

逍遥散对非酒精性脂肪性肝炎肝郁脾虚证大鼠 TLR-4/TRIF 信号转导通路的影响

刘杨, 李明磊, 贾飞, 李若瑜, 关伟, 刘晋芳, 苗宇船*

(山西中医药大学, 山西 晋中 030619)

[摘要] **目的:**观察逍遥散对非酒精性脂肪性肝炎(NASH)肝郁脾虚证大鼠肝细胞 Toll 样受体-4(TLR-4)/ β 干扰素 TIR 结构域衔接蛋白(TRIF)信号转导通路活性的影响。**方法:**选取 32 只 SPF 级 SD 雄性大鼠,随机分为正常组、模型组、逍遥散治疗组和甘氨酸治疗组($n=8$)。除正常组大鼠给与基础饲料常规饲养外,其余实验组均按“高糖高脂饲料+饥饱失常+慢性束缚应激”法饲养 14 周以建立 NASH 肝郁脾虚证大鼠模型,并分别给与生理盐水 $2\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃, $1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 逍遥散溶液按 $3.24\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 剂量灌胃, $2.5\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 甘氨酸溶液按 $2\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 剂量灌胃,给药 4 周后处死。大鼠处死前均计算其肝郁脾虚证证候积分和检测尿 D-木糖排泄率,无菌低温条件下提取肝脏及脑组织。采用酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测大鼠脑组织内去甲肾上腺素(NE),5 羟色胺(5-HT)的含量,苏木素-伊红(HE)染色检测肝细胞脂肪变性及炎细胞浸润程度,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)技术检测大鼠肝组织 TLR-4,TRIF 蛋白的表达。**结果:**与正常组比较,模型大鼠肝郁脾虚证证候积分明显升高,而尿 D-木糖排泄率和脑组织内 5-HT,NE 含量明显降低,肝组织 HE 染色可见肝细胞胞质内出现大量脂肪空泡及肝小叶内可见散在的点状坏死和炎细胞浸润,TLR-4 和 TRIF mRNA 表达以及 TLR-4 和 TRIF 蛋白表达量明显升高($P<0.05$);与模型组比较,逍遥散治疗组和甘氨酸治疗组明显降低大鼠肝郁脾虚证证候积分,明显升高尿 D-木糖排泄率和脑组织内 5-HT,NE 的含量,明显减轻肝细胞脂肪变性程度及炎细胞浸润程度,明显降低 TLR-4 和 TRIF mRNA 表达以及 TLR-4 和 TRIF 蛋白表达量($P<0.05$)。**结论:**逍遥散可通过调节 TLR-4/TRIF 信号转导通路的活性以发挥“疏肝健脾”之功效,从而参与 NASH 肝郁脾虚证的治疗。

[关键词] 非酒精性脂肪性肝炎;肝郁脾虚证;逍遥散;Toll 样受体-4(TLR-4)/ β 干扰素 TIR 结构域衔接蛋白(TRIF);信号转导通路

[中图分类号] R22;R24;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)17-0108-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20181727

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180614.1141.005.html>

[网络出版时间] 2018-06-14 15:28

Effect of Xiqoyaosan on TLR-4/TRIF Signal Transduction Pathway in Rats of Non-alcoholic Fatty Hepatitis with Liver-Qi Stagnation and Spleen Deficiency Syndrome

LIU Yang, LI Ming-lei, JIA Fei, LI Ruo-yu, GUAN Wei, LIU Jin-fang, MIAO Yu-chuan*

(Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Xiaoyaosan on the activity of the Toll-like receptor-4 (TLR-4) /TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β (TRIF) signal transduction pathway in liver cells of rats of non-alcoholic fatty hepatitis (NASH) with liver-Qi stagnation and spleen deficiency syndrome. **Method:**

[收稿日期] 20180319(018)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81470190);山西省卫生厅科研课题项目(201301100)

[第一作者] 刘杨,博士,副教授,从事非酒精性脂肪肝病的发病机制及中西医结合治疗研究, Tel: 0351-3179702, E-mail: syfy2004@163.com

