

## 祛湿化痰方对脂肪肝大鼠肝脏基因表达谱的调节作用

冯琴<sup>1,2,3</sup> 唐亚军<sup>1</sup> 李晓飞<sup>1</sup> 孟胜喜<sup>1</sup> 彭景华<sup>1</sup> 赵瑜<sup>1</sup> 胡义扬<sup>1,2,3,4</sup>

**摘要 目的** 观察祛湿化痰方对高脂饮食诱导脂肪肝大鼠肝脏基因表达谱的干预作用及其作用机制。  
**方法** 20 只 SD 雄性大鼠采用单纯高脂饮食(88% 普通饲料 + 2% 胆固醇 + 10% 猪油)制备脂肪肝大鼠模型。造模 4 周后按随机数字表法分为祛湿化痰方组(10 只)和模型组(10 只),继续造模同时分别给予祛湿化痰方汤剂(0.93 g 生药/100 g 体重)和蒸馏水灌胃,每日 1 次。同时设 10 只 SD 雄性大鼠为正常组,给予等量蒸馏水灌胃,各组均于 8 周末取材。采用生化法检测肝组织甘油三酯(triglyceride, TG)、游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)含量及血清谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)活性;采用 HE 及油红染色观察肝脏组织的病理变化;采用 Affymetrix 基因芯片检测肝组织基因表达,比较祛湿化痰方组与模型组差异表达基因、分析差异基因的功能以及涉及的信号通路;并选取祛湿化痰方组与模型组间 10 个差异倍数大于 2 的涉及糖脂代谢的差异基因进行 RT-PCR 验证。  
**结果** (1)与正常组比较,模型组大鼠肝组织 TG、FFA 含量和血清 ALT、AST 活性均明显升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,祛湿化痰方组大鼠 TG、FFA 含量和 ALT、AST 活性均明显降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。祛湿化痰方能降低高脂饮食诱导的大鼠脂肪肝模型的肝细胞脂肪变性程度,减少炎症,改善肝组织病理。(2)祛湿化痰方组与模型组比较, $P < 0.05$  且差异倍数大于 2 的功能明确、有指定基因名称的差异基因共 80 个,其中上调基因 44 个,下调基因 36 个。80 个差异基因涉及 27 条差异有统计学意义的信号通路(包括甘油酯类代谢、通路脂肪细胞信号通路、胰岛素信号通路及药物代谢信号通路等,  $P < 0.05$ )。(3)对甘油激酶(Gk)、硬脂酰 CoA 去饱和酶-1(Scd1)、甘油-3-磷酸转移酶(Gpat2)、葡萄糖-6-磷酸酶(G6pc)、Irs1 等 10 个调节糖脂代谢基因的 RT-PCR 验证实验结果显示:所有基因 RT-PCR 与基因芯片结果上调或下调趋势完全一致,80% 基因差异倍数非常接近。  
**结论** 祛湿化痰方可调节高脂饮食诱导的脂肪肝大鼠脂肪代谢、糖类代谢、抗脂质过氧化及药物代谢等相关基因表达,表现出中药复方的综合药理作用。

**关键词** 祛湿化痰方;脂肪肝;基因表达谱;糖脂代谢

Regulatory Effect of Qushi Huayu Recipe on Gene Expression Profiles of Fatty Liver Rats FENG Qin<sup>1,2,3</sup>, TANG Ya-jun<sup>1</sup>, LI Xiao-fei<sup>1</sup>, MENG Sheng-xi<sup>1</sup>, PENG Jing-hua<sup>1</sup>, ZHAO Yu<sup>1</sup>, and HU Yi-yang<sup>1,2,3,4</sup> 1 Institute of Liver Diseases, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (201203); 2 Shanghai Key Clinical Laboratory of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (201203); 3 Key Laboratory of Liver and Kidney Diseases, Ministry of Education, Shanghai (201203); 4 E-Institute of Traditional Chinese Internal Medicine, Shanghai (201203)

**ABSTRACT Objective** To observe the intervention and mechanism of Qushi Huayu Recipe (QHR) on gene expression profiles in high lipid diet induced fatty liver rats. **Methods** Fatty liver model was prepared in 20 male SD rats using single high fat diet (88% common forage + 2% cholesterol + 10% lard). Four weeks after modeling they were divided into the model group and the QHR group according to random digit table, 10 in each group. QHR (at 0.93 g crude drug/100 g body weight) and distilled water was respectively to rats in the QHR group and the model group by gastrogavage while modeling, once per day. Meanwhile, 10 SD male rats were recruited in a normal group, administered with equal volume of

