

# 补肾降浊饮对非酒精性脂肪肝大鼠胰岛素抵抗的影响

吕宝伟<sup>1</sup>, 冯春青<sup>2</sup>, 孙建光<sup>1\*</sup>

(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 聊城市人民医院, 山东 聊城 252000)

**[摘要]** **目的:**研究补肾降浊饮对非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 大鼠胰岛素抵抗 (IR) 的干预作用, 探讨其对胰岛素信号通路中细胞因子及激酶等的影响。**方法:**将 60 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、补肾降浊饮低、中、高剂量组 (10, 15, 20 g·kg<sup>-1</sup>) 及水飞蓟宾葡甲胺组 (19 g·kg<sup>-1</sup>), 正常组予普通饲料喂养, 其余各组予高脂饲料喂养并同时灌胃生理盐水或相应剂量药物干预。12 周后检测各组大鼠血清总胆固醇 (TC), 甘油三酯 (TG), 丙氨酸氨基转移酶 (ALT), 天门冬氨酸氨基转移酶 (AST), 空腹血糖 (FBG), 胰岛素 (INS) 水平, 胰岛素抵抗指数 (IRI), 胰岛素敏感指数 (ISI) 及肝组织中脂联素 (ADP), 游离脂肪酸 (FFA), 肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), 超氧化物歧化酶 (SOD), 丙二醛 (MDA) 含量; 苏木素-伊红 (HE) 染色、油红 O 染色检测肝组织脂肪变性程度; 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测大鼠肝组织中 c-Jun 氨基端激酶 1 (JNK1), 磷酸化 c-Jun 氨基端激酶 (p-JNK) 及胰岛素受体  $\alpha$  (IR $\alpha$ ), 磷酸化胰岛素受体底物 1 丝氨酸 307 位点 (p-IRS-1) 表达水平。**结果:**与正常组比较, 模型组大鼠 TG, TC, ALT, AST, FBG, INS, IRI, TNF- $\alpha$ , FFA, MDA 水平及 JNK1, p-JNK 及 p-IRS-1 蛋白表达显著升高, ISI, ADP, SOD 水平显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 补肾降浊饮低、中、高剂量组可不同程度降低大鼠血清中 TG, TC, ALT, AST, FBG, INS, IRI, TNF- $\alpha$ , FFA, MDA 水平及 JNK1, p-JNK 及 p-IRS-1 蛋白表达 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 升高 ISI, ADP, SOD 水平 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 相较于水飞蓟宾葡甲胺组, 补肾降浊饮高剂量组疗效显著 ( $P < 0.01$ )。**结论:**补肾降浊饮可改善非酒精性脂肪肝大鼠胰岛素抵抗, 其机制可能与提高 ADP 含量, 减轻氧化应激, 抑制 JNK 信号通路进而增强胰岛素受体底物活性有关。

**[关键词]** 非酒精性脂肪肝; 胰岛素抵抗; 脂联素; c-Jun 氨基端激酶; 胰岛素信号通路; 补肾降浊饮

**[中图分类号]** R22; R24; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)12-0107-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20181038

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180313.1019.005.html>

**[网络出版时间]** 2018-03-13 13:18

## Intervention Effect of Bushen Jiangzhuoyin on Insulin Resistance on Rat Nonalcoholic Fatty Liver Disease

LYU Bao-wei<sup>1</sup>, FENG Chun-qing<sup>2</sup>, SUN Jian-guang<sup>1\*</sup>

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China;

2. Liaocheng People's Hospital, Liaocheng 252000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the intervention effect of Bushen Jiangzhuoyin on insulin resistance of nonalcoholic fatty liver disease, in order to explore its effect on cytokines and kinases in insulin signaling pathway. **Method:** Totally 60 SD rats were randomly divided into blank group, model group, low-dose, middle-dose and high-dose Bushen Jiangzhuoyin groups (10, 15, 20 g·kg<sup>-1</sup>) and silybin meglumine group (19 g·kg<sup>-1</sup>). The blank group was fed with normal diet, the other groups were fed with high-fat diet and given normal saline or the corresponding dose of medicines. All of the rats were put to death after 12 weeks, the levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), fasting blood glucose (FBG), insulin (INS), insulin resistance index (IRI), insulin sensitivity index (ISI) in serum and

