

穿心莲内酯拮抗雌激素相关受体 α 活性影响小肠脂质分泌的作用机制

李利^{1,2} 高军² 王紫辉^{2,3} 张敏仪² 吴尚英² 姚冬生^{1*} 管敏^{2*}

(¹暨南大学生物医药研究院, 广州 510632; ²中国科学院深圳先进技术研究院, 深圳 518055; ³中国科学院大学, 北京 100049)

摘要 该文旨在研究雌激素相关受体 α (estrogen-related receptor α , ERR α 或ESRRA)拮抗剂穿心莲内酯(andrographolide, AP)对小肠脂质分泌功能的影响及其作用机制。采用荧光素酶报告基因系统探究AP对ERR α 及其共激活因子过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1 α (peroxisome proliferator-activated receptor coactivator 1 α , PGC1 α)转录活性的影响。运用启动子报告基因系统、实时荧光定量PCR和Western blot方法研究AP对ERR α 下游靶基因载脂蛋白B(apolipoprotein B, *ApoB*)和微粒体甘油三酯转移蛋白(microsomal triglyceride transfer protein, *Mttp*)表达的抑制作用。通过脂滴荧光染色和甘油三酯(triglyceride, TG)定量实验分别检测AP处理后胞内的脂滴含量和胞内外TG含量。餐后甘油三酯应答实验、小肠油红O染色和TG定量分析研究AP对小鼠小肠脂质分泌的影响。结果显示, AP下调ERR α /PGC1 α 的转录活性, 并影响ERR α /PGC1 α 对*ApoB*和*Mttp*启动子的转录调控作用; AP下调ERR α 下游靶基因*ApoB*和*Mttp*的表达; AP处理后胞内脂滴含量增多, 胞外TG含量减少; AP抑制小肠中脂质的分泌。结果证明, AP作为ERR α 拮抗剂, 下调ERR α /PGC1 α 介导的脂质分泌关键基因的转录, 抑制小肠脂质的分泌, 并降低小鼠血清中TG水平。

关键词 穿心莲内酯; 雌激素相关受体 α ; 转录活性; 脂质分泌

Andrographolide Inhibits Intestinal Lipid Secretion via Antagonizing Estrogen-Related Receptor α Activity

LI Li^{1,2}, GAO Jun², WANG Zihui^{2,3}, ZHANG Minyi², WU Shangying², YAO Dongsheng^{1*}, GUAN Min^{2*}

(¹Institute of Biomedicine, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

²Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China;

³University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract The aim of this study is to investigate the effect and mechanism of AP (andrographolide), an ERR α (estrogen-related receptor α , also called ESRRA) inverse agonist, on lipid secretion of small intestine. Luciferase reporter assay was employed to identify whether AP decreases transcriptional activity of ERR α and its coactivator PGC1 α (peroxisome proliferator-activated receptor coactivator 1 α). To determine if AP suppresses the promoter activity and gene expression of ERR α target genes *ApoB* (apolipoprotein B) and *Mttp* (microsomal

收稿日期: 2023-02-28 接受日期: 2023-06-05

国家重点研发计划(批准号: 2018YFA0703100)、国家自然科学基金(批准号: 82072493、82000739、81570532)、广东省基础与应用基础研究基金(批准号: 2022A1515010528、2019A1515110128)和深圳市科技研究资助计划(批准号: JCYJ20210324101800002)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0755-86585232, E-mail: tdsyao@jnu.edu.cn; min.guan@siat.ac.cn

Received: February 28, 2023 Accepted: June 5, 2023

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (Grant No.2018YFA0703100), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82072493, 82000739, 81570532), Guangdong Basic and Applied Basic Research Foundation (Grant No.2022A1515010528, 2019A1515110128), and Shenzhen Science and Technology Research Funding (Grant No.JCYJ20210324101800002)

*Corresponding authors. Tel: +86-755-86585232, E-mail: tdsyao@jnu.edu.cn; min.guan@siat.ac.cn

triglyceride transfer protein), promoter reporter activity, real-time quantitative PCR and Western blot were used. The intracellular lipid droplet content and TG content were determined by fluorescent staining of lipid droplets and TG (triglyceride) quantification experiments, respectively. Postprandial triglyceride response experiments, oil red O staining of small intestine and TG content determination were performed to study the effect of AP on lipid secretion in the small intestine of mice. The results showed that AP decreased promoter expression and mRNA levels of *Apob* and *Mttp* via interfering with transcriptional activity of $ERR\alpha/PGC1\alpha$. Furthermore, AP increased intracellular lipid droplets, reduced extracellular TG content and blood TG level indicating reduction of lipids secretion in Caco-2 and small intestine. This finding demonstrated that AP, as an $ERR\alpha$ inverse agonist, inhibited intestinal lipid secretion and decreased serum TG levels through downregulating the transcriptional expression of *Apob* and *Mttp*.

Keywords andrographolide; $ERR\alpha$; transcriptional activity; lipid secretion

随着经济发展和生活水平提高, 失节制饮食和高蛋白高脂肪饮食结构使越来越多的人患上高甘油三酯血症。高甘油三酯血症常伴随着多种代谢疾病, 如肥胖、胰岛素抵抗、糖尿病和胰腺炎等; 此外, 高甘油三酯血症引起的异位脂肪沉积, 是诱发高血压和动脉粥样硬化等心血管疾病的危险因素^[1-3]。血液中甘油三酯(triglycerides, TGs)水平与小肠对膳食脂肪的消化和吸收密切相关: 脂肪在肠道中被水解成脂质小分子产物, 这些脂质小分子被肠黏膜上皮细胞吸收后, 一部分经脂肪酸氧化为机体提供能量, 另一部分形成脂滴(lipid droplets, LDs)储存在细胞内, 但大多数脂质以脂蛋白的形式被分泌到胞外, 经淋巴系统进入血液循环系统, 到达全身各个组织和器官^[4-5]。当脂肪长期摄入过量时, 小肠分泌的脂质超过身体吸收和利用的范围, 就会引起高脂血症^[1]。

穿心莲内酯(andrographolide, AP)是中药材穿心莲的主要有效成分之一, 具有抗炎、抗病毒感染、抗心血管疾病等药理学作用^[6-7]。有文献报道, AP能够降低大小鼠高脂血症模型血液中的TG水平^[8], 也能影响肝脏的脂质代谢, 从而降低高脂饮食小鼠血液中的TG和总胆固醇水平^[9-10]。但尚无文献从AP影响小肠脂质分泌功能的角度来探讨AP降血脂的作用机制。雌激素相关受体 α (estrogen related receptor alpha, $ESRR\alpha$ 或 $ERR\alpha$, 基因ID: 2101)是核受体家族成员之一, 可调控能量代谢相关基因的表达, 它的转录活性受到辅助激活因子过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子 1α (peroxisome proliferator-activated receptor coactivator 1α , $PGC1\alpha$)和 $PGC1\beta$ 的影响^[11-13]。在骨骼肌、脂肪组织、肝脏和小肠等组织和器官

中, $ERR\alpha$ 主要通过和 $PGC1\alpha$ 的相互作用来发挥转录调控作用^[14-15], 但在破骨细胞中由于 $PGC1\alpha$ 不表达, $ERR\alpha$ 的转录活性依赖于 $PGC1\beta$ 的相互作用^[16-17]。课题组前期研究发现, AP干扰 $ERR\alpha/PGC1\beta$ 转录作用进而影响破骨细胞分化, 证明AP是 $ERR\alpha$ 的潜在拮抗剂^[16]。