基金项目:国家自然科学基金面上项目(No. 81374031, No. 81173404);上海市自然科学基金项目(No. 13ZR1442600)

作者单位:1. 上海中医药大学附属曙光医院肝病研究所(上海 201203); 2. 上海市中医临床重点实验室(上海 201203); 3. 教育部肝肾疾病病证实验室(上海 201203); 4. 上海高校中医内科学 E-研究院(上海 201203)

通讯作者:胡义扬, Tel: 021-20256526, E-mail: yyhuliver@163.com

DOI: 10. 7661/CJIM. 2016. 02. 0203

distilled water by gastrogavage. At the end of week 8 all rats were sacrificed, and blood and livers were collected for subsequent analysis. Contents of liver triglyceride (TG) and free fatty acid (FFA), activities of serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were detected using biochemical assay. Pathological changes of liver tissue were observed using H&E and oil red O stain. Liver gene expressions were detected by Affymetrix gene expression profiles. Differentially expressed genes were compared between the QHR group and the model group, functions of differentially expressed genes and signal pathways involved analyzed. Ten differentially expressed genes involved in glycolipid metabolism with fold change more than 2 were selected for verification by real-time PCR. Results (1) Compared with the normal group, contents of liver TG and FFA, and serum activities of ALT and AST obviously increased in the model group ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, contents of liver TG and FFA, and activities of ALT and AST obviously decreased in the QHR group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). QHR could reduce high fat induced fatty degeneration of liver cells, alleviate inflammation, and improve pathological changes of liver tissue. (2) Compared with the model group, there were 80 differentially expressed genes (with fold change  $>2$ ,  $P < 0.05$ ) with clear functions and appointed gene names, including 44 up-regulated and 36 down-regulated genes. Eighty genes were involved in 27 signal pathways with statistical difference, including glycerolipid metabolism, adipocytokine signaling pathway, insulin signal pathway, drug metabolism signal pathway, etc ( $P < 0.05$ ). (3) RT-PCR results of 10 glycolipids metabolism regulating genes such as Gk, Scd1, Gpat2, G6pc, Irs1, and so on showed that all RT-PCR genes were completely coincide with up-regulated or down-regulated tendency in results of gene chips. 80% genes had approximate fold change. Conclusion QHR could regulate gene expressions related to fat metabolism, carbohydrate metabolism, anti-lipid peroxidation, and drug metabolism in high fat diet induced fatty liver rats, and its comprehensive pharmacological actions could be manifested.

**KEYWORDS** Qushi Huayu Recipe; fatty liver; gene expression profiles; glycolipids metabolism

非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是遗传—环境—代谢应激相关性肝病,患病率逐年升高,已成为一种公共健康威胁<sup>[1]</sup>。因 NAFLD 是一种复杂的、系统性的代谢性疾病,很难针对某一靶点设计出理想的治疗药物,所以现代医学仍缺乏理想治疗药物。目前临床运用中医药治疗 NAFLD 比较普遍。祛湿化痰方是上海曙光医院长期以来治疗 NAFLD 的临床有效经验方<sup>[2]</sup>。近十年来,动物实验反复证实了该方对实验性脂肪肝有显著降低肝脏脂肪含量、减轻肝脏炎症的药理效应<sup>[3,4]</sup>。本课题组前期从非酒精性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver, NAFL) 病理机制的某些环节探讨其作用机制,表明该方防治 NAFL 的机制与调节单磷酸腺苷激活的蛋白激酶 (AMPK) 活性、升高脂联素、调节肠道菌群、降低游离脂肪酸 (free fatty acid, FFA) 毒性等途径有关<sup>[5-8]</sup>。然而,这些研究都是对某些特定病理环节的探索,研究角度与范围相对比较局限。为了能相对全面地探索祛湿化痰方有效防治 NAFL 的作用靶点与途径,本研究在再次验证祛湿化痰方对实验性 NAFL 疗效显著的基础上,运用基因表达谱芯片,观察分析经祛湿化痰方治疗后的 NAFL 大鼠肝脏差异基因表达谱的

改变,相对系统全面地探讨该方有效防治 NAFL 的作用机制。

## 材料与方法

1 动物 30 只 SD 雄性大鼠,体重 (170 ± 20) g, SPF 级,购自中国科学院上海实验动物中心,合格证号证号:SCXK(沪)2003-0002。上海中医药大学实验动物中心清洁级动物房饲养,自由饮水。

