

# 葛花解酒涤脂汤对酒精性脂肪肝小鼠肝脏 核受体 PXR, CAR 表达的影响

易旭, 游绍伟\*, 龙毅, 王硕石, 陆道敏  
(贵阳中医学院第二附属医院, 贵阳 550003)

**[摘要]** 目的:探讨葛花解酒涤脂汤对小鼠酒精性脂肪肝(AFLD)的干预作用及对肝组织孕烷受体(PXR),组成性雄甾烷受体(CAR)表达的影响。方法:将29只雄性C57BL/6J小鼠随机分为正常组,模型组,葛花解酒涤脂汤高、低剂量组。采用美国国立卫生研究院酒精滥用和酒精中毒研究所(NIAAA)方法制备AFLD小鼠模型,经鉴定成功后,分别灌胃给予高、低剂量葛花解酒涤脂汤(4.9, 2.45 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)。9 d后处死小鼠,收集血清及肝组织样本。酶联免疫吸附法检测血清中游离胆固醇(FCHOL)及甘油三酯(TG)水平,苏木素伊红(HE)染色检测肝组织损伤情况;实时荧光定量PCR及蛋白免疫印迹法(Western blot)分析肝组织PXR, CAR mRNA和蛋白表达,及其调控的细胞色素P450氧化酶(CYP3A11, CYP3A25, CYP2B9, CYP2B10)基因表达水平。结果:与模型组比较,葛花解酒涤脂汤组小鼠肝脏脂肪变性显著减轻,并呈剂量依赖性。与模型组和空白组比较,葛花解酒涤脂汤组可显著上调PXR, CYP3A25表达水平( $P < 0.01$ ),明显增加CAR mRNA水平( $P < 0.05$ )。与正常组比较,模型组血清游离胆固醇及甘油三酯水平显著增加( $P < 0.01$ )。结论:葛花解酒涤脂汤能够显著改善小鼠AFLD,其作用机制可能与肝脏PXR及其调控基因CYP3A25表达的活化有关。

**[关键词]** 酒精性脂肪肝; 葛花解酒涤脂汤; 孕烷受体; 组成性雄甾烷受体; 游离胆固醇; 甘油三酯

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)22-0134-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.sjfx.2016220134

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160919.1357.060.html>

**[网络出版时间]** 2016-09-19 13:57

## Intervention Effect of Gehua Jiejiu Dizhi Decoction on Alcoholic Fatty Liver and Liver PXR, CAR Expression in Mice

YI Xu, YOU Shao-wei\*, LONG Yi, WANG Shuo-shi, LU Dao-min

(NO. 2 Hospital Affiliated to Traditional Chinese Medicine College of Guiyang, Guiyang 550003, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effect of Gehua Jiejiu Dizhi decoction on the liver pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR) and their target genes CYP3A11, CYP3A25, CYP2B9 and CYP2B10 in mice with alcoholic fatty liver. **Method:** Twenty-nine C57BL/6J mice were randomly divided into four groups, namely normal control group, model group, and Gehua Jiejiu Dizhi decoction high-dose and low-dose groups. At first, the alcoholic fatty liver model in mice was prepared by using National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA) method. Then, Gehua Jiejiu Dizhi decoction was given orally at doses of 4.9, 2.45 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> by gavage (once a day for up to 9 days). Serum and liver tissue samples were collected for biochemical and histopathological examination of liver injury. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to detect free cholesterol (FCHOL) and triglyceride (TG) levels. HE staining was used to detect liver injury. Real-time PCR and Western blot were used to examine the expressions of PXR, CAR and their target genes CYP3A11,

**[收稿日期]** 20160222(003)

**[基金项目]** 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题项目(QZYY-2014-008)

**[第一作者]** 易旭, 博士, 副教授, 从事肝病的防治基础与临床研究, Tel: 0851-85283051, E-mail: yixu2013@yeah.net

**[通讯作者]** \* 游绍伟, 硕士, 副主任医师, 从事消化系统疾病研究, Tel: 0851-85559052, E-mail: 2263459237@qq.com

CYP3A25, CYP2B9 and CYP2B10 in mice liver. **Result:** Compared with model group, hepatic steatosis significantly reduced in Gehua Jiejiu Dizhi decoction-treated mice in a dose-dependent manner. Compared with model group and blank group, expressions of PXR and CYP3A25 significantly increased in Gehua Jiejiu Dizhi decoction-treated mice ( $P < 0.01$ ). CAR mRNA level significantly rose ( $P < 0.05$ ). Compared with normal group, FCHOL and TG levels significantly increased in model group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Gehua Jiejiu Dizhi decoction could significantly ameliorate AFLD in mice, which was possibly correlated with the activation of PXR and its regulatory genes CYP3A25.

