

· 基础研究 ·

祛湿化瘀方对非酒精性脂肪肝小鼠
肠黏膜损伤的保护作用海亚美^{1,2} 黄甫^{1,2} 冷静^{1,2} 田华捷^{1,2} 冯琴^{1,2} 赵瑜^{1,2}
顾宏图^{1,2} 胡义扬^{1,2} 彭景华^{1,2,3}

摘要 **目的** 观察祛湿化瘀方对非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 小鼠肠黏膜损伤的保护作用, 解析祛湿化瘀方治疗 NAFLD 的机制。**方法** (1) 采用 NAFLD 模型和 NAFLD 合病肠炎模型, C57BL/6J 小鼠分为对照组 (12 只, 对照饲料)、NAFLD 组 (24 只, 高脂饲料)、NAFLD 合病肠炎组 [24 只, 高脂饲料及 0.5% 葡聚糖硫酸钠 (DSS) 饮水], 至造模 20 周末, NAFLD 组再分为高脂组 (12 只) 和高脂 + 祛湿化瘀方组 (12 只); NAFLD 合病肠炎组再分为高脂 + DSS 组 (12 只) 和高脂 + DSS + 祛湿化瘀方组 (12 只); 祛湿化瘀方灌胃给药 4 周。(2) 采用 1% DSS 饮水 12 周诱导的慢性大肠炎小鼠模型, C57BL/6J 小鼠分为对照组 (12 只)、DSS 组 (12 只)、DSS + 祛湿化瘀方组 (12 只)。造模 8 周后, 予祛湿化瘀方干预 4 周。采用 HE 染色观察肝脏和结肠病理, 透射电镜观察结肠超微结构, 油红 O 染色、肝组织甘油三酯 (TG) 检测观察肝脏脂质沉积, 检测血清谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、血清 TG、游离脂肪酸、血清脂多糖结合蛋白 (LBP), real-time PCR 检测结肠组织紧密连接 ZO-1、Occludin mRNA 表达。**结果** 在 NAFLD 及 NAFLD 合病肠炎模型中, 高脂组和高脂 + DSS 组肝组织病变明显, 肝组织 TG、血清 ALT、AST、LBP 水平均较对照组显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 高脂组结肠组织 HE 染色病变不明显, 高脂 + DSS 组则可见明显病变, 高脂组和高脂 + DSS 组结肠组织超微结构均可见明显病变, 结肠组织紧密连接 mRNA 表达较对照组明显减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。祛湿化瘀方干预后, 肝组织病变、结肠超微结构改善, 血清 ALT、AST、LBP 及肝组织 TG 显著下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 结肠组织 ZO-1 mRNA 表达显著升高 ($P < 0.05$); 高脂 + DSS + 祛湿化瘀方组较高脂 + DSS 组结肠组织 HE 染色病变改善, Occludin mRNA 表达明显恢复 ($P < 0.05$)。在慢性大肠炎模型中, DSS 组小鼠结肠 HE 染色及超微结构病变明显, 病理积分较对照组增加 ($P < 0.05$), 血清 LBP 升高 ($P < 0.05$), 结肠组织紧密连接 mRNA 表达下降 ($P < 0.05$); 祛湿化瘀方干预后, 结肠病变改善, 病理积分、血清 LBP 下降 ($P < 0.05$), 结肠组织紧密连接 mRNA 表达有所升高 ($P < 0.05$)。**结论** 祛湿化瘀方能够保护 NAFLD 小鼠肠黏膜, 该作用与其防治 NAFLD 有关。

关键词 非酒精性脂肪性肝病; 肠黏膜屏障; 祛湿化瘀方

Qushi Huayu Decoction Protected Gut Mucosa Barrier Injury of Non-alcoholic Fatty Liver Disease Mice HAI Ya-mei^{1,2}, HUANG Fu^{1,2}, LENG Jing^{1,2}, TIAN Hua-jie^{1,2}, FENG Qin^{1,2}, ZHAO Yu^{1,2}, GU Hong-tu^{1,2}, HU Yi-yang^{1,2}, and PENG Jing-hua^{1,2,3} 1 Department of Liver Cirrhosis, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (201203); 2 Institute of Liver Diseases, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (201203); 3 Shanghai Key Laboratory of Traditional Chinese Clinical Medicine, Shanghai (201203)

ABSTRACT **Objective** To observe the protection of Qushi Huayu Decoction (QHD) on gut mucosa barrier injury of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), and to analyze its mechanism. **Methods**

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81370094; No. 81673750); 上海市科委“浦江人才”计划 (No. 17PJ1408900); 上海市进一步加快中医药事业发展三年行动计划: “杏林新星”计划 (No. ZY3-RCPY-2-2010)

作者单位: 1. 上海中医药大学附属曙光医院肝硬化科 (上海 201203); 2. 上海中医药大学肝病研究所 (上海 201203); 3. 上海市中医临床重点实验室 (上海 201203)

