

· 基础研究 ·

扶正化瘀片对非酒精性脂肪性肝炎大鼠
枯否细胞极化的影响吴旭玮¹ 霍苗苗² 甘巧蓉¹ 王 斌³ 林爱芳¹ 潘 晨¹ 黄祖雄¹

摘要 **目的** 研究扶正化瘀片对非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 大鼠枯否细胞极化的影响, 并进一步探讨相关机制。**方法** 50 只雄性 SD 大鼠随机分为正常组, 模型组, 低、高剂量中药组和罗格列酮组, 每组 10 只。除正常组外, 其余 4 组经高脂喂养 20 周后, 模型组以等体积蒸馏水灌胃干预, 低、高剂量中药组分别予浓度 750、1 500 mg/(kg·d) 扶正化瘀片混悬液灌胃, 罗格列酮组给予浓度 30 mg/(kg·d) 混悬液灌胃, 6 次/周, 共 4 周; HE 染色观察肝组织病理变化并计算 NAFLD 活动度积分 (NAS); 全自动生化仪检测血清总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 水平; ELISA 法检测血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 (IL)-6 及 IL-10 含量; 免疫组织化学染色法及 Real-time PCR 测定肝组织诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、甘露糖受体 (CD206) 蛋白及 mRNA 表达水平; Western Blot 法测肝组织核转录因子- κ B (NF- κ B)、过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR)- γ 蛋白表达水平。**结果** 与正常组比较, 模型组肝组织显示典型 NASH 组织学特征, 出现明显脂肪变性, 不同程度的炎细胞浸润和坏死灶; 血清 TC、TG、ALT、AST、TNF- α 、IL-6 表达均升高而 IL-10 表达下降 ($P<0.05$); 肝组织 iNOS、CD206 mRNA 及蛋白表达均升高 ($P<0.05$); 肝组织 NF- κ B、PPAR- γ 蛋白表达均升高 ($P<0.05$)。NAS 及血清 ALT、AST、TNF- α 、IL-6 表达、肝组织 iNOS mRNA 及蛋白、NF- κ B 蛋白表达各药物组较模型组均降低 ($P<0.05$), 高剂量中药组较罗格列酮组均降低 ($P<0.05$)。血清 IL-10 表达、肝组织 CD206 mRNA 及蛋白、PPAR- γ 蛋白表达各药物组较模型组均升高, 高剂量中药组较罗格列酮组均升高 ($P<0.05$)。**结论** 扶正化瘀片对 NASH 大鼠治疗效应确切, 可能与扶正化瘀片增强 PPAR- γ 信号通路表达并抑制 NF- κ B 信号通路表达, 从而促进 M2 型枯否细胞极化有关。

关键词 非酒精性脂肪性肝炎; 枯否细胞; 极化; 扶正化瘀片; 过氧化物酶体增殖物激活受体- γ

Effect of Fuzheng Huayu Tablet on Polarization of Kupffer Cells in Nonalcoholic Steatohepatitis Rats WU Xu-wei¹, HUO Miao-miao², GAN Qiao-rong¹, WANG Bin³, LIN Ai-fang¹, PAN Chen¹, and HUANG Zu-xiong¹ 1 Department of Hepatology, Meng Chao Hepatobiliary Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou (350025); 2 Department of Gastroenterology, Fuzhou Second Hospital of Xiamen University, Fuzhou (350007); 3 Department of Pathology, Meng Chao Hepatobiliary Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou (350025)

ABSTRACT Objective To study the effect of Fuzheng Huayu Tablet (FZHYT) on Kupffer cell polarization in rats with nonalcoholic steatohepatitis (NASH), and to further observe its underlying mechanism. **Methods** Totally 50 male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into the following groups: normal group, model group, low and high dose FZHYT groups, Rosiglitazone group, 10 in each group. Except for the normal group, the rats in the rest four groups were fed with high-fat diet for 20 weeks to induce NASH model. Rats in the model group were intragastrically administered with distilled water of the same volume. Rats in low and high dose FZHYT groups were intragastrically administered with 750 mg/kg and 1 500 mg/kg FZHYT suspension per day. Rats in the Rosiglitazone

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81670532); 福州市科技计划项目 (No. 2019-SZ-50)

作者单位: 1. 福建医科大学孟超肝胆医院内科 (福州 350025); 2. 厦门大学附属福州第二医院消化内科 (福州 350007); 3. 福建医科大学孟超肝胆医院病理科 (福州 350025)

