

· 基础研究 ·

下瘀血汤下调 NLRP3 改善高脂饮食诱导小鼠
非酒精性脂肪性肝炎

吴 柳^{1,2} 杨广越³ 张 洁^{1,2} 陈 蓓^{1,2} 马文婷^{1,2} 张 玮³
陶 乐^{1,2} 薛冬英^{1,2} 刘 成^{1,3}

摘要 目的 探讨下瘀血汤对高脂饮食诱导的非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的干预作用及机制。方法 24 只雄性 C57/BL6 小鼠随机分为低脂饮食(LFD)组(8 只)、高脂饮食(HFD)组(16 只),喂养 6 周。第 7 周始,HFD 组随机分为 HFD-water 组(简称 HFD 组,8 只)和下瘀血汤干预组(高脂饮食+下瘀血汤治疗组,简称 XYX 组,8 只),灌胃共计 16 周。22 周结束后,检测小鼠血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)含量;采用 HE 染色、油红 O 染色,观察小鼠肝脏组织形态、脂滴沉积;实时定量 PCR 检测肝组织中脂肪代谢途径相关因子固醇调节元件结合蛋白 1(SREBP-1)、脂肪酸合成酶(FASN)、乙酰辅酶A羧化酶 α (ACC α),炎症因子肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 18(IL-18)、簇分化抗原 68(CD68)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)及核苷酸结合寡聚化结构域蛋白样受体 3(NLRP3)炎症小体相关基因等;Western Blot、免疫组化检测 NLRP3 表达;天狼猩红染色、免疫组化检测 α -SMA 观察肝脏纤维化。结果 与 LFD 组比较,HFD 组血清 ALT 活性、TC、TG 含量显著升高($P<0.05$, $P<0.01$)。肝脏脂肪变明显,NAS 评分显著升高($P<0.05$);SREBP-1、FASN、ACC α 等脂肪代谢合成相关因子显著上调,CD68、MCP-1 等炎症相关因子 mRNA 表达显著升高($P<0.05$);NLRP3 炎症小体相关基因的表达显著上调($P<0.01$, $P<0.05$);与 HFD 组比较,XYX 组的肝脏脂肪变改善,NAS 评分下调,脂肪代谢合成相关因子、炎症因子的 mRNA 表达下调,NLRP3 炎症小体相关基因下调和 NLRP3 蛋白表达下调(均 $P<0.05$)。天狼猩红染色及 α -SMA 染色显示 HFD 组的染色面积较 LFD 组增加($P<0.05$),XYX 组则较 HFD 组减少($P<0.05$)。结论 下瘀血汤对 HFD 诱导小鼠 NASH 有显著改善作用;抑制 NLRP3 是下瘀血汤改善 NASH 的作用机制之一。

关键词 下瘀血汤;非酒精性脂肪性肝炎;高脂饮食;核苷酸结合寡聚化结构域蛋白样受体 3

Xiayuxue Decoction Improved HFD-induced Nonalcoholic Steatohepatitis Mice by Down-regulating

NLRP3 WU Liu^{1,2}, YANG Guang-yue³, ZHANG Jie^{1,2}, CHEN Bei^{1,2}, MA Wen-ting^{1,2}, ZHANG Wei³, TAO Le^{1,2}, XUE Dong-ying^{1,2}, and LIU Cheng^{1,3} 1 Laboratory of Liver Disease, Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (200062); 2 Department of Infectious Disease, Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (200062); 3 Central Laboratory, Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (200062)

ABSTRACT Objective To observe the intervention effect and mechanism of Xiayuxue Decoction (XYXD) on nonalcoholic steatohepatitis NASH induced by high fat diet. **Methods** Twenty-four male C57/BL6 mice were randomly divided into low fat diet (LFD, 8 mice) group and high fat diet (HFD, 16 mice) group. All were fed for 6 weeks. From the 7th week mice in HFD were further randomly divided into HFD-wa-

基金项目:国家自然科学基金面上项目(No.81673788, No.81873136);国家自然科学基金青年项目(No.81803898, No.81803232);上海中医药大学医学高峰学科项目(No.A-U151902);普陀医院人才类项目(No.2016204B, No.2017207A);普陀区自主创新项目(No.ptkws201817, No.ptkws201904)

作者单位:1. 上海中医药大学附属普陀医院肝病实验室(上海 200062); 2. 上海中医药大学附属普陀医院感染科(上海 200062); 3. 上海中医药大学附属普陀医院中心实验室(上海 200062)