[**Key words**] alcoholic fatty liver; Gehua Jiejiu Dizhi decoction; pregnane X receptor (PXR); constitutive androstane receptor (CAR); free cholesterol (FCHOL); triglyceride (TG)

酒精性脂肪肝(AFLD)是由于长期大量饮酒致过量脂肪在肝内持久贮积所致的疾病,表现为渐进性的肝脏脂肪变性。近 20 多年来,随着我国人民的生活水平普遍增高及中国酒业的发展,人群中嗜酒者的比例以及患病率有明显的上升趋势。过量的酒精摄入已经成为导致肝脏损伤的第二大因素,仅次于肝炎病毒,AFLD 已经成为目前临床上最为常见的肝脏疾病之一<sup>[1]</sup>。由于 AFLD 是进一步发展为肝炎、肝纤维化甚至肝癌等酒精性肝病的重要病理前提,所以治疗 AFLD 以阻止酒精对肝脏进一步损害极其重要。西医学对 AFLD 的病理生理基础及发病机制的研究取得了很大进步,但目前治疗 AFLD 仍以降脂为主,效果仍不甚满意<sup>[2-3]</sup>。中医整体治疗观念和中药多途径药理作用决定了中医药在脂肪肝治疗中的独特优势。古今中医家均认为尽早戒酒为治疗本病的根本,而中医药的辨证施治尤其重要。目前已有较多针对 AFLD 的方药,但由于其证型繁杂,药物选择与配伍在实际应用中仍具有较大局限性<sup>[4]</sup>。因此,积极探索能够同时针对不同证型 AFLD 产生有效干预作用的方药具有重要意义。课题组经过长期临床积累,在辨证论治的基础上,将时方葛花醒酒汤进行临证加减,形成葛花解酒涤脂汤。本文通过制备 AFLD 小鼠模型及给予葛花解酒涤脂汤干预,拟为葛花解酒涤脂汤对 AFLD 的影响提供科学的实验依据。由于孕烷受体(PXR)和组成性雄甾烷受体(CAR)是核受体亚家族的重要成员,主要通过对其靶基因细胞色素 P450 药物代谢酶的调控发挥肝脏毒性保护作用<sup>[5]</sup>。因此,本文从 PXR, CAR 及其调控的细胞色素 P450 氧化酶(CYP3A, CYP2B)的角度探讨葛花解酒涤脂汤对实验小鼠 AFLD 影响的可能机制。

## 1 材料

**1.1 药物与试剂** 葛花解酒涤脂汤由葛花 18 g,茯苓 17 g,绵茵陈 15 g,青皮 15 g,葛根 12 g,决明子 12

g,山楂 12 g,白矾 4 g,甘草 9 g 等组成,由贵阳医学院第二附属医院药剂室提供,取蒸馏水 500 mL 浸泡药材 30 min,武火煮沸后,改中火煎煮 25 min,过滤、收集汤药;再次加入蒸馏水 500 mL 同法煎煮,将 2 次汤药混合得煎液 500 mL,相当于生药 0.228 g·mL<sup>-1</sup>,参照实验小鼠与人临床用药剂量体重换算标准给药。Lieber-DeCarli 酒精液体饲料及其对照液体饲料(南通特洛菲饲料科技有限公司,批号分别为 TP4030D,TP4030C);95%乙醇(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号 C1526008);游离胆固醇(FCHOL),甘油三酯(TG)酶联免疫吸附检测(ELISA)试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技有限公司,批号分别为 AK0015OCT26020,AK0015OCT26019);组织总 RNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司,批号 N3117);RNA 逆转录试剂盒(美国 Thermo 公司,批号 00238763);SYBR Green Master Mix(美国 Applied Biosystems 公司,批号 A25742);抗-PXR 抗体,抗-CAR 抗体,抗-GAPDH 抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab192579, ab186869, ab9484);羊抗兔辣根过氧化物酶标记的免疫球蛋白(Ig)G-HRP(北京鼎国昌盛生物技术有限公司,批号 29000180);电化学发光检测试剂盒(美国 Millipore 公司,批号 1227902)。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,PXR(117 bp):上游 5'-CCCATCAACGTAGAGGAGGA-3',下游 5'-TCTGAAAAACCCCTTGCATC-3';CAR(150 bp):上游 5'-CTCAAGGAAAGCAGGGTCAG-3',下游 5'-AGTTCCTCGGCCATATTCT-3';CYP3A11(147 bp):上游 5'-AGGGAAGCATTGAGGAGGAT-3',下游 5'-GGTAGAGGAGCACCAAGCTG-3';CYP3A25(147 bp):上游 5'-GCCTTGCTCAAACCAGAAG-3',下游 5'-CATCATAGCCCCGAAGATA-3';CYP2B9(149 bp):上游 5'-TACCTGCTCCCCAAGAACAC-3',下游 5'-AAGGGCAGAAAAGCTTACA-3';CYP2B10(147