通讯作者: 黄祖雄, Tel: 0591-88116074, E-mail: huangzuxiong215@hotmail.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20210204. 165

group were intragastrically administered with 30 mg/kg Rosiglitazone suspension. The drug intervention was administered 6 times per week for a total of 4 weeks. Animal models and drug efficacy were evaluated by HE staining. NAFLD activity score (NAS) was also calculated. The serum levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) were measured by automatic biochemistry analyzer. The contents of serum tumor necrosis factor (TNF)- α , IL-6, IL-10 were detected by ELISA. The expressions of inducible nitric oxide synthase (iNOS), mannose receptor (CD206) mRNA and protein in the liver tissue were evaluated with Real-time PCR and immunohistochemical staining. Western Blot was used to observe the expressions of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) protein. **Results** Compared with the normal group, typical histological features of NASH occurred in the liver tissue of rats in the model group. Obvious steatosis, infiltration of inflammatory cells and necrotic foci were observed. The levels of serum TC, TG, ALT, AST, TNF- α , and IL-6 were significantly elevated, while IL-10 significantly decreased in the model group ($P<0.05$). The liver expressions of iNOS and CD206 mRNA and protein, NF- κ B, PPAR- γ signaling pathway protein all significantly increased in the model group ($P<0.05$). Compared with the model group, serum levels of ALT, AST, TNF- α , and IL-6, mRNA and protein expressions of iNOS, protein expression of NF- κ B all decreased significantly in each medicated group ($P<0.05$). They were obviously lower in the high dose FZHYT group than in Rosiglitazone group ($P<0.05$). Serum IL-10 expression, mRNA and protein expressions of CD206, PPAR- γ protein expression all significantly increased more in each medicated group than in the model group ($P<0.05$). They were obviously lower in the high dose FZHYT group than in Rosiglitazone group ($P<0.05$). **Conclusions** The therapeutic effect of FZHYT on NASH rats was definite. This mechanism might be closely related to the fact that FZHYT enhanced the expression of PPAR- γ signaling pathway and inhibited the expression of NF- κ B signal pathway, thus promoting the polarization of M2 Kupffer cell polarization.

KEYWORDS nonalcoholic steatohepatitis; Kupffer cell; polarization; Fuzheng Huayu Tablet; peroxisome proliferator-activated receptor γ

非酒精性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH) 是非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 病情进展的关键阶段, 可进一步发展为肝硬化甚至肝细胞癌^[1]。其发病机制与多种因素有关, 其中免疫因素在 NASH 的发病机制中占据了重要的地位。肝内枯否细胞是定居肝脏的巨噬细胞, 作为参与 NASH 进展的关键免疫细胞之一, 枯否细胞具有高度的可塑性和异质性, 可针对不同的微环境刺激信号作出应答分化成具有不同功能的表型细胞即极化。M1 型枯否细胞发挥促炎、抗增殖、介导组织损伤作用, M2 型枯否细胞则发挥抑制炎症、促进组织修复和重塑作用。既往研究证实, 过氧化物酶增殖物激活受体- γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ , PPAR- γ) 是巨噬细胞极化的关键调节因子, 可通过调控巨噬细胞的极化方向而影响机体炎症反应。枯否细胞极化与 NASH 病理生理过程密切相关, 可能是 NASH 治疗的潜在靶点^[2]。

扶正化瘀片 (Fuzheng Huayu Tablet, FZHYT) 是治疗 NASH 的中成药制剂, FZHYT 治疗 NASH 的作用机制包括: 可调节肝脏脂质代谢、调节炎症和

与纤维化相关的基因表达^[3,4]。中药复方制剂成分复杂, 其作用涉及多环节多靶点, 对单一机制研究很难全面的反映其作用机制。目前, FZHYT 对于 NASH 免疫机制的影响尤其是针对枯否细胞极化的研究, 未见深入报道; 本研究旨在通过观察 FZHYT 对于 NASH 大鼠肝组织病理学、M1 型及 M2 型枯否细胞标志物蛋白、信号通路蛋白、炎症指标影响及变化, 试图从调节枯否细胞极化途径探讨 FZHYT 治疗 NASH 可能相关作用机制。

材料与方法

1 动物 SD 大鼠, 雄性, 清洁级, 体重 (150 ± 20) g, 8 周龄, 购自上海斯莱克实验动物有限公司, 许可证号: SCXK (沪) 2017-0005。实验动物饲养于福建医科大学孟超肝胆医院实验动物中心, 自由饮水, 饲养温度控制在 $20 \sim 22$ °C, 相对湿度 65%~70%, 室内通风良好, 每日光照 10~12 h, 适应性饲养 1 周。本实验经福建医科大学孟超肝胆医院医学伦理委员会审批 (No.2019-058-01)。

2 药物 FZHYT [组成: 丹参、发酵虫草菌粉、桃仁、松花粉、绞股蓝、五味子(制), 规格:

0.4 g/片], 购自上海黄海制药有限责任公司(批号: Z20050546)。罗格列酮片(规格: 1 mg/片)购自成都恒瑞制药有限公司(批号: H20030569)。给药剂量根据人与动物每千克体重剂量折算法^[5]: 大鼠给药量(mg/kg) = 折算系数 W × 人的给药量(mg/kg), 得出大鼠的扶正化瘀片等效剂量为 150 mg/kg, 罗格列酮等效剂量为 3 mg/kg。设定 FZHYT 低、高剂量分别为临床成人用量的 5、10 倍, 罗格列酮为临床成人用量的 10 倍。

