

· 基础研究 ·

血府逐瘀汤防治非酒精性脂肪肝的效应机制研究

宋 丽¹ 唐宋琪^{1,2} 童继威¹ 蔡 飘¹ 刘嘉欣¹ 任雪交¹ 黄 巍¹

摘要 **目的** 探讨血府逐瘀汤对非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 的防治效应及作用机制。**方法** 36 只小鼠采用数字表法随机分为 6 组: 预防-空白 (C-P) 组、预防-模型 (M-P) 组、预防-血府逐瘀汤 (X-P) 组、治疗-空白 (C-T) 组、治疗-模型 (M-T) 组、治疗-血府逐瘀汤 (X-T) 组。并采用高脂饲料联合亚临床剂量脂多糖 (LPS) 腹腔注射建立 ApoE^{-/-} 小鼠 NAFLD 模型, 造模期间或造模完成后, 分别给予血府逐瘀汤 15 g/kg 灌胃干预 4 周。HE 染色和油红 O 染色观测肝脏组织形态学变化, 流式细胞检测全血 CD14⁺CD11b⁺Ly6G⁺ 细胞数量, ELISA 检测血浆角蛋白趋化因子 (KC)、巨噬细胞炎性蛋白-2 (MIP-2) 及肝组织髓过氧化物酶 (MPO)、MIP-2 含量。**结果** 血府逐瘀汤可明显减少肝组织炎性细胞浸润, 减轻肝组织脂肪变性, 与模型组比较, 减少了外周血中 CD14⁺CD11b⁺Ly6G⁺ 细胞数量 ($P < 0.05$), 降低了肝组织和外周血中 MIP-2、KC 含量 ($P < 0.05$), 但对肝组织中 MPO 含量无显著性影响。**结论** 血府逐瘀汤对高脂饲料联合亚临床剂量 LPS 腹腔注射构建的 ApoE^{-/-} 小鼠 NAFLD 模型的肝组织炎症及脂肪变性具有防治作用, 预防作用优于治疗作用, 其作用机制与抗中性粒细胞趋化密切相关。

关键词 血府逐瘀汤; 非酒精性脂肪肝; 脂多糖; 中性粒细胞; 微炎症状态

Study on the Mechanism of Xuefu Zhuyu Decoction in Preventing and Treating NAFLD SONG Li¹, TANG Song-qi^{1,2}, TONG Ji-wei¹, CAI Piao¹, LIU Jia-xin¹, REN Xue-jiao¹, and HUANG Wei¹ 1 Basic Medical College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu (611137); 2 TCM Medical College, Hainan Medical University, Haikou (571199)

ABSTRACT **Objective** To observe the preventive and therapeutic effects and mechanism of Xuefu Zhuyu Decoction (XFZYD) on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Methods** Totally 36 mice were divided into a preventive-control group (C-P), preventive-model group (M-P), preventive-XFZYD group (X-P), treatment-control group (C-T), treatment-model group (M-T), treatment- XFZYD group (X-T) by random digit table. ApoE^{-/-} mice NAFLD model was established by intraperitoneal injection of high fat diet combined with subclinical dose of lipopolysaccharide (LPS). During or after the establishment of the model, XFZYD (15 g/kg) was administered as intervention by gastrogavage for 4 successive weeks. HE staining and oil red O staining were used to observe the morphological changes of liver tissues. Flow cytometry was used to detect the number of CD14⁺CD11b⁺Ly6G⁺ cells in whole blood. ELISA was used to detect the contents of plasma keratinocyte chemoattractant (KC), macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2), and myeloperoxidase (MPO) in liver tissues. **Results** XFZYD significantly reduced the infiltration of inflammatory cells in liver tissues, attenuated the steatosis of liver tissues. Compared with the model group, the number of CD14⁺CD11b⁺Ly6G⁺ cells in peripheral blood were reduced ($P < 0.05$), and the contents of MIP-2 and KC in liver tissues and peripheral blood were lowered ($P < 0.05$). But it had no significant effect on MPO in liver tissues. **Conclusions** XFZYD had preventive and therapeutic effects on inflammation and steatosis of liver tissues in ApoE^{-/-} mice NAFLD model established by intraperitoneal injection of high fat diet combined with subclinical dose LPS. Its preventive effects were better than its therapeutic effects. Its mechanism might be closely related to anti-neutrophil chemotaxis.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81673879)

