞、树突状细胞、淋巴细胞和中性粒细胞等,引起肝脏慢性炎症及纤维化^[14]。其中,肝内巨噬细胞被认为是肝脏炎症的关键免疫细胞,主导肝纤维化的进展或逆转过程^[15]。巨噬细胞具有明显的异质性和可塑性,可以根据肝内微环境

的改变而发生表型转换。巨噬细胞一般分为经典活化的促炎 M1 表型和替代活化的抗炎 M2 表型。巨噬细胞向 M1 型极化后, IL-6、TNF- α 等促炎细胞因子基因表达上调。肝损伤发生后, 肝组织中活化的 M1 型巨噬细胞增加, 并通过释放促炎细胞因子对肝实质细胞造成直接损伤, 增强炎症免疫细胞浸润, 并促进肝纤维化。M2 型巨噬细胞抑制炎症反应并参与组织修复, 其高表达 Arg1 和 Ym-1 在肝纤维化中发挥保护作用^[16]。在本研究中, 经 AdipoRon 治疗的小鼠模型肝内 M1 型巨噬细胞比例减少, M1 型巨噬细胞相关基因 IL-6、TNF- α 表达下调, 且 M2 型巨噬细胞相关基因 Arg1、Ym-1 表达上调。以上结果表明, AdipoRon 能够减少肝内 M1 型巨噬细胞、促进其向 M2 型巨噬细胞极化和浸润, 发挥抗肝纤维化作用。

综上所述, AdipoRon 可有效改善 CCl₄ 诱导的肝纤维化小鼠模型肝脏脂质代谢紊乱, 减轻肝组织胶原纤维沉积及病理损伤, 抑制肝内 M1 型巨噬细胞并促进其向 M2 型极化, 改善小鼠肝组织纤维化。本研究为 AdipoRon 运用于肝纤维化的治疗提供了动物实验依据。

参考文献

- [1] Pei Q, Yi Q, Tang L. Liver fibrosis resolution: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(11): 9671. doi:10.3390/ijms24119671.
- [2] Peiseler M, Schwabe R, Hampe J, et al. Immune mechanisms linking metabolic injury to inflammation and fibrosis in fatty liver disease - novel insights into cellular communication circuits[J]. *J Hepatol*, 2022, 77(4): 1136 - 60. doi:10.1016/j.jhep.2022.06.012.
- [3] Wang Z, Du K, Jin N, et al. Macrophage in liver fibrosis: identities and mechanisms[J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 120: 110357. doi:10.1016/j.intimp.2023.110357.
- [4] 贺思思, 孙鸿妍, 张晓天, 等. 脂联素检测在 2 型糖尿病诊治中的研究进展[J]. *中国实验诊断学*, 2023, 27(11): 1374 - 7. doi:10.3969/j.issn.1007-4287.2023.11.027.
- [4] He S S, Sun H Y, Zhang X T, et al. Detection of adiponectin in the diagnosis and treatment of type 2 diabetes mellitus[J]. *China Experimental Diagnostics*, 2023, 27(11): 1374 - 7. doi:10.3969/j.issn.1007-4287.2023.11.027.
- [5] Nicolas S, Rochet N, Gautier N, et al. The adiponectin receptor agonist AdipoRon normalizes glucose metabolism and prevents obesity but not growth retardation induced by glucocorticoids in young mice[J]. *Metabolism*, 2020, 103: 154027. doi:10.1016/j.metabol.2019.154027.
- [6] 孙竟然, 卢秉久, 郑佳连, 等. 四氯化碳诱导 C57BL/6J 小鼠肝纤维化模型建立方法及优化[J]. *中国实验动物学报*, 2024, 32(6): 743 - 52.
- [6] Sun J R, Lu B J, Zheng J L, et al. Establishment and optimization of C57BL/6J mouse liver fibrosis model induced by carbon tetrachloride[J]. *Acta Lab Animalis Sci Sin*, 2024, 32(6): 743 - 52.
- [7] Zhang M, Serna-Salas S, Damba T, et al. Hepatic stellate cell senescence in liver fibrosis: characteristics, mechanisms and perspectives[J]. *Mech Ageing Dev*, 2021, 199: 111572. doi:10.1016/j.mad.2021.111572.
- [8] Hieu V N, Thuy L T T, Hai H, et al. Capacity of extracellular globins to reduce liver fibrosis *via* scavenging reactive oxygen species and promoting MMP-1 secretion[J]. *Redox Biol*, 2022, 52: 102286. doi:10.1016/j.redox.2022.102286.
- [9] Li Y, Song B, Ruan C, et al. AdipoRon attenuates hypertension-induced epithelial-mesenchymal transition and renal fibrosis *via* promoting epithelial autophagy[J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2021, 14(3): 538 - 45. doi:10.1007/s12265-020-10075-8.
- [10] Salmons H I, Gow C, Limberg A K, et al. The safety of adiponectin receptor agonist AdipoRon in a rabbit model of arthrofibrosis[J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2023, 29(4): 154 - 9. doi:10.1089/ten.TEC.2023.0008.
- [11] Feng S, Sun Z, Jia X, et al. Lipophagy: molecular mechanisms and implications in hepatic lipid metabolism[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2023, 28(1): 6. doi:10.31083/j.fbl2801006.
- [12] Zhao C, Wu B, Li J, et al. AdipoRon alleviates fatty acid-induced lipid accumulation and mitochondrial dysfunction in bovine hepatocytes by promoting autophagy[J]. *J Dairy Sci*, 2023, 106(8): 5763 - 74. doi:10.3168/jds.2022-22723.
- [13] Tan W, Wang Y, Cheng S, et al. AdipoRon ameliorates the progression of heart failure with preserved ejection fraction *via* mitigating lipid accumulation and fibrosis[J]. *J Adv Res*, 2025, 68: 299 - 315. doi:10.1016/j.jare.2024.02.015.
- [14] Yan J, Horng T. Lipid metabolism in regulation of macrophage functions[J]. *Trends Cell Biol*, 2020, 30(12): 979 - 89. doi:10.1016/j.tcb.2020.09.006.
- [15] 江 静, 李 虎, 彭宗根. 肝内巨噬细胞在肝纤维化发展中的双重作用及其靶向治疗研究进展[J]. *中国药理学杂志*, 2021, 56(23): 1869 - 73. doi:10.11669/cpj.2021.23.001.
- [15] Jiang J, Li H, Peng Z G. Recent progress in study on the progressive and regressive roles of liver macrophage in hepatic fibrosis and its targeted drugs[J]. *Chin Pharm J*, 2021, 56(23): 1869 - 73. doi:10.11669/cpj.2021.23.001.
- [16] Kaps L, Huppertsberg A, Choteschovsky N, et al. pH-degradable, bisphosphonate-loaded nanogels attenuate liver fibrosis by repolarization of M2-type macrophages[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119(12): e2122310119. doi:10.1073/pnas.2122310119.