3 主要试剂及仪器 一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS, 批号: ab15323)、甘露糖受体(mannose receptor, CD206, 批号: ab64693)购自英国 Abcam 公司, 核转录因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B, 批号: 8242)、PPAR- γ (批号: 2443)购自美国 CST 公司, β -actin(批号: 58673)购自美国 Santa Cruz 公司, 羊抗兔免疫组化二抗试剂盒(批号: ZB-5301)、DAB 显色试剂盒(批号: ZLI-9017)购自北京中杉金桥公司; 羊抗兔 IgG(批号: GA1013)购自福州沃森生物有限公司。实时荧光定量 PCR 扩增仪购自 ABI 公司; Quant cDNA 第一链合成试剂盒(批号: DRR047A)、SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒(批号: DRR820A)购自日本 TaKaRa 公司; 引物序列由上海生物工程公司设计并合成。肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α , 批号: R2856c)、白细胞介素(interleukin, IL)-6(批号: R0015c)、IL-10(批号: R0016c) ELISA 试剂盒购自武汉 Elabscience 公司; Image-Pro plus 6.0 图像分析系统。

4 动物分组、造模及干预方法 50 只 SD 雄性大鼠适应性饲养 1 周后, 按随机数字表法分为 5 组, 正常组, 模型组, 低、高剂量中药组, 罗格列酮组, 每组 10 只。正常组给予标准饲料喂养, 其他 4 组给予高脂饲料(2% 胆固醇 + 10% 猪油 + 88% 标准饲料)喂养 20 周后, 除正常组外, 其余 4 组分别灌服蒸馏水及相应药物。将药物溶于蒸馏水中制成混悬液, 灌胃体积为每天 10 mL/kg。模型组大鼠以等体积蒸馏水灌胃, 低、高剂量中药组分别配成 75、150 mg/mL 浓度, 分别给予 750、1 500 mg/(kg · d) 扶正化瘀片混悬液灌胃, 罗格列酮组配成 3 mg/mL 浓度, 给予浓度 30 mg/(kg · d) 罗格列酮混悬液灌胃, 每周 6 次, 给药 4 周后处死大鼠, 留取血清和肝组织标本备用。

5 检测指标及方法

5.1 血液生化指标检测 采用日立 7180 全自动生物化学分析仪测定血清总胆固醇(total cholesterol, TC), 甘油三酯(triglyceride, TG), 丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT), 天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)血清浓度。

5.2 ELISA 法检测血清 TNF- α 、IL-6、IL-10 表达 各组分别取血 3 mL, 分别按各自 ELISA 试剂盒说明书所述步骤检测血清 TNF- α 、IL-6、IL-10 表达水平。

5.3 肝病理组织学检查 大鼠肝组织病理切片分别行 HE 染色, 观察肝组织病理变化参照《非酒精性脂肪性肝病防治指南(2018 更新版)》^[6]及《美国国立卫生研究院 NASH 临床研究网病理工作组指南》^[7], 分别计算 NAFLD 活动度积分(NAFLD activity score, NAS)。由病理科两位医师盲法阅片评分, 取平均值为最终评分。

5.4 肝组织总 RNA 的提取与 cDNA 的合成 取约 20 mg 肝组织, 加入 1 mL Trizol 匀浆, 将匀浆液转至 EP 管中, 加入氯仿(氯仿: 匀浆液体积, 1: 5), 剧烈振荡 15 s, 室温静置 10 min, 4℃ 12 000 × g 离心 10 min; 将上层的水相转移到另一 EP 管中, 加入 0.25 mL 异丙醇和 0.25 mL 高盐溶液(0.8 mmol/L 柠檬酸钠和 1.2 mmol/L NaCl)混匀, 4℃ 12 000 × g 离心 15 min, 弃上清, 加 1 mL 的 75% 乙醇(0.1% DEPC 处理)重悬白色沉淀物, 4℃ 7 500 × g 离心 5 min; 弃上清, 沉淀物在室温下晾干至半透明, 用 10~20 μ L 无 RNAase 水溶解, 紫外分光光度计测定样品在 260 nm 和 280 nm 的吸光度, 计算样品的浓度与纯度, 260 nm (OD)/280 nm (OD) 处于 1.8~2.0, cDNA 合成按照试剂盒说明书进行。

