

· 基础研究 ·

茵陈黄口服液治疗非酒精性脂肪性
肝炎大鼠的机制研究

刘晓琳 信丰智 杨蕊旭 赵泽华 周达 潘勤 范建高

摘要 **目的** 探讨茵陈黄口服液治疗非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)的作用通路及分子机制。**方法** 将 30 只 SD 大鼠随机均分为 3 组:对照组给予普通饮食;模型组给予高脂饮食和生理盐水灌胃;治疗组给予高脂饮食和茵陈黄口服液灌胃,持续 16 周。肝脏切片进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin)、油红 O 和 Masson 染色进行病理学评估,血清测定转氨酶和血脂血糖,肝脏匀浆后测定肝内甘油三酯水平。每组随机选 4 只大鼠,提取肝脏 RNA 进行 RNA 和小 RNA 测序,提取蛋白进行蛋白质谱检测,差异基因和蛋白进行 KEGG 通路富集分析。**结果** 模型组大鼠造模成功,均发展为 NASH,与模型组比较,治疗组大鼠体重、肝指数和脂肪指数显著降低,血清谷丙转氨酶(alanine transaminase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate transaminase, AST)、总胆红素(total bilirubin, TBIL)、总胆固醇(total-cholesterol, TC)、空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)和肝脏甘油三酯(triglyceride, TG)水平显著下降且肝脏脂肪变、气球样变和小叶炎症水平出现缓解。模型组比对照组显著升高且治疗组比模型组显著下降的交集基因有 56 个、miRNA 有 51 个、蛋白 35 个,KEGG 通路分析发现富集于 Toll 样受体、过氧化物酶体增殖物活化受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)、核转录因子(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factors, TNF)、脂肪酸代谢和胰岛素抵抗信号通路等;模型组比对照组显著降低且治疗组比模型组显著升高的交集基因有 7 个、miRNA 有 36 个、蛋白 35 个,它们主要富集于氧化磷酸化、PPAR、丙酮酸代谢、非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)等相关通路。**结论** 茵陈黄口服液可以通过抑制脂质合成与促进脂质氧化代谢、抑制氧自由基的产生以及抑制炎症相关蛋白和多种趋化因子来缓解 NASH。

关键词 非酒精性脂肪性肝炎;茵陈黄口服液;系统生物学;作用机制

Mechanism of Yinzh Huang Oral Liquid on Non-alcoholic Steatohepatitis Rats LIU Xiao-lin, XIN Feng-zhi, YANG Rui-xu, ZHAO Ze-hua, ZHOU Da, PAN Qin, and FAN Jian-gao Department of Gastroenterology, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai (200092)

ABSTRACT **Objective** To observe the pathway and molecular mechanism of Yinzh Huang Oral Liquid (YZHOL) for treating high fat diet induced non-alcoholic steatohepatitis (NASH) rats. **Methods** A total of 30 SD rats were randomly divided into 3 groups, the control group, the model group, and the treatment group. Rats in the control group were fed with standard diet. Rats in the model group were fed with high fat diet (HFD) and intragastrically administered with normal saline. Those in the treatment group were fed with HFD and intragastrically administered with YZHOL. All medication lasted for 16 consecutive weeks. At the end of the 16th week, liver slices were stained with HE, oil red O, and Masson. Pathological

基金项目: 国家科技部精准诊疗项目(No. 2017YFSF090203); 国家自然科学基金项目(No. 81470840, No. 81873565); 上海市领军人才计划(No. 2017019)

作者单位: 上海交通大学医学院附属新华医院消化内科(上海 200092)

通讯作者: 范建高, Tel: 021-25077340, E-mail: fanjiangao@xinhuaumed.com.cn

DOI: 10.7661/j.cjim.20180929.291

assessment was performed. Serum levels of aminotransferases, lipids, and glucose were measured. Hepatic triglyceride (TG) level was determined after liver homogenate. Four rats were randomly selected from each group to extract hepatic RNA to perform RNA and small RNA sequencing, and protein was extracted to perform mass spectrometric detection. Differentially expressed genes and proteins were selected to perform KEGG pathway enrichment analyses. Results All rats in the model group developed NASH. Compared with the model group, body weight, liver index, and fat index decreased significantly in the treatment group. Serum levels of alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), total bilirubin (TBIL), total cholesterol (TC), fasting blood glucose (FBG), and hepatic triglyceride (TG) significantly decreased in the treatment group. Hepatic steatosis, ballooning, and lobular inflammation were relieved. A total of 56 mRNAs, 51 miRNAs, and 35 proteins were found to significantly decrease in the model group than in the control group and to decrease in the treatment group than in the model group. The KEGG pathway analysis of them were enriched in Toll like receptor, peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR), nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B), tumor necrosis factors (TNF), fatty acid metabolism, and insulin resistance pathway. But 7 mRNAs, 36 miRNAs, and 35 proteins were found to significantly decrease in the model group than in the control group and to significantly increase in the treatment group than in the model group, and they were mainly enriched in oxidative phosphorylation, PPAR, pyruvate metabolism, and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) related signaling pathways. Conclusion YZHOL could alleviate NASH by inhibiting lipid synthesis and promoting lipid oxidation, preventing the production of oxygen free radicals, and down-regulating inflammation related proteins and chemokines.