AdipoRon improves fibrosis liver function by regulating lipid metabolisms and remodeling macrophages polarization

Wang Haikun, Yao Ping, Yang Tao, Xi Lili

(Dept of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054)

Abstract Objective To investigate the role of AdipoRon, an adiponectin receptor agonist, in treatment of carbon tetrachloride (CCl_4) induced liver fibrosis mice model and the mechanisms. **Methods** Forty mice were randomly divided into control group, model group, L- AdipoRon group and H-AdipoRon group, with 10 mice in each group. Hepatic fibrosis was induced by intraperitoneal injection of CCl_4 solution. The mice in L- and H-AdipoRon groups were given 100 mg/kg and 200 mg/kg AdipoRon by gavage, respectively. The activities of serum aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were detected by biochemical method. Liver histopathological changes and fibrosis were detected by HE staining, Masson staining and Sirius scarlet stain. The protein expression levels of Collagen I, α -smooth muscle actin (α -SMA), matrix metalloproteinase 1 (MMP-1) and matrix metalloproteinase inhibitor 1 (TIMP-1) in mice liver were detected by Western blot. Lipid deposition in liver were detected by oil red O staining. The percentage (%) of CD68 + iNOS + positive M1-type macrophages in the liver were detected by immunofluorescence. The expression levels of fatty acid synthetase (Fasn), stearoyl-CoA desaturase 1 (Scd1), fatty acid transporter (Cd36), peroxisome proliferator activated receptor- α (Ppar α) and carnitine palmitoyl transferase 1 α (Cpt1 α) in mice liver tissues, as well as M1 macrophage-related genes interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) and M2 macrophage-related genes arginase 1 (Arg1), Chil3 chitinase-like 3 (Ym-1) were detected by RT-qPCR assay. **Results** Compared with model group, in low-dose AdipoRon group and high-dose AdipoRon group, serum ALT and AST activities significantly decreased ($P < 0.05$); liver tissues structure were damaged, liver cells degeneration and inflammatory cells infiltration were improved; collagen fiber deposition was also significantly reduced; the relative expression levels of Collagen I, α -SMA and TIMP-1 proteins were significantly down-regulated ($P < 0.05$), while the relative expression levels of MMP-1 protein were significantly up-regulated ($P < 0.05$); the lipid droplets deposition in livers were significantly reduced. The relative Fasn, Scd1 and Cd36 mRNA expression levels in liver tissues were significantly down-regulated ($P < 0.05$), and the relative Ppar α and Cpt1 α mRNA expression levels were significantly up-regulated ($P < 0.05$); the percentage (%) of CD68 + iNOS + positive M1-type macrophages significantly decreased ($P < 0.05$); the relative IL-6 and TNF- α mRNA expression levels significantly decreased ($P < 0.05$), the relative Arg1 and Ym-1 mRNA expression levels were significantly up-regulated ($P < 0.05$). In addition, the improvement effects of high-dose AdipoRon group were better than those of low-dose AdipoRon group ($P < 0.05$). **Conclusion** AdipoRon can improve the disorder of lipid metabolisms, inhibit the M1 type macrophages polarization, and improve the liver fibrosis in CCl_4 -induced liver fibrosis mice model.

Key words liver fibrosis; adiponectin receptor agonist AdipoRon; liver function; lipid metabolism; macrophage polarization; CCl_4 -induced liver fibrosis mouse model

Fund program Xinjiang Uyghur Autonomous Region Science and Technology Aid Project (No. 2022E02044)

Corresponding author Xi Lili, E-mail:630434374@qq.com