5.5 Realtime-PCR 引物设计与合成 从 NCBI 的 nucleotide 中查得目的基因和内参照基因全长序列, 由上海生物工程公司设计并合成设计上下游引物, 以 GAPDH 为内参照, 序列见表 1。

表 1 基因引物序列

基因名称	引物序列	扩增长度 (bp)
iNOS	上游: 5'-GTGTTCCACCAGGAGATGTTG-3'	156
	下游: 5'-CTCCTGCCCCACTGAGTTCGTC-3'	
CD206	上游: 5'-GTACCTCAGGATTAACAGTTC-3'	186
	下游: 5'-CAGGGTTTAGTGACACACAGCTC-3'	
GAPDH	上游: 5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3'	134
	下游: 5'-GAGCTTCACAAAGTTGTCATTGAG-3'	

Realtime-PCR 反应体系按照 TaKaRa 公司 SYBR 说明书,以 GAPDH 内参照,分析其含量。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量方式分析结果。(1) $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$; (2) $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{实验组}} - \Delta Ct_{\text{对照组}}$; (3) 当目的基因与内参基因的扩增效率接近时, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示所检测样品相对于作为参照因子样品的目的基因的表达倍数。

5.6 免疫组织化学染色方法检测 iNOS、CD206 蛋白表达 肝组织病理切片依次脱蜡、水化,加 3% H_2O_2 10 min, 枸橼酸钠修复液 (pH 6.0) 高压热修复 5 min, 加非特异性血清 30 min, 分别加入 iNOS (1:300)、CD206 (1:400), 于 4 °C 过夜, 免疫组化二抗 37 °C 孵育 20 min, DAB 显色 2~5 min, 水洗、苏木素复染、脱水、透明、封片、显微镜下观察。连续切片阴性对照,以 PBS 代替一抗,其余步骤相同。免疫组织化学染色的半定量分析,图像采用 Image-Pro plus 6.0 图像分析系统测量阳性细胞的个数, iNOS、CD206 阳性细胞均为胞浆内棕褐色颗粒样着色的细胞。每只大鼠肝组织取 5 张切片,每张切片分为 4 个象限,显微镜下每个象限取 1~2 个高倍视野,即每张切片选取 4~8 个高倍视野,计算阳性细胞的个数及其均值,进行统计分析。

5.7 Western Blot 法检测 NF- κ B、PPAR- γ 蛋白水平 提取肝组织蛋白质并测定浓度,各时间点取等量蛋白质进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,用半干电转移法恒流 (1~2 mA/cm²) 转移 0.5~1 h, 使凝胶上的蛋白质转移至聚偏氟乙烯膜上,置于封闭液 (5% 脱脂奶粉) 中室温摇动封闭 1 h, 加第一抗体, 4 °C 过夜。加辣根过氧化物酶标记的第二抗体,室温摇动孵育 1 h, 进行电化学发光,暗室曝光,X 光胶片显影。扫描图片,用 Image-Pro plus 6.0 图像分析系统测定条带吸光度,以各指标条带与对应内参条带 β -actin 的吸光度值比值作为该指标蛋白的相对表达量。

6 统计学方法 采用 SPSS 16.0 软件系统分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间指标的均数比较采用 ANOVA 单因素方差分析,两两均数比较采用

LSD 检验 (方差齐) 和 Tamhane 检验 (方差不齐), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠血清 TC、TG、ALT、AST 水平比较 (表 2) 与正常组比较,模型组大鼠血清 TC、TG、ALT、AST 水平均升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较,各药物组 ALT、AST 均下降 ($P < 0.05$),高剂量中药组 ALT、AST 较罗格列酮组均下降 ($P < 0.05$); 各药物组 TC、TG 与模型组比较差异无统计学意义 ($P = 0.28$)。

2 各组大鼠血清 TNF- α 、IL-6、IL-10 水平比较 (表 3) 与正常组比较,模型组血清 TNF- α 、IL-6 水平均升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较,各药物组表达水平均下降 ($P < 0.05$); 高剂量中药组 TNF- α 、IL-6 较罗格列酮组下降 ($P < 0.05$); 低剂量中药组与罗格列酮组比较差异无统计学意义 ($P = 0.18$)。与正常组比较,模型组血清 IL-10 水平降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较,各药物组表达水平均升高 ($P < 0.05$); 高剂量中药组 IL-10 较罗格列酮组升高 ($P < 0.05$); 低剂量组与罗格列酮组比较差异无统计学意义 ($P = 0.23$)。

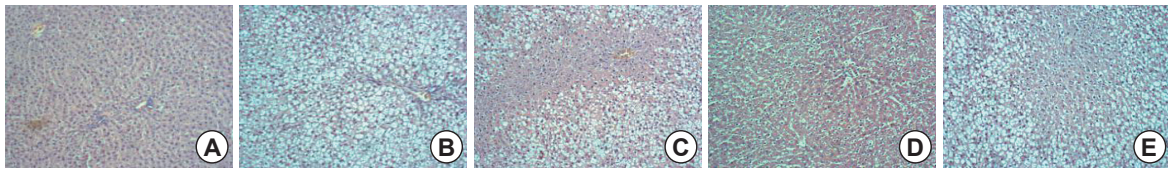
3 各组大鼠肝组织 HE 染色病理学变化 (图 1、表 4) 正常组肝小叶为类圆形,肝组织结构正常,肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列规则,肝小叶结构完整,未见肝细胞性、坏死等病理变化;模型组显示典型 NASH 组织学特征,可见明显肝细胞脂肪变性、气球样变、小叶内炎性细胞浸润。与正常组比较,模型组肝组织脂肪变、小叶炎症、气球样变、NAS 评分均升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较,各药物组各项评分均降低 ($P < 0.05$)。高剂量中药组各项评分较罗格列酮组降低 ($P < 0.05$)。