KEYWORDS non-alcoholic steatohepatitis; Yinzh Huang Oral Liquid; systems biology; mechanism

在非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)的疾病进展中,非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)是非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver, NAFL)发展为肝硬化和肝癌的必经阶段,也是病情恶化的转折点;如果 NASH 不积极治疗,有可能进展为肝硬化和肝细胞癌等不可逆的肝脏损伤^[1]。NASH 已成为慢性肝脏疾病最常见的病因,也是肝移植的第二大指征,因此对 NASH 进行干预具有重要临床意义^[2]。亚太工作组发布的 NAFL 指南提出,对于不能严格遵守生活方式干预的 NAFLD 患者、以及伴或不伴肝纤维化的 NASH 患者,应该实施药物干预^[3]。但世界各地的 NAFLD 防治指南均未推荐可用于 NASH 的常规治疗药物^[4]。因此,研发可作用于 NASH 复杂病理过程的有效治疗药物迫在眉睫^[5]。

茵栀黄口服液是一种中药复方制剂,由茵陈、栀子、黄芩和金银花的提取物制成,具有清热解毒、利湿退黄的功效^[6]。茵栀黄口服液已被证实可用于治疗新生儿黄疸和肝内胆汁淤积等疾病,其疗效显著且副作用较小^[7,8]。同时,在药物毒物诱导的肝损伤小鼠模型中,茵栀黄口服液被证实可有效地降低血清转氨酶和胆红素水平^[9,10]。有临床报道,66 例 NAFLD 患者给予茵栀黄口服液治疗 12 周,可显著改

善其肝酶、血清胆红素、甘油三酯和总胆固醇等血生化指标,且无明显不良反应^[11]。笔者前期实验证实,在蛋氨酸胆碱缺乏饮食诱导的 NASH 大鼠中,茵栀黄口服液也可明显改善 NASH 大鼠的肝脏脂肪变、气球样变、小叶炎症和纤维化等肝脏组织学评分^[12]。但其具体的作用机制目前尚未有研究报道。

本实验采用 RNA 测序、小 RNA 测序和蛋白质谱联合技术,分析了茵栀黄口服液对高脂饮食诱导的 NASH 大鼠的治疗作用,以期初步揭示茵栀黄口服液治疗 NASH 的作用通路及分子机制。

材料与方法

1 材料

1.1 动物 30 只 6 周龄雄性 SD 大鼠购于上海中科院实验动物中心[No.SCXK(沪)2016-0002],饲养于上海睿太莫斯生物科技有限公司[No.SYXK(沪)2016-0004],恒温恒湿,自由进食和饮水。本动物实验方案经过上海睿太莫斯生物科技有限公司实验动物伦理委员会审核批准(No.SHRM-IACUC-001),符合动物保护、动物福利和伦理原则,符合国家实验动物福利伦理的相关规定。

1.2 药物 茵栀黄口服液由茵陈提取物 12 g 栀子提取物 6.49 g 黄芩提取物 40 g 金银花提取物

8 g 组成,是根据茵陈蒿汤结合茵栀黄注射液的有效成分改剂型而成的中成药制剂。该实验根据前期研究^[13]使用 $[15 \text{ mL}/(\text{kg} \cdot \text{d})]$ 的剂量给予大鼠灌胃。

1.3 主要试剂及仪器 普通饲料购于上海斯莱克实验动物有限责任公司,高脂饲料(high fat diet, HFD;88%基础饲料+10%猪油+2%胆固醇)购于南通特洛菲饲料科技有限公司,戊巴比妥钠购于 SigmaAldrich 公司,4%多聚甲醛购于上海国药集团化学试剂有限公司,HE 和 Masson 染剂购于 BASO 生物科技有限公司,油红 O 染色试剂盒购于上海源叶生物科技有限公司,甘油三酯(triglyceride, TG)测定试剂盒购于南京建成生物工程研究所。RNA 测序、小 RNA 测序和蛋白质谱仪由深圳华大基因科技有限公司提供。