通讯作者: 彭景华, Tel: 021-20256526, E-mail: pengjinghua2004@163.com

DOI: 10.7661/j. cjim. 2018613. 140

(1) NAFLD model and NAFLD combined with colitis model were used. C57BL/6J mice were divided into the control group ($n=12$, fed with control forage), the NAFLD group ($n=24$, fed with high fat forage), the NAFLD combined with colitis group [$n=24$, fed with high fat forage + 0.5% dextran sulfate sodium (DSS) drinking water]. Till the end of week 20, mice in the NAFLD group were further divided into the high fat group ($n=12$) and the high fat + QHD group ($n=12$). Mice in the NAFLD combined with colitis group were further divided into the high fat + DSS group ($n=12$) and the high fat + DSS + QHD group ($n=12$). QHD was administrated for four weeks by gastrogavage. (2) Chronic colitis mouse model was induced by using 1% DSS drinking water for 12 weeks. C57BL/6J mice were divided into the control group ($n=12$), the DSS group ($n=12$), the DSS + QHD group ($n=12$). After 8 weeks of modeling, QHD was intervened for 4 weeks. Pathological changes of liver and colon were observed by HE staining. Ultrastructure of colon was observed by using transmission electron microscope. Lipid deposition in liver was observed in oil red staining sections. Hepatic triglyceride (TG), serum alanine aminotransferase (ALT), and aspartate transaminase (AST) were detected to evaluate liver function. Levels of free fatty acid (FFA) and serum TG were detected to evaluate blood lipids. And lipopolysaccharide-binding protein (LBP) were detected to evaluate endotoxin intestinal leakage. mRNA expressions of tight junction ZO-1 and Occludin in colon were detected by real-time PCR. Results In NAFLD and NAFLD combined with colitis models, obvious pathological changes in liver tissue were observed in the high fat group and the high fat + DSS group, as well as increased serum levels of ALT, AST, LBP, hepatic TG, as compared with those in the control group ($P<0.05$, $P<0.01$). Pathological changes of colon were observed in the high fat + DSS group, but not in the high fat group. Pathological changes of colon ultrastructure could be obviously seen in the high fat group and the high fat + DSS group. mRNA expressions of tight junction in colon obviously decreased more in the two groups than in the control group ($P<0.05$, $P<0.01$). Pathological changes in liver and ultrastructure of colon were ameliorated after intervened by QHD. Decreased serum levels of ALT, AST, LBP, hepatic TG ($P<0.05$, $P<0.01$), and restored ZO-1 mRNA expression in colon ($P<0.05$) were also observed with QHD treatment. In addition, ameliorated pathological changes in HE stained colon and restored Occludin mRNA expression in colon tissue were observed in the high fat + DSS + QHD group, as compared with that in the high fat + DSS group ($P<0.05$). In the chronic colitis mouse model, obvious pathological changes in HE staining sections or ultrastructure of colon were observed in the DSS group, as well as increased pathological scores ($P<0.05$) and serum LBP level ($P<0.05$), and decreased mRNA expressions of tight junction in colon ($P<0.05$). With administration of QHD, pathological changes and scores were improved, decreased serum LBP and restored mRNA expression of colonic tight junctions were observed after intervened by QHD ($P<0.05$). Conclusion QHR could significantly ameliorate gut mucosa barrier injury in NAFLD mice, and its effects could be verified in NAFLD combined with colitis model and chronic colitis model.

KEYWORDS non-alcoholic fatty liver disease; gut mucosa barrier; Qushi Huayu Recipe

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一种与胰岛素抵抗和遗传易感密切相关的代谢应激性肝脏损伤^[1],近年来发病率呈上升趋势。NAFLD是代谢性疾病在肝脏的病理表现,已成为临床密切关注和研究的热点。新近关于NAFLD发病机制的研究提示了“肠道因素”在NAFLD发病中的重要作用^[2-7]。前期研究发现经祛湿化痰方能够调整高脂饮食诱导的NAFLD大鼠肠道菌群结构向正常菌群回归,其中有害菌丰度下降,有益菌丰度增加^[7]。

本研究拟进一步观察祛湿化痰方对高脂饮食诱导

的NAFLD小鼠肠黏膜损伤的影响,并在高脂饮食复合葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)诱导的NAFLD复合肠炎模型和单纯DSS诱导的大肠炎模型小鼠中进行验证,以期从“肠道因素”解析祛湿化痰方治疗NAFLD的作用机制提供科学依据。

材料与方法

1 动物 C57BL/6J 雄性小鼠,12 周龄,SPF 级,购自上海斯莱克实验动物有限公司。饲养于上海中医药大学实验动物中心,合格证号为 SCKC(沪)-2012-