4 各组大鼠肝组织 iNOS、CD206 mRNA 表达比较 (图 2) 与正常组比较,模型组 iNOS、CD206 mRNA 表达均升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较,各药物组中 iNOS mRNA 表达水平均下降 ($P < 0.05$),且

表 2 各组大鼠血清 TC、TG、ALT、AST 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)
正常	10	1.67 $\pm$ 0.32	0.55 $\pm$ 0.13	25.39 $\pm$ 5.41	36.24 $\pm$ 7.62
模型	10	4.53 $\pm$ 0.57*	1.84 $\pm$ 0.36*	134.74 $\pm$ 16.28*	143.28 $\pm$ 21.35*
低剂量中药	10	4.85 $\pm$ 0.26	1.53 $\pm$ 0.24	103.25 $\pm$ 18.53 Δ	113.26 $\pm$ 17.58 Δ
高剂量中药	10	4.74 $\pm$ 0.32	1.61 $\pm$ 0.35	72.02 $\pm$ 12.31 Δ $\blacktriangle$	81.24 $\pm$ 13.51 Δ $\blacktriangle$
罗格列酮	10	4.66 $\pm$ 0.43	1.49 $\pm$ 0.34	96.63 $\pm$ 14.52 Δ	108.28 $\pm$ 18.25 Δ

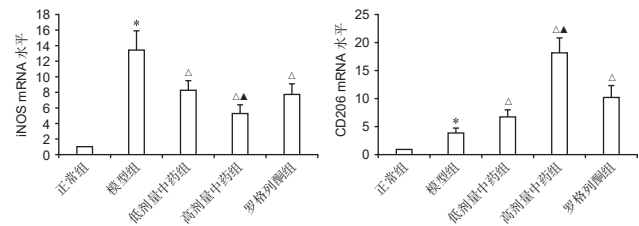
注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, Δ $P < 0.05$;与罗格列酮组比较, $\blacktriangle$ $P < 0.05$



注: A 为正常组; B 为模型组; C 为低剂量中药组; D 为高剂量中药组; E 为罗格列酮组

图 1 各组大鼠肝组织病理学变化 (HE 染色, ×100)

高剂量中药组较罗格列酮组下降明显 ($P<0.05$), 低剂量组与罗格列酮组差异无统计学意义 ($P=0.16$); 与模型组比较, 各药物组中 CD206 mRNA 表达水平均升高, 其中高剂量组表达最高 ($P<0.05$), 低剂量组与罗格列酮组差异无统计学意义 ($P=0.31$)。

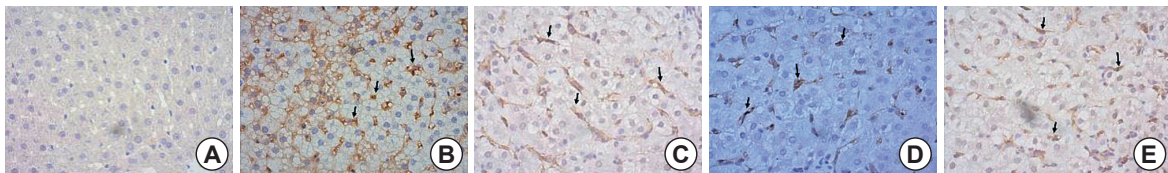


注: 与正常组比较, * $P<0.05$; 与模型组比较, $\Delta P<0.05$; 与罗格列酮组比较, $\blacktriangle P<0.05$;

图 2 各组大鼠肝组织 iNOS、CD206 mRNA 表达比较

5 各组大鼠肝组织 iNOS、CD206 蛋白表达比较 (图 3、4) 正常组大鼠肝组织 iNOS、CD206 表达水平均低, 主要分布在肝窦; 模型组 iNOS、CD206 表达较正常组升高 ($P<0.05$), 除了分布肝窦外, 还有一部分在汇管区和纤维间隔内。与模型组比较, 各药物组中 iNOS 表达水平均下降 ($P<0.05$), 高剂量中药组较罗格列酮组下降 ($P<0.05$)。低剂量中药组与罗格列酮组比较差异无统计学意义 ($P=0.41$); 与模型组比较, 各药物组中 CD206 表达水平均升高 ($P<0.05$), 高剂量中药组较罗格列酮组升高 ($P<0.05$)。低剂量中药组与罗格列酮组比较差异无统计学意义 ($P=0.15$)。