通信作者:刘 成, Tel: 021-22233329, E-mail: liucheng0082010@163.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20200904. 336

ter group (HFD, $n=8$) and XYXD group (HFD+XYXD treated group, abbreviated as XYX, $n=8$). The intra-gastrical medication lasted for 16 weeks. At week 22 after modeling, contents of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), triglyceride (TG), and total cholesterol (TC) were detected. The morphology of liver tissue and lipid droplet deposition were observed by HE staining and oil red O staining. Real-time quantitative PCR were used to detect related factors of fat metabolism pathway sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1), recombinant acid synthase (FASN), acetyl coenzyme A carboxylase α (ACC α), inflammation factors [tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin 1B (IL-1B), interleukin 18 (IL-18), differentiation-68 (CD68), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)], and nucleotide-binding oligomerization-domain protein-like receptors protein 3 (NLRP3) inflammatory body related genes. Western Blot and immunohistochemistry were used to detect NLRP3 expression, Sirius red staining and SMA immunohistochemical staining were used to observe liver fibrosis. **Results** Compared with LFD group, the activity of serum ALT, contents of TC and TG, hepatic steatosis occurred obviously, NAS score significantly increased in HFD group. SREBP-1, FANS, ACC α , and so on were significantly up-regulated. mRNA expressions of CD68 and MCP-1 significantly increased ($P<0.05$). Expressions of NLRP3 related genes were significantly up-regulated ($P<0.01$, $P<0.05$). Compared with HFD group, hepatic steatosis was improved, NAS score was down-regulated, mRNA expressions of fat metabolism synthesis related factors and inflammatory factors were significantly down-regulated, NLRP3 inflammatory body related genes and NLRP3 protein were significantly down-regulated in XYX group ($P<0.05$). Sirius red staining and α -SMA staining showed more staining area in HFD group than in LFD group ($P<0.05$), less staining area in XYX group than in HFD group ($P<0.05$). **Conclusion** XYXD significantly improved HFD induced NASH in mice, and inhibiting NLRP3 might be one of its mechanisms for improving NASH.

KEYWORDS Xiayuxue Decoction; nonalcoholic steatohepatitis; high fat diet (HFD); NLRP3

代谢功能障碍相关脂肪性肝病 (metabolic-dysfunction-associated fatty liver disease)^[1], 即非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD), 全球患病率 25%^[2], 我国患病率高达 29.2%^[3]。非酒精性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH)^[4] 占 NAFLD 的 20% ~ 30%, 其肝内脂质至少在 5% 肝细胞中蓄积并伴有肝脏炎症, 最终发生纤维化^[5], 在医疗支出等多方面给社会带来巨大的经济负担^[6]。迄今为止, 临床仍无针对特异性靶点的治疗药物。

下瘀血汤出自东汉医圣张仲景之《金匮要略》, 临床可用于治疗慢性肝炎、肝硬化、盆腔炎、肥胖症等。本课题组前期发现下瘀血汤可以改善胆碱蛋氨酸缺乏 (methionine-choline-deficient, MCD) 模型的脂肪变性^[7], 本研究进一步建立高脂饮食诱导的小鼠模型, 研究下瘀血汤对其的干预作用及可能的机制。

材料与方法

1 动物 清洁级 C57/BL6 雄性小鼠, 6~8 周龄, 体重为 (18 $\pm$ 2) g。饲养于上海中医药大学附属普陀医院实验动物中心, 合格证号为 SYXK (沪) 2018-0032。室温 (22 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 30% ~

60%, 12 h 光照/12 h 黑暗, 适应性喂养 1 周, 动物自由进食和饮水。本实验遵循上海市普陀区中心医院关于实验动物保护与使用准则, 并通过上海市普陀区中心医院实验伦理委员会的批准 [No. PTEC-R-2018-15(Y)-1]。

2 药物 下瘀血汤所含的生药大黄、桃仁、蟅虫均购自上海华宇药业有限公司, 有明确的原产地并经生药学专家鉴定, 由上海中医药大学附属曙光医药制备: 大黄 2.0 kg、桃仁 2.0 kg、蟅虫 1.2 kg, 分别制成粗粉末, 分别加 20% 乙醇 8 倍量, 浸泡 1 h, 回流提取 2 次, 第 1 次加 20% 乙醇回流提取 30 min, 滤过取汁; 药渣再加 6 倍量 20% 乙醇回流提取 1 h, 滤过取汁, 合并 2 次提取液。