0002。本实验遵循上海中医药大学实验动物中心关于实验动物保护与使用准则,并获得上海中医药大学动物实验伦理委员会的批准(批准号:SZY201710015)。

2 试剂与药物 DSS (分子量: 36 000 ~ 50 000), 货号 9011-18-1, 购自 Sigma 公司。祛湿化癥方原药材(虎杖、田基黄、姜黄、茵陈、栀子)购于上海华宇药业有限公司, 药物由上海中医药大学中药研究所制备。祛湿化癥方原方组成: 茵陈 12 g 田基黄 9 g 虎杖 9 g 姜黄 6 g 栀子 6 g。以生药含量 0.93 g/mL 为标准, 熬制 800 mL 祛湿化癥方, 具体方法如下: (1) 称取栀子 107 g、田基黄 160 g, 加入 10 倍量水浸泡 30 min, 煎煮 90 min, 纱布滤过, 药渣加入 8 倍量水, 煎煮 90 min (重复两次), 合并 3 次所得药液, 浓缩至 267 mL (药液与药材比例 1:1)。加入 400 mL 乙醇 (使含醇量为 60%), 4 ℃ 层析柜静置过夜。用纱布滤过, 浓缩至适宜体积。(2) 称取茵陈 213 g, 姜黄 107 g, 虎杖 160 g, 加入 10 倍量 75% 乙醇, 回流提取 2 h, 回收滤液, 药渣加入 10 倍量 75% 乙醇再回流提取 1 h, 过滤药液 (重复两次), 合并 3 次所得滤液, 回收乙醇, 浓缩药液至适宜体积。合并以上两次浓缩的药液再浓缩至 800 mL, 分装, -70 ℃ 冻存。

3 动物模型制备及分组用药

3.1 高脂饮食诱导 NAFLD 小鼠模型及高脂饮食复合 DSS 诱导 NAFLD 合病肠炎模型 C57BL/6J 雄性小鼠分为对照组 (12 只)、NAFLD 组 (24 只)、NAFLD 合病肠炎组 (24 只), 对照组予 10% 热量源于脂肪的对照饲料 (购自 Research Diets 公司, 货号 D12450B), NAFLD 组予 60% 热量源于脂肪的高脂饲料 (购自 Research Diets 公司, 货号 D12492), NAFLD 合病肠炎组予 60% 热量源于脂肪的高脂饲料同时予含 0.5% DSS 的饮用水 (7 天 0.5% DSS 饮水, 10 天灭菌饮用水, 循环交替)^[8]。至 20 周末, NAFLD 组进一步分为高脂组 (12 只) 和高脂 + 祛湿化癥方组 (12 只); NAFLD 合病肠炎组进一步分为高脂 + DSS 组 (12 只) 和高脂 + DSS + 祛湿化癥方组 (12 只); 中药干预组的小鼠灌胃给予祛湿化癥方, 其余小鼠灌胃等量灭菌饮用水, 至 24 周末。按每天 1 mL/100 g (按体表面积折算, 约为临床 70 kg 成人用量 16 倍) 灌胃给药^[7]。

3.2 DSS 诱导慢性大肠炎模型 C57BL/6J 雄性小鼠分为对照组 (12 只)、DSS 组 (12 只)、DSS + 祛湿化癥方组 (12 只)。对照组给予灭菌饮用水自由饮用, DSS 组及 DSS + 祛湿化癥方组给予 1% DSS 水溶液 (7 天 1% DSS 饮水 - 10 天灭菌饮用水, 循环交替),

至 8 周末, DSS + 祛湿化癥方组小鼠灌胃中药祛湿化癥方, 其余小鼠灌胃等量灭菌饮用水直至 12 周末。

造模结束后, 收集血清、肝组织、结肠组织用于相关指标观察检测。

- 4 观察指标与检测方法
- 4.1 肝组织病理采用 HE 染色观察; 肝组织脂质沉积采用油红 O 染色观察。
- 4.2 肝组织甘油三酯 (TG)、血清 TG 检测 称取 100 mg 肝组织放入乙醇 - 丙酮 (各 750 μL) 液中, 匀浆 10 000 r/min, 10 s, 3 次, 制备肝组织匀浆。4 ℃ 静置过夜。离心 3 000 r/min, 4 ℃, 15 min, 上清液用于 TG 检测。TG 检测试剂盒购自浙江东瓯生物有限公司, 按说明书操作。
- 4.3 血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、游离脂肪酸 (FFA) 检测 试剂盒购自南京建成生物制品研究所, 按说明书操作。
- 4.4 血清脂多糖结合蛋白 (LBP) 采用 ELISA 检测, 试剂盒购自美国 Cell Sciences Inc. 货号 CKM043, 按说明书操作。
- 4.5 结肠组织病理采用 HE 染色观察; 结肠组织超微结构采用透射电镜观察。

结肠组织病理积分评定^[9]: 由两位病理专家独立阅片并评分, 结肠病理积分由炎症严重程度、炎症累及范围、黏膜损伤程度和病变范围 4 个指标构成, 具体评分标准见表 1。