bp): 上游 5'-AAGGAGAAGTCCAACCAGCA-3', 下游 5'-CTCTGCAACATGGGGTACT-3'; GAPDH (132 bp): 上游 5'-AACTTTGGCATTGTGGAAG'-3', 下游 5'-GGATGCAGGGATGATGTTCT-3'。

**1.2 动物** SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 29 只, 体重 (21 ± 2) g, 由贵州医科大学实验动物中心提供, 许可证号 SYXK(黔)2015-0001, 饲养于贵州医科大学实验动物中心带有 IVC 系统的饲养房内, 恒温 20 ~ 23 °C。实验前适应性喂养 1 周, 自由进食和饮水。

**1.3 仪器** Qubit 2.0 型核酸蛋白定量仪(美国 Invitrogen 公司); T100 型 PCR 仪, Gel Doc EQ 型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司); ABI7500 型荧光定量 PCR 仪, Mutiskan Go 型全波长扫描型酶标仪(美国 Thermo 公司); BX53 型正置显微镜(日本 Olympus 公司)。

## 2 方法

**2.1 建立模型** 按随机数字表法将小鼠分为正常组(5 只), 模型组(8 只), 葛花解酒涤脂汤高、低剂量组(各 8 只)。参考文献[6], 以美国国立卫生研究院酒精滥用和酒精中毒研究所(NIAAA)法制备酒精性脂肪肝小鼠模型, 共计 16 d, 经组织病理学鉴定模型制备成功后, 葛花解酒涤脂汤高、低剂量组小鼠分别灌胃葛花解酒涤脂汤煎液(4.9, 2.45 g · kg<sup>-1</sup>), 正常组和模型组给予灭菌自来水灌胃, 每天 1 次, 共 9 次。

**2.2 取材** 末次给药后 24 h, 小鼠用戊巴比妥钠麻醉, 眼球采血; 处死小鼠, 取肝组织(0.7 cm × 0.7 cm)于 10% 中性甲醛内固定, 其余置 -80 °C 备用。

## 2.3 检测指标

**2.3.1 肝组织病理学** 肝组织样本置于 10% 中性甲醛内固定 24 ~ 48 h 后, 常规石蜡包埋, 制成 4 μm 切片, 行苏木素伊红(HE)染色, 光学显微镜下观察肝细胞损伤情况。

**2.3.2 血清 FCHOL, TG 含量检测** 小鼠血液经 3 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 ~ 15 min 后分离血清, 参照 ELISA 试剂盒说明书进行检测, 计算 FCHOL, TG 实际浓度。

**2.3.3 肝组织 PXR, CAR, CYP3A11, CYP3A25, CYP2B9 及 CYP2B10 mRNA 水平检测** 采用实时荧光定量 PCR 检测, 提取小鼠肝组织总 RNA, 以总 RNA 进行逆转录为 cDNA; 进行实时荧光定量 PCR 检测, 反应条件: 50 °C 2 min, 95 °C 10 min, 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40 个循环。目的基因 C<sub>t</sub> 值经同一样本的内参基因校正后, 通过 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 计算 mRNA 相对

