

· 基础研究 ·

化痰祛湿活血方干预非酒精性脂肪性肝炎大鼠
ADPN/AKT/NF- κ B 通路的研究赵文霞¹ 张丽慧¹ 崔健娇¹ 杨晓青² 张琼方³ 许顺畅³

摘要 **目的** 探讨化痰祛湿活血方对非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)大鼠 ADPN/AKT/NF- κ B 信号通路中关键蛋白 ADPN、AdipoR2、p-AKT(ser473)、p-NF- κ Bp65(ser536)表达的影响及抗炎作用。**方法** 72 只雄性 SD 大鼠,随机分为空白组、模型组、对照组及化痰祛湿活血方高剂量组、中剂量组、低剂量组,每组 12 只;空白组予普通饲料、不给药,其余 5 组予高脂饲料;模型组予生理盐水 1 mL/100 g 灌胃,对照组予多烯磷脂酰胆碱 28.5 mg/100 g 灌胃,高剂量、中剂量、低剂量组分别予化痰祛湿活血方 5.04、2.52、1.26 g/100 g 灌胃,连续 7 周。检测肝功能(ALT、AST、ALP)、血脂(TC、TG)、血糖(GLU)水平,HE 染色观察肝组织病理学变化,免疫组化测定 ADPN、AdipoR2、p-AKT(ser473)、p-NF- κ Bp65(ser536)蛋白表达。**结果** (1)与空白组比较,模型组大鼠血清 ALT、AST、ALP、TC、TG、GLU 水平明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,各用药组大鼠血清 ALT、AST、ALP、TC、TG、GLU 水平均明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$);与化痰祛湿活血方高剂量组比较,化痰祛湿活血方中、低剂量组及对照组大鼠血清 ALT、AST、ALP、TC、TG、GLU 水平明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。化痰祛湿活血方高剂量组少数肝细胞内有细小脂滴,小叶分界清晰,肝索呈放射状排列;中剂量组部分肝细胞存在大小不等的脂滴,少数汇管区有炎症细胞浸润。(2)与空白组比较,模型组大鼠肝组织 ADPN、AdipoR2、p-AKT(ser473)蛋白表达明显下降,p-NF- κ Bp65(ser536)蛋白表达明显升高(均 $P < 0.01$);与模型组比较,各用药组大鼠肝组织 AdipoR2、p-AKT(ser473)蛋白表达明显升高,p-NF- κ Bp65 蛋白表达明显下降(均 $P < 0.01$),化痰祛湿活血方高、中剂量组及对照组大鼠肝组织 ADPN 蛋白表达明显升高($P < 0.01$);与高剂量组比较,化痰祛湿活血方中、低剂量组及对照组大鼠肝组织 ADPN、AdipoR2 蛋白表达明显下降,p-NF- κ Bp65 蛋白表达明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 化痰祛湿活血方能通过上调肝组织中 ADPN、AdipoR2、p-AKT(ser473)的蛋白表达,抑制 p-NF- κ Bp65(ser536)的蛋白表达,而有效改善肝功能、血脂、GLU,改善 NASH 大鼠肝组织脂肪变程度,减轻肝脏炎症。

关键词 化痰祛湿活血方;非酒精性脂肪性肝炎;ADPN/AKT/NF- κ B 信号通路

Huatan Qushi Huoxue Recipe Intervened Nonalcoholic Steatohepatitis Rats by ADPN/AKT/NF- κ B Signal Pathway ZHAO Wen-xia¹, Zhang Li-hui¹, CUI Jian-jiao¹, YANG Xiao-qing¹, ZHANG Qiong-fang², and Xu Shun-chang² 1 Department of Digestion, First Affiliated Hospital, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou (450000); 2 Department of Pathology, First Affiliated Hospital, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou (450000); 3 First Clinical Medical college, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou (450000)

ABSTRACT **Objective** To observe effects of Huatan Qushi Huoxue Recipe (HQHR) on expressions of ADPN, AdipoR2, p-AKT(ser473), p-NF- κ Bp65(ser536) in non-alcoholic steatohepatitis

基金项目:国家自然科学基金面上项目(No.81473651);河南省中医药科研专项课题(No.2014ZY01012);河南省科技计划项目(No.152102310101)

作者单位:1.河南中医药大学第一附属医院脾胃肝胆科(郑州 450000);2.河南中医药大学第一附属医院病理科(郑州 450000);3.河南中医药大学第一临床医学院(郑州 450000)