[通信作者] *苗宇船,博士,教授,从事非酒精性脂肪肝病的发病机制及中西医结合治疗研究, Tel: 0351-3179702, E-mail: mych65@163.com

Thirty-two SPF grade SD male rats were selected and randomly divided into normal control group, model group, Xiaoyaosan treatment group and glycine treatment group ($n = 8$). Except for the rats in normal control group, which were fed routinely with normal die, the NASH with the liver-Qi stagnation and the spleen deficiency syndrome experimental model were established in the rats of the other 3 groups with the 'high-glucose and high-fat feed + irregular eating + chronic bondage stimulation' method for 14 weeks. And then, normal saline, Xiaoyaosan solution ($1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$) and glycine solution ($2.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$) were given by gavage for 4 weeks at the dosage of $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, $3.24 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ and $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ in model group, Xiaoyaosan treatment group and glycine treatment group, respectively. The syndrome scores of liver-Qi stagnation and spleen deficiency were calculated, and the urine *D*-xylose excretion rate was detected in all of rats before being put to death, and the liver and brain tissues were extracted under aseptic and low temperature conditions. The content of norepinephrine (NE) and 5-serotonin (5-HT) in brain, the degree of steatosis and inflammatory cell infiltration and activity of TLR-4/TRIF signal transduction pathways in liver were detected with enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), htoxylin eosin (HE) staining and Real-time PCR, western blot technique. **Result:** Compared with the normal control group, increased syndrome scores of liver-Qi stagnation and spleen deficiency syndrome, declined urine *D*-xylose excretion rate and content of 5-HT and NE in brain, lots of fat vacuoles in hepatocyte cytoplasm and scattered spotty necrosis and inflammatory cells infiltration in hepatic lobular, increased TLR-4, TRIF mRNA and protein expressions in liver could be found in rats of model group ($P < 0.05$). Compared with the model group, decreased syndrome scores of liver-Qi stagnation and spleen deficiency syndrome, elevated urine *D*-xylose excretion rate and content of 5-HT and NE in brain, alleviated steatosis and inflammatory cell infiltration, declined TLR-4, TRIF mRNA and protein expressions in liver could be found in rats of Xiaoyaosan treatment group and glycine treatment group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Xiaoyaosan could play the role in the treatment of NASH with liver-Qi stagnation and spleen deficiency syndrome by dispersing stagnated liver-qi, strengthening spleen and inhibiting activity of TLR-4/TRIF signal transduction pathway.

[**Key words**] non-alcoholic fatty hepatitis (NASH); liver-Qi stagnation and spleen deficiency syndrome; Xiaoyaosan; Toll-like receptor-4 (TLR-4) /TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β , (TRIF); signal transduction pathway

非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是指除外酒精和其他明确的损肝因素所致的肝细胞内脂肪过度沉积为主要特征的临床病理综合征, 与胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 和遗传易感性密切相关, 包括单纯性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH) 及其非酒精性脂肪性肝硬化。随着肥胖及其相关代谢综合征的全球化流行, NAFLD 现已成为发达国家和我国富裕地区最常见的慢性肝病, 患病率高达 10% ~ 30%, 其中 10% ~ 20% 的患者为 NASH^[1], 后者 10 年内发生肝硬化并继发成为肝细胞肝癌的概率高达 25%^[2]。临床上, 中医辨证论治 NASH 的证型多为肝郁脾虚证、痰湿内阻证、湿热内蕴证、痰瘀互结证、肝肾不足证。其中, 肝郁脾虚证是 NASH 发病的基本病机。逍遥散出自《太平惠民和剂局方》, 为中国中西医结合学会对 NASH 肝郁脾虚证的推荐用药^[3], 目前有关逍遥散对肝郁脾虚证的调节机制