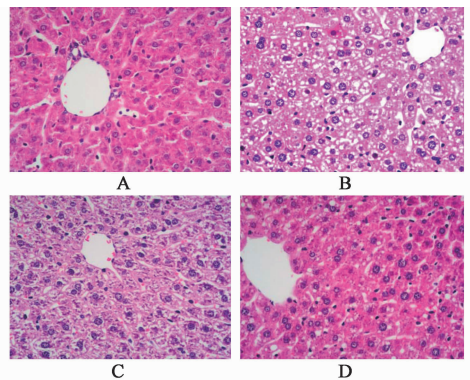
表达量。

**2.3.4 肝组织 PXR, CAR 蛋白表达检测** 采用蛋白免疫印迹法(Western blot), 肝组织总蛋白提取后, 采用 BCA 蛋白定量法测定蛋白浓度, 总蛋白上样, 进行 SDS-PAGE 电泳, 经 PVDF 膜转移后, 一抗(PXR 1:500, CAR1:1 000)4 °C 孵育过夜, 次日羊抗兔 IgG-HRP 二抗(1:5 000)室温孵育后, 以电化学发光法进行 X 光片曝光, 显影及置凝胶成像仪内分析结果。

**2.4 统计学方法** 所有数据采用 SPSS 19.0 统计软件分析。定量数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示; 多组间比较采用单因素方差分析, 分析前行方差齐性检验。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 葛花解酒涤脂汤对小鼠肝脏病理学的影响** 正常组小鼠肝细胞索围绕中央静脉呈放射状排列, 未见肝细胞水肿、坏死、炎性细胞浸润及肝细胞脂肪变性; 模型组小鼠肝组织结构正常, 个别小鼠肝脏可见散在炎性细胞浸润, 可见普遍的肝细胞浊肿及显著的肝细胞大泡性脂肪变性; 给药组小鼠可见肝细胞浊肿, 与模型组比较, 肝细胞脂肪显著减少, 高剂量组尤其显著。见图 1。



A. 正常组; B. 模型组; C, D. 葛花解酒涤脂汤(4.9, 2.45 g · kg<sup>-1</sup>)组(图 2, 3 同)

图 1 葛花解酒涤脂汤对各组小鼠肝组织病理形态的影响(HE, × 200)

Fig. 1 Effect of Gehua Jiejiu Dizhi decoction on pathological changes of liver in each group(HE, × 200)

**3.2 葛花解酒涤脂汤对小鼠血清 FCHOL, TG 水平的影响** 与正常组比较, 模型组 FCHOL, TG 水平均显著升高(P < 0.01), 葛花解酒涤脂汤高、低剂量组 FCHOL, TG 水平明显升高(P < 0.05)。与模型组比较, 葛花解酒涤脂汤低剂量组 FCHOL, TG 水平明显降低(P < 0.05)。葛花解酒涤脂汤高剂量组 FCHOL, TG 含量与正常组相似。见表 1。

表 1 葛花解酒涤脂汤对各组小鼠血清中 FCHOL, TG 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effect of Gehua Jiejiu Dizhi decoction on Serum FCHOL and TG levels in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别      | 剂量 / $g \cdot kg^{-1}$ | <i>n</i> | FCHOL / $ng \cdot L^{-1}$      | TG / $\mu g \cdot L^{-1}$    |
|---------|------------------------|----------|--------------------------------|------------------------------|
| 正常      | -                      | 5        | 17.8 ± 2.5                     | 9.7 ± 1.5                    |
| 模型      | -                      | 8        | 1 068.2 ± 133.6 <sup>1)</sup>  | 436.5 ± 38.6 <sup>1)</sup>   |
| 葛花解酒涤脂汤 | 4.9                    | 8        | 20.9 ± 3.4 <sup>2)</sup>       | 10.2 ± 1.2 <sup>2)</sup>     |
|         | 2.45                   | 8        | 176.5 ± 25.9 <sup>1,2,4)</sup> | 29.1 ± 3.5 <sup>1,2,4)</sup> |

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与葛花解酒涤脂汤高剂量组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup> $P < 0.01$ (图 2,3 同)。

**3.3 葛花解酒涤脂汤对小鼠肝组织 PXR, CAR, CYP3A11, CYP3A25, CYP2B9 及 CYP2B10 mRNA 表达的影响** 与正常组和模型组比较,葛花解酒涤脂汤高、低剂量干预组均有显著升高的肝组织 PXR 及 CYP3A25 mRNA 转录水平 ( $P < 0.01$ ),且葛花解酒涤脂汤高剂量组 PXR 及 CYP3A25 mRNA 转录水平明显高于低剂量干预组 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。葛花解酒涤脂汤高、低剂量组较模型组和正常组 CAR mRNA 转录水平明显升高 ( $P < 0.05$ )。各组具有相似的 CYP3A11, CYP2B9, CYP2B10 mRNA 转录水平。见图 2。