2 药物 祛湿化痰方由茵陈 (安徽) 15 g 虎杖 (江苏) 12 g 田基黄 (江西) 12 g 姜黄 (四川) 9 g 生栀子 (福建) 9 g 组成,均购自上海华宇药业有限公司。栀子、田基黄水提醇沉,茵陈、姜黄、虎杖醇提,配成 0.93 g 生药/mL 浓度用以灌胃给药。

3 试剂及仪器 血清丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 测定试剂盒,批号:20090930;血清门冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 测定试剂盒,批号:20091120;FFA,批号:20100409,均购自南京建成生物有限公司;甘油三酯 (Triglyceride, TG) 试剂盒,批号:2009.11.0003,购自浙江东欧生物工程公司。RNA 抽提试剂盒,批号:2608A,购自上海华舜生物工

程有限公司; cDNA 合成试剂盒, 批号: 1310, Fermentas 公司产品; 荧光定量 PCR 试剂盒, 批号: BK4402, TAKARA 公司产品; PCR 引物由 TAKARA 公司设计、上海生工生物工程技术有限公司合成。引物序列及片段长度如下见表 1。PCR 扩增仪 Eppendorf/mastercycler ep realplex, Eppendorf 公司产品。

4 动物模型制备 参照文献[4]。20 只 SD 雄性大鼠采用高脂饲料(88% 普通饲料 + 2% 胆固醇 + 10% 猪油)8 周诱导制备大鼠脂肪肝模型, 饲料购自上海斯莱克实验动物有限公司, 脂肪肝造模成功率为 100%。

5 动物分组及给药 将造模大鼠 20 只, 给予高脂饲料造模 4 周后按随机数字表法分为模型组和祛湿化痰方组, 每组 10 只。继续给予高脂饲料造模同时, 祛湿化痰方组灌服祛湿化痰方药液(0.93 g 生药/100 g 体重), 模型组给予相应量的蒸馏水灌胃。同时另设 10 只 SD 雄性大鼠为正常组, 给予普通饲料喂养和给予相应量蒸馏水灌胃。各组均持续 8 周。

6 观察指标及检测方法

6.1 标本的采集 实验 8 周末, 用 2% 戊巴比妥钠 3 mL/kg 腹腔注射麻醉, 打开腹腔。经下腔静

脉采血, 离心后吸取血清, -70 °C 低温保存。在同一肝叶和位置切取小块组织, 置入 10% 中性福尔马林缓冲液中固定, 另定位取肝组织分装于离心管中低温保存。

6.2 肝组织 TG 和 FFA 含量 采用生化试剂盒检测, 具体操作按说明书进行。

6.3 血清 ALT 和 AST 活性检测 采用生化试剂盒检测, 具体操作按说明书进行。

6.4 肝组织病理 肝组织行 HE 及油红染色。

6.5 肝组织基因表达谱芯片检测 每组选取 3 个肝组织样本, 采用 Affymetrix 基因芯片检测肝组织基因表达, 比较药物组与模型组差异代谢物和差异表达基因, 分析差异基因的功能、涉及的信号通路。

6.6 差异基因 RT-PCR 验证 选取药物组与模型组间 10 个差异倍数大于 2 的涉及糖脂代谢的差异基因进行 RT-PCR 验证。

7 统计学方法 所有数据均使用 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。组间比较采用单因素方差分析 LSD 检验(最小显著差 t 检验)。基因芯片所有数据分析均在线运用 SBC Analysis System 3.0, SAS 3.0 软件(www.ebioservice.com)进行。P < 0.05 为差异有统计学意义。