研究, 多集中于从改善机体应激反应的角度进行, 如研究发现逍遥散可以通过抑制蓝斑-去甲肾上腺素能神经元的活性从而改善慢性束缚应激大鼠抑郁样行为^[4]; 可通过上调海马神经元 PSD-95 与 SYP 的表达水平, 逆转慢性束缚应激肝郁脾虚证大鼠学习记忆功能的下降^[5]; 可通过调节能量代谢、氨基酸代谢、肠道微生物活性对轻度应激模型大鼠起到治疗作用^[6]。而对逍遥散对 NASH 肝郁脾虚证的炎症反应调节机制, 尚未见明确的研究报道。研究发现, Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLR) -4/含 TIR 功能区的接头蛋白诱导的干扰素 β (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β , TRIF) 炎症通路是 NASH 的发生发展过程中发挥重要作用^[7]。因此, 本文拟通过观察逍遥散对 NASH 肝郁脾虚证大鼠肝脏内 TLR-4/TRIF 炎症信号通路活性的影响, 从而对逍遥散对 NASH 肝郁脾虚证证候改变以及抑炎机制进行探讨, 为逍遥散治疗

NASH 肝郁脾虚证提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 选取 SPF 级雄性 SD 大鼠 32 只,购自北京海淀兴旺实验动物养殖场,合格证号 SCXK(京)2014-0003,体质量(200 ± 10) g。本实验已获山西中医药大学实验动物伦理委员会批准,大鼠在本实验室经 1 周恒温、恒湿适应性饲养[温度(23 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,湿度(48 ± 4)%,每天光照 12 h]后方可开始实验。

1.2 药物与试剂 逍遥散(山西天生制药有限公司,国药准字 Z14020457,为大蜜丸,每丸 9 g,药物组成为柴胡、当归、白芍、炒白术、茯苓、炙甘草、薄荷);甘氨酸(美国 Amresco 公司,批号 20141013);TLR-4 单克隆抗体和 TRIF 单克隆抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab22048,ab13810), β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号 sc-47778);RIPA 组织细胞裂解液和 HRP-标记免疫球蛋白(Ig)G(海斯信生物科技有限公司,批号分别为 PAB180006,PAB160013);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,编号 P0010);ECL 超敏发光液(北京普利莱基因技术有限公司,批号 P1010);超纯 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒和 Real-time PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司,批号分别为 D9108B,DRR047A,DRR420A);TLR-4, TRIF 和 β -actin 引物由日本 TaKaRa 公司合成,引物序列见表 1;去甲肾上腺素(noradrenaline, NE),5 羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司,批号分别为 105157,1051573);其他相关生化试剂或耗材均购自美国 Sigma 公司和北京中杉金桥生物技术有限公司。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

引物名称	引物序列(5'-3')	引物长度/bp
TLR4	上游 CTGCATAGAGGTTAGTTCCT	128
	下游 TCCAGCCACTGAAGTTCCTGA	
TRIF	上游 AGATCAGCCAGTCGCCACTCT	131
	下游 GTCAGGTTCTTCGCAGCCTTCAG	
β -actin	上游 ACTCTGTGTGGATTGCTGGC	155
	下游 AGAAAGGTTGTAACGCAGC	

1.3 仪器 RM2235 型石蜡切片机(德国 Leica 公

司);ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司);MK3 型酶标仪(芬兰 Thermo 公司);5424 R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);NANODROP 2000 型分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司);Mini protean 3 cell 型电泳仪,Mini Trans-Blot[®] Cell 小型转印槽(美国 Bio-Rad 公司);Chemray240 型全自动生化分析仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司);CBIO-GelPro 型全自动电泳凝胶成像系统(北京赛百奥科技有限公司);DFC295-IMS 型图象分析系统(上海研吉生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 模型建立 参照文献[8]的方法建立 NASH 肝郁脾虚证大鼠模型,大鼠按“高糖高脂饲料 + 饥饿失常 + 慢性束缚应激”法进行处理,其中,高糖高脂饲料的制作方法参照文献[9],并进行适当改良,各成分及其质量分数分别为基础大鼠饲料(68.6%),猪油(20%),蔗糖(10%),胆固醇(1%),胆酸钠(0.2%)和丙硫氧嘧啶(0.2%);饥饿失常处理:采用每日足量给食高糖高脂饲料,隔日禁食的方法(期间正常自由饮水);慢性束缚应激刺激处理:每日将大鼠置于特制的束缚制动筒内,持续束缚时间为 4 h,束缚制动期间禁食、禁水。造模 14 周后,通过大鼠的肝郁脾虚证侯积分(根据参照文献[10]的方法进行计算),检测大鼠脑组织内 NE 和 5-HT 的含量以及尿 D-木糖排泄率,观察大鼠肝脏病理学变化的方法,以综合评价模型建立是否成功。