通讯作者:赵文霞, Tel:0371-66220253, E-mail:zhao-wenxia@163.com

DOI: 10.7661/j. cjim. 20170630. 145

(NASH) rats by ADPN/AKT/NF- κ B signal pathway and its anti-inflammation. **Methods** Totally 72 male SD rats were randomly divided into blank group, model group, positive control group, high, middle, low dose HQHR groups, 12 in each group. Rats in the normal control group were fed with common forage. Rats in the rest groups were fed with high fat forage. Normal saline was administered to rats in the model group by gastrogavage (1 mL/100 g). Rats in the control group was administered with polyene choline phosphate (28.5 mg/100 g) by gastrogavage to rats in the positive control group. HQHR at 5.04, 2.52, 1.26 g/100 g was administered to rats in high, middle, and low dose HQHR groups by gastrogavage for 7 successive weeks. Levels of ALT, AST, ALP, TC, TG, and GLU in serum were detected. Liver histopathological changes were observed by HE staining. Protein expressions of ADPN, AdipoR2, p-AKT (ser473), and p-NF- κ Bp65 (ser536) were determined by immunohistochemistry. **Results** (1) Compared with the blank group, the levels of serum ALT, AST, ALP, TC, TG, and GLU were significantly increased in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, serum levels of ALT, AST, ALP, TC, TG, and GLU were significantly decreased in each medication group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the high dose HQHR group, serum levels of ALT, AST, ALP, TC, TG, and GLU increased significantly in the middle dose HQHR group, low dose HQHR group, and the positive control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Fine lipid droplets existed in cytoplasm of few hepatocytes of the high dose HQHR group. The boundary of hepatic lobules were clear and hepatic cords were radiatedly ranked. Lipid droplets of unequal sizes existed in partial hepatocytes of the middle dose HQHR group. Inflammatory infiltration existed in few headers. (2) Compared with the blank group, the protein expressions of ADPN, AdipoR2, and p-AKT (ser473) in the liver tissue decreased significantly, and the expression of p-NF- κ Bp65 (ser536) protein increased significantly in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the protein expressions of AdipoR2 and p-AKT (ser473) significantly increased, the expression of p-NF- κ Bp65 protein decreased significantly in each medication group ($P < 0.01$). The ADPN protein expression in liver tissue significantly increased ($P < 0.01$) in the high dose HQHR group, middle dose HQHR group, and the positive control group. Compared with the high dose HQHR group, protein expressions of ADPN and AdipoR2 in rat liver tissue significantly decreased, and p-NF- κ Bp65 protein expression significantly increased the low dose HQHR group, middle dose HQHR group, and the positive control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** HQHR could up-regulate protein expressions of ADPN, AdipoR2, and p-AKT (ser473) in liver tissue, inhibit p-NF- κ Bp65 (ser536) expression, thus effectively improving liver function, blood lipids, and blood glucose, reversing steatosis extent in NASH rat liver tissue, and attenuating inflammation of the liver.

KEYWORDS Huatan Qushi Huoxue Recipe; non-alcoholic steatohepatitis; ADPN/AKT/NF- κ B signal pathway

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是指非饮酒及其他明确损肝因素引起的,因多余脂肪积聚于患者肝脏,造成的以肝细胞弥漫性脂肪沉积(脂肪变性)为主的二次肝脂肪变性的临床病理综合征^[1]。非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)是 NAFLD 的终极形式,并常伴有进行性纤维化,长期可演变为肝硬化^[2,3]。研究发现脂联素(adiponectin, ADPN)能够抑制与炎性反应紧密相关的核转录因子 κ B (nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B) 的激活,减弱 NF- κ B 的核移位,从而降低肿瘤坏死因子- α (tumor

necrosis factor- α , TNF- α) 等炎症因子表达及分泌,对肝细胞损伤有重要保护作用^[4]。化痰祛湿活血方是河南中医药大学第一附属医院长期用于治疗 NASH 患者的临床有效经验方,近十年临床研究显示:化痰祛湿活血方可改善 NASH 患者胰岛素抵抗^[5,6],显著降低 NASH 患者 ALT、TG 水平,改善 BMI,提高肝/脾 CT 值^[7];动物及细胞实验研究显示:化痰祛湿活血方能够通过调控 AMPK/ACC/CPT-1 信号通路,增强脂肪酸的氧化,减少脂肪酸在肝内的沉积^[8,9],从而降低血清 ALT、AST、TC、TG 和肝匀浆游离脂肪酸(free fatty acids, FFA)水平,抑制肝

内脂肪合成^[10]。本研究在既往临床实验基础上,进一步探讨化痰祛湿活血方对 NASH 大鼠 ADPN/AKT/NF- κ B 信号通路中关键蛋白 ADPN、AdipoR2、p-AKT (ser473)、p-NF- κ Bp65 (ser536) 表达的影响及抗炎作用。

材料与方法

1 动物 健康雄性 SPF 级 SD 大鼠 72 只,体重 (200 $\pm$ 10) g。由河南省实验动物中心提供。动物合格证号:0008435。许可证号:SCXK (豫) 2010 - 0002。河南中医药大学动物实验中心清洁级动物房饲养,室温设置:20 ~ 25 $^{\circ}$ C,湿度 50% ~ 70%,自由饮水、进食,适应性饲养 1 周。