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)
Gk	NM024381.2	上游: 5'-AGCTGTGATGAAAGTCCATTGGTTG-3' 下游: 5'-GGGCTTGCATCTTGGGATTCTA-3'	97
Scd1	NM139192.2	上游: 5'-AAAGCTGGACATGTCTGACCTGAA-3' 下游: 5'-ACGAACAGGCTGTGCAGGAA-3'	150
Gpat2	NM001168529.1	上游: 5'-CACCTTGCCAGCCATTTT-3' 下游: 5'-GCCTGCTACCCAGCAACT-3'	112
G6pc	NM010098.2	上游: 5'-AACGTCTGTCTGTCCCGGATCTAC-3' 下游: 5'-ACCTCTGGAGGCTGGCATTG-3'	133
Irs1	NM012969.1	上游: 5'-ACGCTCCAGTGAGGATTTAAGCA-3' 下游: 5'-GGTCTGGTTGTGAATCGTGAA-3'	180
Me1	NM012600.2	上游: 5'-TGAGGACCCACCTCTGAGACAA-3' 下游: 5'-AGGCCCTGAGCTCTCAGTCATC-3'	128
Ugt2b17	NM173295.1	上游: 5'-GCTCTTGCCAAATTCACAG-3' 下游: 5'-TTGCCTCATAGATGCCATTTGTTCC-3'	172
Cry11	NM175757.2	上游: 5'-CGACCAGGTCACTCCTCAGCA-3' 下游: 5'-CTAGCTCAACCAGCGGGACATAA-3'	134
Adh1	NM019286.3	上游: 5'-GCCACTGACTGTAACAACCTCAA-3' 下游: 5'-ATGGCAGCTTAACAGGGCAGA-3'	141
Aldh1a1	NM022407.3	上游: 5'-AAAGACCTGGACAGGGCCATC-3' 下游: 5'-CCATTTCCAGACATCTTGAATCCAC-3'	122
Gapdh	DQ403053.1	上游: 5'-TCCTGCACCACCAACTGCTTAG-3' 下游: 5'-AGTGGCAGTGATGGCATGGACT-3'	102

### 结 果

1 各组大鼠肝组织 TG 和 FFA 含量比较(表 2) 与正常组比较,模型组大鼠肝组织 TG 和 FFA 含量均明显升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,祛湿化痰方组 TG 和 FFA 含量降低 ( $P < 0.01, P < 0.05$ )。祛湿化痰方组肝组织 TG、FFA 含量分别为模型组的 53.4%、65.9%。

表 2 各组大鼠肝组织 TG 和 FFA 含量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	肝组织 TG(mg/g)	肝组织 FFA( $\mu\text{mol/g}$ )
正常	10	11.4 $\pm$ 6.4	475 $\pm$ 178
模型	10	54.7 $\pm$ 20.3*	786 $\pm$ 174*
祛湿化痰方	10	29.2 $\pm$ 11.7 $\Delta\Delta$	518 $\pm$ 139 $\Delta$

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

2 各组大鼠血清 ALT 和 AST 活性比较(表 3) 与正常组比较,模型组血清 ALT 及 AST 明显升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,祛湿化痰方组 ALT 和 AST 明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。

表 3 各组大鼠血清 ALT 及 AST 活性比较 (U/L,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	ALT	AST
正常	10	31.8 $\pm$ 6.5	80.7 $\pm$ 15.8
模型	10	67.9 $\pm$ 16.2*	135.4 $\pm$ 15.0*
祛湿化痰方	10	44.3 $\pm$ 15.0 $\Delta$	52.1 $\pm$ 21.4 $\Delta\Delta$

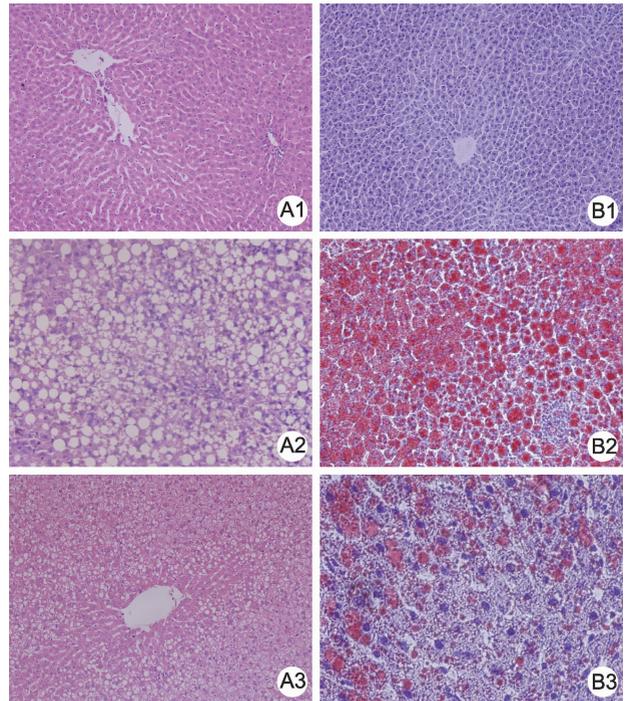
注:与正常组比较,\* $P < 0.01$ ;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$ , $\Delta\Delta P < 0.01$