作者单位: 1. 成都中医药大学基础医学院 (成都 611137); 2. 海南医学院中医学院 (海口 571199)

通讯作者: 黄 巍, Tel: 028-86132695, E-mail: gracehw@126.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20200315. 132

KEYWORDS Xuefu Zhuyu Decoction; non-alcoholic fatty liver disease; lipopolysaccharide; neutrophil; low-grade inflammation

中医经典古方血府逐瘀汤具有活血祛瘀、行气止痛之功^[1],临床用于治疗非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)疗效确切、优势明显^[2],但作用机制尚未完全阐明。本实验采用高脂饲料饲养 C57BL/6J ApoE^{-/-}小鼠联合亚临床剂量脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)腹腔注射建立 NAFLD 模型,评价血府逐瘀汤干预 NAFLD 的作用效应及血府逐瘀汤对抗中性粒细胞浸润的作用规律和特点。

材料与方法

1 动物及分组 C57BL/6J ApoE^{-/-}小鼠, 36 只, SPF 级, 雄性, 8~10 周龄, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 许可证号: SYXK(川)2017-204。饲养屏障系统内, 温度 20~26℃, 相对湿度 40%~70%, 12 h/12 h 昼夜明暗交替。采用数字表法随机分为 6 组, 即: 预防-空白(C-P)组、预防-模型(M-P)组、预防-血府逐瘀汤(X-P)组、治疗-空白(C-T)组、治疗模型(M-T)组、治疗-血府逐瘀汤(X-T)组, 每组 6 只。本实验已通过成都中医药大学附属医院伦理委员会审查(No. 2016010221)。

2 药物 血府逐瘀汤由当归 9 g 生地黄 9 g 桃仁 12 g 红花 9 g 赤芍 6 g 枳壳 6 g 柴胡 3 g 川芎 4.5 g 牛膝 9 g 桔梗 4.5 g 甘草 3 g 共 11 味中药组成。赤芍(四川恒康源药业有限公司, 货号: 180301); 红花(四川国强中药饮片有限公司, 货号: 180101); 当归(货号: 180301), 桃仁(货号: 171101), 枳壳(货号: 180401), 桔梗(货号: 170601), 生地黄(货号: 180401), 甘草(货号: 180301), 以上 6 味中药均购自四川百草园药业有限公司; 柴胡(四川新荷花中药饮片股份有限公司, 货号: D1707099); 川芎(四川禾一天然药业有限公司, 货号: 17110303); 川牛膝(四川吉安康药业有限公司, 货号: 170601)。高脂饲料(TD88051, 美国 ENVIGO)。

3 试剂及仪器 LPS(025M4040V, 美国 Sigma-Aldrich); PBS(1943327, 美国 GIBCO); MPO DuoSet ELISA kit(P148534), MIP-2 DuoSet ELISA kit(P148182), KC Quantikine ELISA kit(P162147), MIP-2 Quantikine ELISA kit(P174020), 均为美国 R&D Systems 公司生产; CD33 Monoclonal Antibody PE-Cyanine7(9A11-CD33), CD14 Monoclonal Antibody FITC(Sa2-8), CD11b Monoclonal

Antibody Alexa Fluor 488(M1/70), Ly-6G Monoclonal Antibody FITC(1A8-Ly6g), 均为美国 eBioscience 公司生产。酶标仪(MULTISKAN GO, 美国 Thermo), 冷冻离心机(H1850R, 长沙湘仪离心机仪器有限公司), 流式细胞仪(FC500, 美国 Beckman)。摊片机(HI1210), 切片机(RM2245), 包埋机(EG1150), 全自动染色机(ST5010), 显微镜(DM500)均为德国 Leica。全自动封闭式组织脱水机(JSD-QD), 病理组织漂烘仪(PHY-III), 均为常州中威电子仪器有限公司。