表 1 结肠炎组织学评分标准		
评分分类	分值	描述
炎症严重程度 (A)	0	无
	1	轻微
	2	适中
	3	严重
炎症范围 (B)	0	无
	1	黏膜
	2	黏膜及黏膜下层
黏膜损伤 (C)	3	基底层
	0	无
	1	靠近基膜 1/3 的隐窝丢失
	2	靠近基膜 2/3 的隐窝丢失
病变范围 (D)	3	隐窝全部消失, 上皮细胞完整覆盖
	4	隐窝、上皮均消失
	0	0
	1	1% - 25%
	2	26% - 50%
	3	51% - 75%
	4	76% - 100%

4.6 结肠组织紧密连接 mRNA 表达 real-time PCR 检测。总 RNA 提取试剂盒购自生工生物工程上

海有限公司(货号 B511321-0100),cDNA 合成试剂盒购自 Bio-Rad 公司(货号 1708891),real-time PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司(货号 RR420A),引物由生物工程上海有限公司合成,序列见表 2。

表 2 引物序列		
目的基因	引物序列(5'-3')	产物长度(bp)
ZO-1-F	GCTTTAGCGAACAGAAGGAGC	156
ZO-1-R	TTCATTTTTCCGAGACTTCACCA	
Occludin-F	ACCCGAAGAAAGATGGATCG	151
Occludin-R	CATAGTCAGATGGGGGTGGA	
β-actin-F	GGCTGTATTCCCCTCCATCG	154
β-actin-R	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT	

5 统计学方法 采用 SPSS 16.0 软件。数据正态性检验采用 Shapiro 法,两组等级资料采用Mann-Whitney 秩和检验。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。相关性分析采用 Spearman-rank correlation analysis, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 祛湿化痰方对 NAFLD 及 NAFLD 合病肠炎小鼠模型的作用

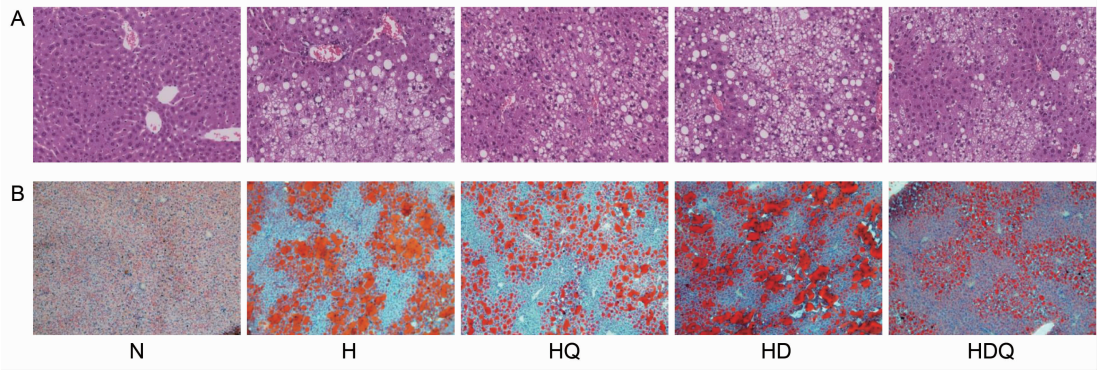
1.1 一般情况 在 NAFLD 模型中,高脂组 [(48.3 ± 4.2)g] 与高脂 + 祛湿化痰方组 [(48.5 ± 4.2)g] 体重无差异,但均较对照组 [(30.5 ± 1.4)g] 显

著增加。在 NAFLD 合病肠炎模型中,高脂 + DSS 组 [(42.1 ± 6.5)g] 与高脂 + DSS + 祛湿化痰方组 [(44.1 ± 7.1)g] 体重无差异,但均较对照组显著增高,高脂 + DSS 组小鼠可见血便,18 周末死亡 1 只,高脂 + DSS + 祛湿化痰方组小鼠少见血便。

1.2 肝组织病理变化(图 1) 高脂组和高脂 + DSS 组肝脏出现明显脂肪变性并可见局灶性炎症细胞浸润,高脂 + 祛湿化痰方组和高脂 + DSS + 祛湿化痰方组肝细胞脂肪变性减轻(图 1A),油红 O 染色可见高脂组和高脂 + DSS 组肝脏出现明显脂质沉积,高脂 + 祛湿化痰方组和高脂 + DSS + 祛湿化痰方组肝脏脂质沉积有所减轻(图 1B)。

1.3 血清 ALT、AST、TG、FFA 及肝组织 TG 变化(表 3) 血清 ALT、AST、肝组织 TG:高脂组和高脂 + DSS 组均较对照组升高($P < 0.01$),高脂 + 祛湿化痰方组和高脂 + DSS + 祛湿化痰方组分别较高脂组和高脂 + DSS 组显著下降($P < 0.01$, $P < 0.05$)。血清 TG 各组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。血清 FFA 高脂组较对照组降低($P < 0.01$),其余组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.4 结肠组织病理及超微结构变化(图 2) 在 NAFLD 模型中,各组小鼠结肠组织病理 HE 染色未见明显病理改变(图 2A),透射电镜可见高脂组小鼠结肠微绒毛稀疏变短,细胞间紧密连接损伤断裂,高脂 +