2 药物 多烯磷脂酰胆碱胶囊购于赛诺菲安万特 (北京) 制药有限公司,批号:4JD137。化痰祛湿活血方颗粒剂购于四川新绿色药业科技发展股份有限公司,药物组成:泽泻 30 g、海藻 15 g、决明子 10 g、郁金 15 g、丹参 15 g、山楂 15 g、柴胡 6 g、水飞蓟 15 g。给药剂量根据人与动物每千克体重剂量折算法^[11]:大鼠给药量 (mg/kg) = 折算系数 W $\times$ 人的给药量 (mg/kg),得出大鼠的化痰祛湿活血方等效剂量为 1.26 g/100 g,多烯磷脂酰胆碱胶囊等效剂量为 14.18 mg/100 g。设定化痰祛湿活血方低、中、高剂量分别为临床成人用量的 5、10、20 倍,多烯磷脂酰胆碱胶囊为临床成人用量的 10 倍。

3 试剂及仪器 血清 ALT、AST、ALP、TG、TC、GLU 检测试剂盒均购自深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司,货号分别为:140114025、140214021、1403114014、141714024、141614019、141514008;ADPN 多克隆抗体购自 R&D 公司,货号:AF3100;AdipoR2、p-AKT (Ser473)、p-NF- κ Bp65 (Ser536) 多克隆抗体、SP 检测试剂盒均购自北京博奥森生物技术有限公司,货号分别为:bs-0611R、bs-0876R、bs-0982R、SP-0023;全自动生化分析仪:深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司 (BS-220);半自动轮转式切片机:德国 Leica 公司 (RM2245);生物组织自动包埋机:德国 Leica 公司 (EG1150H);移液器:美国 Thermo Fisher 公司。

4 动物分组 适应性喂养 1 周后,按随机数字表法分为 6 组,每组 12 只:空白组、模型组、对照组、化痰祛湿活血方高剂量组 (高剂量组)、化痰祛湿活血方中剂量组 (中剂量组)、化痰祛湿活血方低剂量组 (低剂量组)。至实验结束,高剂量组因灌胃不当死亡 2 只,低剂量组因注射器损伤内脏死亡

4 只。

5 造模及给药方法 空白组予普通饲料、不给药,其余 5 组予高脂饲料 (84% 普通标准饲料 + 10% 猪油 + 5% 蛋黄粉 + 1% 胆固醇),造模第 1 天时腹腔注射 1 次四环素 (100 mg/kg),造模 1 周后每 6 天腹腔注射 1 次四环素 (70 mg/kg),共计 8 次;自造模第 2 周起,除空白组外,其余 5 组分别灌服生理盐水及相应药物。将药物溶于蒸馏水中制成混悬液,灌胃体积为每天 1 mL/100 g。模型组灌服生理盐水,对照组多烯磷脂酰胆碱胶囊配成 28.5 mg/mL 浓度灌胃给药,化痰祛湿活血方高、中、低剂量组分别配成 5.04、2.52、1.26 g/mL 浓度灌胃给药。各组大鼠每天定时灌胃,连续 6 天,停灌 1 天,连续 7 周。

6 观察指标及方法

6.1 标本的采集 10% 水合氯醛溶液 (0.3 mL/100 g) 经腹腔内注射麻醉大鼠,麻醉显效后剖开腹腔,于腹主动脉采血,0.5 h 内以 3 000 r/min 的转速离心 10 min 以分离血清,置入 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。迅速取出肝脏,吸水纸吸去附着液体,用冰生理盐水漂洗肝脏,在肝左叶中间部位取肝组织 8 块 (大小约 0.5 cm $\times$ 0.5 cm $\times$ 0.3 cm),置入放有 4% 多聚甲醛液的 50 mL EP 管中固定。

6.2 肝组织病理学观察 HE 染色。常规脱水透明、浸蜡、包埋、切片、烤片,浸入二甲苯 I、II 中脱蜡各 10 min,浸入无水乙醇 I、无水乙醇 II、95% 乙醇 I、95% 乙醇 II、80% 乙醇中各 3 min,脱去二甲苯,流水冲洗 1 min,苏木精染液中浸染 5 min,1% 盐酸酒精分化 3 s,流水冲洗 3 min,伊红染液浸染 3 min,流水冲 30 s,浸入 80% 乙醇 1 min,95% 乙醇 I、95% 乙醇 II 各 2 min,无水乙醇 I、无水乙醇 II 3 min,浸入二甲苯 I、II、III 透明处理,各 3 min,中性树胶封片,待晾干后观察。