2.2 分组处理 大鼠随机分为正常组、模型组、逍遥散治疗组和甘氨酸治疗组(每组 8 只)。正常组大鼠常规饲养,其余实验组大鼠按上述方法建立 NASH 肝郁脾虚证病证结合模型,模型建立成功后,模型组生理盐水 $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃;逍遥散治疗组将逍遥散配制成 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液后,按 $3.24 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 剂量灌胃(根据《中药药理实验方法学》中人与大鼠按体表面积转换系数 0.018 及成人每日蜜丸量 18 g 计算所得)^[11];甘氨酸治疗组将甘氨酸配制成 $2.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液后,按 $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 剂量灌胃。上述实验组均给药 4 周。给药结束后处死动物,无菌、低温条件下提取肝脏及脑组织,肝脏部分液氮保存,部分 4% 多聚甲醛固定,脑组织 -20°C 保存。

2.3 大鼠肝郁脾虚证侯积分的计算 参照文献[10]的方法,对各实验组大鼠的症状、体征及行为学改变进行量化评分,主要包括大鼠精神状态、进食及饮水情况、舌质、腹部有无肿胀、粪便性状、眼睛、

毛色、尾部瘀斑等。均于处死前进行,双人进行评分,取平均值。

2.4 大鼠肝脏苏木素-伊红(HE)染色 大鼠肝组织经 4% 多聚甲醛固定后,常规石蜡包埋、切片及 HE 染色,光学显微镜下观察病理变化。

2.5 ELISA 法检测大鼠脑组织内 NE,5-HT 含量 大鼠处死后即刻,低温条件下分离脑组织,并制备匀浆液,3 000 r·min⁻¹离心 10 min(4 ℃),取上清液。按 ELISA 试剂盒说明书分别加入相关试剂,酶标仪检测,计算 NE,5-HT 的含量。

2.6 分光光度计检测大鼠尿 D-木糖排泄率 大鼠处死前 1 d 给予 4 mL 3% D-木糖溶液灌胃处理,然后收集 5 h 尿液(期间禁食不禁水),尿液样本经双蒸水稀释 9 倍后,按 D-木糖试剂盒说明书步骤,采用 NANODROP 2000 分光光度计检测大鼠尿液 D-糖排泄率。

2.7 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测 TLR-4 和 TRIF mRNA 的含量 按超纯 RNA 提取试剂盒说明书的方法提取各实验组大鼠肝组织中总 RNA。取总 RNA 5 μL 用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳,以检测总 RNA 的完整性。按反转录试剂盒说明书将相关试剂与总 RNA 10 μL 混合后(总体积为 20 μL),进行反转录,反应条件为 37 ℃ 15 min,1 次循环;85 ℃ 5 s,1 次循环(反转录产物 4 ℃ 保存)。取反转录产物 2 μL 与 Real-time PCR 试剂盒相关试剂混合后(总体积为 20 μL),进行 PCR 扩增,反应条件为 95 ℃ 30 s,1 次循环;(95 ℃ 5 s,60 ℃ 34 s),40 个循环。根据 Real-time PCR 原始检测结果,按照 2^{-ΔΔC_t} 相对定量计算公式,计算出各样品的目的基因相对含量结果。