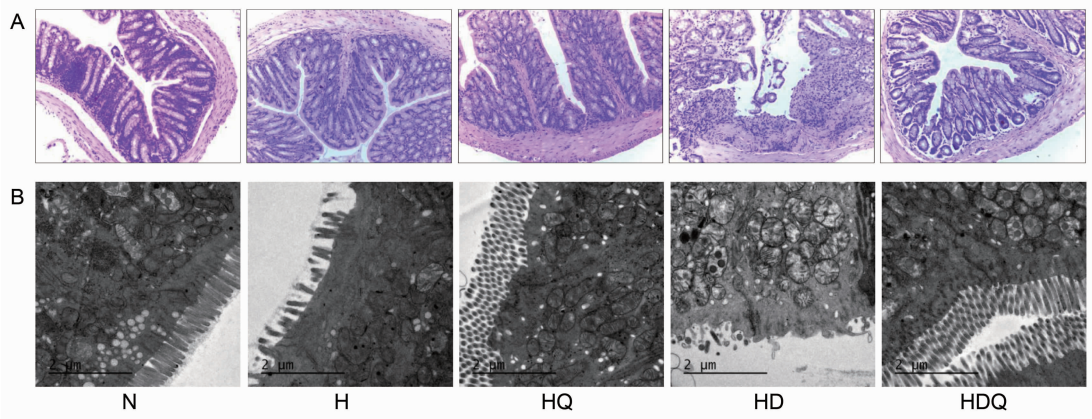


注:A 为肝组织(HE 染色,×200);B 为肝组织(油红 O 染色,×100);N 为对照组;H 为高脂组;HQ 为高脂 + 祛湿化痰方组;HD 为高脂 + DSS 组;HDQ 为高脂 + DSS + 祛湿化痰方组

图 1 祛湿化痰方对 NAFLD 及 NAFLD 合病肠炎模型小鼠肝脏病理及脂质沉积的影响

表 3 祛湿化痰方对 NAFLD 及 NAFLD 合病肠炎小鼠肝组织 TG、血清 ALT、AST、TG、FFA 的影响 ($\bar{x} \pm s$)							
模型	组别	<i>n</i>	肝组织 TG (mg/g 组织)	ALT (IU/L)	AST (U/L)	血清 TG (mg/L)	血清 FFA (mol/L)
NAFLD	对照	12	27.74 ± 6.49	43.37 ± 21.99	19.71 ± 9.93	16.16 ± 2.55	1.321 ± 0.21
	高脂	12	53.93 ± 4.27 *	153.50 ± 59.86 *	50.22 ± 19.90 *	12.70 ± 1.42	0.80 ± 0.17 *
NAFLD	高脂 + 祛湿化痰方	12	45.17 ± 8.39 △	91.41 ± 51.88 △	32.28 ± 12.88 △	13.21 ± 1.99	0.82 ± 0.12
NAFLD 合病肠炎	高脂 + DSS	11	62.01 ± 16.19 *	122.33 ± 44.73 *	35.79 ± 10.64 *	14.57 ± 5.86	1.27 ± 0.60
NAFLD 合病肠炎	高脂 + DSS + 祛湿化痰方	12	38.69 ± 13.31 ▲▲	76.84 ± 41.03 ▲	25.18 ± 6.30 ▲	12.21 ± 1.38	1.07 ± 0.17

注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与高脂组比较,△ $P < 0.05$;与高脂 + DSS 组比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$



注:A 为结肠组织(HE 染色, ×200);B 为结肠组织透射电镜观察(×11 500);N 为对照组;H 为高脂组;HQ 为高脂 + 祛湿化痰方组;HD 为高脂 + DSS 组;HDQ 为高脂 + DSS + 祛湿化痰方组

图 2 祛湿化痰方对高脂饮食诱导的小鼠 NAFLD 及 NAFLD 复合肠炎模型结肠病变的影响

祛湿化痰方组小鼠结肠微绒毛排列整齐,紧密连接完整(图 2B)。在 NAFLD 合病肠炎模型中,高脂 + DSS 组小鼠结肠组织黏膜破坏,隐窝损伤,基底层大量炎细胞浸润,部分伴有溃疡形成,祛湿化痰方干预后,结肠黏膜破坏不明显,连接较完整,隐窝结构完整,仅有少量炎细胞浸润(图 2A);透射电镜可见高脂 + DSS 组小鼠结肠微绒毛缺损,肠黏膜上皮细胞线粒体中有异常分泌颗粒,紧密连接变短松散,部分出现断裂,高脂 + DSS + 祛湿化痰方组小鼠结肠微绒毛缺损少见,也可见肠黏膜上皮细胞线粒体中异常分泌颗粒,紧密连接结构基本完整(图 2B)。