**[收稿日期]** 20171227(008)

**[基金项目]** 山东省高等学校科技计划项目 (J09LF14)

**[第一作者]** 吕宝伟, 在读博士, 从事中医肝胆病临床与实验研究, E-mail: 15506693969@163.com

**[通信作者]** \* 孙建光, 博士生导师, 教授, 从事中医肝胆病临床与实验研究, E-mail: 13508939361@163.com

adiponectin (ADP), free fatty acid (FFA), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) in liver were detected; HE staining and oil red O staining were used to detect the degree of fatty degeneration of liver tissue; the expression levels of c-Jun amino terminal kinase1 (JNK1), insulin receptor  $\alpha$  (IR $\alpha$ ), phosphorylated insulin receptor substrate 1 serine 307 (p-IRS-1) were detected by Western blot method. **Result:** Compared with blank group, model group showed significant increases in levels of TG, TC, ALT, AST, FBG, INS, IRI, TNF- $\alpha$ , FFA and MDA, and JNK1, p-JNK and p-IRS-1 protein expressions, and significant decreases in ISI, ADP, SOD levels ( $P < 0.01$ ); compared with model group, low-dose, middle-dose and high-dose Bushen Jiangzhuoyin groups showed different degrees of reduction in rat serum TG, TC, ALT, AST, FBG, INS, IRI, TNF- $\alpha$ , FFA, MDA levels, and JNK1, p-JNK, p-IRS-1 protein expressions ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and rise in ISI, ADP, SOD levels ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); compared with silybin meglumine group, high-dose Bushen Jiangzhuoyin group showed a significant efficacy ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Bushen Jiangzhuoyin can improve IR in NAFLD rats, and it's mechanism may be related to the increase of ADP content, the reduction of oxidative stress, the inhibition of JNK signaling pathway and the enhancement of IRS activity.

[**Key words**] nonalcoholic fatty liver disease; insulin resistance; adiponectin; c-Jun N-terminal kinase; insulin signaling pathway; Bushen Jiangzhuoyin

非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 是指除外酒精和其他明确损肝因素导致的, 以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变为主要病理特征的临床病理综合征, 疾病谱包括单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎和肝硬化。“二次打击学说”为目前大家所公认的发病机制, 胰岛素抵抗 (IR) 在其中扮演了重要角色<sup>[1]</sup>, 而胰岛素增敏剂如双胍类和噻唑烷二酮类药物治疗 NAFLD 的疗效并不理想<sup>[2]</sup>, 目前临床治疗 NAFLD 多选用具有抗氧化、降血脂及保肝降酶等作用的药物如水飞蓟宾葡甲胺等。中医药在防治 NAFLD 方面疗效明显, 中药复方抗氧化、降血脂及保肝降酶等作用已得到药理实验的证实, 并且越来越多的研究表明中药复方在改善 IR 方面疗效显著<sup>[3]</sup>。补肾降浊饮是以补肾名方“六味地黄丸”补泻理论为依据, 以补肾阴及化浊功效中药为主组成, 前期研究发现补肾降浊类方剂对 NAFLD 大鼠 IR 有明显改善效果<sup>[4]</sup>, 但其机制尚未明了。最近研究揭示 IR 发生机制可能与脂肪细胞因子、相关激酶等干扰胰岛素信号转导有关<sup>[5]</sup>。为此, 本研究拟从中药复方影响脂肪细胞因子及相关激酶水平等角度观察其对胰岛素信号通路的作用, 进一步阐明其治疗 NAFLD 的作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物与饲料** 8~12 周龄雄性 SD 大鼠 60 只, SPF 级, 体质量 (180 ± 20) g, 购于济南朋悦实验动物中心, 合格证号 SCXK (鲁) 2014-0007。本研究通过山东中医药大学动物伦理委员会审查, 编号 DWSY201703002。标准普通饲料购自济南朋悦实验动物中心, 高脂饲料 (基础饲料 88.2%, 猪油

10%, 胆固醇 1.3%, 胆盐 0.5%) 由山东中医药大学实验动物中心制作。

**1.2 药物及试剂** 补肾降浊饮组成: 枸杞子 15 g, 女贞子 15 g, 何首乌 15 g, 茯苓 15 g, 泽泻 12 g, 薏苡仁 30 g, 芦根 15 g, (炒) 山药 15 g, 黄精 15 g, 茵陈 20 g, 败酱草 20 g, 甘草 5 g, 中药饮片购于山东中医药大学附属医院门诊中药房, 由附属医院中药制剂重点实验室张学顺教授鉴定为正品且符合 2015 年版《中国药典》规范, 煎药室水煎浓缩 (每付水煎浓缩至 50 mL, 含生药 2 g·mL<sup>-1</sup>)。水飞蓟宾葡甲胺胶囊 (天津天士力制药股份有限公司, 国药准字 H20040299)。肝组织中脂联素 (ADP), 肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 酶联免疫吸附法 (ELISA) 试剂盒 (武汉华美生物工程有限公司, 批号分别为 E02013593, U20010400); 游离脂肪酸 (FFA), 超氧化物歧化酶 (SOD), 丙二醛 (MDA) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号分别为 20170615, 20170622, 20170626); 胰岛素受体  $\alpha$  (IR $\alpha$ ) 抗体 (美国 Abcam 公司, 批号 GR301368-6); c-Jun 氨基端激酶 1 (JNK1) 抗体, p-JNK 抗体, 磷酸化胰岛素受体底物 1 丝氨酸 307 位点 (p-IRS-1) (Ser307) 抗体 (美国 CST 公司, 批号分别为 CST3708S0003, CST9251S0007, CST2381S0005); 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔及抗小鼠二抗 (碧云天公司, 批号分别为 zb2301, zb2305)。