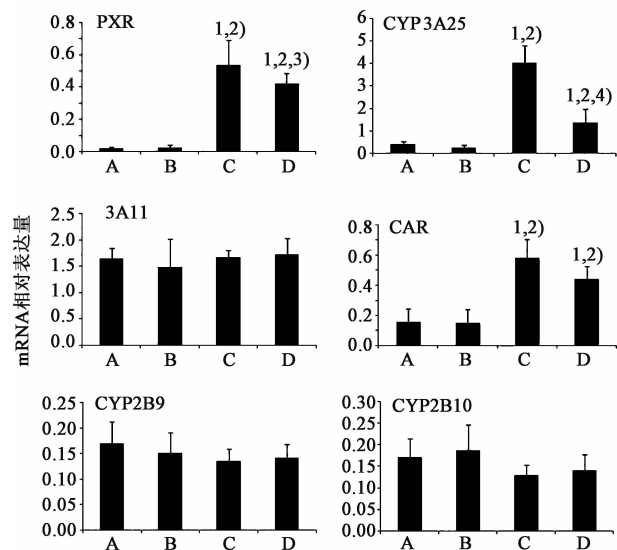


图 2 葛花解酒涤脂汤对各组小鼠肝组织 PXR, CAR, CYP3A11, CYP3A25, CYP2B9, CYP2B10 mRNA 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 2 Effect of Gehua Jiejiu Dizhi decoction on mRNA expressions of PXR, CAR, CYP3A11, CYP3A25, CYP2B9, CYP2B10 in mice liver ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

**3.4 葛花解酒涤脂汤对小鼠肝组织 PXR, CAR 蛋白表达的影响** 与正常组、模型组比较,葛花解酒涤脂汤高剂量组小鼠肝组织 PXR 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ ),葛花解酒涤脂汤低剂量组明显高于高剂量组 ( $P < 0.05$ )。各组 CAR 蛋白表达水平无明显差异。见图 3。

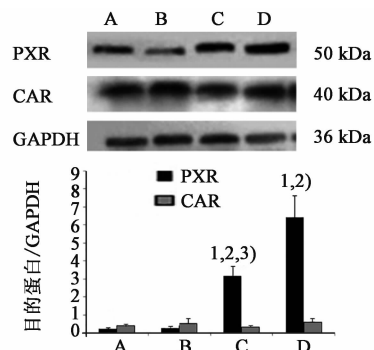


图 3 葛花解酒涤脂汤对各组小鼠肝脏 PXR, CAR 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 3 Effect of Gehua Jiejiu Dizhi decoction on PXR and CAR protein expressions in mice liver ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

#### 4 讨论

古代医籍没有 AFLD 病名记载,但在历代文献中有类似描述。中医学的经典著作《金匱要略》曰:“心下坚,大如旋盘……积术汤主之。”所述的证候类似脂肪肝。故根据其临床表现和病因,可归于“痰证”、“积聚”、“胁痛”、“肥气”、“肝著”、“伤酒”、“黄疸”等病证<sup>[2]</sup>。综合目前的研究,认为过量饮酒,导致湿热、痰浊、气滞、瘀血,是为 AFLD 发病的关键环节,病位在肝并累及脾肾。酒毒伤肝致肝失疏泄、脾失运化、肾失司化,致气滞湿阻、日久化热,湿热、痰浊和瘀血相互胶着胁下而成本病<sup>[2]</sup>。多年来国内诸多临床学者对本病辨证论治,已经取得明显疗效,现代研究也表明,中医药在预防和治疗 AFLD 方面显示出较好的优势<sup>[7]</sup>。总结中医药治疗 AFLD,总体上着眼于除湿解酒、健脾疏肝、行气活血、降脂除湿<sup>[4]</sup>,但仍存在辨证分型、诊断标准及疗效评定标准不甚统一,对 AFLD 的中医药治疗机制及药理作用等基础性的研究还比较少,研究成果缺乏实验室依据支撑等问题,严重影响了中医药在 AFLD 治疗中的标准规范建立及推广应用。基于多数医家对 AFLD 病因病机的认识,本课题组认为 AFLD 仍以实证为主。紧密结合 AFLD 病因、病机,辨证施治,结合验方进