3 主要试剂及仪器 谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT, 批号: C009-1)、谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST, 批号: C010-1)、甘油三酯 (triglyceride, TG, 批号: P001)、总胆固醇 (total cholesterol, TC, 批号: P002) 试剂盒购自南京建成生物; RNA 抽提 Trizol (批号: 9109)、High-Capacity cDNA 反转录试剂盒 (批号: RR037A) 及 SYBR 荧光染料 (批号: RR420) 购自日本 TAKARA; 天狼猩红购自北京雷根生物技术有限公司 (批号: BD1150); 油红购自国药

集团化学试剂有限公司(批号:No. 20161128)。BCA 蛋白定量试剂盒购自美国 Thermo scientific(批号:23227)。PVDF 膜购自德国 Merck Millipore(批号:IPVH00010)。NLRP3 抗体(批号:ab214185)、CD68 抗体(批号:ab31630)、 α -SMA 抗体(批号:ab7817)购自英国 Abcam。超声波细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所, JY92-II), 多功能酶标仪(美国 ThermoVarioskan LUX), 超微量分光光度计(德国 Berthold Detection Systems, colibri), 普通 PCR 仪(美国 Bio-RAD, T100), 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI, VIIA 7 DX), 电泳仪(美国 Bio-Rad, PowerPac™ Basic 041BR127719), 化学发光凝胶成像分析系统(上海培清科技有限公司, JS-1060), 冰冻切片机(德国 Leica, CM1950), 半自动轮转式切片机(德国 Leica, RM2245), 自动脱水机(德国 Leica, TP1020), 包埋机(德国 Leica, EG1150H), 全自动染色机(德国 Leica, ST5010), 自动封片机(德国 Leica, CV5030), 荧光显微镜(Olympus, BX43), 共聚焦显微镜(德国 Zeiss, LSM800)。

4 造模、分组及给药方法 24 只雄性 C57/BL6 小鼠采用随机数字表法分为低脂饮食(LFD)组(8 只)、高脂饮食(HFD)组(16 只), 适应性喂养 6 周;第 7 周起 HFD 组采用随机数字表法分为下瘀血汤治疗(HFD-XYXD)组(简称 XYX 组, 批号:8 只)和高脂饮食组(HFD-water)组(简称 HFD 组)(8 只)。采用南通特洛非高脂饲料(high-fat diet, HFD, 批号:TP 2330055A), 脂肪热量 60%, 蛋白质热量 15%, 碳水化合物热量 25%, 总热量为 5.5 千卡/g。对照低脂饲料(low-fat diet, 批号:TP 2330055AC): 脂肪热量 10%, 蛋白质热量 15%, 碳水化合物热量 75%, 总热量为 3.8 kcal/g。下瘀血汤按 70 kg 成人体重临床用量等体重的 10 倍量, 以 1 mL/100 g 小鼠体重的剂量以相应药物灌胃, 对照组予以相同剂量的水灌胃, 每日 1 次至 22 周末, 共计 16 周。

5 观察指标及方法

5.1 观察实验过程中动物的体重变化。

5.2 血清学及肝组织指标检测 采用南京建成生物公司相关试剂盒, 检测各组小鼠血清 ALT、AST、TG、TG 及肝组织 TC、TG。

5.3 肝组织病理学观察 选取肝右侧最厚一叶, 切取 0.5 cm×0.4 cm×0.3 cm 大小肝组织 1 块, 10% 中性福尔马林固定, 自动脱水机逐级酒精脱水、二甲苯透明, 包埋、4 μ m 切片, 观察组织的病理变化。HE 染色观察组织学的损伤, 上海中医药大学附属普陀医院病理科两位医师盲法阅片评估 NAS 评分^[8]。

天狼猩红染色: 石蜡切片脱蜡至水, 蒸馏水洗 5 min×3, 滴加天狼猩红染色液, 30 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 无水乙醇冲洗, 晾干后封片。油红染色: 冰冻切片复温后 PBS 洗 5 min×2, 60% 异丙醇洗 1 min, 室温晾干, 油红稀释液染色 30 min, 蒸馏水清洗 5 min, PBS 洗 5 min, 封片)。免疫组化染色: 石蜡切片脱蜡至水, 1% 柠檬酸钠抗原修复, 3% H_2O_2 室温孵育 5~10 min, PBS 清洗, 3 min×3 次, 5% BSA 封闭 30 min, 一抗抗体 NL-RP6(1:200)/CD68(1:200) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBS 清洗, 3 min×3 次。滴加北京中杉试剂盒中相应二抗, 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min, PBS 清洗, 3 min×3; 第二代辣根酶标记链霉卵白素工作液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min, PBS 清洗, 3 min×3。显色剂显色(DAB)。自来水充分冲洗, 苏木素复染, 封片。采用 Image-pro plus 6.0 分析病理图片的阳性染色区域。