1.5 血清 LBP 含量变化比较(表 4) 高脂组和高脂 + DSS 组血清 LBP 含量较对照组均显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),高脂 + 祛湿化痰方组和高脂 + DSS + 祛湿化痰方组分别较高脂组和高脂 + DSS 组

显著下降($P < 0.05$)。高脂 + DSS 组较高脂组有升高趋势。

1.6 结肠组织紧密连接 ZO-1、Occludin mRNA 表达变化(表 4) 高脂组和高脂 + DSS 组 ZO-1 mRNA 表达均较对照组下降($P < 0.01$),高脂 + DSS 组 Occludin mRNA 表达较对照组下降($P < 0.01$);高脂 + 祛湿化痰方组和高脂 + DSS + 祛湿化痰方组 ZO-1 mRNA 表达分别较高脂组和高脂 + DSS 组显著升高($P < 0.05$);高脂 + DSS + 祛湿化痰方组 Occludin mRNA 表达较高脂 + DSS 组显著升高($P < 0.05$)。

2 祛湿化痰方对慢性大肠炎模型小鼠的作用

2.1 一般情况 DSS 组及 DSS + 祛湿化痰方组可见血便、体重下降,其中 DSS 组小鼠在造模过程中死亡 2 只,DSS + 祛湿化痰方组小鼠无死亡。

表 4 祛湿化痰方对 NAFLD 及 NAFLD 合病肠炎小鼠血清 LBP 及结肠组织紧密连接 mRNA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

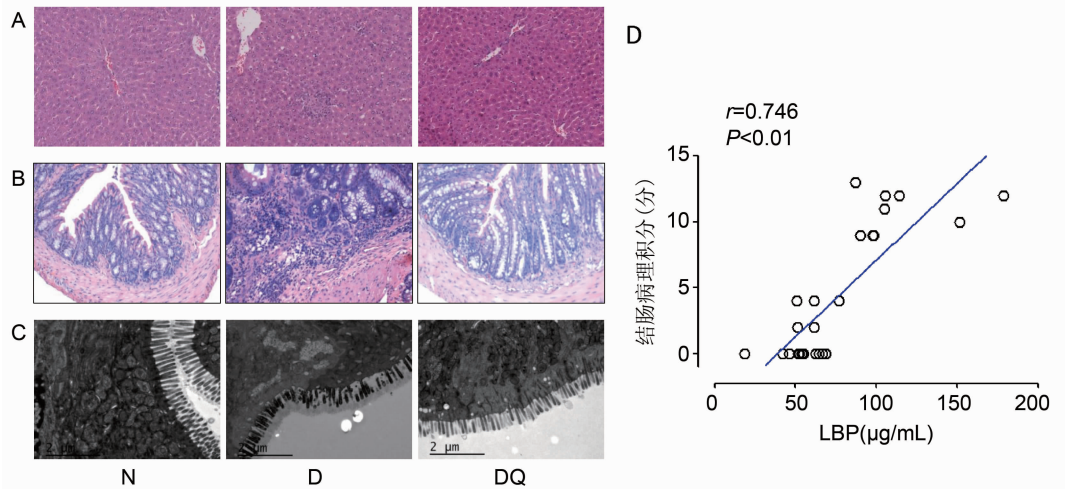
模型	组别	n	血 LBP (μg/mL)	ZO-1 / β-actin	Occludin / β-actin
NAFLD	对照	12	42.52 ± 9.86	1.00 ± 0.41	0.99 ± 0.23
	高脂	12	58.27 ± 12.10 *	0.30 ± 0.07 **	0.73 ± 0.06
	高脂 + 祛湿化痰方	12	43.39 ± 9.34 ^Δ	1.03 ± 0.37 ^Δ	0.84 ± 0.21
NAFLD 合病肠炎	高脂 + DSS	11	71.14 ± 15.89 **	0.12 ± 0.01 **	0.12 ± 0.01 **
NAFLD 合病肠炎	高脂 + DSS + 祛湿化痰方	12	48.69 ± 11.25 [▲]	0.41 ± 0.12 [▲]	0.41 ± 0.12 [▲]

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与高脂组比较, ^Δ $P < 0.05$;与高脂 + DSS 组比较, [▲] $P < 0.05$

