

· 基础研究 ·

基于内源性大麻素探讨皂术茵陈方治疗
非酒精性脂肪性肝炎的作用机制庄鸿莉¹ 张利敏² 许诗霖² 梁惠卿³ 赖鹏华² 高凉琴⁴ 许玲夏² 周志佳² 陈少东²

摘要 目的 研究皂术茵陈方对非酒精性脂肪性肝炎大鼠的药理效应及对内源性大麻素的作用机制。**方法** 30 只 Wistar 雄性大鼠随机分为正常组、模型组和治疗组,每组 10 只。造模 12 周期间,正常组给予普通饲料喂养,模型组和治疗组给予高脂饲料以复制非酒精性脂肪性肝炎模型。从第 7 周开始,治疗组给予皂术茵陈方灌胃治疗 6 周。检测大鼠血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)活性,肝组织甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC);HE 染色法观察大鼠肝组织的病理变化;采用高效液相色谱-质谱联用法(LC/MS)检测肝组织 2-花生四烯酸甘油(2-AG)含量;通过 Real-time PCR 法检测大鼠肝组织脂肪酰胺水解酶(FAAH)和单酰基甘油酯酶(MGL) mRNA 表达水平。**结果** 与正常组比较,模型组大鼠肝组织内出现明显脂肪沉积和炎症损伤,血清 ALT、AST 活性明显升高($P < 0.01$),肝组织 TG、TC 含量升高($P < 0.01$);肝组织大麻素 2-AG 含量显著升高($P < 0.01$),FAAH、MGL mRNA 表达降低($P < 0.01$)。治疗组与模型组比较,治疗 6 周后血清 ALT、AST 活性、肝组织 TG、TC、大麻素 2-AG 含量明显降低($P < 0.05$),FAAH、MGL mRNA 表达升高($P < 0.01$)。**结论** 皂术茵陈方对非酒精性脂肪性肝炎具有良好的治疗作用,其作用机制与抑制内源性大麻素密切相关。

关键词 皂术茵陈方;非酒精性脂肪性肝炎;内源性大麻素

Mechanism of Zaozhu Yinchen Recipe for Treatment of Non-alcoholic Steatohepatitis Based on Endogenous Cannabinoid ZHUANG Hong-li¹, ZHANG Li-min², XU Shi-lin², LIANG Hui-qing³, LAI Peng-hua², GAO Liang-qin⁴, XU Ling-xia², ZHOU Zhi-jia², and CHEN Shao-dong² 1 Department of Traditional Chinese Medicine, First Hospital of Xiamen University, Fujian (361001); 2 School of Medicine, Xiamen University, Fujian (361102); 3 Liver Disease Center, Xiamen Hospital of Traditional Chinese Medicine, Fujian (361009); 4 Department of Traditional Chinese Medicine, of Xiamen University Hospital, Fujian (361005)

ABSTRACT Objective To study the pharmacological effect of Zaozhu Yinchen Recipe (ZZYCR) on nonalcoholic steatohepatitis (NASH) rats and to observe the mechanism of action on endogenous cannabinoid. **Methods** Thirty Wistar male rats were randomly divided into the normal group, the model group, and the treatment group, 10 in each group. During the 12 weeks of modeling, rats in the normal group were fed with common forage. NASH model was duplicated in rats of the model group and the treatment group by feeding high-fat forage. Starting from the 7th week, ZZYCR was administered to rats in the treatment group by gastrogavage for 6 successive weeks. Serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), triglyceride (TG), and total cholesterol (TC) were detected. Pathological changes of rat liver tissues were observed by HE staining. The content of 2-arachidonoyl

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81503529, No. 81673660);福建省科技计划引导性项目(No. 2015D0007, No. 2016D012);厦门市科技计划项目(No. 3502Z20174028);厦门市重要重大疾病联合攻关项目(No. 3502Z20179047);福建中医药大学临床专项校管课题基金(No. XB2016080)

作者单位:1. 厦门大学附属第一医院中医科(福建 361001); 2. 厦门大学医学院(福建 361102); 3. 厦门市中医院肝病中心(福建 361009); 4. 厦门大学医院中医科(福建 361005)