行合理的加减,自拟葛花解酒涤脂汤,力求发挥中医药在 AFLD 防治中的独特优势。

葛花解酒涤脂汤方中葛花归脾、胃、肝经,具有醒酒解毒、生津止渴之功效。《药鉴》:“葛花能解酒不醉,解酒中之苛毒”,故立为君药;茯苓归心、脾、肺、膀胱经,具有健脾补中、利水渗湿之功效,持有补而不助邪、利而不伤正的特质,作为辅助治疗由脾虚湿痰壅盛而致的各种证候群;绵茵陈归脾、胃、肝、胆经,具有清热利湿、退黄之功效,其辅佐葛花位居臣药,对于湿热内结所致诸症用而不疑;青皮归肝、胆经,具有疏肝解郁、破气消积之效。《珍珠囊》:“破坚癖、散滞气、去下焦诸湿,治左肋肝经积气”,故此方特选其为辅治肝郁气滞的臣药;其中葛根为葛花之根,归脾、胃、肝经,具有生津止渴、升阳举陷、解肌退热、发表透疹之功效。《珍珠囊》:“升阳生津,脾虚作渴者非此不除”,《本草纲目》:“散郁火”,《药鉴》:“止胃虚之消渴,解酒之苛毒”,一首一尾,佐君施效,非此莫属。决明子归肝、胆经,具有清肝明目,润肠通便、降低血清胆固醇作用,佐助君药以解目疾等。方中山楂归脾、胃、肝经,具有消食化积,活血化痰,降压通痹之效,力佐君药建功;佐药白矾归肝、脾、肺、大肠经,少量内服能祛痰燥湿,清污澄浊;于本方中既是使药又是佐药之设的甘草归十二经,具有健脾和中,调和诸药之功效。此方君臣佐使,九味为伍,共奏健脾渗湿、清热解毒、疏肝解郁、消食理气、化痰通络、和胃降浊、生津止渴、涤脂荡肪之功。本文从组织病理学结果来看,葛花解酒涤脂汤能够显著减轻 AFLD 小鼠肝脏脂肪变性,以高剂量组尤其显著。血清 FCHOL, TG 含量增加作为肝脏脂肪变性的重要标志,本文血清生化结果显示经葛花解酒涤脂汤处理后, AFLD 小鼠血清 FCHOL, TG 含量显著下降,与正常组小鼠相似。结合肝脏组织病理结果,提示葛花解酒涤脂汤能够呈剂量依赖性地改善 AFLD 小鼠肝脏脂质的沉积,促进肝细胞功能的恢复。

近年来大量的证据表明配体活化的转录因子核受体(NRs)涉及酒精诱导的肝损伤,其对脂质稳定性和炎症等的调节起了关键作用。鉴于 NRs 在生理过程中举足轻重的作用,使其成为许多代谢和脂质相关性疾病(包括酒精性肝病)治疗和预防的潜在靶标,改变的 NRs 表达水平可能决定靶基因表达水平和对 ALD 的敏感性<sup>[8-10]</sup>。孕烷 X 受体(PXR)和雄烷受体(CAR)同属于 NRs 家族的非