**1.3 仪器** Dx800 型全自动生化仪 (美国 Beckman Coulter 公司); BX53F 型显微镜 (日本 Olympus 公司); 5424R 型低温高速台式离心机 (德

国 Eppendorf 公司); Powerpac HC 型电泳仪及转膜系统, ChemiDoc MP 型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 分组造模与处理** 60 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周后随机分为正常组、模型组、补肾降浊饮低、中、高剂量组和西药组, 每组 10 只。参照文献[6]予高脂饲料共 12 周复制大鼠 NAFLD 模型, 正常组给予普通饲料喂养, 其余 5 组给予高脂饲料喂养, 同时补肾降浊饮低、中、高剂量组及阳性药组分别灌胃补肾降浊饮(含生药 10, 15, 20 g·kg<sup>-1</sup>)和水飞蓟宾葡甲胺(19 g·kg<sup>-1</sup>)治疗, 1 次/d。12 周后处死大鼠取血检测血清学指标并取其肝脏行肝组织相应指标检测、病理切片染色及蛋白免疫印迹(Western blot)实验。

**2.2 血清及肝组织指标测定** 总胆固醇(TC), 甘油三酯(TG), 丙氨酸氨基转移酶(ALT), 天门冬氨酸氨基转移酶(AST), 空腹血糖(FBG)采用全自动生化分析仪测定; 胰岛素(INS)采用放射免疫法测定; 胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)采用稳态模型法(HOMA)计算, HOMA-IR = FBGXINS/22.5, 计算值取自然对数变换后成为正态分布; 胰岛素敏感指数(ISI)采用公式计算, ISI = 1/(FBGXINS), 计算值取自然对数变换后成为正态分布; 大鼠肝组织 ADP, TNF-α 采用 ELISA 测定, 按试剂盒说明书进行 FFA, SOD, MDA 含量测定。

**2.3 肝组织病理切片染色及定量分析** 苏木素-伊红(HE)染色肝组织经多聚甲醛固定, 脱水后石蜡包埋, 组织切片切片机切片, HE 染色, 脱水后中性树脂封片。镜下观察, 细胞核呈蓝色, 细胞浆呈粉红色或红色。油红 O 染色肝组织切片用 70% 乙醇清洗后滴入苏丹 III 染料 20 min, 继以 Mayer 氏改良苏木素浅染胞核 5 min, 1% 盐酸乙醇分化后水洗至胞核显蓝色, 封片。镜下观察, 脂肪呈橙红或鲜红色, 胞核呈蓝色。将切片于 40 倍物镜下选择阳性

细胞较多的区域采集 3~5 个视野, HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文分析系统进行计算机定量分析。

**2.4 Western blot 测定肝组织 JNK1, p-JNK, IRα 及 p-IRS-1 蛋白表达** 取大鼠肝组织 100 mg, 液氮研磨后加入蛋白裂解液 1 mL 及相关抑制剂, 4 ℃, 12 000 r·min 离心 15 min, 取上清后采用 BCA 法测定蛋白浓度; SDS-PAGE 电泳后采用湿转法(200 mA 或 350 mA, 2 h)将蛋白条带转移至 PVDF 膜, 脱脂奶粉封闭 2 h 后分别加入 JNK1 抗体(1:1 000), p-JNK 抗体(1:500), IRα 抗体(1:1 000)及 p-IRS-1 抗体(1:200)过夜, TBST 洗膜后, 加入二抗(辣根过氧化物酶标记的抗兔或抗鼠 IgG, 1:5 000), 摇床孵育 2 h, 洗膜后 ECL 发光显影, AlphaViewSA 分析软件对条带行定量分析。

**2.5 统计学分析** 采用 SPSS 22.0 对结果进行统计分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间数据比较采用单因素方差分析, 两组间数据比较采用 LSD 检验, 以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对大鼠一般情况的影响** 实验中补肾降浊饮高剂量组大鼠死亡 2 只, 补肾降浊饮中、低剂量组及水飞蓟宾葡甲胺组各死亡 1 只。与正常组比较, 模型组大鼠精神不振, 反应迟钝, 活动减少, 大便稀溏。与模型组比较, 各用药组大鼠精神状态、活动及大便等情况均有好转。

**3.2 对 NAFLD 大鼠血清 TG, TC 及肝功能 ALT, AST 的影响** 与正常组比较, 模型组 TG, TC 及 ALT, AST 水平均显著升高( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 补肾降浊饮低、中、高剂量组 TG, TC 含量减少, ALT, AST 水平下降( $P < 0.05, P < 0.01$ )。与水飞蓟宾葡甲胺组比较, 在降低 TG, TC 方面, 补肾降浊饮高剂量组减少显著( $P < 0.01$ ); 在降低 ALT, AST 方面, 各用药组间差异不明显。见表 1。