通讯作者:陈少东, Tel: 0592-2183069, E-mail: adong@xmu.edu.cn

DOI: 10.7661/j.cjim.20190819.315

glycerol (2-AG) in liver tissue was detected by LC/MS, and the mRNA expression levels of fatty amide hydrolase (FAAH) and monoglyceride esterase (MGL) in liver tissue were detected by Real-time PCR. Results Compared with the normal group, obvious fat deposition and inflammation injury occurred in the liver tissue, activities of ALT and AST in serum increased significantly ($P < 0.01$), the contents of TG and TC in liver tissue increased significantly ($P < 0.01$), the contents of 2-AG in liver tissue increased significantly ($P < 0.01$), and the mRNA expressions of FAAH and MGL decreased in the model group ($P < 0.01$). After 6 weeks of treatment, serum activities of ALT and AST, contents of TG, TC, and 2-AG in liver tissue significantly decreased ($P < 0.05$), and the mRNA expressions of in FAAH and MGL increased ($P < 0.01$) in the treatment group. Conclusion ZZYCR showed good therapeutic effects on NASH, and its mechanism was closely related to inhibiting endogenous cannabinoid.

KEYWORDS Zaozhu Yinchen Recipe; non-alcoholic steatohepatitis; endogenous cannabinoid

非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)是非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)出现细胞坏死,炎症损伤的病理阶段,可进一步进展为肝纤维化、肝硬化,逐步替代慢性乙型肝炎,成为我国第一大肝病,因此加强 NASH 的防治,截断其发展具有重要的意义。本病西医治疗多采用对症处理、保肝降酶、抗炎抗氧化,但缺乏有效的手段^[1],中药复方因其作用多途径、多环节的作用特点成为防治 NASH 的研究热点,皂角刺茵陈方以经典方茵陈汤为基础配伍皂角刺和白术而成,前期临床工作已证实皂术茵陈方治疗 NASH 作用显著^[2-4]。新近研究表明,内源性大麻素系统与 NAFLD 发生、发展密切相关,其中内源性大麻素受体 1(cannabinoid receptor 1, CB1)、大麻素受体 2(cannabinoid receptor 2, CB2)参与调控机体脂质代谢、肝脏炎症损伤^[5],内源性大麻素 2-花生四烯酸甘油(2-arachidonoylglycerol, 2-AG)通过激活 CB1 促进食欲、增加能量摄入,并增加脂肪组织分解脂肪,促进 TG 向肝脏转移促使脂肪肝产生^[6,7]。而参与水解内源性大麻素的两种水解酶分别是脂肪酰胺水解酶(fatty acid amide hydrolase, FAAH)和单酰基甘油酯酶(monoacylglycerol lipase, MGL),也有报道可独立影响体内脂质代谢^[8]。本研究以内源性大麻素为切入点,探讨皂术茵陈方对 NASH 大鼠的治疗作用及其作用机制。

材料与方法

1 动物 Wistar 雄性大鼠 30 只,清洁级,体重(220 ± 10)g,10 周龄,由上海斯莱克实验动物有限公司提供,许可证号:SCXK 2012-0002。实验动物饲养于厦门大学医学院实验动物中心,自由饮水,饲养温度控制在 $20 \sim 22^\circ\text{C}$,相对湿度 65%~70%。本实验

方案通过厦门大学实验动物伦理委员会审查(No. XMULAC20120020)。

2 药物 皂术茵陈方由皂角刺 15 g、炒白术 15 g、茵陈蒿 15 g、栀子 9 g、姜黄 6 g 组成,购于北京同仁堂厦门市思明区禾祥中医门诊部,由厦门大学医学院中医系协助制备,制备药物浓度为 625 mg/mL。

3 试剂 ALT 试剂盒(生产批号:20160301); AST 试剂盒(生产批号:20160301); TG 试剂盒(生产批号:20160315); TC 试剂盒(生产批号:20160316),以上试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

4 仪器设备 Mini-6K 微型离心机;CHOL-16M 高速台式冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);M2000 多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司);HP 1200 高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司);Qtrap 3200 质谱仪(美国 AB 公司);罗氏 LightCycler 480 II 罗氏荧光定量 PCR。