6.3 血清 ALT、AST、ALP、TG、TC、GLU 水平检测 使用全自动生化分析仪,采用生化试剂盒检测,具体操作按说明书进行。

6.4 肝组织 ADPN、AdipoR2、p-AKT (Ser473)、p-NF- κ Bp65 (Ser536) 检测 采用免疫组化法,常规脱水透明、浸蜡、包埋、切片、烤片,入二甲苯 I、II 各 10 min,入无水乙醇 I、II 各 5 min,95% 乙醇 I、II 各 5 min,80% 乙醇 5 min,脱去二甲苯,蒸馏水浸泡 1 min,高压锅中煮沸 3 min,PBS 缓冲液冲洗 3 min $\times$ 3 次,3% H₂O₂ 液封闭 15 min,PBS 洗 2 min $\times$ 3 次,30% 鸡蛋清封闭,PBS 洗 3 min $\times$ 3 次,山羊血清 37 $^{\circ}$ C 封闭 15 min,滴加一抗 (ADPN

以 1:65 比例稀释,AdipoR2、p-AKT、p-NF-κBp65 以 1:75 比例稀释),4℃ 过夜,37℃ 复温,PBS 洗 3 min×3 次,滴加二抗皆以 1:200 比例稀释,37℃ 孵育 20 min,PBS 洗 3 min×3 次,滴加辣根酶标记链霉素卵白素液,37℃ 孵育 20 min,PBS 洗 3 min×3 次,DAB 显色 2~5 min,复染,封片。采用双盲读片法(对实验信息不知情的 2 名病理医师读片)。随机抽取切片 3 张/组,随机选取 5 个互不重叠的高倍视野(×400),对免疫组化结果进行评估。如存在异议,则重新读取。应用计算机彩色病理图像系统和 Image-Pro Plus6.0 图像分析软件,根据染色面积和强度进行半定量分析,平均光密度值 = 积分光密度/面积。

7 统计学方法 采用 SPSS 19.0 进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,经检验,数据符合正态分布且方差齐,使用单因素方差分析,进行组与组间的多重比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠血清 ALT、AST、ALP 水平比较(表 1)与空白组比较,模型组大鼠血清 ALT、AST、ALP 水平均明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,各用药组 ALT、AST、ALP 水平均有下降($P < 0.05$, $P < 0.01$);与高剂量组比较,对照组、中剂量组、低剂量组血清 ALT、AST、ALP 水平均有升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠血清 ALT、AST、ALP 水平比较 (U/L , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	ALT	AST	ALP
空白	12	42.93 ± 6.46	104.03 ± 15.95	85.84 ± 12.08
模型	12	116.13 ± 16.96 *	266.73 ± 49.28 *	154.56 ± 13.16 *
对照	12	74.68 ± 7.14 $\Delta\Delta\Delta$	185.45 ± 32.67 $\Delta\Delta$	118.98 ± 13.85 $\Delta\Delta\Delta$
高剂量	10	60.86 ± 7.68 $\Delta\Delta$	144.78 ± 31.49 Δ	102.62 ± 10.08 $\Delta\Delta$
中剂量	12	82.10 ± 4.37 $\Delta\Delta\Delta$	178.75 ± 35.12 $\Delta\Delta$	118.76 ± 17.00 $\Delta\Delta\Delta$
低剂量	8	90.63 ± 6.04 $\Delta\Delta\Delta$	225.81 ± 46.70 $\Delta\Delta$	131.33 ± 12.76 $\Delta\Delta\Delta$

注:与空白组比较, * $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与高剂量组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

2 各组大鼠血清 TC、TG、GLU 水平比较(表 2)与空白组比较,模型组大鼠血清 TC、TG、GLU 水平均明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,各用药组 TC、TG、GLU 水平均明显下降($P < 0.01$);与高剂量组比较,对照组、中剂量组、低剂量组 TC、TG、GLU 水平均升高($P < 0.01$)。

3 各组大鼠肝组织病理学变化(图 1) HE 染

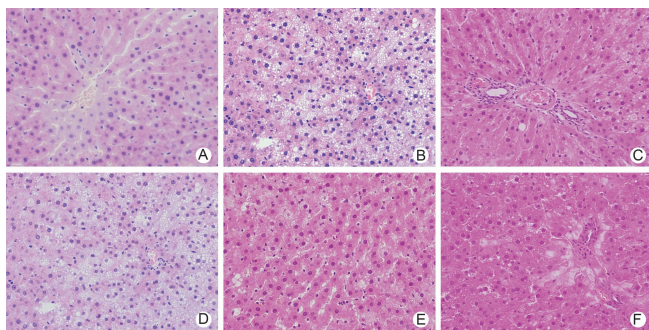
表 2 各组大鼠血清 TG、TG 及 GLU 水平比较

(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	TC	TG	GLU
空白	12	1.18 ± 0.05	0.94 ± 0.21	6.22 ± 0.65
模型	12	2.92 ± 0.19 *	2.01 ± 0.21 *	14.43 ± 1.80 *
对照	12	1.75 ± 0.16 $\Delta\Delta$	1.50 ± 0.22 $\Delta\Delta$	9.36 ± 1.26 $\Delta\Delta$
高剂量	10	1.60 ± 0.18 Δ	1.25 ± 0.20 Δ	8.05 ± 0.61 Δ
中剂量	12	1.84 ± 0.15 $\Delta\Delta$	1.56 ± 0.21 $\Delta\Delta$	9.81 ± 0.75 $\Delta\Delta$
低剂量	8	2.15 ± 0.29 $\Delta\Delta$	1.75 ± 0.29 $\Delta\Delta$	10.10 ± 1.12 $\Delta\Delta$