4 方法

4.1 药液制备 按中药饮片 75 g 加水 1 000 mL 浸泡 30 min, 煎煮 2 次, 每次 30 min, 合并滤液浓缩, 制备成含生药量 1.5 g/mL 的浸膏。

4.2 LPS 溶液配制 10 mg LPS 加 10 mL PBS 溶液混匀, 配置成 1 mg/mL 母液, 分装后于 -20℃ 储存, 使用时稀释至 0.2 ng/mL。

4.3 造模及给药(干预)方法 参考 Guo H^[3]造模方法, 将 LPS 母液溶于 PBS 溶液中, 4 ng/kg LPS 腹腔注射联合高脂饲料喂养; 空白组给予 PBS 溶液 20 mL/kg 腹腔注射, 同时给予高脂饲料喂养; 两组注射频次为 1 次/3 天, 适应性注射 10 天后, 给予高脂饲料喂养, 从高脂喂养开始计算造模时间。

C-P 组: PBS 腹腔注射联合高脂饲料喂养 4 周; M-P 组: LPS 腹腔注射联合高脂饲料喂养 4 周; X-P 组: LPS 腹腔注射联合高脂饲料喂养, 同时给予血府逐瘀汤灌胃预防性治疗 4 周; C-T 组: PBS 腹腔注射联合高脂饲料喂养 4 周后, 停止腹腔注射, 继续高脂饲料喂养 4 周; M-T 组: LPS 腹腔注射联合高脂饲料喂养 4 周后, 停止腹腔注射, 继续高脂饲料喂养 4 周; X-T 组: LPS 腹腔注射联合高脂饲料喂养 4 周后, 停止腹腔注射, 继续高脂饲料喂养 4 周, 同时给予血府逐瘀汤灌胃治疗 4 周。给药剂量: 本实验采用人体临床等效剂量, 根据小鼠与人等效剂量换算系数以 12 计算得出^[4], X-P 汤组小鼠及治疗血府逐瘀汤组给药剂量均为 15 g/kg, 给药体积为 10 mL/kg, 给药浓度为 1.5 g/mL, 其余 4 组均给予等体积的生理盐水; 其中 C-P 组的给药周期为 1~4 周, X-T 组的给药周期为 5~8 周。

5 观察指标及检测方法

5.1 肝脏组织形态学观察 腹主动脉放血处死小鼠, 采集小鼠肝脏, 取左侧外叶相同部位肝脏组织约 1 cm³ 用 10% 中性甲醛固定, HE 染色, 观察肝脏组织病

理学改变。另取肝脏组织约 0.5 cm^3 置于液氮中固定, 制作冰冻切片, 油红 O 染色, 观察肝脏组织脂肪变性。

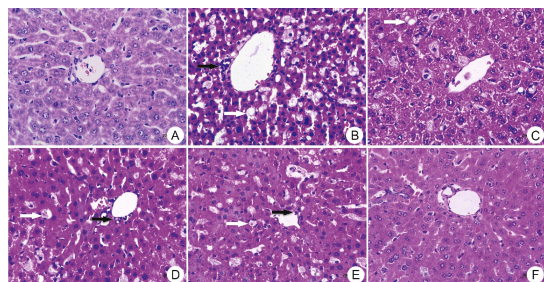
5.2 $\text{CD14}^+\text{CD11b}^+\text{Ly6G}^+$ 细胞数量 末次给药结束后, 禁食不禁水 12 h, 麻醉小鼠, 腹主动脉采集全血置于含肝素钠的 EP 管中, 取 0.2 mL 采用流式细胞检测 $\text{CD14}^+\text{CD11b}^+\text{Ly6G}^+$ 细胞数量。