3 各组大鼠肝组织病理变化(图 1) HE 染色显示正常组大鼠肝小叶结构清晰,肝细胞索由中央静脉向四周呈放射状排列,肝细胞内无明显脂肪变性。模型组大鼠肝组织均出现不同程度的大泡性或小泡性脂肪变性,有散在点状坏死及炎细胞浸润;祛湿化痰方能显著降低高脂饮食诱导的脂肪肝模型肝细胞脂肪变性程度,减少炎症,改善肝组织病理。

4 祛湿化痰方组与模型组基因芯片表达谱的比较

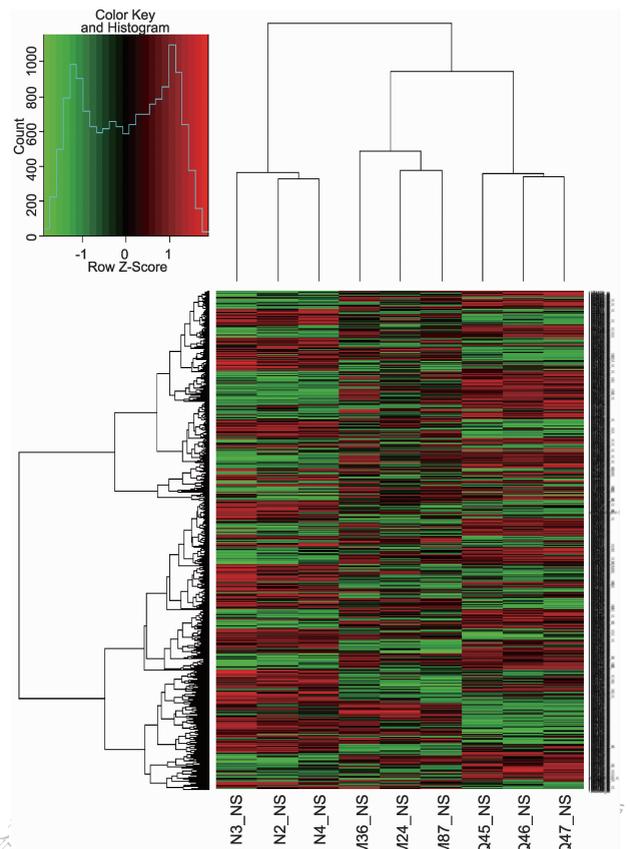
4.1 正常组、模型组与祛湿化痰方组主成分分析(PCA) 选取正常组、模型组与祛湿化痰方组差异基因( $P < 0.05$ ),进行主成分分析作图,结果显示每组组内的 3 个样本自然集聚,而 3 组间样本之间自然分开,提示各组内样本相似度大,而不同组间样本差异大。

4.2 正常组、模型组与祛湿化痰方组聚类分析(图 2) 选取正常组与模型组之间差异基因( $P < 0.05$ )、模型组与祛湿化痰方治疗组之间差异基因



注: A1、B1 为正常组;A2、B2 为模型组;A3、B3 为祛湿化痰方组; A 为 HE 染色;B 为油红染色

图 1 各组大鼠肝组织病理变化 ( $\times 200$ )



注:N 为正常组;M 为模型组;Q 为祛湿化痰方组

图 2 正常组、模型组与祛湿化痰方组聚类分析热图

( $P < 0.05$ ) 的所有基因,进行聚类分析热图,正常组、模型组与祛湿化痰方组每组内的 3 个样本自然聚类,基因表达情况接近,而不同组间的基因表达有差异。

#### 4.3 祛湿化痰方组与模型组间差异基因表达

祛湿化痰方组与模型组之间差异有统计学意义的基因 1 169 个,其中差异倍数大于 2 的探针序列对应基因 120 个,120 个基因中功能明确、有指定基因名称的差异基因共 80 个,其中上调基因 44 个,下调基因 36 个。

#### 4.4 祛湿化痰方组与模型组相比差异基因涉及的信号调控通路(表 4)

将模型组与正常组变化倍数大于 2 的 80 个差异基因,进行 pathway 富集分析,并对富集的功能归类运用超几何检验(hypergeometric test)进行显著性分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。结果显示这 80 个差异基因涉及 41 条信号通路,其中 27 条  $P < 0.05$ ,提示该 27 条通路在祛湿化痰方防治高脂饮食诱导的 NAFL 的药理作用方面意义显著。