前期研究中, 我们证明 $ERR\alpha$ 调控小鼠肝脏中载脂蛋白B(apolipoprotein B, *Apob*)和微粒体甘油三酯转移蛋白(microsomal triglyceride transfer protein, *Mttp*)的转录^[18], 载脂蛋白(apolipoprotein)参与小肠脂质分泌的过程, 其中ApoB作为乳糜微粒(chylomicrons)和极低密度脂蛋白(very low-density lipoprotein, VLDL)的结构蛋白参与这两种脂蛋白的形成和分泌过程^[19]。有文献报道, 小鼠小肠中*Apob*特异性敲除影响肠道脂质分泌功能^[20], *APOB*基因突变受试者的餐后血脂水平较低^[21], 这说明ApoB对于小肠脂蛋白的组装和分泌是必不可少的。除ApoB外, MTTP是另一个被明确报道参与脂质分泌过程的转运蛋白, 介导脂蛋白组装和分泌过程的脂质转运^[5], 并且能够维持ApoB蛋白的结构^[22-23]。胰腺炎是高甘油三酯血症的并发症之一, 胰腺炎患者口服MTTP拮抗剂Iomitapide后其血脂水平显著降低且症状得到有效缓解^[24]。此外, *Mttp*小肠特异性敲除使得小鼠的餐后血清TG水平显著降低^[25]。因此我们认为下调小肠中脂质分泌关键基因*Apob*和*Mttp*的表达, 能够降低血液中的TG水平, 有助于改善高甘油三酯血症。然而, 至今无文献报道 $ERR\alpha$ 是否能够通过调控小肠中*Apob*和*Mttp*的转录来参与小肠的脂质分泌过程。因此, 本研究旨在探讨AP、 $ERR\alpha$ 和小肠脂质分泌功能三者之间的联系, 证明AP能通过抑

制 *ERR α* /*PGC1 α* 的转录活性, 下调 *Apob* 和 *Mttp* 基因的表达, 从而影响小肠的脂质分泌。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 从珠海百试通生物科技有限公司购进 16 只 SPF 级的 7 周龄 C57BL/6J 雄鼠, 分三笼, 饲养于中国科学院深圳先进技术研究院实验室动物中心。小鼠饲养间为屏障环境, 室温保持 24 °C, 光暗循环每隔 12 h, 普通饲料喂养, 小鼠自由摄食和饮水。本文中相关动物实验已经通过中国科学院深圳先进技术研究院实验动物管理和使用委员会审查, 批准编号为 SIAT-IRB-170304-YY-S-GUANM-A0303。

1.1.2 细胞系 Caco-2 人结肠腺癌细胞购自深圳市豪地华拓生物科技有限公司; HEK-293T 购自中国科学院上海细胞库。

1.1.3 主要试剂和仪器 主要试剂和耗材包括: AP 购自成都瑞芬思生物科技有限公司; 橄榄油 (olive oil) 购自 Aladdin 公司; Triton WR-1339 购自 Sigma-Aldrich 公司; Compound 29 购自 ChemPartner 公司; Trizol AG RNAex Pro Reagent 购自艾科瑞生物有限公司; HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit 购自诺唯赞生物科技股份有限公司; 2 \times RealStar Fast 染料法 qPCR 预混液购自 GenStar 公司; RIPA 裂解液、4% PFA 固定液、苏木素染色液购自碧云天生物技术有限公司; β -actin 抗体、DAPI 购自 Cell Signaling Technology 公司; anti-apolipoprotein B 抗体购自 Abcam 公司; 24 孔板圆形细胞爬片购自卧宏生物科技有限公司; 油酸 (oleic acid, OA)、油红 O (oil red O) 购自 Sigma 公司; BODIPY 493/503、Lipofectamine 3000 购自 Invitrogen 公司; 甘油三酯测定试剂盒购自普利莱基因技术有限公司。

主要仪器包括: 双荧光素酶报告基因检测系统 (Promega, E1960)、冰冻切片机 (Leica, CM1950)、正置荧光显微镜 (Olympus, Olympus BX53)、实时荧光定量 PCR 系统 (Biorad, CFX96)、全自动快速研磨仪 (上海净信实业发展有限公司, JXFSTPRP-24)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 Caco-2 细胞和 HEK-293T 细胞均用含 10% 胎牛血清、1% 青/链霉素混合液的 H-DMEM 完全培养基, 于 37 °C、5% CO₂、100% 湿度的细胞

培养箱中培养。

1.2.2 小鼠餐后甘油三酯应答实验 7 周龄 C57BL/6J 雄鼠随机分成对照组 (Vehicle) 和实验组 (AP 给药组), 每组各 8 只。每天通过灌胃方式给药, AP 组给予 AP (100 mg/kg), 对照组给予等量溶剂, 持续给药 14 天。

实验前禁食 12 h, 腹腔注射 Triton WR-1339 (500 mg/kg), 30 min 后灌胃橄榄油 (10 μ L/g)。收集灌胃橄榄油后 0、1、2、3、4 h 时的尾血。收集的尾血用于 TG 检测。随后立即处死小鼠, 用 PBS 清洗小肠后, 收集小肠。

1.2.3 质粒构建及荧光素酶活性检测 以人源 cDNA 为模板, 扩增出 *ERR α* -LBD 的序列, 随后分别将其克隆到载体 pCMV-BD-vector 上, 构建 pCMV-BD-*ERR α* -LBD。将 *ERR α* 和 *PGC1 α* 的全长人源 cDNA 片段分别克隆到载体 pCMX 和 pcDNA4 上, 构建 pCMX-*ERR α* 和 pcDNA4-*PGC1 α* 。以小鼠基因组 DNA 为模板, 扩增出具有 *ERR α* 反应元件的 *Apob*、*Mttp* 的启动子片段, 随后将其克隆到载体 pGL3-Basic 上, 构建 pGL3-*Apob*-Luc 和 pGL3-*Mttp*-Luc。

HEK-293T 细胞铺于 96 孔板上, 12 h 后, 待汇合率达 80% 时, 按照 Lipofectamine 3000 转染试剂盒说明书进行转染。pFR 报告系统: pCMV-BD-*ERR α* 、pcNDA4-*PGC1 α* 和 pFR-Luc 共转染到 HEK-293T 细胞中。启动子报告系统: pGL3-*Apob*-Luc 或 pGL3-*Mttp*-Luc 与 pCMX-*ERR α* 和 pcNDA4-*PGC1 α* 共转染。pRL-TK 质粒转染到每一个实验组中作为内参。转染 6 h 后, 换成无酚红的 H-DMEM 培养基并加药处理。24 h 后, 裂解细胞, 取细胞裂解液用于荧光素酶检测仪的荧光活性检测。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 将 Caco-2 细胞铺于 12 孔板上, 当细胞汇合率达 80%~90% 时, 分别加入 DMSO、C29 (10 μ mol/L)、AP (10、25、50 μ mol/L) 处理 24 h。用 Trizol 提取 RNA, 反转试剂盒将 RNA 反转为 cDNA。根据荧光定量 PCR 试剂盒的说明书进行实时定量 PCR。