5.4 RT-PCR 检测 采用 RT-PCR 法检测各组 SREBP-1c、FASN、ACC α 、CD68、TNF- α 、IL-1 β 、IL-18、MCP-1、CXCL2、NLRP3、Caspase-1、ASC 的 mRNA 表达水平, 引物由上海生工生物科技有限公司合成, 见表 1。

5.5 Western Blot 检测 GAPDH、NLRP3 蛋白表达 0.1 mg 肝组织加入预冷的 RIPA(含蛋白酶抑制剂)匀浆, 4 $^{\circ}$ C 下 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清。蛋白定量, 取 20 μ g 样品, 12% SDS-PAGE 电泳, 100 V 转移 1 h 至 PVDF 膜, 封闭 1 h; 一抗 NL-RP3(1:400) 4 $^{\circ}$ C 过夜, 兔二抗(1:5 000)室温孵育 45 min, ECL 显影, 采用 Image J 分析 Western Blot 的蛋白表达灰度值。

6 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件对数据进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 Mann-Whitney 秩和检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠体重比较 HFD 组体重(32.1 $\pm$ 0.5)g 显著高于 LFD 组(28.0 $\pm$ 0.6)g(P<0.05), XYX 组体重(30.6 $\pm$ 0.5)g 低于 HFD 组, 但差异无统计学意义(P>0.05)。

2 各组小鼠血清及肝组织 TC 和 TG 含量比较(表 2) 与 LFD 组比较, HFD 组血清及肝组织 TC、TG 含量显著升高(P<0.05, P<0.01)。与 HFD 组比较, XYX 组血清及肝组织 TC、TG 含量显著下降(P<0.05, P<0.01)。

表 1 PCR 反应目的基因引物序列

基因名称	GENEBANK ACC	引物序列	产物长度(bp)
18S	X0117	上游: 5'-GTAACCCGTTGAACCCATT-3' 下游: 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'	151
TNF- α	21926	上游: 5'-CTGAACCTCGGGTGATCGG-3' 下游: 5'-GGCTTGTCACCTCGAATTTTCAGA-3'	122
IL-1 β	16176	上游: 5'-GAAATGCCACCTTTTGACAGTG-3' 下游: 5'-TGGATGCTCTCATCAGGACAG-3'	116
MCP-1	20296	上游: 5'-TAAAAACCTGGATCGGAACCAAA-3' 下游: 5'-GCATTAGCTTCAGATTACGGGT-3'	120
CD68	12514	上游: 5'-CCATCCTTCACGATGACACCT-3' 下游: 5'-GGCAGGGTTATGAGTGACAGTT-3'	138
IL-18	16173	上游: 5'-GACTCTTGCGTCAACTTCAAGG-3' 下游: 5'-CAGGCTGTCTTTGTCAACGA-3'	169
CXCL2	20309	上游: 5'-CCAACCACAGGCTACAGG-3' 下游: 5'-GCGTCACACTCAAGCTCTG-3'	164
SREBP-1 c	20787	上游: 5'-GCAGCCACCATCTAGCCTG-3' 下游: 5'-CAGCAGTGAGTCTGCCTTGAT-3'	199
FASN	14104	上游: 5'-GGAGGTGGTGATAGCCGGTAT-3' 下游: 5'-TGGGTAATCCATAGAGCCAG-3'	140
ACC α	107476	上游: 5'-CTCCCGATTGATAATTGGTCTG-3' 下游: 5'-TCGACCTTGTTTACTAGGTGC-3'	217
NLRP3	216799	上游: 5'-ATTACCCGCCGAGAAAGG-3' 下游: 5'-TCGCAGCAAAGATCCACACAG-3'	141
Caspase-1	12362	上游: 5'-ACAAGGCACGGGACCTATG-3' 下游: 5'-TCCAGTCAGTCCTGGAAATG-3'	237
ASC	66824	上游: 5'-GACAGTGCAACTGCGAGAAG-3' 下游: 5'-CGACTCCAGATAGTAGCTGACAA-3'	106