2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 TLR-4 和 TRIF 蛋白的表达量 取各实验组大鼠肝组织 1 g,加入 RIPA 组织细胞裂解液 1 mL 后,冰上研磨、消化 5 min,4 ℃ 12 000 × g 离心 10 min,上清液采用 BCA 法进行蛋白质定量(总蛋白 1 g·L⁻¹)。采用 SDS-PAGE 凝胶电泳(10% 浓缩胶 80 V 40 min,4% 分离胶 120 V 50 min)分离蛋白质,湿转法转移蛋白质(90 V 30 min)。5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h 后分别加入 1:1 000 稀释的 TLR-4 单抗,TRIF 单抗及 β-actin 单抗(4 ℃ 摇床上过夜),TBST 缓冲液洗涤 5 min 3 次后,后加入 1:500 稀释的 HRP-IgG(室温 1 h,摇床上进行),TBST 洗涤 5 min 3 次后,加入 ECL 超敏发光液曝光,结果输入电脑后,采用 IMS 图象分析系统计算 TLR-4,TRIF 与 β-actin 条带灰度

值的比值,作为其各自的相对表达量。

2.9 统计学分析 采用 SPSS 13.0 软件进行方差分析和 SNK 检验,所得计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对 NASH 大鼠肝郁脾虚证证候积分、尿 D-木糖排泄率、脑组织内 5-HT,NE 含量和肝组织病理学变化的影响 与正常组比较,模型大鼠出现情绪低落、活动减少、毛色发黄、大便溏薄等肝郁脾虚的临床表现,其肝郁脾虚证证候积分升高($P < 0.05$),而尿 D-木糖排泄率和脑组织内 5-HT,NE 的含量降低($P < 0.05$),肝组织 HE 染色可见肝细胞中度至重度水肿,胞质内出现大量脂肪空泡,肝小叶正常结构破坏,小叶内可见散在的点状坏死和炎细胞浸润。提示造模 14 周后,大鼠已出现明显的 NASH 肝郁脾虚证的临床表现,病证结合的动物模型建立成功。与模型组比较,逍遥散治疗组和甘氨酸治疗组大鼠肝郁脾虚证证候积分降低($P < 0.05$),而尿 D-木糖排泄率和脑组织内 5-HT,NE 的含量升高($P < 0.05$),肝组织 HE 染色可见肝细胞脂肪变性程度明显减轻,仅可见细胞内可见少许小泡性脂肪滴,炎细胞浸润程度明显减轻。提示经逍遥散和甘氨酸治疗 4 周后,大鼠 NASH 肝郁脾虚证的临床表现得以显著改善。见表 2 和图 1。

表 2 逍遥散对 NASH 肝郁脾虚证大鼠肝郁脾虚证证候积分、尿 D-木糖排泄率和脑组织内 5-HT,NE 的含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of Xiaoyaosan on syndrome score of liver depression and spleen deficiency, D-xylose excretion rate in urine, contents of 5-HT and NE in brain in NASH with liver depression and spleen deficiency model rats($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	证候积分 /分	尿 D-木糖 排泄率/%	5-HT /ng·L ⁻¹	NE /ng·L ⁻¹
正常	-	0.5 ± 0.3	36.3 ± 3.2	9.3 ± 2.1	13.9 ± 2.9
模型	-	15.7 ± 5.3 ¹⁾	21.1 ± 4.1 ¹⁾	3.0 ± 0.8 ¹⁾	7.9 ± 1.3 ¹⁾
逍遥散	3.24	6.2 ± 0.9 ²⁾	31.6 ± 3.5 ²⁾	5.4 ± 0.6 ²⁾	11.0 ± 1.9 ²⁾
甘氨酸	5.0	6.0 ± 0.8 ²⁾	33.2 ± 4.8 ²⁾	6.6 ± 1.3 ²⁾	11.9 ± 2.1 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 3~4 同)。