注:与空白组比较, * $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$;与高剂量组比较, $\Delta P < 0.01$

色显示空白组肝组织结构清晰;模型组肝细胞索紊乱,肝小叶结构欠清晰,大部分细胞肿胀,弥漫性脂肪变性,汇管区及小叶内存在炎细胞浸润和点状坏死灶。对照组肝小叶分界较模糊,肝细胞内可见大小不等的脂滴,汇管区偶见炎症细胞浸润。高剂量组少数肝细胞胞浆内有细小脂滴,小叶分界清晰,肝索呈放射状排列。中剂量组部分肝细胞存在大小不等的脂滴,少数汇管区有炎症细胞浸润。低剂量组肝索结构紊乱,肝腺泡 3 区和 2 区存在弥漫性的脂肪空泡,并可见气球样变细胞,汇管区仍见大量炎症细胞浸润。



注:A 为空白组;B 为模型组;C 为对照组;D 为低剂量组;E 为中剂量组;F 为高剂量组;下图同

图 1 各组大鼠肝组织病理学变化 (HE ×400)

4 各组大鼠肝组织 ADPN 表达(图 2,表 3)

空白组肝窦内皮细胞染色呈黄棕色,阳性表达较强;模型组、低剂量组少数肝窦内皮细胞阳性表达;对照组、中剂量组部分肝窦内皮细胞阳性表达;高剂量多数肝窦内皮细胞阳性表达。各组 ADPN 平均光密度提示:与空白组比较,模型组阳性表达降低($P < 0.01$);与模型组比较,高剂量、中剂量组及对照组 ADPN 阳性表达均有升高($P < 0.01$);与高剂量组比较,对照组、中剂量组、低剂量组 ADPN 阳性表达均有下降($P < 0.01$)。

5 各组大鼠肝组织 AdipoR2 表达(图 3,表 3)

空白组呈棕褐色染色,以中央静脉周围的肝细胞胞浆

表达最为聚集,阳性表达较强;模型组、低剂量组少数肝细胞胞浆淡褐色阳性表达;对照组、中剂量组部分肝细胞胞浆棕褐色阳性表达;高剂量组多数肝细胞胞浆棕褐色阳性表达。各组 AdipoR2 平均光密度提示:与空白组比较,模型组阳性表达降低($P < 0.01$);与模型组比较,各用药组 AdipoR2 表达均有升高($P < 0.01$);与高剂量组比较,对照组、中剂量组、低剂量组 AdipoR2 表达均有下降($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

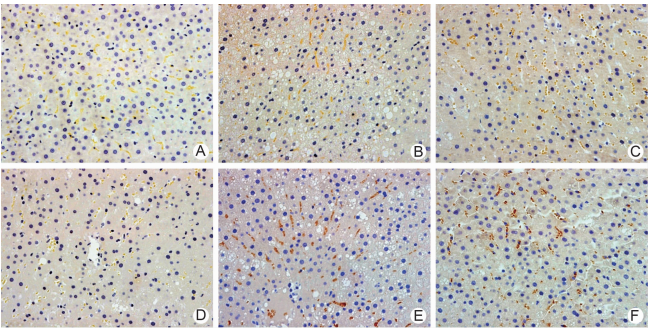


图2 各组大鼠肝组织 ADPN 表达 (免疫组化, ×400)

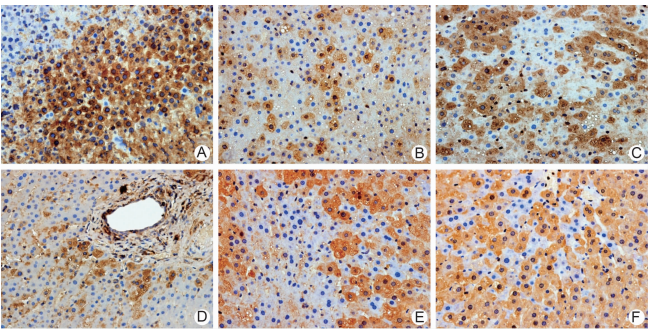


图3 各组大鼠肝组织 AdipoR2 表达 (免疫组化, ×400)