2 方法

2.1 动物分组和处理 适应性饲养 1 周后,大鼠被随机均分成 3 组,每组 10 只。对照组给予普通饮食;模型组给予 HFD,并于第 8 周末给予生理盐水灌胃 $[15 \text{ mL}/(\text{kg} \cdot \text{d})]$;治疗组给予 HFD 的同时,于第 8 周末给予茵栀黄口服液灌胃 $[15 \text{ mL}/(\text{kg} \cdot \text{d})]$ 。第 16 周末,将所有大鼠隔夜禁食后称重,麻醉,取下腔静脉血,分离血清;取肝脏和附睾脂肪,分别称重,计算肝指数(肝重/体重 $\times 100\%$)和脂肪指数(附睾脂重/体重 $\times 100\%$)。将一部分肝脏置于 10%福尔马林中固定,其余样本于液氮中保存。根据脂肪变、活动度、纤维化(SAF)诊断标准^[14]判断模型组大鼠是否发展为 NASH。

2.2 观察指标及检测方法

2.2.1 肝脏病理和肝内 TG 水平 将福尔马林固定好的肝脏组织用石蜡包埋,切片后进行 HE 染色和 Masson 染色;将冰冻肝脏组织在冰冻机切片,进行油红 O 染色。对大鼠肝脏切片进行病理学特征评分,包括肝脏脂肪变、气球样变、小叶炎症和肝纤维化。将肝脏匀浆后使用 TG 测试盒测定肝内 TG 水平。

2.2.2 血清生化指标的测定 使用全自动生化分析仪进行血清谷丙转氨酶(alanine transaminase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate transaminase, AST)、总胆红素(total bilirubin, TBIL)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、TG、高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)、空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)的测定。

2.2.3 RNA 测序分析 每组大鼠随机选取 4 个肝脏样本使用 Trizol 试剂盒提取总 RNA,用带有

Oligo dT 的磁珠富集有 polyA 尾巴的 mRNA,用打断缓冲液把获得的 RNA 片段化,随机的 N6 引物进行反转录,合成 cDNA 二链形成双链 DNA。把合成的双链 DNA 末端补平并修饰,通过特异的引物进行 PCR 扩增。PCR 产物热变性成单链,再用一段桥式引物将单链 DNA 环化得到单链环状 DNA 文库,上机测序。将原始测序数据进行质控、过滤、比对。随后用 RSEM 工具进行基因表达定量,使用 NOIseq 方法根据差异倍数 ≥ 2 且偏离概率值 ≥ 0.8 的标准,筛选差异表达基因。随后采用聚类分析来判断组间差异基因在不同实验条件下的表达模式,用热图表示;分别对模型组/对照组和治疗组/模型组进行差异基因筛选,并以 FP-KM 值进行聚类,红色表示高表达基因,绿色表示低表达基因。最后在 KEGG 数据库中进行差异基因的 Pathway 显著性富集分析,Q 值 <0.05 的 Pathway 为在差异表达基因中显著富集。

2.2.4 小 RNA 测序分析 将肝脏总 RNA 用 PAGE 电泳切胶分离 18-30 nt 的 RNA。将 3'接头连接 RNA 的 3'端,加入 RT 引物杂交,5'接头连接产物的 5'端。以 RT 引物进行逆转录延伸,合成一链 cDNA,随后使用高敏聚合酶对 cDNA 进行扩增。使用 PAGE 电泳分离 100~120 bp 范围 PCR 产物,进行文库定量及 pooling 环化,上机测序。测序所得序列通过数据过滤和比对后,使用 TPM 计算公式标准化 miRNA 的表达水平,用于后续差异比较分析。使用 DEGseq 方法根据差异倍数 ≥ 2 且 Q 值 ≤ 0.001 筛选显著的差异表达 miRNA。使用 RNAhybrid、miRanda 和 TargetScan 数据库预测 miRNA 的靶基因,并对其进行 KEGG 的 pathway 注释。Q 值 <0.05 的 Pathway 定义为在差异 miRNA 中显著富集。

2.2.5 蛋白质谱检测 将每组随机选取的 4 只大鼠各取 100 mg 肝脏组织加入 1 mL 裂解液提取总蛋白,对肝脏蛋白溶液进行定量后用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测样品完整性,随后对蛋白进行酶解,使用 ITRAQ 标签试剂进行肽段标记。采用岛津 LC-20AB 液相系统 Gemini C18 柱对样品进行液相分离,通过岛津 LC-20AD 纳升液相色谱仪进行高效液相分离。经过液相分离的肽段进入到 ESI 串联质谱仪进行质谱检测。原始质谱数据用 Mascot 蛋白质鉴定软件比对 NCBInr 数据库搜索鉴定。随后使用 IQuant 软件进行 ITRAQ 定量分析,分别在肽段和蛋白水平进行两次 FDR 过滤($\text{FDR} \leq 0.01$),筛选显著差异蛋白,最后进行差异蛋白 Pathway 富集分析。