3.2 对 NASH 肝郁脾虚证大鼠肝脏 TLR-4 和 TRIF mRNA 相对表的影响 与正常组比较,模型组大鼠 TLR-4 和 TRIF mRNA 相对含量升高($P < 0.05$);与模型组比较,逍遥散治疗组和甘氨酸治疗组 TLR-4 和 TRIF mRNA 相对含量明显降低($P < 0.05$)。见表 3。

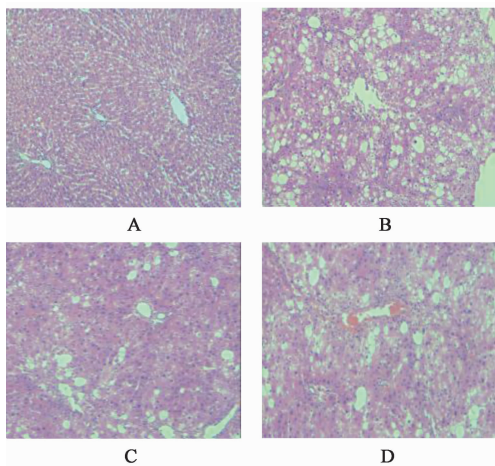


图 1 逍遥散对 NASH 肝郁脾虚证大鼠肝细胞脂肪变性及炎细胞浸润程度的影响 (HE, ×200)

Fig.1 Effect of Xiaoyaosan on degree of hepatocyte steatosis in NASH with liver depression and spleen deficiency model rats (HE, ×200)

表 3 逍遥散对 NASH 肝郁脾虚证大鼠肝脏 TLR-4 和 TRIF mRNA 相对含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of Xiaoyaosan on relative quantity of TLR-4 and TRIF mRNA in NASH with liver depression and spleen deficiency model rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TLR-4	TRIF
正常	-	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1
模型	-	2.1 ± 0.1 ¹⁾	2.3 ± 0.1 ¹⁾
逍遥散	3.24	1.4 ± 0.2 ²⁾	1.6 ± 0.2 ²⁾
甘氨酸	5.0	1.6 ± 0.2 ²⁾	1.7 ± 0.2 ²⁾

3.3 对 NASH 肝郁脾虚证大鼠肝脏 TLR-4 和 TRIF 蛋白相对表达量的影响 与正常组比较,模型组大鼠 TLR-4 和 TRIF 蛋白相对表达量升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较,逍遥散治疗组和甘氨酸治疗组 TLR-4 和 TRIF 蛋白相对表达量显著降低 ($P < 0.05$)。见图 2 和表 4。

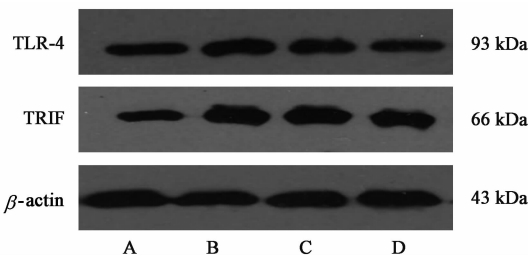


图 2 NASH 肝郁脾虚证大鼠肝脏 TLR-4 和 TRIF 表达电泳
Fig. 2 Expression of TLR-4 and TRIF in NASH with liver depression and spleen deficiency model rats by electrophoresis

4 讨论

NASH 为 NAFLD 的活动状态,以肝细胞损伤、

表 4 逍遥散对 NASH 肝郁脾虚证大鼠肝脏 TLR-4 和 TRIF 蛋白相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of Xiaoyaosan on relative expression quantity of TLR-4 and TRIF in NASH with liver depression and spleen deficiency model rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TLR-4/ β -actin	TRIF/ β -actin
正常	-	0.24 ± 0.01	0.26 ± 0.06
模型	-	1.06 ± 0.04 ¹⁾	1.07 ± 0.08 ¹⁾
逍遥散	3.24	0.49 ± 0.01 ²⁾	0.49 ± 0.03 ²⁾
甘氨酸	5.0	0.55 ± 0.04 ²⁾	0.52 ± 0.10 ²⁾