表 2 各组小鼠血清及肝组织 TC 和 TG 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	血清 TC (mmol/L)	血清 TG (mmol/L)	肝组织 TC (mmol/gprot)	肝组织 TG (mmol/gprot)
LFD	8	2.32 $\pm$ 0.16	0.50 $\pm$ 0.05	0.096 $\pm$ 0.025	2.46 $\pm$ 0.47
HFD	8	3.97 $\pm$ 0.39**	0.66 $\pm$ 0.03*	0.360 $\pm$ 0.050*	6.52 $\pm$ 0.71*
XYX	8	2.28 $\pm$ 0.08 $\Delta\Delta$	0.48 $\pm$ 0.02 $\Delta\Delta$	0.170 $\pm$ 0.020 Δ	3.60 $\pm$ 0.38 Δ

注:与 LFD 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 HFD 组比较, Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$

3 各组小鼠血清 ALT、AST 含量比较(表 3) 与 LFD 组比较, HFD 组血清 ALT、AST 含量升高(均 $P < 0.05$)。与 HFD 组比较, XYX 组血清 ALT 和 AST 含量降低(均 $P < 0.05$)。

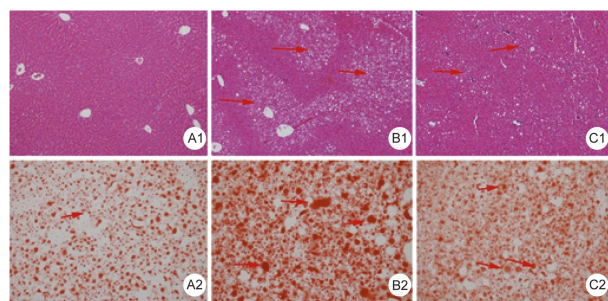
表 3 各组小鼠血清 ALT 和 AST 含量比较 (U/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	ALT	AST
LFD	8	55.50 $\pm$ 3.89	67.27 $\pm$ 9.90
HFD	8	98.80 $\pm$ 19.37*	168.50 $\pm$ 16.70*
XYX	8	33.85 $\pm$ 11.79 Δ	71.30 $\pm$ 11.54 Δ

注:与 LFD 组比较, * $P < 0.05$;与 HFD 组比较, Δ $P < 0.05$

4 各组肝组织 HE 和油红染色(图 1) LFD 组肝小叶结构正常,肝细胞索围绕中央静脉这一中心呈现放射状排列;HFD 组见大量脂肪变,炎症细胞浸润明显;与 HFD 组比较,XYX 组脂肪变显著减轻。HFD 组 NAS 评分(5.8 $\pm$ 0.4)均 > 4 分,该 NASH 小鼠模型

造模成功;XYX 组 NAS 评分显著下降[(3.6 $\pm$ 0.4)分, $P < 0.05$]。



注:A1、A2 为 LFD 组;B1、B2 为 HFD 组;C1、C2 为 XYX 组;A1、B1、C1(HE 染色, $\times 100$), 箭头所指为脂肪变;A2、B2、C2(油红 O 染色, $\times 200$), 箭头所指为阳性染色

图 1 各组小鼠肝组织比较

HFD 组油红 O 染色见肝细胞内被大量红色脂滴填充,形状不规则的脂滴排列紧密,形态较大。油红 O

染色阳性面积统计结果显示:与 LFD 组[(4.52±0.55)%]比较,HFD 组油红阳染面积[(42.77±3.96)%]增加($P<0.05$),与 HFD 组比较,XYX 组[(29.52±6.21)%]油红阳染面积减少($P<0.05$)。

5 各组脂肪合成相关因子 mRNA 的表达变化(表 4) 与 LFD 组比较,HFD 组脂肪代谢合成途径相关因子 SREBP-1、FASN、ACC α mRNA 显著上调($P<0.01$, $P<0.05$),XYX 组相较于 HFD 组显著下降($P<0.05$)。

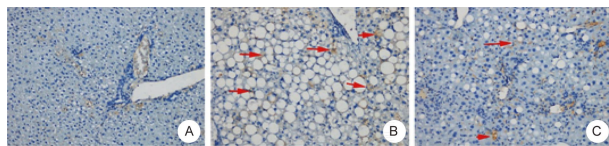
表 4 各组小鼠肝组织脂肪合成相关因子 mRNA 水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	SREBP-1 c	FASN	ACC α
LFD	8	1.02±0.17	1.05±0.23	1.01±0.25
HFD	8	14.78±1.15**	10.92±0.96**	5.78±0.76*
XYX	8	10.59±0.62 Δ	6.88±0.92 Δ	2.92±0.36 Δ

注:与 LFD 组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 HFD 组比较, $\Delta P<0.05$