表 5 祛湿化痰方对慢性大肠炎小鼠血清 ALT、结肠组织病理积分、血清 LBP 水平及结肠组织紧密连接 mRNA 的影响

组别	n	ALT (IU/L, $\bar{x} \pm s$)	结肠病理积分 [中位数(四分位数)]	LBP (μg/mL, $\bar{x} \pm s$)	ZO-1 / β-actin ($\bar{x} \pm s$)	Occludin / β-actin ($\bar{x} \pm s$)
对照	12	38.96 ± 7.71	0(0,0)	58.52 ± 11.02	1.00 ± 0.20	1.00 ± 0.14
DSS	12	91.57 ± 68.33 *	11(9,12) *	114.19 ± 30.73 *	0.27 ± 0.03 *	0.19 ± 0.07 *
DSS + 祛湿化痰方	12	46.89 ± 9.71 ^Δ	2(0,4) ^Δ	54.43 ± 15.04 ^Δ	0.55 ± 0.11 ^Δ	0.61 ± 0.18 ^Δ

注:与对照组比较, * $P < 0.05$;与 DSS 组比较, ^Δ $P < 0.05$



注:A 为肝组织(HE 染色, $\times 200$);B 为结肠组织(HE 染色, $\times 200$);C 为结肠组织(透射电镜观察, $\times 11500$);D 为结肠组织病理积分与血清 LBP 相关性;N 为对照组;D 为 DSS 组;DQ 为 DSS +祛湿化痰方组

图 3 祛湿化痰方对慢性大肠炎小鼠肝脏及结肠病变的影响

2.2 肝组织病理及血清 ALT 变化(图 3A,表 5)

DSS 组肝组织出现局灶性的炎症细胞浸润,血清 ALT 较对照组显著升高($P<0.05$),DSS +祛湿化痰方组肝组织炎症细胞浸润较少见,血清 ALT 水平较组显著下降($P<0.05$)。

2.3 结肠组织病理及超微结构变化

DSS 组可见结肠上皮连续性破坏、隐窝结构消失,浅溃疡、糜烂形成,炎性细胞浸润,病理积分较对照组显著增加($P<0.05$),DSS +祛湿化痰方组结肠黏膜破坏不明显,连接较完整,隐窝结构完整,仅有少量炎细胞浸润,病理积分较 DSS 组有所下降($P<0.05$)(图 3B,表 5)。透射电镜观察可见模型组小鼠结肠微绒毛缺失变短、紧密连接结构松散断裂,DSS +祛湿化痰方组结肠微绒毛排列整齐、紧密连接完整、少见紧密连接结构松散(图 3C)。

2.4 血清 LBP 变化(表 5)

DSS 组血清 LBP 较对照组显著升高($P<0.05$),DSS +祛湿化痰方组血清 LBP 较 DSS 组明显下降($P<0.05$)。

2.5 结肠组织病理积分与血清 LBP 含量相关性(图 3D)

结肠病理积分与血清 LBP 水平呈显著正相关($r=0.746$)。

2.6 结肠组织紧密连接 ZO-1、Occludin mRNA 表达变化(表 5)

DSS 组结肠组织 ZO-1、Occludin mRNA 表达较对照组显著下降($P<0.05$),DSS +祛湿化痰方组小鼠结肠组织 ZO-1、Occludin mRNA 表达较 DSS 组有所升高($P<0.05$)。

讨 论

诸多研究已经证实了肠道因素在 NAFLD 发病机

制中的作用,肠道菌群结构紊乱、肠黏膜屏障破坏可使肠源性内毒素或称脂多糖(LPS)进入血液^[2-6]。研究显示大鼠经 4~6 周高脂饮食喂养后血 LPS 浓度明显升高,因其内毒素的浓度较感染性休克时内毒素浓度低 10~50 倍,而被称为代谢性内毒素血症^[4]。代谢性内毒素血症则可进一步通过诱导炎症因子而诱发胰岛素抵抗加重肝脏脂质沉积^[10],同时引发或加重肝脏炎症损伤来参与到 NAFLD 的发生发展过程中^[11]。因而针对“肠道因素”进行干预,很可能成为防治 NAFLD 的全新有效策略。

在本研究中,我们首先在高脂饮食诱导的 NAFLD 小鼠模型中验证了祛湿化痰方抑制其肝脏脂质沉积、改善肝组织病变和血清肝功能的药效,同时观察到,高脂饮食 24 周小鼠虽然在 HE 染色的结肠组织普通病理切片未见明显病变,但其超微结构显示微绒毛稀疏变短、紧密连接破坏,血清 LBP 水平升高,结肠组织紧密连接 ZO-1、Occludin mRNA 表达下降。LBP 以高亲和性在血液中与 LPS 结合,其作为 LPS 发挥生物学作用的重要载体以及一种急性期反应蛋白,被认为是内毒素血症的标志物^[12],从而反映内毒素肠渗漏的程度。上述变化均提示 NAFLD 小鼠存在肠黏膜损伤。经祛湿化痰方干预后,上述病理改变均有显著减轻或恢复,提示祛湿化痰方对 NAFLD 小鼠肠黏膜的保护作用。

进而我们在高脂饮食复合 DSS 饮水诱导的 NAFLD 合病肠炎模型中,进一步放大 NAFLD 小鼠中存在的肠黏膜损伤。祛湿化痰方抑制肝脏脂质沉积、改善肝损伤的作用再次得到验证,同时祛湿化痰方改