将 1.2.2 中得到的小鼠小肠剪碎后放入含有 1 mL Trizol 的离心管中, 随后放入研磨仪中研磨。后续步骤与上述方法相同。

1.2.5 Western blot 将 Caco-2 细胞铺于 12 孔板上, 当细胞汇合率达 80%~90% 时, 分别加入 DMSO、C29 (compound 29) (10 μ mol/L)、AP (10、25、50 μ mol/L) 处理 24 h。用 RIPA 裂解液提取蛋白, 用 BCA 试剂盒

测定蛋白浓度。检测ApoB蛋白时,用丙烯酰胺浓度为6%的分离胶进行电泳,110 V恒压转膜4 h。检测其他蛋白时,用丙烯酰胺浓度为12%的分离胶进行电泳,110 V恒压转膜1.5 h。

1.2.6 脂滴荧光染色 Caco-2细胞铺于细胞爬片上,当汇合率达60%时,加入OA(400 $\mu\text{mol/L}$)处理过夜。PBS洗去OA后,分别加入含有DMSO、C29(10、25 $\mu\text{mol/L}$)、AP(10、25 $\mu\text{mol/L}$)的培养基培养24 h。用4% PFA进行固定,用BODIPY 493/503进行脂滴染色10 min。PBS洗去BODIPY后,用DAPI染色3~5 min。

1.2.7 胞内外TG含量检测 将Caco-2细胞铺于12孔板上,当汇合率达60%时,加入OA(400 $\mu\text{mol/L}$)处理过夜,PBS洗去OA后,换成无酚红的H-DMEM培养基并加药处理。24 h后分别收集培养基和细胞。细胞裂解后,用TG试剂盒分别测定培养基和细胞内的TG,用BCA试剂盒测定蛋白浓度。计算出每毫克蛋白对应的培养基中分泌或细胞内的TG含量。

1.2.8 小鼠油红O染色 将1.2.2中收集的小肠用4% PFA浸泡24 h后,30%蔗糖脱水过夜。小肠用OCT包埋后放入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 凝固,随后冰冻切片,切片的厚度为10 μm 。切片用60%异丙醇润洗5 min后,放入油红O染液中,37 $^{\circ}\text{C}$ 染色30 min,60%异丙醇分化1 min。蒸馏水洗涤2次后,苏木素染色5 min,蒸馏水洗涤2次,放入1%盐酸酒精中迅速分化30 s,自来水水洗返蓝10 min。用水性封片剂封片。

1.2.9 小鼠小肠TG含量检测 将1.2.2中收集的小鼠小肠剪碎后放入含有500 μL 生理盐水的离心管中,随后放入研磨仪中研磨。6 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心15 min后,收集上清以及挂在管壁上的脂质,用TG试剂盒测定小肠内TG,用BCA试剂盒测定蛋白浓度。计算出每毫克蛋白对应的小肠内的TG含量。

1.2.10 统计学分析 实验数据以平均数 \pm 标准偏差表示。以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 AP抑制ERR α /PGC1 α 的转录活性进而下调ApoB、Mtp的启动子活性

由于尚未发现ERR α 的内源性配体,因此ERR α 也称为孤儿核受体。ERR α 的配体结合域(ligand binding domain, LBD)中的近C-端嵌入了保守的激活结构域-2(activation function-2, AF-2)。天然配体与核受体的相互作用决定AF-2螺旋基序处于活性或非

活性状态,但ERR α 的蛋白质构象使得AF-2螺旋基序处于活化状态^[26-27]。因此,ERR α -LBD中AF-2螺旋基序的活性构型使得ERR α 即使在没有配体存在下也能招募辅助激活因子PGC1 α ,二者发生相互作用后会极大提高ERR α 的转录活性^[11-12]。

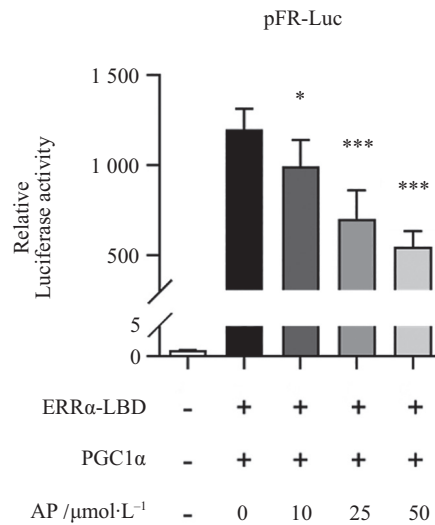
pFR-Luc载体上有GAL4识别并结合的上游激活序列(upstream activating sequence, UAS)和荧光素酶基因的融合片段。我们采用经典的酵母双杂交系统,ERR α -LBD与PGC1 α 发生相互作用后,pCMV-BD-ERR α -LBD质粒表达的融合蛋白结构变松散,GAL4呈现完整的转录活性,启动了下游荧光素酶基因的转录。荧光素酶表达量增多,荧光素酶活性增强,荧光强度增强,因此我们采用荧光素酶报告基因系统来探究AP是否影响ERR α /PGC1 α 的转录调控功能。

首先构建包含ERR α -LBD表达载体的荧光素酶报告基因系统,结果显示,ERR α -LBD和PGC1 α 的相互作用促进荧光素酶的表达(图1),表明荧光素酶报告基因系统成功构建。随后,往细胞培养液中加入10、25、50 $\mu\text{mol/L}$ 的AP处理24 h,发现荧光素酶活性显著减弱(图1),说明AP干扰ERR α 和PGC1 α 的相互作用,是ERR α 的潜在拮抗剂。

干扰ERR α 和PGC1 α 的相互作用可能会下调ERR α /PGC1 α 的转录活性。ERR α 反应元件(ERR α response element, ERRE)的基序图示如图2A所示(引用自JASPAR数据库),ApoB、Mtp启动子上存在ERR α 的反应元件(图2B和图2C)。为了探讨AP是否通过影响ERR α /PGC1 α 的转录调控作用进而影响脂质分泌关键基因ApoB和Mtp的转录,我们构建含有ApoB、Mtp启动子片段的荧光素酶报告基因系统。结果显示,ERR α 和PGC1 α 在细胞中富集时,荧光素酶活性显著增强,表明ERR α /PGC1 α 可上调ApoB、Mtp的启动子活性。给予不同剂量AP处理后,发现荧光素酶活性呈浓度梯度性下降,这表明AP可抑制ERR α /PGC1 α 对ApoB、Mtp启动子的转录调控作用(图2D和图2E),证明AP通过抑制ERR α /PGC1 α 的转录活性进而下调ApoB、Mtp的启动子活性。

2.2 ERR α 拮抗剂AP抑制脂质分泌关键基因的表达

Caco-2来源于人结直肠腺癌的黏膜上皮细胞系,是研究肠道脂质代谢的经典体外细胞模型^[28-31]。为了进一步验证AP是否影响ApoB和MTTP的表达,我们采用Caco-2细胞模型,并给予AP处理后,检测细胞



$n=6$; * $P<0.05$, *** $P<0.001$, 与DMSO组比较。

$n=6$; * $P<0.05$, *** $P<0.001$ compared with the DMSO group.