表 1 补肾降浊饮对 NAFLD 大鼠血清 TG, TC, ALT, AST 含量的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effect of Bushen Jiangzhuoyin on serum levels of TG, TC, ALT and AST in NAFLD rats( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	TG/mmol·L <sup>-1</sup>	TC/mmol·L <sup>-1</sup>	ALT/U·L <sup>-1</sup>	AST/U·L <sup>-1</sup>
正常	10	-	0.42 ± 0.06	1.43 ± 0.04	45.27 ± 4.11	89.08 ± 1.74
模型	10	-	0.79 ± 0.05 <sup>1)</sup>	2.62 ± 0.06 <sup>1)</sup>	72.49 ± 4.85 <sup>1)</sup>	156.52 ± 3.71 <sup>1)</sup>
补肾降浊饮	9	10	0.74 ± 0.03 <sup>2)</sup>	2.55 ± 0.03 <sup>2)</sup>	67.18 ± 4.14 <sup>2)</sup>	153.21 ± 4.41 <sup>2)</sup>
	9	15	0.67 ± 0.05 <sup>3)</sup>	2.25 ± 0.07 <sup>3)</sup>	60.86 ± 5.43 <sup>3)</sup>	140.06 ± 1.35 <sup>3)</sup>
	8	20	0.53 ± 0.03 <sup>3,4)</sup>	1.85 ± 0.08 <sup>3,4)</sup>	55.09 ± 2.63 <sup>3)</sup>	130.15 ± 1.48 <sup>3)</sup>
水飞蓟宾葡甲胺	9	19	0.69 ± 0.03 <sup>3)</sup>	2.30 ± 0.05 <sup>3)</sup>	61.46 ± 5.33 <sup>3)</sup>	143.15 ± 1.68 <sup>3)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ , <sup>3)</sup> $P < 0.01$ ;与水飞蓟宾葡甲胺组比较<sup>4)</sup> $P < 0.01$ (表 2~5)。

**3.3 对 NAFLD 大鼠 FBG, INS, IRI 及 ISI 的影响**  
与正常组比较, 模型组 FBG, INS, IRI 水平显著升高及 ISI 水平显著降低 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 补肾降浊饮高、中剂量组及水飞蓟宾葡甲胺组明显降

低 FBG, INS, IRI 水平, 升高 ISI 水平 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。与水飞蓟宾葡甲胺组比较, 补肾降浊饮高剂量组效果显著, 组间差异具有显著性意义 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

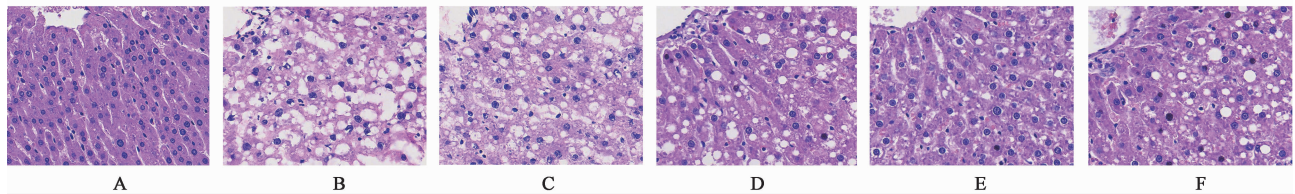
表 2 补肾降浊饮对 NAFLD 大鼠 FBG, INS, IRI, ISI 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effect of Bushen Jiangzhuoyin on levels of FBG, INS, IRI and ISI in NAFLD rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	FBG/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	INS/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	IRI	ISI
正常	10	-	9.82 ± 0.89	18.48 ± 1.11	0.90 ± 0.06	-2.26 ± -0.06
模型	10	-	12.55 ± 2.19 <sup>1)</sup>	27.57 ± 1.73 <sup>1)</sup>	1.18 ± 0.08 <sup>1)</sup>	-2.53 ± 0.08 <sup>1)</sup>
补肾降浊饮	9	10	10.95 ± 1.51	25.81 ± 1.33	1.09 ± 0.06	-2.45 ± 0.06
	9	15	10.21 ± 2.39 <sup>3)</sup>	24.15 ± 2.88 <sup>3)</sup>	1.03 ± 0.15 <sup>3)</sup>	-2.38 ± 0.15 <sup>3)</sup>
	8	20	8.70 ± 0.60 <sup>3,4)</sup>	19.77 ± 2.07 <sup>3,4)</sup>	0.91 ± 0.09 <sup>3,4)</sup>	-2.27 ± 0.09 <sup>3,4)</sup>
水飞蓟宾葡甲胺	9	19	10.80 ± 1.10 <sup>2)</sup>	25.52 ± 1.81 <sup>2)</sup>	1.09 ± 0.05 <sup>2)</sup>	-2.44 ± 0.05 <sup>2)</sup>