#### 4.5 祛湿化痰方组与模型组间糖脂代谢信号调控通路差异基因及差异倍数(表 5)

祛湿化痰方干预后多个糖脂代谢相关基因与模型组比较发生显著改

变,这可能是该方有效防治 NAFL 的重要基础。挑选上述差异基因涉及的且两组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )的 27 条通路中与糖类、脂肪代谢相关的基因进行例举,涉及的通路有 8 条,包括基因 11 个。

#### 4.6 糖脂代谢信号调控通路部分差异基因 RT-PCR 验证(表 6)

选取上述在祛湿化痰方组与模型组比较,与糖类及脂肪代谢关系密切的 8 条信号通路中的 10 个基因,与基因芯片结果对照。结果显示所有基因 PCR 结果与基因芯片上调或下调趋势完全相同,绝大多数基因差异倍数非常接近,仅个别基因差异倍数稍有出入,但 PCR 与基因表达谱芯片结果比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

### 讨 论

研究者所在课题组先后十余次动物实验反复证实了祛湿化痰方对实验性脂肪肝的药理作用,但相关作用机制尚不完全清晰。本研究再次验证该方能降低高脂饮食诱导的脂肪肝大鼠肝组织 TG、FFA 含量及血清 ALT、AST 活性,并明显改善肝组织病理,防治实验性脂肪肝疗效非常显著。在疗效确切基础上,进一步进行肝组织基因表达谱芯片检测,在基因表达层面相对全面地探索该方防治 NAFL 的药理作用机制。

表 4 祛湿化痰方组与模型组之间差异基因涉及的信号调控通路

序号	数据库	信号通路	差异基因个数	通路基因总数	差异基因百分比(%)	P 值	q 值
1	Kegg	代谢通路	16	1 206	1.33	0.0	0.0
2	Kegg	谷胱甘肽代谢	4	54	7.41	0.0	0.0
3	Kegg	细胞色素 P450 对异源物质的代谢	5	71	7.04	0.0	0.0
4	Kegg	细胞色素 P450 对药物的代谢	5	83	6.02	0.0	0.0
5	Kegg	视黄醇代谢	4	69	5.80	0.0	0.0
6	Kegg	P53 信号通路	4	76	5.26	0.0	0.0
7	Kegg	其他酶的药物代谢	3	54	5.56	0.0003	0.0001
8	Kegg	哺乳动物昼夜节律	2	13	15.38	0.0005	0.0001
9	Kegg	PPAR 信号通路	3	75	4.00	0.0007	0.0002
10	Kegg	戊糖和葡萄糖醛酸相互转化	2	23	8.70	0.0014	0.0003
11	Kegg	色氨酸代谢	2	44	4.55	0.0046	0.0008
12	Kegg	淀粉和蔗糖代谢	2	46	4.35	0.0050	0.0008
13	Kegg	神经活性配体与受体的相互作用	4	325	1.23	0.0060	0.0009
14	Kegg	甘油酯类代谢	2	52	3.85	0.0063	0.0009
15	Kegg	脂肪细胞信号通路	2	67	2.99	0.0101	0.0013
16	Kegg	维生素 B1 代谢	1	6	16.67	0.0152	0.0019
17	Kegg	前列腺癌	2	95	2.11	0.0193	0.0021
18	Kegg	小细胞肺癌	2	95	2.11	0.0193	0.0021
19	Kegg	糖酵解和糖异生	2	111	1.80	0.0257	0.0027
20	Kegg	乙醛酸和二羧酸代	1	14	7.14	0.0324	0.0029
21	Kegg	核黄素代谢	1	14	7.14	0.0324	0.0029
22	Kegg	萜类骨干合成	1	14	7.14	0.0324	0.0029
23	Kegg	细胞循环	2	132	1.52	0.0351	0.0029
24	Kegg	轴突导向	2	134	1.49	0.0360	0.0029
25	Kegg	其他多糖降解	1	16	6.25	0.0366	0.0029
26	Kegg	癌症通路	3	334	0.90	0.0381	0.0029
27	Kegg	胰岛素信号通路	2	140	1.43	0.0390	0.0029