图1 ERR α 潜在拮抗剂AP影响ERR α /PGC1 α 的转录活性

Fig.1 AP affects the transcriptional activity of ERR α /PGC1 α as a potential ERR α inverse agonist

的mRNA和蛋白表达水平。结果显示: 脂质分泌关键基因*Apob*、*Mttp*的mRNA水平随着AP浓度增大而呈梯度下调, 经AP处理后ApoB蛋白表达显著减少(图3)。此外, ERR α 特异性拮抗剂C29可降低脂质分泌关键基因*Apob*、*Mttp*的mRNA水平和ApoB蛋白表达水平(图3)。以上结果表明, AP与C29作为ERR α 拮抗剂, 抑制了脂质分泌关键基因的表达。

2.3 ERR α 拮抗剂AP抑制Caco-2细胞脂质的分泌

OA是一种单不饱和脂肪酸, Caco-2细胞摄取的OA, 经过一系列分解和合成代谢后, 形成了TG, 随后TG以脂滴的形式储存在胞内, 或者以脂蛋白形式被分泌至胞外。因此, OA处理后的Caco-2细胞能够模拟餐后状态, 是研究进食后脂质代谢变化的重要模型^[32]。AP抑制脂质分泌关键基因*Apob*和*Mttp*的表达可能会影响细胞的脂质分泌功能, 为了探究AP是否影响脂质的分泌, 我们向细胞培养液中添加OA处理12 h。BODIPY 493/503染色结果显示, 与对照组相比, 经AP处理的细胞内脂滴较大且数量多(图4A)。胞内脂质堆积与脂质分泌功能障碍息息相关, 通过检测胞内外TG含量, 发现AP处理后胞外TG水平显著降低(图4C), 胞内TG含量增多(图4D)。此外, C29处理后胞内脂滴增大且数量增多(图4A), 胞外TG水平下降(图4C), 胞内TG含量增多(图4D)。上述结果证明, AP与C29作为ERR α 拮抗剂, 抑制脂蛋白的分泌。

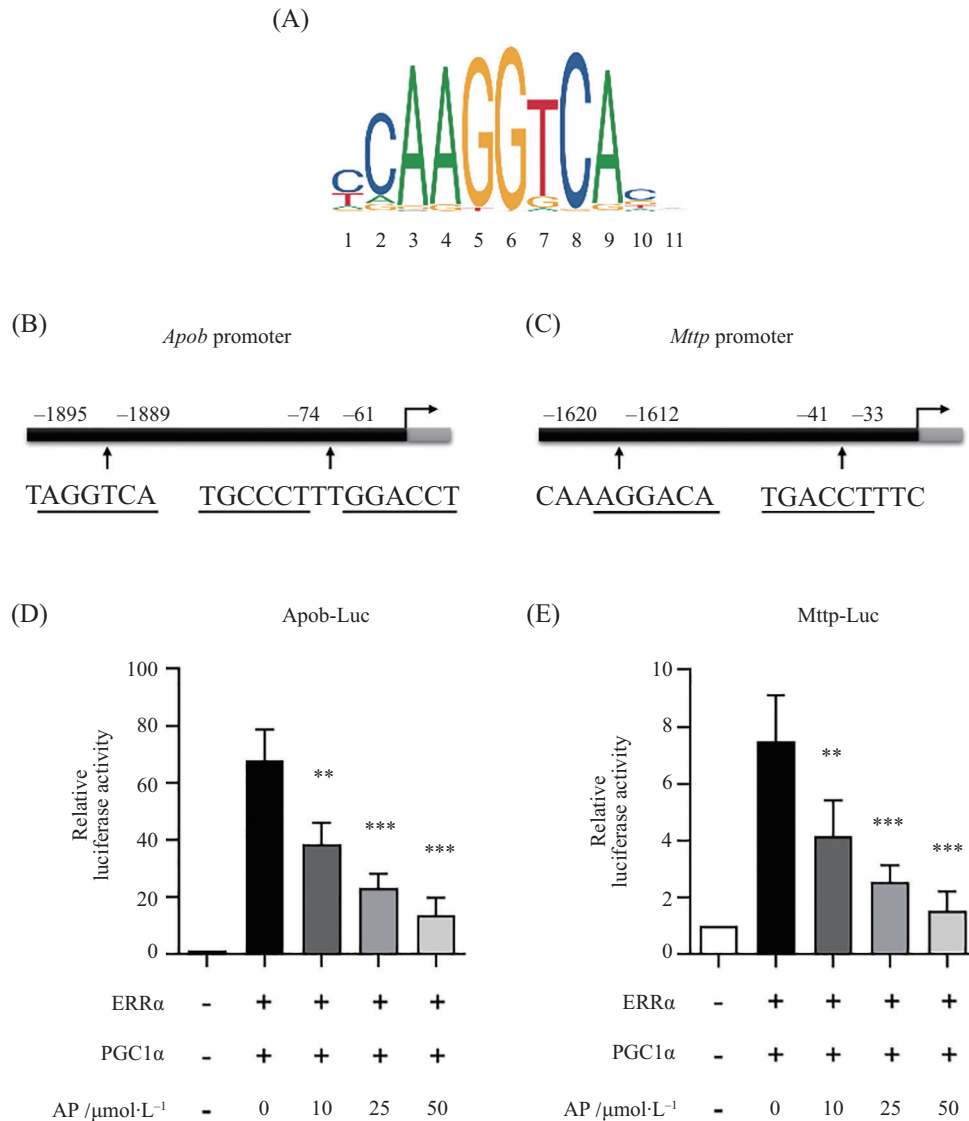
2.4 AP抑制小肠中脂质的分泌

橄榄油富含单不饱和脂肪酸, 比起其他食用油更

能迅速地促进餐后小肠脂蛋白的分泌^[33], 因此采用橄榄油进行餐后甘油三酯应答实验, 来进一步研究AP对小肠脂质分泌功能的影响。连续14天给C57BL/6J雄鼠灌胃AP, 雄鼠在实验前禁食过夜。在灌胃橄榄油前30 min, 通过腹腔注射方式给予Triton WR-1339来阻止血液中脂质降解。与对照组相比, 灌胃橄榄油后1、2、3、4 h, AP组血清中的TG水平降低(图5A)。脂质分泌受阻会使得脂质在小肠上皮绒毛中堆积, 油红O染色结果显示, 相对于对照组, AP组小鼠的小肠绒毛中脂质含量较多(图5B), AP组小鼠的小肠内TG含量较多(图5C), 证明AP抑制小肠中脂质的分泌。此外, AP组小鼠的小肠中*Apob*和*Mttp*的mRNA水平下降(图5D), 因此以上结果表明, AP下调ApoB和MTTP的表达, 进而抑制小肠中脂质的分泌。综上所述, AP通过干扰ERR α /PGC1 α 的转录活性, 抑制脂质分泌关键基因的转录, 抑制肠道脂质分泌, 从而降低血清TG水平。AP抑制小肠内脂质的分泌模式图如图6所示。

3 讨论

高甘油三酯血症是脂质代谢紊乱所引起血脂稳态失衡的疾病, 与肥胖、糖尿病和动脉粥样硬化等代谢性疾病密切相关^[34-35]。脂肪的过量摄取以及脂肪消耗和清除障碍将导致血脂升高, 促进高甘油三酯血症的发生发展。食物中脂肪的摄取依赖于胃肠道消化和吸收作用, 而小肠作为脂肪消化



A: ERRα反应元件基序图; B、C: *Apob*或*Mttp*启动子上含有ERRE的示意图; D、E: *Apob*或*Mttp*启动子驱动报告基因的转录, 运用启动子报告系统分析AP对报告基因转录的影响, $n=6$ 。** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与DMSO组比较。

A: motif logo for ERRα response element; B,C: schematic representations of ERRE located at *Apob* or *Mttp* promoter; D,E: effect of AP on expression of reporters that were driven by *Apob* or *Mttp* promoters was analysed using luciferase reporter assay, $n=6$ 。** $P<0.01$, *** $P<0.001$ compared with the DMSO group.