**3.4 对 NAFLD 大鼠肝脏病理学的影响** HE 染色正常组大鼠肝脏切片中肝细胞排列正常, 未见脂肪变性及炎性细胞浸润。模型组肝细胞体积增大, 细胞内可见大量脂肪空泡, 部分汇管区炎细胞浸润, 未见明显纤维结缔组织增生。各用药组肝细胞内脂肪空泡数量较模型组不用程度减少, 散在炎细胞浸润, 未见明显纤维结缔组织增生。见图 1。油红 O 染色模型组大鼠肝细胞出现大量染为红色的沉积脂肪,

细胞核位于整个细胞的一边。而各用药组肝细胞脂肪染色浓度及区域出现不同程度的减少。见图 2。油红 O 染色经定量分析显示, 与正常组比较, 模型组阳性率及平均灰度增加显著 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 补肾降浊饮高、中剂量组及水飞蓟宾葡甲胺组下降明显 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。与水飞蓟宾葡甲胺组比较, 补肾降浊饮高、中剂量组改变显著 ( $P < 0.01$ )。见图 2 及表 3。



A. 正常组; B. 模型组; C. 补肾降浊饮 10  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组; D. 补肾降浊饮 15  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组; E. 补肾降浊饮 20  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组; F. 水飞蓟宾葡甲胺组 (图 2, 3 同)  
图 1 补肾降浊饮对 NAFLD 大鼠肝组织 HE 染色的影响 (HE,  $\times 400$ )

Fig. 1 Effect of Bushen Jiangzhuoyin on liver tissue HE staining in NAFLD rats (HE,  $\times 400$ )

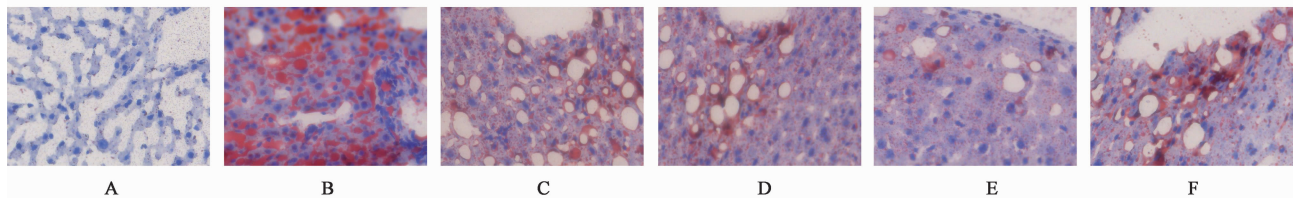


图 2 补肾降浊饮对 NAFLD 大鼠肝组织脂肪染色的影响 (油红 O,  $\times 400$ )

Fig. 2 Effect of Bushen Jiangzhuoyin on liver tissue fat staining in NAFLD rats (oil red O,  $\times 400$ )

**3.5 对 NAFLD 大鼠肝组织 ADP, TNF- $\alpha$ , FFA, SOD 及 MDA 的影响** 与正常组比较, 模型组 ADP, SOD 显著减少, TNF- $\alpha$ , FFA, MDA 显著增加 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 补肾降浊饮高、中剂量组及水飞蓟宾葡甲胺组 ADP, SOD 增加明显

TNF- $\alpha$ , FFA, MDA 减少明显 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); 与水飞蓟宾葡甲胺组比较, 补肾降浊饮高剂量组在增加 ADP, SOD 及减少 TNF- $\alpha$ , FFA, MDA 效果更显著 ( $P < 0.01$ )。见表 4。

**3.6 对 NAFLD 大鼠肝组织 JNK1, p-JNK, IR $\alpha$  及**

表 3 补肾降浊饮对 NAFLD 大鼠脂肪染色阳性率及平均灰度的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Effect of Bushen Jiangzhuoyin on positive rate and average gray level in NAFLD rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	阳性率/%	平均灰度
正常	10	-	0.07 ± 0.01	124.59 ± 0.76
模型	10	-	0.65 ± 0.10 <sup>1)</sup>	161.41 ± 1.15 <sup>1)</sup>
补肾降浊饮	9	10	0.58 ± 0.08	159.80 ± 0.35
	9	15	0.44 ± 0.11 <sup>3,4)</sup>	154.22 ± 0.93 <sup>3,4)</sup>
	8	20	0.41 ± 0.01 <sup>3,4)</sup>	144.06 ± 1.06 <sup>3,4)</sup>
水飞蓟宾葡甲胺	9	19	0.57 ± 0.08 <sup>2)</sup>	159.09 ± 3.81 <sup>2)</sup>

p-IRS-1 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组 JNK1, p-JNK 及 p-IRS-1 表达显著增加 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较,各用药组 JNK1, p-JNK 及 p-IRS-1 表