善 NAFLD 合病肠炎小鼠的结肠组织病理和超微结构,抑制内毒素肠渗漏,恢复结肠组织紧密连接表达的作用也得到了验证。

为了进一步观察和验证祛湿化癥方对于肠黏膜的保护作用,我们还采用了 DSS 饮水诱导的经典大肠炎模型。发现在该模型中存在显著的结肠黏膜损伤、内毒素肠渗漏,同时伴有肝脏散在的局灶性炎症细胞浸润和血清肝功能异常,而祛湿化癥方干预后,结肠组织病理和超微结构改善,内毒素肠渗漏减轻,结肠组织紧密连接 mRNA 表达有所恢复,同时肝损伤减轻。

祛湿化癥方是我们课题组在临床实践基础上总结的治疗脂肪肝经验方剂,临床观察发现该方能够改善脂肪肝患者血清肝功能、肝脏 B 超表现^[13],前期经动物实验反复证实其对四氯化碳复合高脂饮食诱导的 NAFLD 大鼠^[14]、单纯高脂饮食诱导的 NAFLD 大鼠及小鼠^[15,16]肝脏脂质沉积均有明显的抑制作用。本研究的结果进一步表明,祛湿化癥方对于 NAFLD 小鼠肠黏膜损伤的确具有保护作用,该作用很可能是祛湿化癥方抗 NAFLD 的药理效应中重要的一环,关于祛湿化癥方保护 NAFLD 中肠黏膜的作用机制及其与防治 NALFD 效应之间的关系值得进一步深入研究,以期为进一步解析祛湿化癥治法防治 NAFLD 提供科学依据,为开发作用机制明确的抗 NAFLD 有效新药奠定基础。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南[J]. 中国肝脏病杂志, 2010, 2(4): 43-48.
- [2] Miele L, Valenza V, La Torre G, et al. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease[J]. Hepatology, 2009, 49(6): 1877-1887.
- [3] Wigg AJ, Roberts-Thomson IC, Dymock RB, et al. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxemia, and tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis [J]. Gut, 2001, 48(2): 206-211.
- [4] Cani PD, Amar J, Iglesias MA, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance[J]. Diabetes, 2007, 56(7): 1761-1772.
- [5] Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxemia[J]. Diabetologia, 2007, 50(11): 2374-2383.
- [6] Zhang C, Zhang M, Wang S, et al. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice[J]. ISME J, 2010, 4(2): 232-241.
- [7] Yin X, Peng J, Zhao L, et al. Structural changes of gut microbiota in a rat non-alcoholic fatty liver disease model treated with a Chinese herbal formula [J]. Syst Appl Microbiol, 2013, 36(3): 188-196.
- [8] Gabele E, Dostert K, Hofmann C, et al. DSS induced colitis increases portal LPS levels and enhances hepatic inflammation and fibrogenesis in experimental NASH[J]. J Hepatol, 2011, 55(6): 1391-1399.
- [9] Horino J, Fujimoto M, Terabe F, et al. Suppressor of cytokine signaling-1 ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice[J]. Int Immunol, 2008, 20(6): 753-762.
- [10] Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, et al. IRS-1 mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha and obesity-induced insulin resistance [J]. Science, 1996, 271(2): 665-668.
- [11] Yee SB, Ganey PE, Roth RA. The role of Kupffer cells and TNF-alpha in monocrotaline and bacterial lipopolysaccharide-induced liver injury[J]. Toxicol Sci, 2003, 71(1): 124-132.
- [12] Masiá M, Gutiérrez F, Llorca B, et al. Serum concentrations of lipopolysaccharide-binding protein as a biochemical marker to differentiate microbial etiology in patients with community-acquired pneumonia[J]. Clin Chem, 2004, 50(9): 1661-1664.
- [13] 何东仪, 胡义扬, 薛惠明, 等. 肝脂消治疗脂肪肝的临床疗效观察[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2001, 9(1): 35-37.
- [14] 张慧, 冯琴, 胡义扬, 等. 祛湿化癥方对 CCl₄ 复合高脂低蛋白饮食诱导的大鼠脂肪肝的防治作用[J]. 上海中医药杂志, 2006, 40(3): 52-55.
- [15] 张慧, 冯琴, 李红山, 等. 祛湿化癥方对非酒精性脂肪性肝炎大鼠组织蛋白酶 B 和肿瘤坏死因子 α 表达的影响[J]. 中西医结合学报, 2008, 6(9): 928-933.
- [16] Feng Q, Gou XJ, Meng SX, et al. Qushi Huayu Decoction inhibits hepatic lipid accumulation by activating AMP-activated protein kinase *in vivo* and *in vitro* [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013: 184358.

(收稿: 2017-05-16 在线: 2018-07-02)

责任编辑: 李焕荣

英文责编: 张晶晶