图2 AP抑制ERRα/PGC1α介导的*Apob*或*Mttp*基因的表达

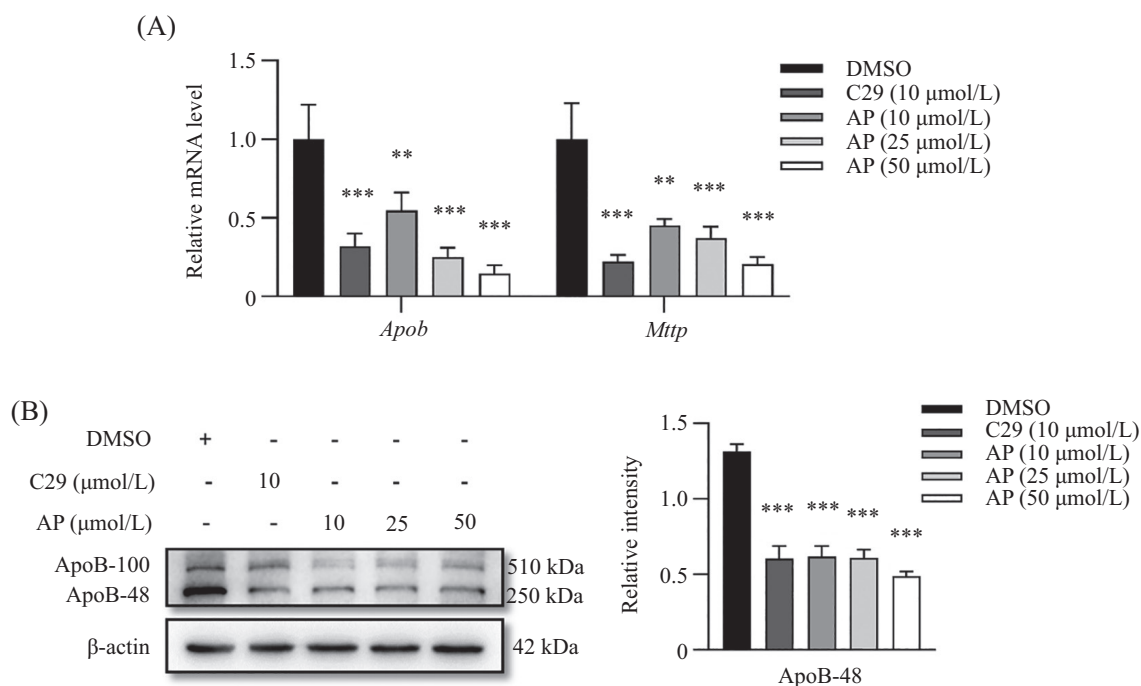
Fig.2 AP suppresses expression of *Apob* or *Mttp* genes which were modulated by ERRα/PGC1α

和吸收的主要场所, 能将肠道内的小分子脂质产物进行包装并分泌至循环系统, 从而完成对脂质的吸收。

本研究利用荧光素酶报告基因系统进行药物筛选, 结果显示AP能够干扰ERRα和PGC1α相互作用, 抑制ERRα/PGC1α转录活性, 继而下调脂质分泌关键基因*Apob*和*Mttp*的表达。进一步研究发现AP减少胞外TG含量和降低餐后血清TG水平, 揭示AP具有抑制小肠脂质分泌的作用。综上所述,

本研究证明AP可以通过靶向抑制ERRα/PGC1α对脂质分泌关键基因的转录调控作用, 抑制小肠分泌脂质, 影响小肠对食物中脂质的吸收作用。因此, 本研究从AP影响小肠的脂质分泌功能的角度展开研究, 为AP降血脂的生物学作用机制提供新的思路。

现有大量研究表明, AP在治疗肥胖、动脉粥样硬化和高脂血症等代谢性疾病上展现出广泛的治疗潜力。有文献报道, AP可通过抑制脂肪生成相关



A: AP或C29处理后, Caco-2细胞中*Apob*和*Mttp*的mRNA表达水平, $n=6$; B: AP或C29处理后, Caco-2细胞中ApoB-48和ApoB-100蛋白免疫印迹分析结果(左图), 条带通过光密度分析法进行定量, 并使用 β -actin条带进行校正(右图)。** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与DMSO组比较。

A: mRNA levels of *Apob* and *Mttp* in Caco-2 cells incubated in the presence or absence of C29 or AP, $n=6$; B: Western blot of ApoB-48 and ApoB-100 in Caco-2 cells incubated in the presence or absence of C29 or AP (left panel), bands were quantified by densitometry analysis and normalized to the β -actin band intensity (right panel). ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ compared with DMSO group.

图3 AP抑制Caco-2细胞脂质分泌相关基因的表达

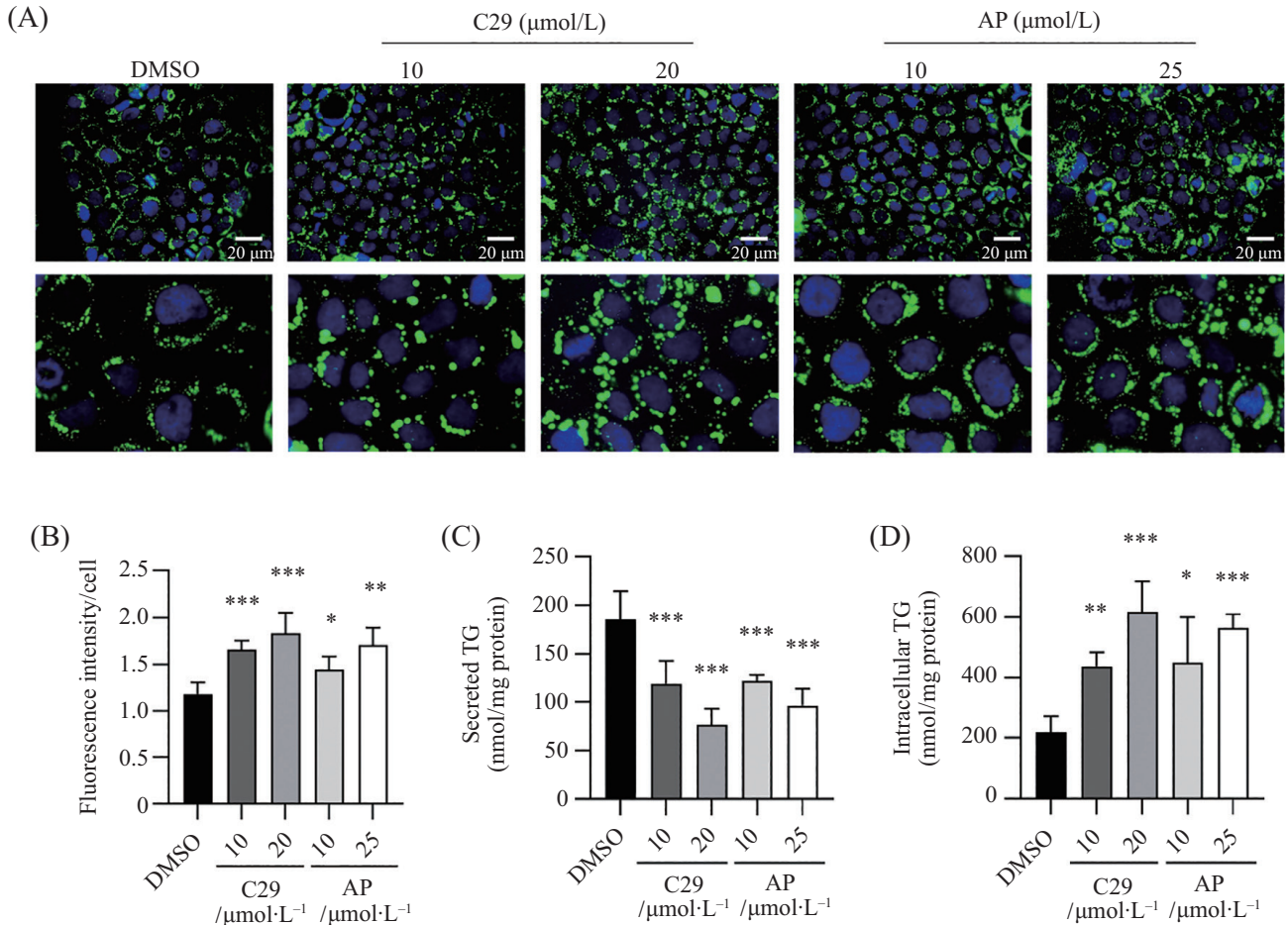
Fig.3 AP inhibits expression of lipid secretion-related genes in Caco-2 cells