6 各组大鼠肝组织 NF- κ B、PPAR- γ 蛋白表达比较 (图 5, 表 5) 与正常组比较, 模型组 NF- κ B、



注: A 为正常组; B 为模型组; C 为低剂量中药组; D 为高剂量中药组; E 为罗格列酮组; 黑色箭头为棕褐色阳性细胞表达

图 3 各组肝组织 iNOS 蛋白表达水平 (免疫组化 SV 法, ×400)

表 3 各组大鼠血清 TNF- α 、IL-6、IL-10 水平比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

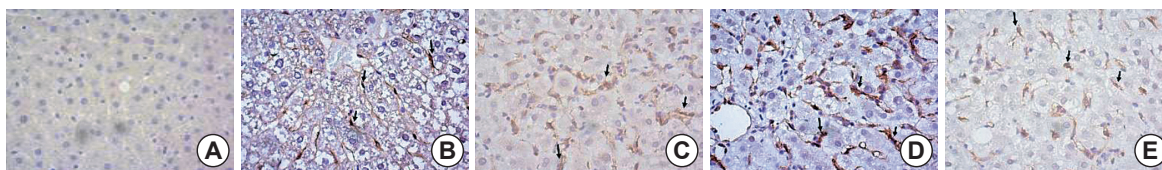
组别	n	TNF- α	IL-6	IL-10
正常	10	146.34 $\pm$ 23.39	221.82 $\pm$ 31.23	425.45 $\pm$ 55.82
模型	10	568.68 $\pm$ 51.07*	765.89 $\pm$ 87.55*	234.65 $\pm$ 26.56*
低剂量中药	10	486.87 $\pm$ 44.86 Δ	578.61 $\pm$ 63.52 Δ	623.58 $\pm$ 58.43 Δ
高剂量中药	10	412.79 $\pm$ 56.63 $\Delta\blacktriangle$	456.86 $\pm$ 47.55 $\Delta\blacktriangle$	772.48 $\pm$ 68.45 $\Delta\blacktriangle$
罗格列酮	10	498.61 $\pm$ 51.75 Δ	589.09 $\pm$ 63.47 Δ	598.28 $\pm$ 64.81 Δ

注: 与正常组比较, * $P<0.05$; 与模型组比较, $\Delta P<0.05$; 与罗格列酮组比较, $\blacktriangle P<0.05$

表 4 各组大鼠肝组织病理学 NAS 评分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	脂肪变	小叶炎症	气球样变	NAS 评分
正常	10	0.00 $\pm$ 0.00	0.21 $\pm$ 0.32	0.14 $\pm$ 0.23	0.44 $\pm$ 0.52
模型	10	2.78 $\pm$ 0.46*	2.83 $\pm$ 0.44*	2.54 $\pm$ 0.35*	7.67 $\pm$ 0.52*
低剂量中药	10	2.62 $\pm$ 0.38 Δ	2.68 $\pm$ 0.36 Δ	2.32 $\pm$ 0.27 Δ	7.26 $\pm$ 0.48 Δ
高剂量中药	10	2.25 $\pm$ 0.31 $\Delta\blacktriangle$	2.01 $\pm$ 0.30 $\Delta\blacktriangle$	1.96 $\pm$ 0.28 $\Delta\blacktriangle$	6.56 $\pm$ 0.63 $\Delta\blacktriangle$
罗格列酮	10	2.50 $\pm$ 0.33 Δ	2.61 $\pm$ 0.49 Δ	2.26 $\pm$ 0.24 Δ	7.31 $\pm$ 0.75 Δ

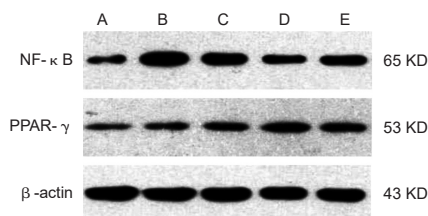
注: 与正常组比较, * $P<0.05$; 与模型组比较, $\Delta P<0.05$; 与罗格列酮组比较, $\blacktriangle P<0.05$



注: A 为正常组; B 为模型组; C 为低剂量中药组; D 为高剂量中药组; E 为罗格列酮组; 黑色箭头为棕褐色阳性细胞表达

图 4 各组肝组织 CD206 蛋白表达水平 (免疫组化 SV 法, $\times 400$)

PPAR- γ 蛋白表达均升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 各药物组中 NF- κ B 表达水平均下降 ($P<0.05$), 高剂量中药组较罗格列酮组下降 ($P<0.05$), 低剂量中药组与罗格列酮组比较差异无统计学意义 ($P=0.09$); 与模型组比较, 各药物组中 PPAR- γ 表达水平均升高 ($P<0.05$), 高剂量中药组较罗格列酮组升高 ($P<0.05$), 低剂量中药组与罗格列酮组比较差异无统计学意义 ($P=0.27$)。