2.3 统计学方法 采用 SPSS 16.0 进行数据

分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析联合 SNK 检验。GraphPad Prism 6.0 进行绘图。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。RNA 及小 RNA 测序和蛋白质谱的统计分析方法分别见上述。

结 果

1 3 组大鼠体重、肝指数、脂肪指数比较(表 1)

实验中无大鼠出现意外死亡。第 16 周末,模型组大鼠体重、肝指数和脂肪指数均高于对照组($P < 0.01$),治疗组大鼠体重、肝指数和脂肪指数均低于模型组($P < 0.01$)。

表 1 3 组大鼠的体重、肝指数、脂肪指数比较 ($\bar{x} \pm s$)				
组别	n	体重(g)	肝指数(%)	脂肪指数(%)
对照	10	566.7 $\pm$ 8.1	2.41 $\pm$ 0.05	0.79 $\pm$ 0.11
模型	10	661.7 $\pm$ 15.8 *	4.20 $\pm$ 0.09 *	1.70 $\pm$ 0.21 *
治疗	10	610.1 $\pm$ 10.2 Δ	3.40 $\pm$ 0.08 Δ	0.69 $\pm$ 0.11 Δ

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

2 3 组大鼠血清生化指标比较(表 2) 与对照组比较,模型组大鼠的 ALT、AST、TC、TG、LDL 及肝脏 TG 水平均升高,HDL 降低($P < 0.05$),而与模型组比较,茵栀黄口服液组大鼠 ALT、AST、TBIL、TC、FBG 和肝脏 TG 水平均降低($P < 0.05$)。

3 3 组大鼠肝脏病理特征比较(图 1) 与对照组比较,模型组大鼠的肝脏脂肪变、气球样变和小叶炎症显著,同时有 3 只出现轻度肝纤维化,所有大鼠均发展为 NASH。与模型组比较,治疗组大鼠的肝脏脂肪

变、气球样变和小叶炎症评分均降低;无大鼠出现肝纤维化。但因模型组的肝纤维化不明显,故不能认为茵栀黄口服液对肝纤维化有改善作用。

4 3 组大鼠的肝脏差异 mRNA 分析(表 3) 模型组与对照组比较,共有差异基因 308 个,其中 261 个上调,47 个下调;而治疗组与模型组比较,差异基因有 89 个,其中 16 个上调,73 个下调。模型组升高且治疗组下调的基因共 56 个,它们富集于 Toll 样受体信号通路、NOD 样受体信号通路、PPAR 信号通路、NF- κ B 信号通路、TNF 信号通路和脂肪酸代谢信号通路,而治疗组出现逆转。同时筛选出在 NASH 状态下降且 YZH 治疗后上调的基因共 7 个,包括 Amdhd1、Fads1、Adh4、Adh6、Sds、Got1 和 Sult2a1,它们是氨基酸水解酶、脂肪酸脱氢酶 1、乙醇脱氢酶 4、乙醇脱氢酶 6、丝氨酸脱氢酶、天冬氨酸转氨酶和磺基转移酶的编码基因。

5 3 组大鼠肝脏差异 miRNA 分析(表 4) 与对照组比较,模型组大鼠肝脏有 190 个 miRNA 显著上调,82 个下调;与模型组比较,治疗组大鼠肝脏有 188 个 miRNA 显著上调,86 个下调。其中模型组较对照组升高且治疗组较模型组降低的 miRNA 共有 51 个,模型组较对照组降低且治疗组较模型组升高的基因共有 36 个。模型组,磷脂酰肌醇信号系统、胰岛素抵抗通路等被激活,而在治疗组这些通路被抑制;而胆碱代谢、AMPK 信号通路和 PPAR 信号通路等在模型组中被抑制,在治疗组这些通路被激活。

表 2 3 组大鼠生化指标比较 ($\bar{x} \pm s$)										
组别	n	ALT	AST	TBIL	TC	TG	HDL	LDL	FBG	肝脏 TG
		(U/L)		(μ mol/L)			(mmol/L)			(mmol/g)
对照	10	37.4 $\pm$ 1.9	92.1 $\pm$ 5.6	1.01 $\pm$ 0.06	0.71 $\pm$ 0.08	1.59 $\pm$ 0.05	0.33 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.01	8.82 $\pm$ 0.39	0.10 $\pm$ 0.01
模型	10	114.3 $\pm$ 26.7 *	160.1 $\pm$ 16.8 *	1.14 $\pm$ 0.22	1.28 $\pm$ 0.12 *	2.36 $\pm$ 0.18 *	0.25 $\pm$ 0.01 *	0.42 $\pm$ 0.04 *	8.51 $\pm$ 0.53	0.33 $\pm$ 0.02 *
治疗	10	39.0 $\pm$ 2.1 Δ	100.6 $\pm$ 6.8 Δ	0.58 $\pm$ 0.05 Δ	0.65 $\pm$ 0.07 Δ	2.54 $\pm$ 0.26	0.22 $\pm$ 0.01	0.35 $\pm$ 0.04	6.38 $\pm$ 0.47 Δ	0.25 $\pm$ 0.02 Δ