转录因子过氧化物酶体增殖物激活受体PPAR γ 信号通路, 降低脂肪细胞标志蛋白的表达量, 最终抑制3T3-L1脂肪前体细胞成脂分化^[36]。同时, AP减轻高脂饮食引起的脂肪组织中脂肪堆积和体重增加^[10]。肿瘤坏死因子TNF α 可诱导黏附分子ICAM-1的表达, 加快动脉粥样硬化的发展, AP下调TNF α 诱导的ICAM-1表达, 表明AP具有预防动脉粥样硬化发展的潜力^[37]。我们近期研究证明AP影响肝细胞核因子HNF4 α 对肝脏VLDL组装和分泌的调控作用, 抑制肝脏VLDL分泌并降低血脂水平从而改善高脂饮食小鼠的高脂血症^[9]。可见AP具有多靶点、多通路协调的特性和优势, 在肥胖、动脉粥样硬化和高脂血症等疾病发展中发挥多种疗效, 这使得AP在治疗代谢性疾病上具有显著效果。

ERR α 调控代谢相关基因的转录, 在维持小肠稳态平衡中起着至关重要的作用。首先, ERR α 广泛表达于不同类型的组织, 尤其在胃肠道等能量需求较高的组织器官中高度表达^[14,38], 并且相较于胃和大肠, 小肠中ERR α 的表达水平更高^[39]。其

次, 有研究报道组蛋白去乙酰化酶HDAC3通过介导ERR α /PGC1 α 对脂质转运体CD36的转录调控作用, 上调CD36表达, 继而促进小肠上皮细胞对脂质的摄取和分泌^[40], 并且小肠上皮细胞特异性缺失HDAC3能够对抗高脂饮食诱导的肥胖^[40]。再次有研究发现, *Erra*基因敲除鼠易患肠道炎, 其肠道微生物群种类和数量显著减少^[41]。ERR α /PGC1 α 可通过调控维持肠道稳态和参与肠道修复关键基因的转录来缓解肠炎症状^[41]。因此, 以上研究表明ERR α /PGC1 α 的转录调控作用介导了小肠的稳态平衡和生理功能。

ERR α 在小肠消化和吸收的过程中也发挥着重要调控作用。有研究发现, ERR α 能够调控载脂蛋白ApoA-IV的表达, 影响脂质至乳糜微粒前体的转运, 进而影响小肠的脂质代谢^[39]。前期研究中, 我们发现*Erra*肝脏特异性敲除抑制VLDL的分泌, 继而导致脂质在肝脏内堆积^[18]。相反, 相较于野生型小鼠, *Erra*全身性敲除可改善高脂饮食引起的肝内脂肪沉积情况^[42], 同时能够对抗高脂饮食诱导的肥胖发生^[43]。这



A: C29或AP处理后, Caco-2细胞内脂滴的分布情况, 脂滴被BODIPY 493/503(绿色)标记; B: C29或AP处理后, Caco-2细胞内脂滴的相对平均荧光强度, $n=5$; C、D: C29或AP处理后, 胞外(C)和胞内(D) TG含量, $n=7$ 。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与DMSO组比较。

A: the lipid droplets distribution of Caco-2 cells incubated in the presence or absence of C29 or AP, lipid droplets were labeled with BODIPY 493/503 (green); B: the normalized mean fluorescence intensity of lipid droplets in Caco-2 cells incubated in the presence or absence of C29 or AP, $n=5$; C, D: extracellular TG (C) and intracellular TG (D) contents in Caco-2 cells incubated in the presence or absence of C29 or AP, $n=7$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ compared with DMSO group.

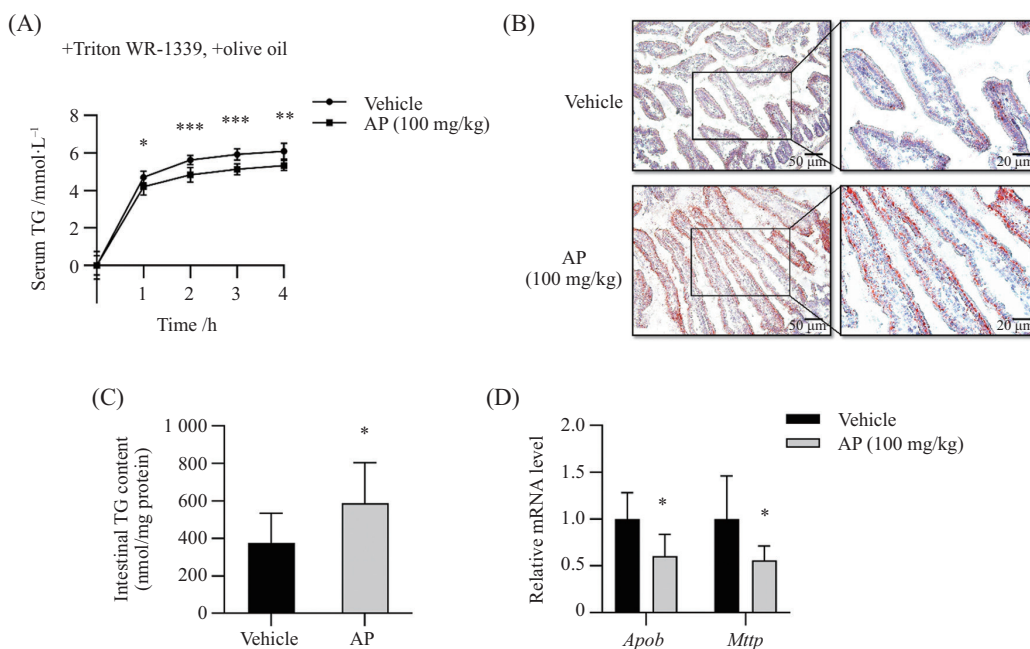
图4 AP抑制Caco-2细胞脂质的分泌

Fig.4 AP inhibits lipid secretion in Caco-2 cells

提示在*Erra*全身敲除鼠中, *Erra*的敲除可能通过影响小肠对脂质的吸收和分泌作用, 降低血清TG水平, 继而减少高脂饮食引起的脂肪异位沉积。C29是人工合成的ERR α 特异性拮抗剂, 与ERR α 发生相互作用后可改变ERR α 空间构象从而阻碍ERR α 和PGC1 α 相互作用^[44]。C29可以降低AKR/J小鼠肥胖模型血液中的TG水平, 改善高甘油三酯血症并减轻体重^[44]。在本研究中, 我们发现C29和ERR α 的另一拮抗剂AP下调ApoB和MTTP的表达, 继而抑制脂质分泌, 降低餐后TG水平, 证明了ERR α 能够介导小肠消化和吸收功能。这也进一步揭示小肠中ERR α 的高度表达, 除了与小肠高能量需求有关^[14,38], 也与小肠的消化和吸收作用有关。