表 4 补肾降浊饮对 NAFLD 大鼠肝组织 ADP, FFA, TNF- $\alpha$ , SOD 及 MDA 的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 Effect of Bushen Jiangzhuoyin on liver levels of ADP, FFA, TNF- $\alpha$ , SOD and MDA in NAFLD rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	ADP/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	FFA/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$	TNF- $\alpha$ / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	SOD/ $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$	MDA/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$
正常	10	-	150.96 ± 7.14	99.59 ± 6.20	1.66 ± 0.08	222.58 ± 2.22	5.45 ± 0.33
模型	10	-	116.34 ± 10.36 <sup>1)</sup>	168.91 ± 9.75 <sup>1)</sup>	3.14 ± 0.07 <sup>1)</sup>	148.92 ± 0.95 <sup>1)</sup>	11.24 ± 0.76 <sup>1)</sup>
补肾降浊饮	9	10	125.29 ± 8.82 <sup>2)</sup>	159.78 ± 7.32 <sup>2)</sup>	3.03 ± 0.06 <sup>2)</sup>	150.51 ± 1.75 <sup>2)</sup>	10.62 ± 0.58 <sup>2)</sup>
	9	15	129.03 ± 7.06 <sup>3)</sup>	145.46 ± 7.40 <sup>3)</sup>	2.65 ± 0.09 <sup>3)</sup>	164.12 ± 0.88 <sup>3)</sup>	8.22 ± 0.48 <sup>3)</sup>
	8	20	140.57 ± 4.28 <sup>3,4)</sup>	124.01 ± 6.97 <sup>3,4)</sup>	2.31 ± 0.08 <sup>3,4)</sup>	181.49 ± 1.47 <sup>3,4)</sup>	6.94 ± 0.55 <sup>3,4)</sup>
水飞蓟宾葡甲胺	9	19	129.04 ± 9.72 <sup>3)</sup>	146.91 ± 11.36 <sup>3)</sup>	2.70 ± 0.18 <sup>3)</sup>	164.68 ± 1.28 <sup>3)</sup>	8.41 ± 0.27 <sup>3)</sup>

表 5 补肾降浊饮对 NAFLD 大鼠肝组织 JNK1, p-JNK, IR $\alpha$  及 p-IRS-1 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 5 Effect of Bushen Jiangzhuoyin on level of JNK1, p-JNK, IR $\alpha$  and p-IRS-1 protein expression in NAFLD rat liver ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	JNK/ $\beta$ -actin	p-JNK/ $\beta$ -actin	IR $\alpha$ / $\beta$ -actin	p-IRS-1/ $\beta$ -actin
正常	10	-	0.49 ± 0.05	0.54 ± 0.04	1.01 ± 0.08	0.46 ± 0.05
模型	10	-	1.91 ± 0.04 <sup>1)</sup>	1.54 ± 0.03 <sup>1)</sup>	1.18 ± 0.07	0.94 ± 0.06 <sup>1)</sup>
补肾降浊饮	9	10	1.87 ± 0.03	1.50 ± 0.03	1.13 ± 0.05	0.89 ± 0.05 <sup>2)</sup>
	9	15	1.81 ± 0.05 <sup>3)</sup>	1.49 ± 0.04 <sup>2)</sup>	1.13 ± 0.08	0.86 ± 0.06 <sup>3)</sup>
	8	20	1.45 ± 0.04 <sup>3,4)</sup>	1.13 ± 0.06 <sup>3,4)</sup>	1.14 ± 0.04	0.54 ± 0.04 <sup>3,4)</sup>
水飞蓟宾葡甲胺	9	19	1.86 ± 0.07 <sup>2)</sup>	1.50 ± 0.06 <sup>2)</sup>	1.16 ± 0.08	0.88 ± 0.05 <sup>2)</sup>

#### 4 讨论

IR 为 NAFLD 发病中的重要环节,其机制尚未完全清楚,最新研究显示其与细胞因子如脂联素、胰岛素信号通路相关激酶如 JNK 等密切相关。脂联素是脂肪特异性细胞因子,有促进糖脂代谢、减轻胰岛素抵抗及抗炎等作用<sup>[7]</sup>。脂联素可抑制脂肪酸合成酶而降低脂肪酸的含量,减少游离脂肪酸进入肝脏。机体在 NAFLD 时,过剩的脂肪酸在肝细胞中发生脂质过氧化,氧化应激状态下产生大量的活性氧自由基,促使 TNF- $\alpha$  大量释放,使机体处于慢性

达减少明显 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); 与水飞蓟宾葡甲胺组比较,补肾降浊饮高剂量组 JNK1, p-JNK 及 p-IRS-1 表达减少显著 ( $P < 0.01$ )。在 IR $\alpha$  表达方面,各组间改变无明显差异。见图 3 及表 5。