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

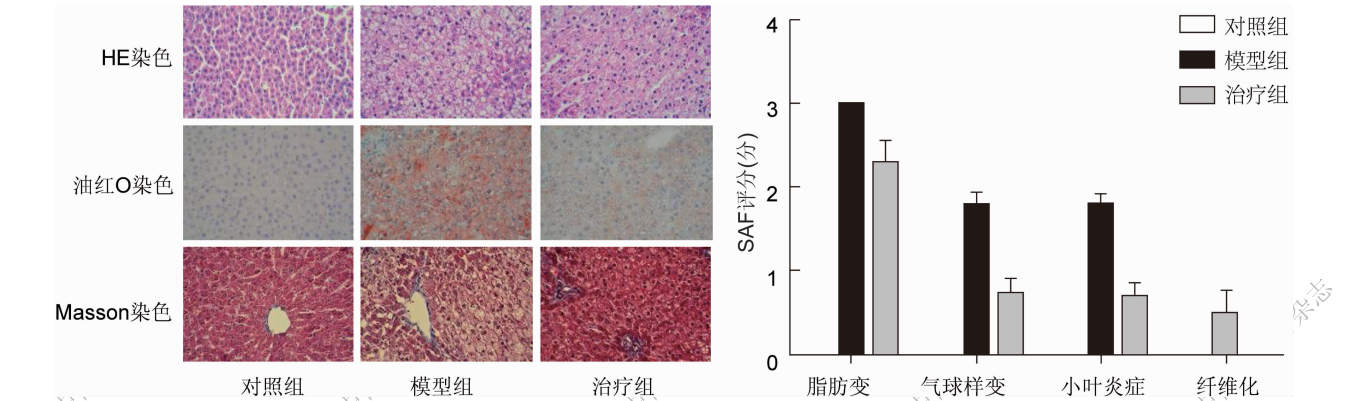


图 1 3 组大鼠肝脏病理特征比较 (×400)

表 3 3 组大鼠肝脏的 mRNA 富集通路

ID	名称	基因 个数	Q 值
rno04062	Chemokine_signaling_pathway	9	0.000 00
rno04620	Toll-like_receptor_signaling_pathway	7	0.000 00
rno04060	Cytokine-cytokine_receptor_interaction	7	0.000 01
rno04621	NOD-like_receptor_signaling_pathway	6	0.000 01
rno03320	PPAR_signaling_pathway	4	0.000 12
rno04657	IL-17_signaling_pathway	4	0.000 21
rno04064	NF-kappa_B_signaling_pathway	4	0.000 22
rno04668	TNF_signaling_pathway	4	0.000 34
rno01212	Fatty_acid_metabolism	3	0.000 63
rno01040	Biosynthesis_of_unsaturated_fatty_acids	2	0.003 74

表 4 3 组大鼠肝脏的 miRNA 预测靶基因富集通路

ID	名称	基因 个数	Q 值
模型组/对照组上调且治疗组/模型组下调			
rno04070	Phosphatidylinositol_signaling_system	12	0.000 01
rno04120	Ubiquitin_mediated_proteolysis	9	0.009 56
rno00562	Inositol_phosphate_metabolism	6	0.013 91
rno01521	EGFR_tyrosine_kinase_inhibitor_resistance	6	0.016 34
rno04931	Insulin_resistance	7	0.020 49
rno04730	Long-term_depression	5	0.021 18
rno00600	Sphingolipid_metabolism	4	0.036 55
rno04150	mTOR_signaling_pathway	8	0.043 04
模型组/对照组下调且治疗组/模型组上调			
rno04115	p53_signaling_pathway	11	0.000 76
rno04068	FoxO_signaling_pathway	16	0.000 87
rno00072	Synthesis_and_degradation_of_ketone_bodies	4	0.003 34
rno04152	AMPK_signaling_pathway	14	0.003 48
rno03320	PPAR_signaling_pathway	10	0.006 75
rno04150	mTOR_signaling_pathway	14	0.017 81
rno05231	Choline_metabolism_in_cancer	10	0.020 73
rno04151	PI3K-Akt_signaling_pathway	24	0.035 89