5 分组、造模及给药 30 只 Wistar 雄性大鼠按随机数字表法分为正常组、模型组、治疗组。除正常组大鼠给予普通饲料外,其他两组大鼠给予高脂饮食^[9](改良高脂饲料配方为:83.25%基础饲料、10%猪油、1.5%胆固醇、5%蔗糖、0.2%脱氧胆酸钠、0.05%丙硫氧嘧啶)喂养 12 周,复制非酒精性脂肪性肝炎模型。治疗组自第 7 周起,按每天 75 mg/kg 剂量给予皂术茵陈方灌胃,按成人体重为 60 kg 计算大鼠每日常规用药量^[10],持续 6 周。实验结束后,各组大鼠经腹主动脉取血、收集肝脏组织并称重,将肝脏组织固定在 10%多聚甲醛中用于组织病理学分析,将剩余的肝脏储存在 -80°C ,用于生化分析。

6 指标检测及方法

6.1 比较各组大鼠体重、肝湿重、肝指数(肝湿重/大鼠体重 $\times 100\%$)。

6.2 观察大鼠肝脏外观变化

6.3 肝组织病理检测 肝组织石蜡切片行 HE 染色,光镜下观察肝组织的脂肪变性程度。

6.4 血清 ALT、AST 活性检测 采用比色法检测各组血清 ALT、AST 活性。

6.5 肝组织 TC、TG 含量检测 称取 100 mg 肝组织,在离心管中加入 0.9 mL 无水乙醇。在冰水浴中用电动匀浆器将肝组织匀浆,并在 4 ℃ 以 2 500 r/min 离心 10 min,取 2.5 μL 上清液进行 TC、TG 测定。使用 TC、TG 试剂盒分别测定各组肝组织 TC、TG 含量。

6.6 大麻素及大麻素水解酶检测 采用液相色谱-质谱联用法(LC-MS)检测大鼠肝组织内源性大麻素 2-AG 含量。采用 Real-time PCR 检测内源性大麻素水解酶的 mRNA 表达。

7 统计学方法 所有数据均采用 SPSS 16.0 软件包进行统计学分析。计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。满足正态性和方差齐性,采用单因素方差分析,组间比较采用 q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学差异。

结 果

1 各组大鼠体重、肝湿重、肝指数比较(表 1) 与正常组比较,模型大鼠体重、肝湿重、肝指数有显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,治疗组大鼠体重、肝湿重、肝指数降低($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠体重、肝湿重、肝指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	体重(g)	肝湿重(g)	肝指数(%)
正常	10	351 ± 20.52	10.32 ± 0.64	2.66 ± 0.11
模型	10	406 ± 20.33 *	19.43 ± 0.79 **	4.75 ± 0.21 **
治疗	10	361 ± 23.62 Δ	16.51 ± 1.71 Δ	3.69 ± 0.22 Δ

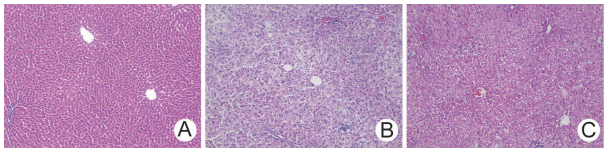
注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

2 各组大鼠肝脏外观比较 肉眼观察正常组大鼠肝脏外观呈红褐色,边缘锐利,表面光滑无结节,质地柔韧富有弹性;模型组大鼠肝脏表面颜色变淡,肝缘厚钝,触感油腻,体积变大;治疗组肝脏外观呈暗红色,边缘、质地较模型组大鼠均有所改善。

3 各组大鼠肝组织病理改变(图 1) 较之正常组,模型组大鼠肝组织均出现不同程度的脂肪变性和气球样变,治疗组大鼠脂肪变性程度及细胞肿胀明显减轻,细胞内脂滴数量减少,体积变小,炎性细胞浸润及坏死灶较模型组少。

4 各组大鼠血清 ALT、AST 活性、肝组织 TG、TC 含量比较(表 2) 与正常组比较,模型组大鼠血清 ALT、AST 活性以及肝组织 TG、TC 含量明显升高