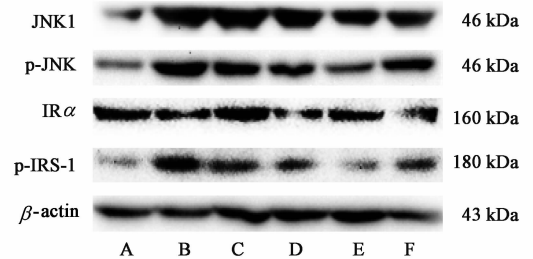


图 3 各组大鼠肝组织 JNK1, p-JNK, IR $\alpha$  及 p-IRS-1 的表达  
Fig. 3 Expression of JNK1, p-JNK, IR $\alpha$  and p-IRS-1 in liver tissue of each group rats

炎症状态。TNF- $\alpha$  可激活多种体内使 IRS 磷酸化的激酶(又称炎性激酶),这其中就包含 JNK<sup>[8]</sup>。

JNK 作为 MAPK 家族中的重要成员之一,在脂肪肝、糖尿病等疾病中起着重要作用,机体的氧化应激或炎症状态可激活 JNK 信号通路,干扰胰岛素的信号转导而引起胰岛素抵抗<sup>[8-9]</sup>。其干扰胰岛素信号转导机制为氧化应激等因素刺激下, JNK 在体内表达增强,通过使 c-Jun 激活区域的丝氨酸 63, 73 位点双磷酸化而提高其转录活性。JNK 活化后导致胰岛素受体底物磷酸化,但其作用部位为酪氨酸附

近的丝氨酸(307 位点)上,此位置磷酸化后就会干扰酪氨酸的磷酸化,导致胰岛素受体底物与胰岛素受体结合松散,激活胰岛素信号通路下游底物的能力下降,减弱胰岛素信号转导,最终导致胰岛素抵抗<sup>[10-11]</sup>。

水飞蓟宾葡甲胺为临床治疗 NAFLD 的常用药物,其主要成分水飞蓟宾可降低 NAFLD 大鼠的血脂、肝功水平,药理实验证实其可降低机体的氧化应激水平,减少 TNF- $\alpha$ 、白细胞介素等炎性介质的生成<sup>[12-13]</sup>。相关研究亦发现水飞蓟宾还可改善高脂饮食大鼠胰岛素的敏感性<sup>[14]</sup>,有效促进细胞因子脂联素及抵抗素等的表达,且效果优于罗格列酮<sup>[15]</sup>。

中医学把 NAFLD 归属于“肥胖”、“积聚”、“胁痛”等疾病范畴,其病机为肝脾肾功能失调,气血津液代谢失常,痰浊蕴结于肝。临床上脂肪肝患者发病年龄多在中年以后,“年四十而阴气自半”,阴精亏虚、浊邪内生为其病机特点,治疗当予补肾化浊。方中枸杞子、女贞子、制何首乌补肾益精,共用为君;茯苓、泽泻、薏苡仁、芦根利湿降浊为臣,黄精、炒山药补脾益气,茵陈、败酱草清热利湿,共为佐药;甘草调和诸药,用为使药。综观全方,补中兼泄,体现了滋补而不滞邪,降泻而不伤正的治疗原则,肾精得补,脾脏得健,则浊邪得除。前期的临床研究已证实补肾降浊类方剂具有良好的改善脂肪肝及其胰岛素抵抗的作用<sup>[4,16]</sup>。现代药理研究亦证实,枸杞子、制何首乌具有降低体内脂质氧化程度,升高血清 SOD 活性量,降低 MDA 含量,清除氧自由基,抵御氧化应激的作用<sup>[17-18]</sup>;女贞子、山药、黄精可明显调节体内血糖代谢而发挥降血糖作用<sup>[19-21]</sup>;泽泻、薏苡仁不仅能降血脂,而且具有保肝、抗炎等作用<sup>[22-23]</sup>;茵陈、败酱草可显著降低氨基转移酶而达到保肝消炎作用<sup>[24-25]</sup>。

本实验结果显示,模型组大鼠血清 TC, TG, FBG, INS, IRI 明显升高, ISI 明显降低,提示 NAFLD 大鼠模型存在显著的 IR。各用药组均能不同程度改善大鼠血清中 TC, TG, ALT, AST 水平及肝组织中 ADP, FFA, TNF- $\alpha$ , SOD, MDA 含量,亦可不同程度改善大鼠肝组织脂肪染色水平及 IR 水平。相较于水飞蓟宾葡甲胺组,补肾降浊饮高剂量组疗效显著。在调节肝组织 JNK1, p-JNK, IR $\alpha$  及 p-IRS-1 表达方面,虽然各组间 IR $\alpha$  表达无明显差异,但各用药组均能不同程度降低 JNK1, p-JNK 及 p-IRS-1 的表达。相较于水飞蓟宾葡甲胺组,补肾降浊饮高剂量组疗效显著。