核受体是一类转录因子, 作为信号通路的枢纽

接受和传导上游信号, 介导相关基因的表达来适应外界环境因素的变化。因此, 核受体在机体的生长发育以及疾病的发生与发展中起着重要作用。核受体与配体相互作用直接影响核受体的调控作用, ERR α 作为核受体家族成员调控参与能量代谢关键基因的表达, 不断增加的证据提示ERR α 与多种代谢性疾病相关, 以ERR α 作为治疗靶点的药物研发在代谢性疾病的治疗上呈现出一定程度的潜力。本研究证实, 在小肠中, *ApoB*和*Mtpp*是ERR α 靶向基因, ERR α 拮抗剂AP和C29均能下调ApoB和MTTP的表达, 抑制小肠的脂质分泌, 影响血清TG水平。阐明ERR α 介导小肠脂质分泌的作用机制, 可为相关疾病尤其是高甘油三酯血症的药物研发提供新的思路。

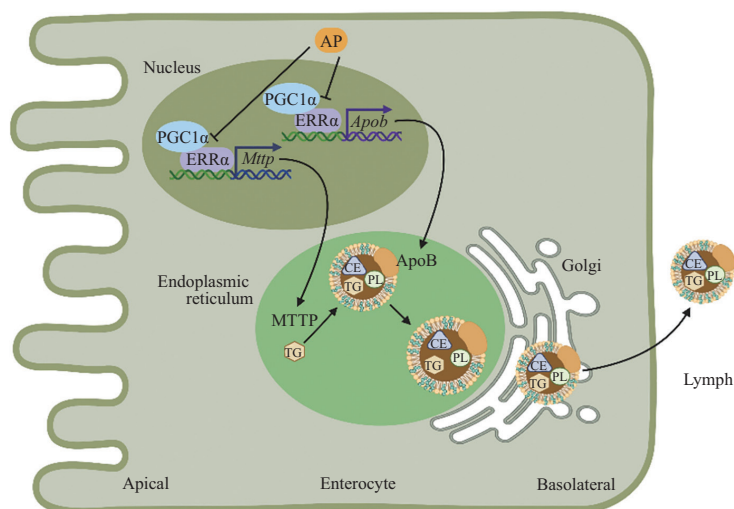


A: 连续14天给药AP或对照溶剂, 橄榄油灌胃后0、1、2、3、4 h时小鼠的血清TG水平, $n=8$; B、C: 连续14天给药AP或对照溶剂, 小鼠小肠的油红O染色(B)和TG含量(C), $n=8$; D: 连续14天给药AP或对照溶剂, 小鼠小肠中*Apob*和*Mttp*的mRNA表达水平, $n=8$ 。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与0 h或Vehicle组比较。

A: after 14 days of AP or vehicle intragastric administration, serum TG levels of mice were measured at 0, 1, 2, 3 and 4 h followed by olive oil administration, $n=8$; B,C: Oil red O staining (B) and TG contents (C) of small intestines of mice received daily AP or vehicle for 14 days, $n=8$; D: mRNA levels of *Apob* and *Mttp* in the small intestine of mice received daily AP or vehicle for 14 days, $n=8$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ compared with 0 h or Vehicle group.

图5 AP抑制餐后小鼠小肠的脂质分泌

Fig.5 AP inhibits postprandial lipid secretion in the small intestine of mice



肠上皮细胞内脂质, 如甘油三酯(triglycerides, TGs)、胆固醇酯(cholesteryl ester, CE)和磷脂(phospholipids, PLs)与ApoB一起被包装成前乳糜微粒。MTTP介导脂质转运到乳糜微粒前体中, 随后乳糜微粒前体在高尔基体中加工成熟。成熟的乳糜微粒通过胞吐作用排出, 经淋巴系统进入血液循环系统。AP通过干扰ERR α /PGC1 α 的转录活性, 降低*Apob*和*Mttp*的表达水平, 从而抑制肠道脂质分泌。

Intestinal lipids, such as triglycerides (TGs), cholesteryl ester (CE) and phospholipids (PLs) are packaged into pre-chylomicrons with apolipoprotein B (ApoB). MTTP mediates the packaging of lipids into pre-chylomicrons, followed by processing and maturation of the pre-chylomicrons in the golgi apparatus. Mature chylomicrons are then discharged by exocytosis and enter the blood circulation system through the lymphatic system. AP inhibits intestinal lipid secretion through decreasing expression of *Apob* and *Mttp* via interfering with transcriptional activity of ERR α /PGC1 α .

图6 ERR α 拮抗剂AP通过下调*Apob*和*Mttp*基因的转录抑制了小肠脂质分泌

Fig.6 A model for AP inhibits intestinal lipid secretion by acting as an ERR α inverse agonist and downregulating the transcription of *Apob* and *Mttp*

参考文献 (References)