6 各组大鼠肝组织 p-AKT 表达(图 4, 表 3) 空白组多数肝细胞胞浆棕褐色阳性表达;模型组少数肝细胞胞浆淡褐色阳性表达;对照组、中剂量组部分肝细胞胞浆棕褐色阳性表达;低剂量组部分肝细胞胞浆淡褐色阳性表达;高剂量组多数肝细胞胞浆棕褐色阳性表达。各组 p-AKT 平均光密度提示:与空白组比较,

模型组 p-AKT(Ser473) 阳性表达降低($P < 0.01$);与模型组比较,各用药组 p-AKT(Ser473) 阳性表达均升高($P < 0.01$);各用药组间比较, p-AKT(Ser473) 阳性表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。

7 各组大鼠肝组织 p-NF-κBp65 表达(图 5, 表 3) 空白组偶见肝细胞胞浆和胞核褐色阳性表达;模型组多数肝细胞胞浆和胞核棕褐色阳性表达;对照组、中剂量组部分肝细胞胞浆和胞核棕褐色阳性表达;低剂量组部分肝细胞胞浆和胞核淡褐色阳性表达;高剂量组少数肝细胞胞浆和胞核棕褐色阳性表达。各组 p-NF-κBp65 平均光密度提示:与空白组比较,模型组 p-NF-κBp65(Ser536) 阳性表达升高($P < 0.01$);与模型组比较,各用药组 p-NF-κBp65(Ser536) 阳性表达下降($P < 0.01$);与高剂量组比较,对照、中剂量、低剂量组 p-NF-κBp65(Ser536) 阳性表达升高($P < 0.01$)。

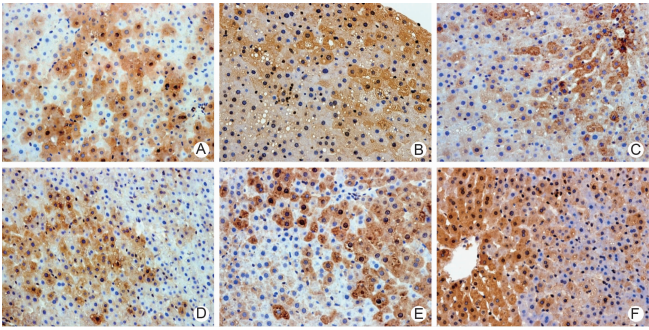


图4 各组大鼠肝组织 p-AKT 比较 (免疫组化, ×400)

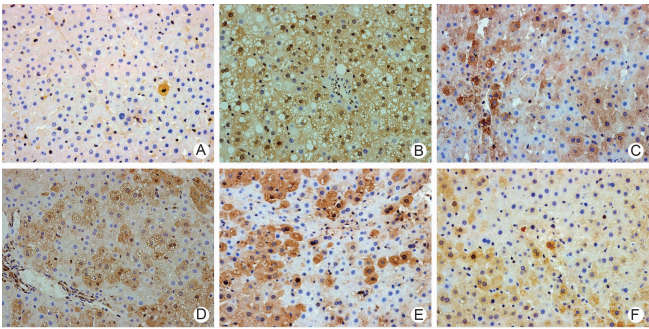


图5 各组大鼠肝组织 p-NF-κBp65 表达 (免疫组化, ×400)

表3 大鼠肝组织 ADPN、AdipoR2、p-AKT、p-NF-KBp65 平均光密度比较 ($\bar{x} \pm s$)					
组别	n	ADPN	AdipoR2	p-AKT	p-NF-κBp65
空白	12	0.098 1 ± 0.012 6	0.193 3 ± 0.025 5	0.193 0 ± 0.029 0	0.077 3 ± 0.014 4
模型	8	0.064 0 ± 0.009 8 *	0.132 7 ± 0.014 4 *	0.085 9 ± 0.019 7 *	0.216 0 ± 0.027 5 *
对照	10	0.080 0 ± 0.014 6 ▲▲▲	0.166 7 ± 0.017 2 ▲▲▲	0.133 8 ± 0.024 6 ▲	0.108 0 ± 0.015 2 ▲▲▲
低剂量	12	0.064 1 ± 0.009 8 ▲▲	0.154 7 ± 0.013 0 ▲▲	0.123 2 ± 0.012 1 ▲	0.122 0 ± 0.015 7 ▲▲▲
中剂量	12	0.080 0 ± 0.008 4 ▲▲▲	0.171 3 ± 0.016 8 ▲▲	0.125 9 ± 0.030 9 ▲	0.113 3 ± 0.016 8 ▲▲▲
高剂量	12	0.094 1 ± 0.011 8 ▲	0.211 3 ± 0.028 2 ▲	0.135 4 ± 0.024 3 ▲	0.092 7 ± 0.014 9 ▲

注:与空白组比较, * $P < 0.01$;与模型组比较, ▲ $P < 0.01$;与高剂量组比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$