6 3 组大鼠的肝脏差异蛋白分析(表 5) 与对照组比较,模型组大鼠的肝脏中有 295 个蛋白显著上调,216 个下调;而与模型组比较,治疗组大鼠的肝脏有 134 个蛋白显著上调,114 个下调。模型组比对照组升高且治疗组比模型组降低的交集蛋白共 35 个,将它们进行通路富集未发现显著调控通路;模型组比对照组降低且治疗组比模型组升高的蛋白共 35 个,在模型组中氧化磷酸化、PPAR 信号通路、丙酮酸代谢、NAFLD 等相关通路被抑制,而治疗组这些通路则发生逆转。治疗组可显著改善线粒体功能、促进氧化磷酸化反应:线粒体呼吸链复合体 I (NADH 脱氢酶)和复合体Ⅲ(细胞色素 C 还原酶)的多个亚基(包括 Ndufa4、9、12 等)在模型组下调,治疗组则显著逆转。

表 5 3 组大鼠肝脏的差异蛋白富集通路

ID	名称	基因 个数	Q 值
rno00190	Oxidative phosphorylation	4	0.014 61
rno03320	PPAR signaling pathway	3	0.021 21
rno04714	Thermogenesis	4	0.035 50
rno00620	Pyruvate metabolism	2	0.040 08
rno04723	Retrograde endocannabinoid signaling	3	0.040 08
rno04932	Non-alcoholic fatty liver disease(NAFLD)	3	0.040 08

讨 论

近年来,NAFLD 的发病机制逐渐由原来的“双重打击学说”演变为现在的“多重打击学说”,认为肝脏的脂质沉积促进肝细胞脂肪变的发生,进而引起多重打击,最终导致 NASH、肝硬化甚至肝细胞癌^[15]。简单来说,就是高水平的脂质代谢物如游离脂肪酸等可以导致线粒体功能障碍、内质网应激,从而引起各种炎症级联反应包括释放氧自由基、募集免疫细胞和其他炎性介质,进而导致细胞损伤、凋亡和纤维重塑。因 NASH 的复杂发病机制涉及多种不同通路,针对 NASH 的治疗应靶向细胞分子事件的多个关键节点才能达到有效治疗目的。

茵栀黄口服液作为一种中草药含有多种成分,可通过不同组分的协同作用靶向多个治疗位点,而系统生物学研究作为一种宏观的整体论方法改变了基于单个或少数几个基因的微观研究模式,具有整体性和高通量的特征,成为我们研究中草药作用机制的一个有力工具^[16]。联合的多组学平台的整合有助于我们从基因、转录和蛋白质等不同水平对药物的作用机制进行整体的认识,同时也可对彼此的实验结果进行验证,从而得出更准确和有说服力的结论^[17]。

在 NAFLD 患者中,肝脏脂质沉积和清除的不平衡导致了肝脂肪变的发生,这在胰岛素抵抗时尤为明显^[18、19]。本研究发现,使用茵栀黄口服液治疗 NASH 大鼠可以在基因和蛋白水平抑制肝脏脂肪的生成、促进其代谢。PPAR 是参与脂质代谢、能量平衡和炎症的转录调控的核受体,PPAR 信号通路中包括了参与脂质代谢的多个调控节点^[20]。其中,茵栀黄口服液可以显著下调在 NASH 中升高 Fabp 和 Scd 的表达,同时上调在 NASH 中降低的 Me1、Fads2、Pepck 的表达。研究证实,Fabp 可促进肝细胞的脂质沉积;下调 Fabp 可显著减轻体重、改善肝细胞脂肪变^[21];Scd 是肝脏脂质从头合成途径的限速酶,可促进肝脏 TG 的沉积,抑制脂质从头合成已被作为 NAFLD 等代谢性疾病的潜在治疗靶点展^[18];增加的

Fads2 可促进体内的饱和脂肪酸脱氢生成不饱和脂肪酸,进而参与脂肪酸的 β 氧化,对脂肪肝具有保护作用^[22];Pepck 可以加速脂肪的动员,促进脂肪酸的 β 氧化^[23];Me1 可加速三羧酸循环,抑制甘油三酯的形成^[24, 25]。因此茵栀黄口服液可以通过抑制脂质的摄取和合成,促进脂质的代谢和氧化来减少肝内脂质的沉积。

线粒体对于脂肪的代谢和能量的产生至关重要,同时也可以调节先天免疫反应来控制炎症的发生,线粒体功能障碍可引起氧化应激的产生,从而导致 NASH 的发生发展^[26]。笔者研究发现,NASH 大鼠肝脏中存在线粒体呼吸链复合体表达下调、氧化磷酸化受阻,这会影响能量合成、干扰脂肪酸的 β 氧化、导致氧自由基产生过多^[27]。使用茵栀黄口服液治疗后,大鼠的线粒体呼吸链复合体 I 和复合体 III 的表达上调,呼吸链功能恢复,氧化磷酸化水平升高,可加速脂肪酸的 β 氧化,抑制氧自由基的生成。