注: A 为正常组; B 为模型组; C 为低剂量中药组; D 为高剂量中药组; E 为罗格列酮组

图 5 各组肝组织 NF- κ B、PPAR- γ 蛋白表达电泳图

表 5 各组肝组织 NF- κ B、PPAR- γ 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NF- κ B/ β -actin	PPAR- γ / β -actin
正常	10	0.18 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.02
模型	10	0.65 $\pm$ 0.07*	0.23 $\pm$ 0.03*
低剂量中药	10	0.52 $\pm$ 0.05 $^{\Delta}$	0.38 $\pm$ 0.03 $^{\Delta}$
高剂量中药	10	0.32 $\pm$ 0.04 $^{\Delta\Delta}$	0.57 $\pm$ 0.06 $^{\Delta\Delta}$
罗格列酮	10	0.48 $\pm$ 0.06 $^{\Delta}$	0.43 $\pm$ 0.05 $^{\Delta}$

注: 与正常组比较, * $P<0.05$; 与模型组比较, $^{\Delta}P<0.05$; 与罗格列酮组比较, $^{\Delta\Delta}P<0.05$

讨 论

M1 型巨噬细胞发挥促炎、抗增殖、介导组织损伤作用。Maina V 等^[8]通过胆碱甲硫氨酸缺乏饮食诱导的小鼠 NASH 模型发现, 肝脏巨噬细胞 M1 型偏倚是 NAFL 向 NASH 进展的重要因素, NASH 的发生常伴随肝内 M1/M2 型巨噬细胞比值增高。M1 型巨噬细胞能快速被募集到炎症反应部位吞噬清除致病原, 分泌 TNF- α 、IL-1 和 IL-6 等促炎性细胞因子, 并产生具有活性生物学效应的氧化物和氮化物, 产生氧化应激, 从而起到促进炎症的作用^[9]。本实

验研究示, 模型组中 M1 型巨噬细胞 (iNOS) 及促炎因子 (IL-6、TNF- α) 表达均明显升高, 表明高脂饮食诱导的 SD 大鼠 NASH 模型枯否细胞表现 M1 型为主的极化并伴炎症因子分泌增加。M2 型巨噬细胞则发挥抑制炎症、促进组织修复和重塑作用, 具有抗炎作用的 M2 型巨噬细胞通过分泌 IL-10, 精氨酸酶-1 等抗炎性细胞因子发挥主要作用; 此外研究证实, M2 型巨噬细胞通过 IL-10 旁分泌的精氨酸酶激活诱导 M1 型巨噬细胞凋亡或向 M2 型巨噬细胞转化, 从而促进组织的修复^[2,9,10]。本研究发现, 扶正化瘀干预组中 M2 型巨噬细胞标志物 (CD206) 及抗炎因子 (IL-10) 表达显著升高, 而 iNOS 及 IL-6、TNF- α 表达明显抑制, 提示促进 M1 型巨噬细胞向 M2 型巨噬细胞极化发挥抗炎效应可能是 FZHYT 能够有效改善和治疗 NASH 的重要机制之一。

近年来, 随着转录组学、转基因学和表观遗传学等研究的深入促进了对巨噬细胞极化和可塑性的分子机制的认识。不同表型的巨噬细胞在极化过程中采取不同的信号通路, 并激活特定的转录因子, 进一步诱导特异性基因的表达。本研究示, FZHYT 能显著抑制 NF- κ B 信号通路活性, 促进上调 PPAR- γ 的信号通路表达。NF- κ B 信号通路参与巨噬细胞 M1 型活化: 通过激活 NF- κ B 信号通路, 调节大量炎症基因的表达, 使巨噬细胞表现为 M1 型极化状态的特征。PPAR- γ 属于核激素受体超家族, 是一种配体应答型转录因子; 罗格列酮作为 PPAR- γ 激动剂, 可通过配体激活实现核转位而调节靶基因表达。研究证实, PPAR- γ 是巨噬细胞 M2 型活化的关键调节因子, PPAR- γ 可通过干扰巨噬细胞 M1 型活化相关的 NF- κ B 信号通路表现抗炎特性; 而当 NF- κ B 被逐渐抑制时, 巨噬细胞则从 M1 型向 M2 型转化, 通过调控巨噬细胞 M2 型活化方向而影响机体炎症反应^[11]。Nan YM 等^[12]研究发现, NASH 模型小鼠体内通过腺病毒载体过表达 PPAR- γ 可显著改善脂肪肝炎和纤维化。研究发现, PPAR- γ 与其激动剂罗格列酮结合活化后, PPAR- γ 与维甲酸类 X 受体结合形成异三聚体并招募一系列协同因子, 调控靶