6 各组炎症相关因子 mRNA 表达变化(表 5) 与 LFD 组比较,HFD 组肝组织中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-18、CD68、CXCL2、MCP-1 的 mRNA 均上升($P<0.05$, $P<0.01$),其中 CD68 mRNA 上升了 18.36 倍。与 HFD 组比较,XYX 组的炎症因子 mRNA 表达则下调($P<0.05$, $P<0.01$)。

7 各组 CD68 免疫组化染色(图 2) HFD 组肝脏巨噬细胞在肝脏中央静脉周围及脂肪细胞周围的浸润,阳染面积与 LFD 组[(1.66±0.63)%]比较增多[(12.63±5.67)%, $P<0.01$];与 HFD 组比较,XYX 组的染色面积下调[(4.85±2.69)%, $P<0.05$]。



注:A 为 LFD 组;B 为 HFD 组;C 为 XYX 组;箭头所指为阳性染色

图 2 各组小鼠肝组织 (CD68 染色, $\times 200$)

7 各组 NLRP3 炎症小体 mRNA 表达变化(表 6) 与 LFD 组比较,HFD 组 NLRP3 炎症小体成分 NLRP3、Caspase-1、ASC mRNA 表达上调($P<0.01$);XYX 组

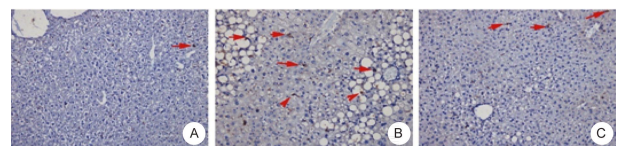
较 HFD 组 mRNA 表达下调($P<0.01$, $P<0.05$)。

8 各组 NLRP3 免疫组化染色(图 3) HFD 组 NLRP3 阳染面积[(10.63±5.67)%]较 LFD 组[(1.12±0.63)%]增多($P<0.01$);与 HFD 组比较,XYX 组染色面积下调[(6.24±1.78)%, $P<0.05$]。

表 6 各组小鼠肝组织 NLRP3 炎症小体 mRNA 水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	NLRP3	Caspase-1	ASC
LFD	8	0.87±0.06	0.87±0.29	0.89±0.14
HFD	8	128.40±20.57*	24.58±4.73*	16.91±1.16*
XYX	8	60.65±6.47 $\Delta\Delta$	9.65±1.28 $\Delta\Delta$	9.15±0.63 Δ

注:与 LFD 组比较,* $P<0.01$;与 HFD 组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$



注:A 为 LFD 组;B 为 HFD 组;C 为 XYX 组;箭头所指为阳性染色

图 3 各组小鼠肝组织 NLRP3 表达 (免疫组化染色, $\times 200$)

9 各组 NLRP3 蛋白表达变化(图 4) 免疫印迹结果与实时定量 PCR 结果一致,与 LFD 组[(16.82±2.64)%]比较,HFD 组 NLRP3 蛋白表达[(81.12±3.27)%]上调($P<0.05$);与 HFD 组比较,XYX 组[(41.93±4.35)%]NLRP3 蛋白表达下调($P<0.05$)。

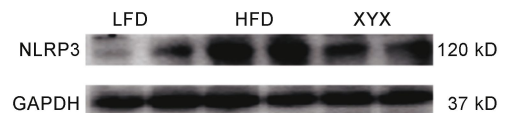


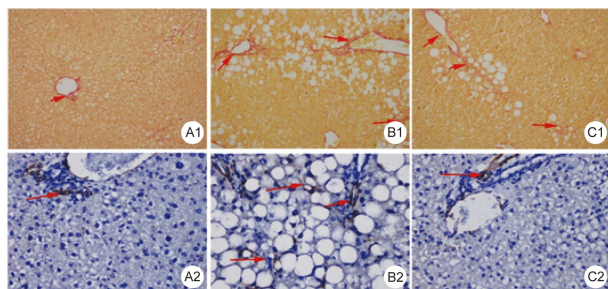
图 4 各组小鼠肝组织 NLRP3 蛋白表达电泳图

10 各组天狼猩红染色和 α -SMA 免疫组化染色(图 5) HFD 组天狼猩红阳染主要分布于中央静脉管壁,小叶间罕有阳染。HFD 组[(5.24±1.82)%]肝小叶间及汇管区可见胶原纤维沉积,与 LFD 组[(2.19±0.83)%]比较阳染面积上调($P<0.05$);与 HFD 组比较,XYX 组[(3.44±0.96)%]天狼猩红阳染面积降低($P<0.05$)。 α -SMA 染色同样证实了 XYX 组[(2.48±1.04)%]较 HFD 组[(3.73±0.75)%]阳性染色面积减少($P<0.05$)。