此外,NASH 发生时还存在肝细胞损伤和肝内炎症性细胞的聚集^[28]。我们的研究在 NASH 大鼠肝脏中证实参与炎症反应的 Lbp、Stat1 和多种趋化因子配体显著升高,而茵栀黄口服液可显著降低它们的表达。已有研究报道,NASH 患者血清中的 Lbp 水平与肝脏小叶炎症程度、血清 C 反应蛋白和 AST 水平存在正相关^[29, 30],敲除 Lbp 的小鼠肝脏病理学特征显著缓解^[31]。多种炎性介质如白介素 6 可激活 Stat1 引起细胞内信号转导,促进炎症反应的发生,而抑制 Stat1 可以抑制趋化因子的释放,控制炎症信号的级联放大^[32]。趋化因子可以促进炎症部位白细胞的迁移、生长和激活,趋化因子及其受体在 NASH 患者的肝脏中表达显著增加^[33]。其中,已有研究证实抑制 Ccl2 和 Cxcl10 的药物可抑制巨噬细胞肝内浸润,缓解肝脏炎症^[34, 35]。因此,茵栀黄口服液可以通过下调 Lbp 和 Stat1 的表达和抑制多种趋化因子产生来缓解 NASH 的肝内炎症。

综上所述,通过联合 RNA 和小 RNA 测序技术及蛋白质谱技术发现,茵栀黄口服液可通过抑制脂质的摄取和合成与促进脂质代谢和 β 氧化来减少肝内脂质的沉积、通过使上调线粒体呼吸链复合体的表达抑制氧自由基的产生、通过下调炎症相关蛋白和抑制多种趋化因子来缓解 NASH 的肝内炎症,从而减轻 NASH 大鼠的体重、降低血清转氨酶、缓解肝脏病理学损伤。这为茵栀黄口服液将来用于 NASH 的临床治疗提供了理论依据。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] EASL, EASD, EASO. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease[J]. J Hepatol, 2016, 64 (6): 1388 - 1402.
- [2] Wong RJ, Aguilar M, Cheung R, et al. Nonalcoholic steatohepatitis is the second leading etiology of liver disease among adults awaiting liver transplantation in the United States[J]. Gastroenterology, 2015, 148 (3): 547 - 555.
- [3] Chitturi S, Wong VW, Chan WK, et al. The Asia-Pacific Working Party on Non-alcoholic Fatty Liver Disease guidelines 2017-Part 2: Management and special groups [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2018, 33(1): 86 - 98.
- [4] 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病防治指南(2018 年更新版)[J]. 实用肝脏病杂志, 2018, 21 (2): 177 - 186.
- [5] Oseini AM, Sanyal AJ. Therapies in non-alcoholic steatohepatitis (NASH) [J]. Liver Int, 2017, 37 (Suppl 1): 97 - 103.
- [6] 刘筠. 茵栀黄口服液临床应用与研究进展[J]. 中国实用医药, 2015, 10(23): 274 - 275.
- [7] Zeng J, Wang SJ, Li YM, et al. Yinzhihuang Oral Liquid in the treatment of neonatal jaundice: a meta-analysis [J]. Pharm Biol, 2017, 55 (1): 554 - 559.
- [8] 严晶晶, 夏晓萍, 部娜. 茵栀黄口服液辅助治疗妊娠肝内胆汁淤积症的 Meta 分析[J]. 中国中药杂志, 2016, 41 (23): 4428 - 4435.
- [9] 刘国华, 王健, 范学林. 茵栀黄口服液对实验性肝损伤的药理作用及毒性研究[J]. 中药新药与临床药理, 1995, 6(2): 28 - 29.
- [10] 仇君, 何荣芬, 高亮. 茵栀黄口服液在免疫性肝损伤中的作用研究[J]. 中国药房, 2010, 21(27): 2510 - 2512.
- [11] 闻淑军. 茵栀黄口服液治疗非酒精性脂肪肝的临床疗效研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2015, 10(11): 1563 - 1564.
- [12] 刘晓琳, 信丰智, 杨蕊旭, 等. 茵栀黄口服液对非酒精性脂肪性肝炎大鼠肝脂肪变的保护作用研究[J]. 实用肝脏病杂志, 2018, 21 (3): 380 - 383.
- [13] Ou QQ, Qian XH, Li DY, et al. Yinzhihuang attenuates ANIT-induced intrahepatic cholestasis in rats through up-regulation of Mrp2 and Bsep expressions[J]. Pediatr Res, 2015, 79(4): 589.
- [14] Bedossa P, Poitou C, Veyrie N, et al. Histopathological algorithm and scoring system for evalua-