肝脏炎症、进行性纤维化为特征,已经成为导致肝硬化和肝细胞癌的重要原因之一^[2]。在我国古代中医学理论中,虽无 NAFLD 和 NASH 的病名,但通过辨证,可认为本病属于“积聚”“胁痛”“胀满”“痞满”等范畴^[12]。NASH 临证多因饮食不节、情志不调,伤及脾胃,脾失健运,水谷不能化为精微,聚为膏脂,凝为痰浊,痰浊内停,气机失于疏泄,肝气郁结,血脉瘀阻,则湿、痰、瘀、脂浊凝聚于肝。因此,肝郁脾虚是 NASH 发病的基本病机,痰湿、瘀血相互胶着则是 NASH 的病理产物^[10]。肝主疏泄功能是中医肝脏生理功能的核心,有调畅气机、调畅情志、促进脾胃运化等作用。张仲景在《伤寒杂病论》中指出:“夫治肝病者,见肝之病,知肝传脾,当先实脾。”故疏肝健脾、调理中州,应作为 NASH 的基本治疗大法,病久可辅以行气活血、化痰祛瘀。逍遥散的药物组成包括醋柴胡、炒白术、薄荷、炒白芍、当归、茯苓、山楂、生姜、甘草等,具有疏肝解郁,健脾和营之功,为中国中西医结合学会对 NASH 肝郁脾虚证的推荐用药^[3]。

TLR-4 属于 TLRs 家族之一,TLRs 是新近发现的模式识别受体,包括 TLR1 ~ TLR11^[13-14]。TLRs 识别内、外源性配体后,启动炎症应答信号通路、诱导炎症因子表达而对机体组织产生保护或损伤作用。其中 TLR-4 可介导髓样分化因子 (myeloid differentiation primary response gene, MyD)-88 依赖性的信号转导通路,它可介导抗原递呈细胞活化 NF- κ B 途径,并诱导炎症因子的表达 [包括细胞间黏附分子 (ICAM), 白细胞介素-2 (IL-2), IL-6, IL-8, 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 等]^[15]。此外 TLR4 介导的信号转导通路还有 MyD88 非依赖性信号转导通路,它通过与 TRIF 结合并相互作用,促进脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的干扰素 (interferon, IFN), 并可诱导干扰素诱导蛋白 (IFN-inducible

protein, IP)-10, 糖皮质激素衰减反应基因 (glucocorticoid attenuated response gene, GARG)-16, 干扰素调节基因 (IFN-regulated gene, IRG-1)-1 表达和树突状细胞 (dendritic cell, DC) 的成熟^[16]。本次实验结果显示,与正常组大鼠比较,NASH 肝郁脾虚证大鼠肝细胞内 TLR-4/TRIF 信号转导通路的活性显著升高,表明“饮食不节、情志不调”所致“肝郁脾虚”可以诱导 TLR4 表达升高,而 TLR4 又可通过 MyD88 非依赖性转导途径,激活其下游靶分子 TRIF,从而启动肝脏内炎症应答反应,造成肝组织损伤。而与模型组比较,逍遥散治疗组大鼠在肝郁脾虚证证候明显改善的同时,其肝细胞内 TLR-4/TRIF 信号转导通路的活性显著降低,表明逍遥散在通过“疏肝解郁,健脾合营”改善肝郁脾虚证候的同时,又可以抑制 TLR-4/TRIF 信号转导通路的活性,从而改善肝脏的炎症损伤。本次研究发现,逍遥散可以有效改善 NASH 肝郁脾虚证大鼠的肝郁脾虚证的临床证候,表现为与模型组大鼠比较,逍遥散治疗组大鼠肝郁脾虚证证候积分显著降低,而尿 D-木糖排泄率和脑组织内 5-HT,NE 的含量升高。同时,逍遥散治疗组大鼠肝细胞脂肪变性程度和炎细胞浸润程度明显改善,仅可见细胞内存在少许小泡性脂肪滴。表明逍遥散在改善大鼠的肝郁脾虚证证候的同时,又可有效减轻肝脏内炎症反应。而逍遥散改善肝脏炎症反应的机制可能与 TLR-4/TRIF 炎症信号转导通路有关。上述实验结果提示,TLR-4/TRIF 炎症信号通路可能就是 NASH 肝郁脾虚证发生发展以及逍遥散发挥“疏肝健脾”功效的关键靶点之一。至于逍遥散抑制 TLR-4/TRIF 信号转导通路后又可以调节其下游哪些靶蛋白的转录表达,将是本课题组下一步研究的重点。