表 5 各组小鼠肝组织炎症因子 mRNA 水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	TNF- α	IL-1 β	IL-18	CD68	CXCL2	MCP-1
LFD	8	1.00±0.16	1.02±0.21	1.02±0.21	1.01±0.22	1.00±0.32	1.11±0.18
HFD	8	2.01±0.27**	1.95±0.32*	9.93±1.19**	18.78±6.28**	11.18±0.74**	11.30±0.49**
XYX	8	1.11±0.19 Δ	1.32±0.11 Δ	5.98±0.62 Δ	8.14±0.58 Δ	7.96±0.72 Δ	7.84±0.64 $\Delta\Delta$

注:与 LFD 组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 HFD 组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$



注: A1、A2 为 LFD 组; B1、B2 为 HFD 组; C1、C2 为 XYX 组; A1、B1、C1 (天狼猩红染色, ×200); A2、B2、C2 (α-SMA 染色, ×400); 箭头所指为阳性染色

图 5 下瘀血汤对高脂饮食小鼠肝纤维化的影响

讨 论

NAFLD 已成为全球重要的公共健康问题之一。虽然做了相当多的努力,部分药物也在研发中,但目前仍缺乏对 NAFLD 的全面公共卫生应对措施^[9]。中医学认为 NAFLD 病变初,以气机不畅为主;随着疾病的进展,脾虚则湿浊内停;湿邪日久,湿热内蕴;久病及肾,痰浊内结,气滞血瘀,痰瘀互结于肝脏,病入血分^[10]。其中后期的治疗方法主要为健脾益肾、化痰散结。NASH 为 NAFLD 中后期,肝脏病变可有脂肪变、炎症和纤维化。下瘀血汤出自东汉医圣张仲景之《金匮要略·妇人产后病脉证治》,方中大黄推陈致新、调和气机、通利邪毒;桃仁活血化瘀;廔虫逐瘀破结并开血闭。全方三药合用共奏活血化瘀以疏通经络、破瘀散结,通利六腑以荡涤胃肠、推陈致新之功。大黄所含的大黄素可以抑制脂肪肝大鼠的 TLR4 信号,从而改善脂肪肝^[11]。

以往已经在 MCD 模型中证实了下瘀血汤治疗的有效性,但 MCD 为营养缺乏性模型^[7],本次研究采用更符合肥胖导致 NAFLD 的 HFD 模型。本研究 HFD 模型 NAS 评分达到 4 分以上,同时 ALT 活性及 TC、TG 显著升高,致炎症相关因子显著升高,提示本研究模型显示出 NASH 的病理特征。XYX 组 ALT、AST 下调,血清及肝内 TC、TG 下调,脂肪合成因子 mRNA 表达显著下调;HE 染色亦提示 NAS 评分显著下调,且 XYX 治疗可下调炎症因子,如 TNF-α、IL-1β、MCP-1 等,提示下瘀血汤对 HFD 致 NASH 有治疗作用,可显著改善肝脏炎症和脂肪变。HFD 组天狼猩红染色和 α-SMA 免疫组化染色面积均较 LFD 组升高,提示模型组出现肝纤维化,XYX 治疗后则阳性染色面积减少,提示下瘀血汤亦可改善肝纤维化。

有研究已经证实了 NLRP3 炎性小体导致的炎症损伤参与了多种肝脏疾病的病变过程,如酒精性肝病、NAFLD、肝纤维化、肝癌等^[12]。NLRP3 炎性小体组成

元件包括 NLRP3、ASC 和 Caspase-1 三部分。炎性小体的激活是通过胞浆内模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs) 识别外源性病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 或内源性损伤相关分子模式 (damage-associated molecular patterns, DAMPs) 来实现的^[13]。激活的炎性小体能够促进促炎细胞因子,如 IL-1β、IL-18、IL-33 等成熟和分泌,从而启动机体固有免疫应答^[13]。MAFLD 尤其是 NASH,由于肝细胞中脂肪的过度蓄积,使得肝细胞功能障碍直至坏死,从而产生 DAMPs,激活炎性小体^[14,15]。动物实验表明,NLRP3 炎性小体的激活在 NAFLD 发生肝纤维化过程中也起着至关重要的作用,抑制 NLRP3 炎性小体可改善 NAFLD 病理过程^[16]。