($P < 0.01$);与模型组比较,治疗组大鼠血清 ALT、AST 活性以及肝组织 TG、TC 水平降低($P < 0.05$)。



注:A 为正常组;B 为模型组;C 为治疗组
图 1 各组大鼠肝组织形态学变化 (HE 染色,×100)

表 2 各组大鼠血清 ALT、AST 活性以及肝组织 TG、TC 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	ALT (U/L)	AST (U/L)	TG (mmol/g pro)	TC (mmol/g pro)
正常	10	33.22 ± 3.62	28.63 ± 6.72	0.51 ± 0.12	0.26 ± 0.05
模型	10	76.43 ± 9.33 *	67.32 ± 8.44 *	1.53 ± 0.46 *	0.92 ± 0.14 *
治疗	10	59.32 ± 7.82 Δ	55.37 ± 8.22 Δ	0.89 ± 0.32 Δ	0.62 ± 0.09 Δ

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

5 各组大鼠肝组织内源性大麻素含量及大麻素水解酶 mRNA 表达比较(表 3) 与正常组比较,模型组肝组织 2-AG 含量增加($P < 0.05$),而大麻素水解酶 FAAH、MGL mRNA 表达降低($P < 0.01$);与模型组比较,治疗组 2-AG 含量降低($P < 0.05$),FAAH、MGL mRNA 表达水平升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 3 各组大鼠肝组织内源性大麻素含量及大麻素水解酶 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	2-AG(nmol/g)	FAAH mRNA	MGL mRNA
正常	10	0.21 ± 0.09	1.32 ± 0.16	1.51 ± 0.37
模型	10	0.68 ± 0.18 *	0.31 ± 0.11 **	0.34 ± 0.15 **
治疗	10	0.43 ± 0.12 Δ	0.67 ± 0.22 $\Delta\Delta$	0.89 ± 0.23 $\Delta\Delta$

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

讨 论

NAFLD 是与胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)及遗传易感性密切相关的一种代谢应激性肝损伤^[11]。肝脏是内源性大麻素作用的重要靶点之一。有研究已经证明内源性大麻素通过其受体介导而参与脂质代谢的调节参与各种肝脏疾病过程,在肝脏炎症损伤、肝纤维化中起重要作用^[12]。高脂饮食可诱导体内 CB1 表达增加,进而激活肝脏脂肪合成基因主要转录因子(sterol-regulatory element binding proteins-1c,SREBP-1c)及其靶酶乙酰辅酶 A 羧化酶(acetyl CoA carboxylase,ACC)和脂肪酸合成酶(fatty acid synthetase,FAS),促进脂肪酸的合成;同时抑制肉碱棕榈酰转移酶(carnitine acyl-transferase,CPT-1)

活性,减少脂肪 β -氧化。最终导致体内甘油三脂增加,致使肥胖和脂肪肝的产生^[13]。有研究证明,CB1 的表达增加,会导致 IR,促进肝脏炎症反应,加快 NAFLD 病程的进展恶化。而使用 CB1 拮抗剂利莫那班等可以改善脂质堆积和炎症损伤症状^[14,15]。