- tion of liver lesions in morbidly obese patients [J]. *Hepatology*, 2012, 56(5): 1751–1759.
- [15] Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. *Metabolism*, 2016, 65(8): 1038–1048.
 - [16] Leung EL, Cao ZW, Jiang ZH, et al. Network-based drug discovery by integrating systems biology and computational technologies [J]. *Brief Bioinform*, 2013, 14(4): 491–505.
 - [17] 刘晓琳, 茅益民, 曾民德. 非酒精性脂肪性肝病的组学研究进展与展望 [J]. *肝脏*, 2013, 18(7): 478–482.
 - [18] Saponaro C, Gaggini M, Carli F, et al. The subtle balance between lipolysis and lipogenesis: A critical point in metabolic homeostasis [J]. *Nutrients*, 2015, 7(11): 9453–9474.
 - [19] Marchesini G, Petta S, Dalle Grave R. Diet, weight loss, and liver health in nonalcoholic fatty liver disease: Pathophysiology, evidence, and practice [J]. *Hepatology*, 2016, 63(6): 2032–2043.
 - [20] Silva AKS, Peixoto CA. Role of peroxisome proliferator-activated receptors in non-alcoholic fatty liver disease inflammation [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(16): 2951–2961.
 - [21] Mukai T, Egawa M, Takeuchi T, et al. Silencing of FABP1 ameliorates hepatic steatosis, inflammation, and oxidative stress in mice with nonalcoholic fatty liver disease [J]. *FEBS Open Bio*, 2017, 7(7): 1009–1016.
 - [22] Osman RH, Liu L, Xia L, et al. Fads1 and 2 are promoted to meet instant need for long-chain polyunsaturated fatty acids in goose fatty liver [J]. *Mol Cell Biochem*, 2016, 418(1–2): 103–117.
 - [23] Garcia-Caraballo SC, Comhair TM, Verheyen F, et al. Prevention and reversal of hepatic steatosis with a high-protein diet in mice [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1832(5): 685–695.
 - [24] Pound KM, Sorokina N, Ballal K, et al. Substrate-enzyme competition attenuates upregulated anaplerotic flux through malic enzyme in hypertrophied rat heart and restores triacylglyceride content: attenuating upregulated anaplerosis in hypertrophy [J]. *Circ Res*, 2009, 104(6): 805–812.
 - [25] Qian S, Mumick S, Nizner P, et al. Deficiency in cytosolic malic enzyme does not increase acetaminophen-induced hepato-toxicity [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2008, 103(1): 36–42.
 - [26] Mansouri A, Gattolliat CH, Asselah T. Mitochondrial dysfunction and signaling in chronic liver diseases [J]. *Gastroenterology*, 2018, 155(3): 629–647.
 - [27] Garcia-Ruiz I, Solis-Munoz P, Fernandez-Moreira D, et al. High-fat diet decreases activity of the oxidative phosphorylation complexes and causes nonalcoholic steatohepatitis in mice [J]. *Dis Model Mech*, 2014, 7(11): 1287–1296.
 - [28] Diehl AM, Day C. Cause, Pathogenesis, and treatment of nonalcoholic steatohepatitis [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(21): 2063–2072.
 - [29] Pang J, Xu W, Zhang X, et al. Significant positive association of endotoxemia with histological severity in 237 patients with non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2017, 46(2): 175–182.
 - [30] Kitabatake H, Tanaka N, Fujimori N, et al. Association between endotoxemia and histological features of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(4): 712–722.
 - [31] Jin CJ, Engstler AJ, Ziegenhardt D, et al. Loss of lipopolysaccharide-binding protein attenuates the development of diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2017, 32(3): 708–715.
 - [32] Tomita K, Kabashima A, Freeman BL, et al. Mixed lineage kinase 3 mediates the induction of CXCL10 by a STAT1-dependent mechanism during hepatocyte lipotoxicity [J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(10): 3249–3259.
 - [33] Roh YS, Seki E. Chemokines and chemokine receptors in the development of NAFLD [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1061: 45–53.
 - [34] Baeck C, Wehr A, Karlmark KR, et al. Pharmacological inhibition of the chemokine CCL2 (MCP-1) diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury [J]. *Gut*, 2012, 61(3): 416–426.
 - [35] Ibrahim SH, Hirsova P, Tomita K, et al. Mixed lineage kinase 3 mediates release of C-X-C motif ligand 10-bearing chemotactic extracellular vesicles from lipotoxic hepatocytes [J]. *Hepatology*, 2016, 63(3): 731–744.

(收稿: 2018-08-04 在线: 2018-11-04)

责任编辑: 段碧芳

英文责编: 张晶晶