讨 论

ADPN 主要位于肝门静脉和肝窦内皮细胞,通过与其受体结合^[12]而发挥作用。AdipoR2 主要位于肝细胞胞质内。Kaser S 等^[13]研究发现,NASH 患者肝脏中 AdipoR2 含量显著减少,且与血清 ALT、AST 水平及肝纤维化程度呈负相关。提示 AdipoR2 在防治 NASH 的过程中发挥一定的作用。p-AKT (Ser473) 的表达主要位于肝细胞胞浆,呈膜下型、全浆型表达。Akt 是 NF- κ B 的生理活化剂之一^[14], PI3K/AKT 信号途径可能是 NF- κ B 的上游激活信号^[15]。NF- κ B 由 p50 和 p65 亚基组成,NF- κ Bp65 是 NF- κ B 的活化组分^[16]。研究发现:ADPN 能够与 AdipoR2 结合,启动 ADPN/AKT/NF- κ B 信号通路,通过激活 PI3K 而调节下游效应激酶 AKT 在 S473 位点的磷酸化,使其具有激酶活性,抑制下游靶蛋白 NF- κ B 的解离及核移位,从而减少 TNF- α 、IL-1、IL-6 等炎症细胞因子的产生,阻止肝脏炎症反应^[17-21]。

NASH 的临床表现属于“肝癖”范畴,其病因与饮食不节、形体肥胖、多卧少动密切相关,脾气亏虚,运化失职致肝失条达、痰湿内停、瘀血阻络是本病的主要病机。宜标本同治,以健脾疏肝、利湿祛痰、活血化瘀为治法,研制成化痰祛湿活血方^[8-12]。方中泽泻利水渗湿,丹参活血化瘀,共为君药;郁金行气活血,海藻软坚消痰,山楂消食化瘀,共为臣药;决明子清肝利湿,水飞蓟清热舒肝,共为佐药;柴胡疏肝解郁,引药归经,使肝气条达,癖气得散,瘀血得化。

现代药理研究发现泽泻具有明显的降脂作用^[22]。范建高^[23]研究发现,泽泻可通过降低 TC、TG 水平,减少 FFA 含量,从而降低 MDA,增强抗氧化能力,发挥保肝作用。闫蕾等^[24]研究证实丹参可通过降低 IL-6 及 TNF- α 水平,进而抑制肝细胞炎症程度,减轻肝组织损伤,达到防治 NAFLD 的疗效。郭建利等^[25]证实丹参可显著降低 NAFLD 大鼠血清 TC、TG、ALT、AST 含量,降低肝组织中 MDA 含量,改善肝内脂质代谢。秦华珍等^[26]研究郁金可通过降低肝纤维化大鼠肝组织中 Hyp、MDA 的表达,升高 SOD、GSH-Px 的含量,有良好的抗脂质过氧化作用。罗先钦等^[27]发现山楂总黄酮通过增加 LDL-R mRNA 及其蛋白的表达,达到防治大鼠脂肪肝的作用。刘月丽等^[28]发现决明子可明显降低 NAFLD 大鼠肝组织中 MDA 和 NO 水平,提高 T-SOD、NOS 活性,增强抗氧化能力,防止脂肪肝向肝炎、肝硬化发展。高学梅等^[29]表明水飞蓟素能够通过抑制肝脏 KCs NF- κ B

亚基 p65 mRNA 的表达,进而减少下游炎症因子 IL-6、ICAM-1 等的产生,从而达到保肝作用。

研究表明,化痰祛湿活血方能通过 ADPN/AKT/NF- κ B 通路上调肝组织中 ADPN、AdipoR2、p-AKT (ser473) 的表达,抑制 p-NF- κ Bp65 (ser536) 的表达,从而有效改善肝功能、血脂及 NASH 大鼠肝组织脂肪变程度,减轻肝脏炎症。推测这可能是其防治 NASH 的作用机制之一。

参 考 文 献

- [1] Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology [J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(7): 1592-1609.
- [2] Vernon G, Baranova A, Younossi ZM, et al. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2011, 34(3): 274-285.
- [3] Gambino R, Cassader M, Pagano G, et al. Meta-analysis: Natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity [J]. *Ann Med*, 2011, 43(8): 617-649.
- [4] Bianchi G, Bugianesi E, Frystyk J, et al. Adiponectin isoforms, insulin resistance and liver histology in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Dig Liver Dis*, 2011, 43(1): 73-77.
- [5] 赵文霞, 刘全忠, 夏瑾瑜, 等. 中医优化方案治疗非酒精性脂肪性肝炎的临床研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(23): 246-249.
- [6] 赵文霞, 张玉禄. 消脂护肝胶囊对非酒精性脂肪肝患者胰岛素抵抗及瘦素水平的影响 [J]. *中医研究*, 2005, 18(5): 21-23.
- [7] 赵文霞, 刘君颖, 孟祥林. 化痰泻浊方联合饮食运动治疗非酒精性脂肪性肝炎患者 TG、ALT、及 BMI 的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2012, 27(3): 654-656.
- [8] 赵文霞, 刘晓燕, 石艳芬. 消脂护肝胶囊对非酒精性脂肪肝病大鼠病理及 PPAR α 基因的影响 [J]. *中医杂志*, 2007, 48(11): 1020-1023.
- [9] 赵文霞, 刘晓燕, 段荣章. 消脂护肝胶囊对非酒精性脂肪肝病大鼠病理及 CYP2E1 基因的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2007, 22(6): 363-366.
- [10] 赵文霞, 刘雪涛, 闫乐. 泽参颗粒对脂肪变 LO2 细胞