本研究发现 HFD 组小鼠肝脏炎性小体相关 NLRP3、ASC 和 Caspase-1 mRNA 的表达显著升高,且下游炎症因子 IL-1β、IL-18 均显著上调;高表达 NLRP3 的巨噬细胞标志物 CD68 免疫组化染色亦显著上调;NLRP3 蛋白表达显著上调。而 XYX 组各项指标均得到明显改善。由此推测,下瘀血汤可能通过下调 NLRP3 炎性小体来改善 NASH。

综上所述,高脂饮食诱导的 NASH 小鼠应用下瘀血汤进行干预可有效改善其肝脏脂质沉积,减轻肝脏炎症损伤程度。且作用可能与抑制 NLRP3 炎性小体,进一步抑制促炎因子 IL-1β、IL-18 的表达,从而调节固有免疫有关。本研究仅初步探讨下瘀血汤治疗高脂饮食诱导 NASH 的机制,尚需要进一步深入研究。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Eslam M, Newsome PN, Anstee QM, et al. A new definition for metabolic associated fatty liver disease: an international expert consensus statement [J]. J Hepatol, 2020. doi: 10.1016/j.jhep.2020.03.039.
- [2] Younossi Z, Tacke F, Arrese M, et al. Global perspectives on nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis [J]. Hepatology, 2019, 69(6): 2672-2682.
- [3] Zhou F, Zhou J, Wang W, et al. Unexpected rapid increase in the burden of NAFLD in China from 2008 to 2018: A systematic review and Meta-analysis [J]. Hepatology, 2019, 70(4): 1119-1133.
- [4] Shi Y, Wang Q, Sun Y, et al. The prevalence of

- lean/nonobese nonalcoholic fatty liver disease: A systematic review and Meta-analysis [J]. *J Clin Gastroenterol*, 2020, 54(4): 378-387.
- [5] Sanyal AJ, Harrison SA, Ratziu V, et al. The natural history of advanced fibrosis due to nonalcoholic steatohepatitis: Data from the Simtuzumab trials [J]. *Hepatology*, 2019, 70(6): 1913-1927.
- [6] Alvarez CS, Graubard BI, Thistle JE, et al. Attributable fractions of NAFLD for mortality in the United States: Results from NHANES III with 27 years of follow-up [J]. *Hepatology*, 2019. doi: 10.1002/hep.31040.
- [7] 吴柳, 张洁, 马文婷, 等. 下瘀血汤对胆碱蛋氨酸缺乏诱导的小鼠非酒精性脂肪性肝炎的抑制作用[J]. *中国肝病杂志(电子版)*, 2018, 10(3): 48-55.
- [8] Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Hepatology*, 2005, 41(6): 1313-1321.
- [9] Lazarus JV, Ekstedt M, Marchesini G, et al. A cross-sectional study of the public health response to non-alcoholic fatty liver disease in Europe[J]. *J Hepatol*, 2020, 72(1): 14-24.
- [10] 中华中医药学会脾胃病分会. 非酒精性脂肪性肝病中医诊疗专家共识意见(2017) [J]. *中医杂志*, 2017, 58(19): 1706-1710.
- [11] 刘涛, 徐秋玲, 赵岩. 大黄素抑制 NAFLD 大鼠肝脏 TLR4 信号表达的研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2016, 27(2): 201-205.
- [12] Platnich JM, Muruve DA. NOD-like receptors and inflammasomes: A review of their canonical and non-canonical signaling pathways [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2019, 670: 4-14.
- [13] Yang Y, Wang H, Kouadir M, et al. Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(2): 128.
- [14] Thomas H. NAFLD: A critical role for the NLRP3 inflammasome in NASH [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 14(4): 197.
- [15] Wan X, Xu C, Yu C, et al. Role of NLRP3 Inflammasome in the progression of NAFLD to NASH [J]. *Can J Gastroenterol Hepatol*, 2016, 2016: 6489012.
- [16] Mridha AR, Wree A, Robertson AAB, et al. NLRP3 inflammasome blockade reduces liver inflammation and fibrosis in experimental NASH in mice [J]. *J Hepatol*, 2017, 66(5): 1037-1046.

(收稿: 2020-05-01 在线: 2020-09-22)

责任编辑: 李焕荣

英文责编: 张晶晶

中国中西医结合杂志社微信公共账号已开通

中国中西医结合杂志社已经开通微信公共账号, 可通过扫描右方二维码或者搜索微信订阅号“中国中西医结合杂志社”加关注。本杂志社将通过微信不定期发送《中国中西医结合杂志》、*Chinese Journal of Integrative Medicine* 的热点文章信息, 同时可查看两本期刊的全文信息, 欢迎广大读者订阅。