表 5 糖脂代谢信号调控通路差异基因及差异倍数

信号调控通路	差异基因	改变倍数
甘油酯类代谢通路	甘油激酶(Gk)	-2.46
	甘油-3-磷酸转移酶(Gpat2)	-2.39
脂肪细胞信号通路	胰岛素受体底物1(Irs1)	-2.22
	葡萄糖-6-磷酸酶(G6pc)	-2.63
胰岛素信号通路	Irs1	-2.22
	G6pc	-2.63
PPAR 信号通路	Gk	-2.46
	硬脂酰 CoA 去饱和酶-1(Scd1)	-6.00
	苹果酸酶[NADP(+ )依赖](Me1)	+2.03
视黄醇代谢通路	乙醇脱氢酶1(Adh1)	+2.30
	乙醛脱氢酶1a1(Aldh1a1)	+2.28
	尿苷三磷酸-葡萄糖醛酰转移酶2b17(Ugt2b17)	+2.60
	细胞色素 P450-2b1(Cyp2b1)	+4.40
淀粉和蔗糖代谢通路	G6pc	-2.63
	Ugt2b17	+2.60
糖酵解和糖异生通路	G6pc	-2.63
	Adh1	+2.30
戊糖和葡萄糖醛酸相互转化	Ugt2b17	+2.60
	晶状体球蛋白1(Cry11)	+6.60

注:与模型组比较,+表示祛湿化痰方组基因表达量升高,-表示基因表达量降低

表 6 部分基因基因芯片与 RT-PCR

基因差异倍数比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

基因	基因芯片结果	RT-PCR 结果
Me1	2.03 ± 0.30	2.02 ± 0.60
Ugt2b17	2.60 ± 0.19	2.56 ± 0.43
Cry11	6.60 ± 0.33	3.93 ± 2.05
Adh1	2.30 ± 0.03	1.32 ± 0.34
Aldh1a1	2.38 ± 0.14	3.05 ± 1.51
Gk	2.46 ± 0.51	2.54 ± 0.08
Scd1	6.00 ± 0.85	13.59 ± 9.04
Gpat2	2.39 ± 0.06	2.92 ± 1.37
G6pc	2.63 ± 0.42	3.41 ± 0.34
Irs1	2.22 ± 0.45	2.58 ± 0.74

研究结果显示祛湿化痰方组与模型组比较,差异倍数大于 2 且  $P < 0.05$  的探针序列对应基因 120 个,其中功能明确、有指定基因名称的差异基因共 80 个,其中上调基因 44 个,下调基因 36 个。80 个差异基因涉及 41 条信号通路,其中有统计学差异通路( $P < 0.05$ ) 27 条。对祛湿化痰方组与模型组间差异基因的功能、涉及信号通路等分析发现祛湿化痰方可调节高脂饮食诱导的 NAFL 大鼠脂肪代谢、糖类代谢、抗脂质过氧化及药物代谢等相关基因表达,对这些基因的调控可能是该方有效防治 NAFL 的重要机制。

基因芯片及 RT-PCR 结果均证实了祛湿化痰方能显著调节高脂饮食诱导的 NAFL 模型多个参与脂肪代谢的通路(包括甘油酯类代谢通路、脂肪细胞通路及 PPAR 信号通路等)中的多个基因,包括 Scd1、Gk、Gpat2 及 Me1 等;并有多条与糖代谢相关信号

通路(胰岛素信号通路、戊糖和葡萄糖醛酸相互转化、淀粉和蔗糖代谢、糖酵解和糖异生、其他多糖降解)在祛湿方组与模型组差异有统计学意义,涉及到的基因包括 G6pc、Irs1、Ugt2b17、Cry11 及 Nev2,以上研究结果强烈提示祛湿化痰方可有效防治 NAFL 的药理作用与其调节脂肪与糖类代谢的作用密不可分;祛湿化痰方干预后,谷胱甘肽代谢通路及多条维生素(维生素 B1、维生素 B2 及维生素 C)代谢通路基因表达与模型组差异显著,祛湿化痰方调节脂肪肝模型谷胱甘肽及维生素代谢环节中多个基因表达,可能是该方抗脂质过氧化、抗肝脏损伤的重要机制;同时,芯片结果显示高脂饮食的大鼠给予中药复方干预后,激活了体内多种进行药物代谢系统,多条药物代谢通路(细胞色素 P450 对药物的代谢、细胞色素 P450 对异源物质的代谢、谷胱甘肽代谢及其他酶药物代谢)的多个基因发生显著变化,如 Cyp2b1、Ugt2b17、Adh1、胸苷激酶 1(thymidine kinase 1, Tk1)等,这些基因的改变可能是祛湿化痰方在生物体进行代谢产生活性物质并导致生物效应的重要基础。