基因向巨噬细胞 M2 型转录活化^[13]。目前临床研究证实, PPAR- γ 激动剂(罗格列酮、吡格列酮)在 NASH 治疗中有较明确临床意义。然而, 该类药物存在一系列临床问题, 如增加绝经后妇女体重增加、液体水钠潴留、心血管事件、前列腺癌、胰腺癌和骨折的风险, 严重限制此类药物使用^[14]。

NASH 基于中医学辨证论体系归类为“湿热内蕴, 痰瘀互结”证。肝郁脾虚为本, 瘀血、气滞为标。FZHYT 由虫草菌丝、桃仁、丹参、松花粉、绞股蓝、五味子组成, 方中丹参、桃仁活血化瘀, 虫草益精补虚, 松花粉及绞股蓝益气润燥、清热解毒。诸药合用, 扶正化瘀, 攻补兼施, 使正气得复, 瘀滞得去, 肝络通畅, 切合病机。另外, 现代中药单体研究发现, 虫草菌丝可抑制大鼠肝星状细胞活化, 增加肝窦血管内皮细胞通透性, 改善肝组织缺血缺氧状态; 桃仁具有改善肝纤维化肝窦毛细血管化, 增加肝脏血流量, 促进细胞外基质降解; 丹参能下调肝组织 TGF- β_1 表达, 显著抑制 HSC 活化, 明显改善肝纤维化的程度^[4]。

综上所述, 本研究发现扶 FZHYT 干预可有效促进枯否细胞 M2 型极化, 抑制 M1 型枯否细胞表达发挥抗炎效应, 对 NASH 具有较好的防治作用。该机制可能与扶正化瘀片促进 PPAR- γ 表达上调并降低 NF- κ B 信号通路活性有关; 本研究为传统中成药扶正化瘀片治疗 NASH 的临床应用提供了理论基础和实验依据参考。

利益冲突: 无。

参 考 文 献

- [1] Castera L, Friedrich-Rust M, Loomba R. Noninvasive assessment of liver disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease[J]. Gastroenterology, 2019, 156 (5): 1264–1281.
- [2] Kazankov K, Jørgensen SMD, Thomsen KL, et al. The role of macrophages in nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2019, 16 (3): 145–159.
- [3] Tao YY, Yan XC, Zhou T, et al. Fuzheng Huayu Recipe alleviates hepatic fibrosis via inhibiting TNF- α induced hepatocyte apoptosis[J]. BMC Complement Alternat Med, 2014, 14 (1): 449.
- [4] 谭普芳, 南月敏, 王荣琦, 等. 扶正化瘀方对非酒精性肝纤维化小鼠肝组织血管生成基因的调节作用及其对肝纤维化的影响[J]. 实用肝脏病杂志, 2015, 18 (4): 352–355.
- [5] 丁虹主编. 实验药理学[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 88.
- [6] 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组, 中国医师协会脂肪性肝病专家委员会. 非酒精性脂肪性肝病防治指南(2018 更新版)[J]. 中华肝脏病杂志, 2018, 34 (5): 641–649.
- [7] Kleiner DE, Brunt EM, Van NM, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease[J]. Hepatology, 2005, 41 (6): 1313–1321.
- [8] Maina V, Sutti S, Locatelli I, et al. Bias in macrophage activation pattern influences non-alcoholic steatohepatitis in mice[J]. Clin Sci, 2012, 122 (11): 545–553.
- [9] Wu R, Nakatsu G, Zhang X, et al. Pathophysiological mechanisms and therapeutic potentials of macrophages in non-alcoholic steatohepatitis[J]. Expert Opin Ther Targets, 2016, 20 (5): 615–626.
- [10] Fukushima J, Kamada Y, Matsumoto H, et al. Adiponectin prevents progression of steatohepatitis in mice by regulating oxidative stress and Kupffer cell phenotype polarization[J]. Hepatol Res, 2009, 39 (7): 724–738.
- [11] Luo W, Xu Q, Wang Q, et al. Effect of modulation of PPAR- γ activity on Kupffer cells M1/M2 polarization in the development of non-alcoholic fatty liver disease[J]. Sci Rep, 2017, 7: 44612.
- [12] Nan YM, Han F, Kong LB, et al. Adenovirus-mediated peroxisome proliferator activated receptor gamma over-expression prevents nutritional fibrotic steatohepatitis in mice[J]. Scand J Gastroenterol, 2011, 46 (3): 358–369.
- [13] Wu R, Nakatsu G, Zhang X, et al. Pathophysiological mechanisms and therapeutic potentials of macrophages in non-alcoholic steatohepatitis[J]. Expert Opin Ther Targets, 2016, 20 (5): 615–626.
- [14] Sumida Y, Yoneda M, Tokushige K, et al. Antidiabetic therapy in the treatment of nonalcoholic steatohepatitis[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21 (6): 1907.

(收稿: 2020-07-16 在线: 2021-08-02)

责任编辑: 李焕荣

英文责编: 张晶晶