- ADPN/AMPK 信号通路的影响[J]. 肝脏, 2014, 19(6): 448-450.
- [11] 丁虹主编. 实验药理学[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 88.
- [12] Yalniz M, Bahcecioglu IH, Ataseven H, et al. Serum adipokine and ghrelin levels in nonalcoholic steatohepatitis [J]. Mediators Inflamm, 2006, 2006(6): 34295.
- [13] Kaser S, Moschen A, Cayon A, et al. Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis[J]. BMJ, 2005, 54(1): 117-121.
- [14] Zdychová J, Komers R. Emerging role of Akt kinase/protein kinase B signaling in pathophysiology of diabetes and its complications[J]. Physiol Res, 2005, 54(1): 1-16.
- [15] Venkatesan B, Valente AJ, Prabhu SD, et al. EMMPRIN activates multiple transcription factors in cardiomyocytes, and induces interleukin-18 expression via Rac1 dependent PI3K/Akt/IKK/NF-kappaB and MKK7/JNK/AP-1 signaling[J]. J Molec Cellular Cardiol, 2010, 49(4): 655-663.
- [16] Choi KM, Ryu OH, Lee KW, et al. Serum adiponectin, interleukin-10 Levels and inflammatory markers in the metabolic syndrome[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2007, 75(2): 235-240.
- [17] Mao X, Kikani CK, Riojas RA, et al. APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function [J]. Nat Cell Biol, 2006, 8(5): 516-523.
- [18] Pearce LR, Komander D, Alessi DR. The nuts and bolts of AGC protein kinases [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010, 11(9): 9-22.
- [19] Raetzsch CF, Brooks NL, Alderman JM, et al. Lipopolysaccharide inhibition of glucose production through the Toll-like receptor-4, myeloid differentiation factor 88, and nuclear factor kappa b pathway[J]. Hepatology, 2009, 50(2): 592-600.
- [20] Holland WL, Bikman BT, Wang LP, et al. Lipid-induced insulin resistance mediated by the proinflammatory receptor TLR4 requires saturated fatty acid-induced ceramide biosynthesis in mice [J]. J Clin Invest, 2011, 121(5): 1858-1870.
- [21] Awazawa M, Ueki K, Inabe K, et al. Adiponectin enhances insulin sensitivity by increasing hepatic IRS-2 expression via a macrophage-derived IL-6-dependent pathway [J]. Cell Metab, 2011, 13(4): 401-412.
- [22] 胡雪峰, 成忠煌, 王松迪, 等. 泽泻汤降血脂作用研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(9): 2073.
- [23] 范建高. 重视慢性病毒性肝炎合并脂肪肝的诊断与治疗[J]. 中华肝脏病杂志, 2009, 17(11): 801-803.
- [24] 闫蕾, 张洪宇, 郭英君. 丹参注射液对非酒精性脂肪肝炎症因子 IL-6、TNF- α 的影响[J]. 亚太传统医药, 2014, 10(24): 10-11.
- [25] 郭建利, 张睦清, 韩雪. 丹参不同组分防治大鼠非酒精性脂肪肝模型作用机制的研究[J]. 河北中医药学报, 2012, 27(1): 8-9.
- [26] 秦华珍, 李彬, 时博. 广西桂郁金对肝纤维化大鼠肝脏组织病理的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(7): 130-133.
- [27] 罗先钦, 黄崇刚, 伍小波. 山楂总黄酮对复合因素致大鼠脂肪肝模型脂质代谢与低密度脂蛋白受体表达的影响[J]. 中草药, 2011, 42(7): 1367-1373.
- [28] 刘月丽, 陈依雨, 吕俊华, 等. 决明子对脂肪肝大鼠肝组织抗氧化能力的影响[J]. 海南医学院学报, 2014, 20(12): 1617-1618.
- [29] 高学梅, 洪汝涛, 李俊. 水飞蓟素抑制大鼠酒精性脂肪肝库普弗细胞 NF- κ B 活性的研究[J]. 安徽医科大学学报, 2014, 49(9): 1242-1245.

(收稿:2016-02-06 修回:2017-06-13)

责任编辑:李焕荣

英文责编:张晶晶