5.3 血浆角蛋白趋化因子 (keratinocyte chemoattractant, KC)、巨噬细胞炎性蛋白-2 (macrophage inflammatory protein 2, MIP-2) 因子及肝组织髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO)、MIP-2 含量 余下抗凝血室温静置 2 h, $4\text{ }^\circ\text{C}$, $2\ 500\text{ r/min}$, 离心 10 min, 分离收集血浆, 加入蛋白酶抑制剂, 无菌 EP 管分装, $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱冻存, 采用 ELISA 检测。

6 统计学方法 结果采用 SPSS 21.0 统计分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示; 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 q 检验, 方差不齐采用秩和检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 肝脏组织 HE 染色形态学观察 (图 1) 镜下观察可见, C-P 组动物肝组织中央静脉、肝细胞板肝细胞、肝窦、汇管区结构清晰, 未见明显异常改变。M-P 组和 X-P 组肝组织可见不同程度脂肪变性, 表现为脂肪变性肝细胞面积增大、肝窦变窄甚至消失、肝细胞浆内出现大小不等的边界清楚的圆形空泡; M-P 组脂肪变性的肝细胞数量较多、分布范围较广, 伴见不同程度炎性细胞浸润; X-P 组脂肪变性的肝细胞数量不同程度减少、分布不同程度缩小。C-T 组、M-T 组和 X-T 组肝组织可见不同程度脂肪变性, 表现为脂肪变性肝细胞面积增大、肝窦变窄甚至消失、肝细胞浆内出现大小不等的边界清楚的圆形空泡; M-T 组脂肪变性较 C-T 组和 X-T 组明显, 且伴见少量炎性细胞浸润; X-T 组脂肪变性程度较低, 肝窦形态较 M-T 组正常。M-T 组在

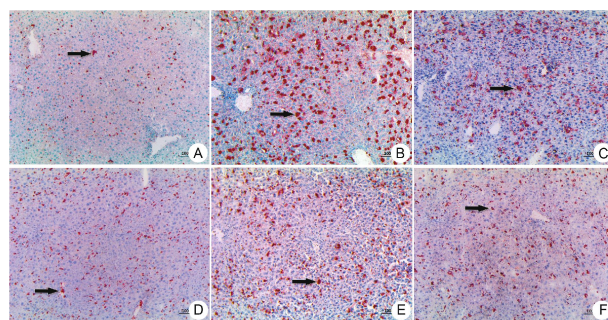


注: A 为 C-P 组; B 为 M-P 组; C 为 X-P 组; D 为 C-T 组; E 为 M-T 组; F 为 X-T 组; 白色箭头所指为脂肪变性; 黑色箭头所指为炎性细胞浸润

图 1 各组小鼠肝组织形态学观察结果 (HE 染色, $\times 400$)

组织形态及脂肪变性方面较 M-P 组有明显改善。

2 肝脏组织油红 O 染色形态学观察 (图 2) 镜下观察可见, 油红 O 染色肝组织肝细胞沉积的中性脂肪呈鲜红色。C-P 组少量肝细胞见中性脂肪沉积。M-P 组可见肝细胞内中性脂肪沉积较多、分布较大。X-P 组肝细胞内中性脂肪沉积不同程度减少、分布范围缩小。C-T 组、M-T 组和 X-T 组肝组织均可见中性脂肪沉积, 以 M-T 组最为明显, X-T 组肝细胞内中性脂肪沉积的程度和范围较 M-T 组小。M-T 组与 M-P 组比较, 肝细胞内中性脂肪沉积不同程度减少、分布范围缩小。



注: A 为 C-P 组; B 为 M-P 组; C 为 X-P 组; D 为 C-T 组; E 为 M-T 组; F 为 X-T 组; 黑色箭头所指为脂肪变性

图 2 小鼠肝组织形态学观察 (油红 O 染色, $\times 100$)