本研究显示补肾降浊饮对改善 NAFLD 大鼠 IR 方面具有较好的疗效,其机制可能是通过增加脂联素含量,减少 FFA 产生,改善了大鼠体内氧化应激水平及炎症状态,体内 TNF- $\alpha$  含量减少则抑制 JNK 信号通路的活化,减少 JNK1 及 p-JNK 的表达,从而减轻胰岛素受体底物丝氨酸 307 位点的磷酸化,恢复其酪氨酸磷酸化而使其与胰岛素受体结合增强,调节胰岛素信号通路发挥胰岛素的生理功能,最终改善胰岛素抵抗。

#### [参考文献]

- [1] 刘超,魏亚聪,冯静,等.非酒精性脂肪肝与胰岛素抵抗的研究进展[J].医学综述,2016,22(20):3994-3998.
- [2] Haukeland J W, Konopski Z, Eggesbo H B, et al. Metformin in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomized, controlled trial [J]. Scand J Gastroenterol, 2009, 44: 853-860.
- [3] 温伟波,杨龄,杨柳华,等.代谢综合征胰岛素抵抗与中医常见证型研究[J].四川中医,2014,32(7):91-92.
- [4] 孙建光,高继龙.补肾化浊方对非酒精性脂肪肝大鼠血清瘦素与胰岛素抵抗的影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(24):288-291.
- [5] 黎增辉,廖爱军. JNK 信号通路[J]. 国际病理科学与临床杂志,2010,30(3):273-276.
- [6] 杨威,徐闯,陈媛媛,等.大鼠非酒精性脂肪肝模型的建立[J].黑龙江八一农垦大学学报,2017,29(3):15-19.
- [7] 张同梅.脂联素与多种疾病关系的研究进展[J].实用心脑血管病杂志,2015,23(2):4-7.
- [8] 王慧敏,都健. JNK 信号转导通路与 2 型糖尿病[J].国外医学:内科学分册,2009,36(3):128-131.
- [9] Sharfi H, Eldar Finkelmann H. Sequential phosphorylation of insulin receptor substrate-2 by glycogen synthase kinase-3 and c-Jun NH2-terminal kinase plays a role in hepatic insulin signaling[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008, 294(2): E307-E315.
- [10] WEI Y, Pagliassotti M J. Hepatospecific effects of fructose on c-jun NH2-terminal kinase: implications for hepatic insulin resistance[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004, 287(5): E926-E933.
- [11] 金正贤,高申,张桂珍.胰岛素抵抗与 IKK 和 JNK 活性的改变[J].中华糖尿病杂志,2009,17(4):319-320.
- [12] 万华,席宏丽,陶迎红,等.水飞蓟宾葡甲胺片治疗非酒精性脂肪性肝炎[J].中国实验方剂学杂志,2010,

- 16(12):157-161.
- [13] 冀润利,张争运,王毓麟.水飞蓟宾葡甲胺对非酒精性脂肪肝大鼠的作用[J].中华实用诊断与治疗杂志,2013,27(8):771-772,776.
- [14] 姚嘉茵,邹敏,鲁义,等.水飞蓟宾对非酒精性脂肪性肝病大鼠脂联素和抵抗素表达的影响[J].实用医学杂志,2011,27(15):2701-2703.
- [15] 尹义存,邹大进,鲁瑾.水飞蓟宾对高脂饮食大鼠胰岛胰岛素敏感性的影响[J].第二军医大学学报,1999(4):31-33.
- [16] 孙建光.补肾泻浊饮治疗非酒精性脂肪性肝病 35 例疗效观察[J].中医研究,2011,24(3):10.
- [17] 侯学谦,祝婉芳,曲玮,等.枸杞化学成分及药理活性研究进展[J].海峡药学,2016,28(8):1-7.
- [18] 高淑红,苏珍枝,肖学凤.制首乌化学成分及药理作用研究进展[J].山西中医学院学报,2012,13(2):74-77.
- [19] 魏祥燕,王国娟,王桦影,等.女贞子药理作用研究进展[J].上海中医药杂志,2017,51(8):106-108.
- [20] 刘晓梅.山药的药理研究及临床新用[J].光明中医,2010,25(6):1087-1088.
- [21] 侯慧.黄精的化学成分及药理作用研究探讨[J].黑龙江科技信息,2014(7):78.
- [22] 田婷,陈华,冯亚龙,等.泽泻药理与毒理作用的研究进展[J].中药材,2014,37(11):2013-2018.
- [23] 张明发,沈雅琴.薏苡仁抗代谢综合征的药理作用研究进展[J].药物评价研究,2014,37(2):178-183.
- [24] 曹锦花.茵陈的化学成分和药理作用研究进展[J].沈阳药科大学学报,2013,30(6):489-494.
- [25] 崔文燕,刘素香,宋晓凯,等.黄花败酱草和白花败酱草的化学成分与药理作用研究进展[J].药物评价研究,2016,39(3):482-488.

[责任编辑 周冰冰]