综上所述,逍遥散可通过参与调节 TLR-4/TRIF 炎症信号转导通路的活性,以发挥“疏肝健脾”之功效,从而参与 NASH 肝郁脾虚证的治疗。

[参考文献]

- [1] Younossi Z M, Koenig A B, Abdelatif D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes [J]. *Hepatology*, 2016, 64(1): 73-84.
- [2] Oliveira C P, Stefano J T, Carrilho F J. Clinical patterns of hepatocellular carcinoma (HCC) in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a multicenter prospective study [J]. *Hepatobil Surg Nutr*, 2017, 6(5): 350-352.
- [3] 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会. 非酒精性脂肪性肝病中西医结合诊疗共识意见 (2017) [J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2017, 25(11): 805-811.
- [4] DING X F, ZHAO X H, TAO Y, et al. Xiao Yao San improves depressive-like behaviors in rats with chronic immobilization stress through modulation of locus coeruleus-norepinephrine system [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, doi: 10.1155/2014/605914.
- [5] MENG Z Z, CHEN J X, JIANG Y M, et al. Effect of xiaoyaosan decoction on learning and memory deficit in rats induced by chronic immobilization stress [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, doi: 10.1155/2013/297154.
- [6] GAO X X, CUI J, ZHENG X Y, et al. An investigation of the antidepressant action of Xiaoyao powder in rats using ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry combined with metabonomics [J]. *Phytother Res*, 2013, 27(7): 1074-1085.
- [7] Tsutsui H, Imamura M, Fujimoto J, et al. The TLR4/TRIF-mediated activation of NLRP3 inflammasome underlies endotoxin-induced liver injury in mice [J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2010, doi: 10.1155/2010/641865.
- [8] 赵荣华, 谢鸣, 李聪, 等. 肝郁、脾虚和肝郁脾虚证模型大鼠下丘脑-垂体-甲状腺轴功能的变化及柴疏四君子汤的作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(4): 119-123.
- [9] GUO Y, LI J X, MAO T Y, et al. Targeting Sirt1 in a rat model of high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease: Comparison of Gegen Qinlian decoction and resveratrol [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(5): 4279-4287.
- [10] 孙晓倩, 孙蓉. 大鼠脂肪肝肝郁脾虚证的模型 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(10): 92-98.
- [11] 李仪奎. *中药药理实验方法学* [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 1063-1064.
- [12] 司晓雪, 白光. 从脾论治脂肪肝 [J]. *实用中医内科杂志*, 2016, 30(8): 30-32.
- [13] Kanuri G, Ladurner R, Skibovskaya J, et al. Expression of Toll-like receptors 1-5 but not TLR 6-10 is elevated in livers of patients with non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Liver Int*, 2015, 35(2): 562-568.
- [14] 郭雨雅, 孙晓琦, 方晶, 等. 加味泽泻汤对 NAFLD 大鼠肝脏炎症信号通路相关蛋白表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(5): 90-94.
- [15] Miura K, YANG L, van Rooijen N, et al. Toll-like receptor 2 and palmitic acid cooperatively contribute to the development of nonalcoholic steatohepatitis through inflammasome activation in mice [J]. *Hepatology*, 2013, 57(2): 577-589.
- [16] Broering R, LU M, Schlaak J F. Role of Toll-like receptors in liver health and disease [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2011, 121(10): 415-26.