3 各组小鼠外周血 $\text{CD14}^+\text{CD11b}^+\text{Ly6G}^+$ 细胞比例比较 (表 1) 与 C-P 组比较, M-P 组外周血 $\text{CD14}^+\text{CD11b}^+\text{Ly6G}^+$ 细胞群百分比显著增高 ($P<0.05$), X-P 组 $\text{CD14}^+\text{CD11b}^+\text{Ly6G}^+$ 细胞群百分比低于 M-P 组, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$); 与 C-T 组比较, M-T 组外周血中 $\text{CD14}^+\text{CD11b}^+\text{Ly6G}^+$ 细胞群百分比亦增高 ($P<0.05$); 与 M-T 组比较, X-T 组外周血中 $\text{CD14}^+\text{CD11b}^+\text{Ly6G}^+$ 细胞群百分比下降 ($P<0.05$)。

表 1 各组小鼠外周血中 $\text{CD14}^+\text{CD11b}^+\text{Ly6G}^+$ 细胞群百分比的比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	$\text{CD14}^+\text{CD11b}^+\text{Ly6G}^+$ (%)
C-P	6	1.71 ± 0.66
M-P	6	$5.35\pm 2.18^*$
X-P	6	4.76 ± 1.84
C-T	6	2.11 ± 1.11
M-T	6	$5.92\pm 2.50^\Delta$
X-T	6	$1.60\pm 0.60^\Delta$

注: 与 C-P 组比较, * $P<0.05$; 与 C-T 组比较, $^\Delta P<0.05$; 与 M-T 组比较, $^\Delta P<0.05$

4 各组小鼠外周血 KC、MIP-2 含量的比较 (表 2) 与 C-P 组比较, M-P 组外周血中 KC、MIP-2 含量明显增高 ($P<0.05$), 同时 X-P 组外周血中 KC、MIP-2 含量明显低于 M-P 组 ($P<0.05$), C-T 组外周

血中 KC、MIP-2 含量低于 M-T 组 ($P<0.05$), 且 X-T 组亦低于 M-T ($P<0.05$)。

表 2 各组小鼠外周血中 KC、MIP-2 因子含量比较 (pg/mL, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	KC	MIP-2
C-P	6	58.79 $\pm$ 17.43	66.30 $\pm$ 9.52
M-P	6	176.10 $\pm$ 33.27*	100.30 $\pm$ 32.36*
X-P	6	137.30 $\pm$ 41.29 [△]	26.34 $\pm$ 10.97 [△]
C-T	6	47.49 $\pm$ 4.42	42.56 $\pm$ 11.92
M-T	6	111.15 $\pm$ 18.44 [△]	67.67 $\pm$ 5.88 [△]
X-T	6	81.05 $\pm$ 16.11 [○]	37.33 $\pm$ 6.91 [○]

注:与 C-P 组比较, * $P<0.05$; 与 C-T 组比较, [△] $P<0.05$; 与 M-P 组比较, [△] $P<0.05$; 与 M-T 组比较, [○] $P<0.05$

5 各组小鼠肝组织 MPO、MIP-2 含量比较(表 3)与 C-P 组比较, M-P 组肝组织中 MIP-2、MPO 含量明显增高 ($P<0.05$), X-P 组肝组织中 MIP-2、MPO 含量低于 M-P 组 ($P<0.05$), C-T 组肝组织中 MIP-2、MPO 含量亦低于 M-T 组 ($P<0.05$), 且 X-T 组 MIP-2 亦低于 M-T 组 ($P<0.05$), MPO 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 3 各组小鼠肝组织中 MIP-2、MPO 含量比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	MIP-2 (pg/mg · pro)	MPO (ng/mg · pro)
C-P	6	234.30 $\pm$ 82.05	4.42 $\pm$ 1.22
M-P	6	1501.00 $\pm$ 309.70*	11.43 $\pm$ 3.56*
X-P	6	1034.00 $\pm$ 129.60 [△]	10.90 $\pm$ 4.16
C-T	6	994.88 $\pm$ 204.06	5.72 $\pm$ 1.33
M-T	6	1987.04 $\pm$ 561.54 [△]	10.36 $\pm$ 1.42 [△]
X-T	6	966.14 $\pm$ 110.33 [○]	10.64 $\pm$ 3.62

注:与 C-P 组比较, * $P<0.05$; 与 C-T 组比较, [△] $P<0.05$; 与 M-P 组比较, [△] $P<0.05$; 与 M-T 组比较, [○] $P<0.05$