皂术茵陈方以皂刺活血化痰,白术健脾益气,茵陈清热利湿,栀子清热泻火,姜黄活血化瘀。全方共奏清热利湿、化痰活血之功效。本实验结果显示,皂术茵陈方能显著减轻大鼠体重和肝湿重、降低 ALT、AST 活性以及 TG、TC 含量,表明该方具有显著的治疗 NASH 的药理效应。值得注意的是,LC-MS 结果显示,皂术茵陈方能够显著降低大鼠肝组织 2-AG 含量,这可能是其治疗 NASH 的作用机制之一。通过减少 2-AG 的含量,可以减少其与相应受体 CB1 的结合,进而减少下游因子生物效应。有研究证明 FAAH 的含量减少会通过反馈性引起中枢性甲状腺功能减退症,进而导致脂质堆积和胰岛素抵抗产生^[16]。本实验 Real-time PCR 结果提示,皂术茵陈方能升高内源性大麻素的两种水解酶的表达,FAAH、MGL 的表达增加可以加速水解体内 2-AG,进而减少与其受体 CB1、CB2 的结合。上述实验结果表明皂术茵陈方通过调控内源性大麻素系统进而调节 NASH 大鼠体内的脂质水平,改善组织脂肪变性,有效清除自由基。其作用机制可能与通过降低内源性大麻素含量,增加内源性大麻素水解酶表达,进而提高大鼠抗氧化能力、减轻氧化损伤有关。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] 林立,梁惠卿,陈少东,等.非酒精性脂肪肝同病异证与肝活检病理学的相关性研究[J].中华中医药杂志,2019,34(4):1462-1465.
- [2] 陈少东,杨嘉恩,王宏国,等.皂术茵陈方治疗非酒精性脂肪性肝炎 40 例临床研究[J].中医药通报,2015,14(1):46-48,64.
- [3] 唐金模,梁惠卿,王宏国,等.皂术茵陈方治疗非酒精性脂肪性肝炎的临床疗效及对游离脂肪酸和 TNF- α 的影响[J].中国中西医结合杂志,2016,36(5):545-549.
- [4] 林立,梁惠卿,庄鸿莉,等.皂术茵陈方治疗非酒精性脂肪性肝炎的临床观察及其对肠道菌群的影响[J].中国中西医结合杂志,2018,38(6):673-676.
- [5] O'Keefe L, Simcocks AC, Hryciw DH, et al. The cannabinoid receptor 1 and its role in influencing peripheral metabolism[J]. Diabetes Obes Metab, 2014, 16(4): 294-304.
- [6] Jeong WI, Osei-Hyiaman D, Park O, et al. Paracrine activation of hepatic CB1 receptors by stellate cell-derived endocannabinoids mediates alcoholic fatty liver[J]. Cell Metab, 2008, 7(3): 227-235.
- [7] Deveaux V, Cadoudal T, Ichigotani Y. Cannabinoid CB2 receptor potentiates obesity-associated inflammation, insulin resistance and hepatic statuses[J]. PLoS One, 2009, 4(6): 5844.
- [8] Holtfrerich A, Hanekamp W, Lehr M. (4-Phenoxyphenyl) tetrazolecarboxamides and related compounds as dual inhibitors of fatty acid amide hydrolase (FAAH) and monoacylglycerol lipase (MAGL)[J]. Eur J Med Chem, 2013, 63: 64-75.
- [9] Kucera O, Cervinkova Z. Experimental models of non-alcoholic fatty disease in rats[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(26): 8364-8376.
- [10] 梁惠卿,林曼婷,赵道,等.栀子苷改善大鼠非酒精性脂肪性肝病游离脂肪酸代谢的机制研究[J].中国中药杂志,2016,41(3):470-475.
- [11] Portillo P, Yavuz S, Bril F. Role of insulin resistance and diabetes in the pathogenesis and treatment of nonalcoholic fatty liver disease[J]. Curr Hepatol Rep, 2014, 13(2): 159-170.
- [12] Mallat A, Teixeira-Clerc F, Deveaux V, et al. The endocannabinoid system as a key mediator during liver diseases: new insights and therapeutic openings[J]. Br J Pharmacol, 2011, 163(7): 1432-1440.
- [13] Jourdan T, Djaouti L, Demizieux L, et al. CB1 antagonism exerts specific molecular effects on visceral and subcutaneous fat and reverses liver steatosis in diet-induced obese mice[J]. Diabetes, 2010, 59(4): 926-934.
- [14] Jorgačević B, Mladenović D, Ninković M, et al. Rimonabant improves oxidative/nitrosative stress in mice with nonalcoholic fatty liver disease[J]. Oxidat Med Cell Longevity, 2015: 842108.
- [15] Mallat A, Teixeira-Clerc F, Lotersztajn S. Cannabinoid signaling and liver therapeutics[J]. J Hepatol, 2013, 59(4): 891-896.
- [16] Brown WH, Gillum MP, Lee HY, et al. Fatty acid amide hydrolase ablation promotes ectopic lipid storage and insulin resistance due to centrally-mediated hypothyroidism[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(37): 14966-14971.

(收稿:2019-03-25 在线:2019-11-04)

责任编辑:李焕荣

英文责编:张晶晶