中药复方具有多途径、多靶点的药理特点,作用机制复杂,单纯应用传统的药物研究方法,很难从整体上对其进行研究。基因芯片最显著的特点是高通量,通过基因芯片,在同一实验条件下,一次性检验上万个生物信息的改变,为多靶点的中药复方药理机制的研究提供了有效的工具与技术平台<sup>[9]</sup>。本研究显示高脂

饮食造模诱导的实验性脂肪肝大鼠经中药祛湿化痰方干预后多个基因及信号通路发生显著变化,为该方药理作用作了清晰剖析,也为后续机制研究提供线索。今后,对差异基因进一步结合蛋白表达及功能进行深入研究,将会更清晰阐明该方防治 NAFL 的作用机制,为其临床应用提供有力依据。

### 参 考 文 献

- [1] Dyson JK, Anstee QM, McPherson S. Non-alcoholic fatty liver disease: a practical approach to treatment [J]. *Frontline Gastroenterol*, 2014, 5 (4): 277-286.
- [2] 慕永平, 都金星, 刘平. 刘平教授治疗非酒精性脂肪性肝炎遣方用药经验探析 [J]. *中西医结合肝病*, 2009, 19(3): 170-171.
- [3] 张慧, 冯琴, 胡义扬, 等. 祛湿化痰方对 CCl<sub>4</sub> 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.
- [4] 李红山, 冯琴, 胡义扬, 等. 祛湿化痰方对高脂饮食诱导的大鼠肝脏脂质沉积的干预效应 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2009, 29(12): 1096-1099.
- [5] 李红山, 冯琴, 胡义扬, 等. 脂联素及其受体在实验性脂肪肝中的变化及中药干预作用 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2009, 17(11): 812-816.
- [6] 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.
- [7] Yin X, Peng J, Hu Y, 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] Feng Q, Cheng Y, Zhang H, et al. Qushi Huayu Decoction inhibits CTSE protein expression and gene expression in HepG<sub>2</sub> cells induced by free fatty acid [J]. *Chin J Integr Med*, 2010, 16(6): 518-524.
- [9] 刘婷婷, 徐红兵. 基因芯片技术及其产前应用进展 [J]. *现代医药卫生*, 2014, 30(14): 2133-2135.

(收稿:2015-01-26 修回:2015-05-18)

## 2015“中国最具国际影响力学术期刊”名单发布

中国学术期刊未来论坛于 2015 年 12 月 18—19 日在北京举行,并由中国学术期刊(光盘版)电子杂志社、清华大学图书馆发布“2015 中国最具国际影响力学术期刊”和“中国国际影响力优秀学术期刊”。

根据遴选结果, *Chinese Journal of Integrative Medicine* 再次获得“中国最具国际影响力学术期刊”。其国际影响力指数 CI 为 101.710, 国际他引总被引频次 704 次, 国际他引影响因子 1.027。《中国中西医结合杂志》再次获得“中国国际影响力优秀学术期刊”。其国际影响力指数 CI 为 79.389, 国际他引总引频次 1 025 次, 国际他引影响因子 0.140。

*Chinese Journal of Integrative Medicine* 创办于 1995 年创刊,主编为陈可冀院士,是我国第一本被 SCI 收录的中医、替代医学及结合医学领域的杂志。2014 年 6 月公布本刊最新影响因子为 1.217。

《中国中西医结合杂志》创办于 1981 年,主编为陈可冀院士,由中国科协主管,中国中西医结合学会和中国中医科学院主办,是国内第一本全国性中西医结合综合性学术期刊,国内外公开发行。主要宣传我国中医药政策和中西医结合方针,报道我国以及其他国家和地区中西医结合在临床、科研、预防、教学等方面的经验和成果,探讨中西医结合的思路和方法,介绍国内外有关本专业的进展,促进中外学术交流,开展学术争鸣,为继承和发扬我国传统医药学,提高中西医结合学术水平,促进我国医学科学现代化,为人类健康服务。本刊按国际标准编排,印有英文版权页、目次、摘要等。年发行量数十万册。除国内 31 个省市自治区外,国外订户分布于美国、日本、新加坡、韩国、英国、德国及澳大利亚等 20 多个国家和地区。