讨 论

LPS 是革兰氏阴性菌细胞壁成分,在细菌感染性炎症中扮演了重要角色,其通过与细胞膜上的 TLR4 结合而启动炎症反应,极低浓度的 LPS 经肠道漏出进入血液循环,在到达肝脏后,可引发细胞趋化因子 MIP-2、KC 释放,中性粒细胞向肝组织募集浸润等一系列级联反应,在肝组织中形成微炎症状态,造成肝细胞损伤,在脂代谢紊乱环境下,肝组织迅速发生脂肪变性,这一过程与 NAFLD 的形成密切相关^[3]。极低浓度的 LPS 入血是一种常态,如各种原因造成的肠道黏膜功能失调,引发肠道菌群漏出、异位定植,可使血液中出现极低浓度的 LPS,通过肠肝循环到达肝脏,因此肝脏最易受到 LPS 的影响^[5]。本实验模拟该病理过程,采用亚临床剂量 LPS 腹腔注射联合高脂饲料造模,该法较传统造模方式,成模时间短,4 周即可成模,且病理形态学与人

本实验通过对肝组织 HE 染色和油红 O 染色观察发现,血府逐瘀汤对 NAFLD 的预防和治疗均具有一定的疗效,且预防作用优于治疗作用。研究中同时发现,当 LPS 撤去后,模型动物的肝损伤和脂肪变性程度均有所恢复,该结果进一步证实了极低浓度 LPS 在 NAFLD 发生中的重要作用。

KC 是 CXC 趋化因子角质形成细胞衍生的趋化因子, MIP-2 是巨噬细胞炎性蛋白-2,在中性粒细胞募集过程中发挥重要作用^[6]。上述因子在本研究模型动物血清及肝组织中明显升高,同时模型动物血液中活化的 CD14⁺CD11b⁺Ly6G⁺中性粒细胞比例也明显增加,该现象提示本研究动物模型 NAFLD 的形成与中性粒细胞向肝组织的募集及活化密切相关。血府逐瘀汤在预防期和治疗期对上述因子具有不同程度的抑制作用,可能是其发挥防治效应的内在作用机制。MPO 是中性粒细胞的功能标志和激活标志,代表中性粒细胞浸润的程度,并参与氧化应激反应^[7]。本研究发现,NAFLD 模型动物肝组织中的 MPO 明显升高,进一步证实了中性粒细胞浸润在 NAFLD 形成中的重要作用,但血府逐瘀汤对肝组织中的 MPO 含量并无明显的抑制作用,提示血府逐瘀汤对肝组织中已发生活化的中性粒细胞缺乏抑制作用,由此可部分诠释其预防作用优于治疗作用的机制。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] 清·王清任. 医林改错[M]. 天津: 科学技术出版社, 2011: 13-16.
- [2] 董桂芬. 血府逐瘀汤加减治疗非酒精性脂肪肝 50 例[J]. 光明中医, 2013, 28(6): 1151-1152.
- [3] Guo H, Diao N, Yuan R, et al. Subclinical-dose endotoxin sustains low-grade inflammation and exacerbates steatohepatitis in high-fat diet-fed mice[J]. J Immunol, 2016, 196(5): 2300-2308.
- [4] 陈奇主编. 中药药理研究方法学[M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 1167-1170.
- [5] Seki E, Schnabl B. Role of innate immunity and the microbiota in liver fibrosis: crosstalk between the liver and gut[J]. J Physiol, 2012, 590(3): 447-458.
- [6] Rich J, Lee JC. The pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infection in the diabetic NOD mouse[J]. Diabetes, 2005, 54(10): 2904-2910.
- [7] Shalkami AS, Hassan M, Bakr AG. Anti-inflammatory, antioxidant and anti-apoptotic activity of diosmin in acetic acid induced ulcerative colitis[J]. Hum Exp Toxicol, 2018, 37(1): 78-86.

(收稿: 2019-12-01 在线: 2020-04-16)

责任编辑: 段碧芳
英文责编: 张晶晶