- [1] CHAIT A, ECKEL R H. The chylomicronemia syndrome is most often multifactorial [J]. *Ann Intern Med*, 2019, 170(9): 626-34.
- [2] WATTS G F, OOI E M M, CHAN D C. Demystifying the management of hypertriglyceridaemia [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2013, 10(11): 648-61.
- [3] BORÉN J, TASKINEN M R, BJÖRNSON E, et al. Metabolism of triglyceride-rich lipoproteins in health and dyslipidaemia [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2022, 19(9): 577-92.
- [4] XIAO C, STAHEL P, CARREIRO A L, et al. Recent advances in triacylglycerol mobilization by the gut [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2018, 29(3): 151-63.
- [5] HUSSAIN M M. Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2014, 25(3): 200-6.
- [6] DAI Y, CHEN S R, CHAI L, et al. Overview of pharmacological activities of *Andrographis paniculata* and its major compound andrographolide [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2019, 59(sup1): S17-S29.
- [7] BURGOS R A, ALARCÓN P, QUIROGA J, et al. Andrographolide, an anti-inflammatory multitarget drug: all roads lead to cellular metabolism [J]. *Molecules*, 2021, 26(1): 5.
- [8] YANG T, SHI H X, WANG Z T, et al. Hypolipidemic effects of andrographolide and neoandrographolide in mice and rats [J]. *Phytother Res*, 2013, 27(4): 618-23.
- [9] ZHANG M, YANG M, WANG N, et al. Andrographolide modulates HNF4 α activity imparting on hepatic metabolism [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2020, 513: 110867.
- [10] DING L, LI J, SONG B, et al. Andrographolide prevents high-fat diet-induced obesity in C57BL/6 mice by suppressing the sterol regulatory element-binding protein pathway [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2014, 351(2): 474-83.
- [11] SCHREIBER S N, KNUTTI D, BROGLI K, et al. The transcriptional coactivator PGC-1 regulates the expression and activity of the orphan nuclear receptor estrogen-related receptor α (ERR α) [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(11): 9013-8.
- [12] LAGANIÈRE J, TREMBLAY G B, DUFOUR C R, et al. A polymorphic autoregulatory hormone response element in the human estrogen-related receptor α (ERR α) promoter dictates peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α control of ERR α expression [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(18): 18504-10.
- [13] SCHOLTES C, GIGUÈRE V. Transcriptional control of energy metabolism by nuclear receptors [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, 23(11): 750-70.
- [14] GIGUÈRE V. Transcriptional control of energy homeostasis by the estrogen-related receptors [J]. *Endocr Rev*, 2008, 29(6): 677-96.
- [15] HANDSCHIN C, SPIEGELMAN B M. Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism [J]. *Endocr Rev*, 2006, 27(7): 728-35.
- [16] HUANG T, FU X, WANG N, et al. Andrographolide prevents bone loss via targeting estrogen-related receptor- α -regulated metabolic adaptation of osteoclastogenesis [J]. *Br J Pharmacol*, 2021, 178(21): 4352-67.
- [17] WEI W, WANG X, YANG M, et al. PGC1 β Mediates PPAR γ activation of osteoclastogenesis and rosiglitazone-induced bone loss [J]. *Cell Metab*, 2010, 11(6): 503-16.
- [18] YANG M, LIU Q, HUANG T, et al. Dysfunction of estrogen-related receptor alpha-dependent hepatic VLDL secretion contributes to sex disparity in NAFLD/NASH development [J]. *Theranostics*, 2020, 10(24): 10874-91.
- [19] KO C W, QU J, BLACK D D, et al. Regulation of intestinal lipid metabolism: current concepts and relevance to disease [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17(3): 169-83.
- [20] YOUNG S G, CHAM C M, PITAS R E, et al. A genetic model for absent chylomicron formation: mice producing apolipoprotein B in the liver, but not in the intestine [J]. *J Clin Invest*, 1995, 96(6): 2932-46.
- [21] HOOPER A J, ROBERTSON K, BARRETT P H R, et al. Postprandial lipoprotein metabolism in familial hypobetalipoproteinemia [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92(4): 1474-8.
- [22] HUSSAIN M M, BAKILLAH A, NAYAK N, et al. Amino acids 430-570 in apolipoprotein B are critical for its binding to microsomal triglyceride transfer protein [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(40): 25612-5.
- [23] JIANG Z G, LIU Y, HUSSAIN M M, et al. Reconstituting initial events during the assembly of apolipoprotein B-containing lipoproteins in a cell-free system [J]. *J Mol Biol*, 2008, 383(5): 1181-94.
- [24] SACKS F M, STANESA M, HEGELE R A. Severe hypertriglyceridemia with pancreatitis: thirteen years' treatment with lomitapide [J]. *JAMA Intern Med*, 2014, 174(3): 443-7.
- [25] XIE Y, NEWBERRY E P, YOUNG S G, et al. Compensatory increase in hepatic lipogenesis in mice with conditional intestine-specific Mttp deficiency [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(7): 4075-86.
- [26] XIE W, HONG H, YANG N N, et al. Constitutive activation of transcription and binding of coactivator by estrogen-related receptors 1 and 2 [J]. *Mol Endocrinol*, 1999, 13(12): 2151-62.
- [27] CHEN S, ZHOU D, YANG C, et al. Molecular basis for the constitutive activity of estrogen-related receptor α -1 [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(30): 28465-70.
- [28] LEE J, RIDGWAY N D. Phosphatidylcholine synthesis regulates triglyceride storage and chylomicron secretion by Caco2 cells [J]. *J Lipid Res*, 2018, 59(10): 1940-50.
- [29] NAULI A M, SUN Y, WHITTIMORE J D, et al. Chylomicrons produced by Caco-2 cells contained ApoB-48 with diameter of 80-200 nm [J]. *Physiol Rep*, 2014, 2(6): e12018.
- [30] LEVY E, MEHRAN M, SEIDMAN E. Caco-2 cells as a model for intestinal lipoprotein synthesis and secretion [J]. *FASEB J*, 1995, 9(8): 626-35.
- [31] LUCHOONMUN J, ZHOU Z K, BAKILLAH A, et al. Assembly and secretion of VLDL in nondifferentiated Caco-2 cells stably transfected with human recombinant ApoB48 cDNA [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17(11): 2955-63.
- [32] LUCHOONMUN J, HUSSAIN M M. Assembly and secretion of chylomicrons by differentiated Caco-2 cells [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274: 19565-72.
- [33] JACKSON K G, ROBERTSON M D, FIELDING B A, et al. Olive oil increases the number of triacylglycerol-rich chylomicron particles compared with other oils: an effect retained when a second standard meal is fed [J]. *Am J Clin Nutr*, 2002, 76(5): 942-9.
- [34] EZEH K J, EZEDEMBA O. Hyperlipidemia: a review of the novel methods for the management of lipids [J]. *Cureus*, 2021, 13(7): e16412.

- [35] YUAN G, AL-SHALI K Z, HEGELE R A. Hypertriglyceridemia: its etiology, effects and treatment [J]. CMAJ, 2007, 176(8): 1113-20.
- [36] JIN L, FANG W, LI B, et al. Inhibitory effect of Andrographolide in 3T3-L1 adipocytes differentiation through the PPAR γ pathway [J]. Mol Cell Endocrinol, 2012, 358(1): 81-7.
- [37] CHAO C Y, LII C K, TSAI I T, et al. Andrographolide inhibits ICAM-1 expression and NF- κ B activation in TNF- α -treated EA.hy926 cells [J]. J Agric Food Chem, 2011, 59(10): 5263-71.
- [38] BOOKOUT A L, JEONG Y, DOWNES M, et al. Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network [J]. Cell, 2006, 126(4): 789-99.
- [39] CARRIER J C, DEBLOIS G, CHAMPIGNY C, et al. Estrogen-related receptor α (ERR α) is a transcriptional regulator of apolipoprotein A-IV and controls lipid handling in the intestine [J]. J Biol Chem, 2004, 279(50): 52052-8.
- [40] KUANG Z, WANG Y, LI Y, et al. The intestinal microbiota programs diurnal rhythms in host metabolism through histone deacetylase 3 [J]. Science, 2019, 365(6460): 1428-34.
- [41] TRAN A, SCHOLTES C, SONGANE M, et al. Estrogen-related receptor alpha (ERR α) is a key regulator of intestinal homeostasis and protects against colitis [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 15073.
- [42] B'CHIR W, DUFOUR C R, OUELLET C, et al. Divergent role of estrogen-related receptor α in lipid- and fasting-induced hepatic steatosis in mice [J]. Endocrinology, 2018, 159(5): 2153-64.
- [43] LUO J, SLADEK R, CARRIER J, et al. Reduced fat mass in mice lacking orphan nuclear receptor estrogen-related receptor α [J]. Mol Cell Biol, 2003, 23(22): 7947-56.
- [44] PATCH R J, SEARLE L L, KIM A J, et al. Identification of diaryl ether-based ligands for estrogen-related receptor α as potential antidiabetic agents [J]. J Med Chem, 2011, 54(3): 788-808.