类固醇激素受体,在调节药物代谢与转运、糖异生及生酮作用、脂质代谢以及炎症反应等方面具有重要的意义<sup>[5,8]</sup>。PXR 又称为固醇 X 受体,如同 CAR,是重要的异生物质感受器<sup>[5]</sup>。活化的 PXR, CAR 与视黄醛 X 受体(RXR)形成异二聚体,发生胞质-核转移,再结合到靶代谢基因近端启动子区的直接重复序列元件或逆向重复序列元件,调控下游基因的转录和表达。PXR 及 CAR 调控的靶基因包括 I 相, II 相药物代谢酶及一些药物转运体家族成员<sup>[5,11]</sup>。CYP3A, CYP2B 是生物体内化学物代谢的 I 相关键酶,其中 CYP3A11, CYP3A25, CYP2B9, CYP2B10 是小鼠肝细胞主要表达的代谢酶基因<sup>[12]</sup>;研究发现, CYP3A11, CYP3A25 在肝脏表达的增强,参与了安宫牛黄丸对小鼠肝毒性的保护作用<sup>[13]</sup>。由于 PXR 是 CYP3A 基因表达的转录活化因子,因此本文选择 PXR 及其调控的靶基因 CYP3A11, CYP3A25 探讨葛花解酒涤脂汤对小鼠 AFLD 影响的可能机制。研究报道,活化的 CAR 能抑制胆固醇调节元件结合蛋白 1(SREBP-1)基因的表达,从而降低血浆三酰甘油水平。用高脂饲料喂养的小鼠给予 CAR 激动剂(TCPOBOP)后明显抑制或逆转了肥胖的发生<sup>[14]</sup>。Dong 等<sup>[15]</sup>研究发现活化的 CAR 可改善肥胖小鼠模型的脂代谢紊乱。在低密度脂蛋白受体缺乏的小鼠体内,活化的 CAR 可降低低密度胆固醇水平并抑制动脉粥样硬化的发生<sup>[16]</sup>。CAR 是 CYP2B9, CYP2B10 基因表达的转录活化因子。研究发现,小鼠 CAR 的缺失引起了 CYP2C29, CYP2B13, CYP2B10 表达的改变, CAR 裸鼠具有显著降低 CYP2B9, CYP2B10 表达水平<sup>[17]</sup>。本研究模型组小鼠具有同正常组小鼠相似的 PXR, CAR, CYP3A11, CYP3A25, CYP2B9, CYP2B10 mRNA 转录水平,经过葛花解酒涤脂汤汤药处理后, PXR, CAR, CYP3A25 mRNA 表达水平明显升高,且 PXR 蛋白表达水平也呈一致性增加。其中高剂量组 PXR mRNA 转录水平分别是正常组与模型组的 30, 23 倍,低剂量干预组 PXR mRNA 转录水平分别是正常组与模型组的 23, 18 倍,高剂量组 CYP3A25 mRNA 转录水平分别是正常组与模型组的 10, 15 倍,低剂量组 CYP3A25 mRNA 转录水平分别是正常组与模型组的 3.4, 5 倍,高剂量组 CAR mRNA 转录水平分别是正常组与模型组的 3.8, 3.9 倍,低剂量组 CAR mRNA 转录水平均是正常组与模型组的 2.9 倍,但 CAR mRNA 表达水平与蛋白水平并不一致,

尚未显示增加的 CAR 蛋白表达。本文结果显示,葛花解酒涤脂汤能够上调 AFLD 小鼠肝脏 PXR 及 CYP3A25 表达水平。

综上所述,葛花解酒涤脂汤具有显著改善实验小鼠酒精性脂肪肝的作用,其作用机制可能通过增加 PXR 及其调控的靶基因 CYP3A25 表达水平,从而改善肝细胞损伤有关。但尚需进一步开展该方药作用机制及药理作用等基础性研究,以及临床多中心、大样本临床试验,为其最终的临床推广应用奠定坚实的科学基础。

[参考文献]

[1] 贾艳,付怡静,刘晓阳,等. 我国酒精性脂肪肝病的研究进展[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2014,23(4):376-379.

[2] 刘丰,赵喜颖. 中医药治疗酒精性脂肪肝的研究进展[J]. 中医临床研究,2012,4(14):119-120.

[3] 范建高,李继强,曾民德. 脂肪肝的药物治疗进展[J]. 中华肝脏病杂志,1996,4(4):248-250.

[4] 李阳明,阮杏林. 中医药治疗酒精性脂肪肝研究进展[J]. 中医药通报,2009,3(8):63-66.

[5] Jia Y, Viswakarma N, Reddy J K. Med1 subunit of the mediator complex in nuclear receptor-regulated energy metabolism, liver regeneration, and hepatocarcinogenesis [J]. Gene Expr, 2014, 16(2):63-75.

[6] Bertola A, Mathews S, Ki S H, et al. Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model) [J]. Nat Protoc, 2013, 8(3):627-637.

[7] 郭文平,王建华,王玉果. 酒精性脂肪肝中医药治疗进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2012,14(5):257-258.

[8] Gyamfi M A, Wan Y J. Pathogenesis of alcoholic liver disease; the role of nuclear receptors [J]. Exp Biol Med: Maywood, 2010, 235(5):547-560.

[9] Mello T, Polvani S, Galli A. Peroxisome proliferator-activated receptor and retinoic X receptor in alcoholic

liver disease [J]. PPAR Res, 2009, 2009(2):748147.

[10] Barclay T B, Peters J M, Sewer M B, et al. Modulation of cytochrome P-450 gene expression in endotoxemic mice is tissue specific and peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  dependent [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1999, 290(3):1250-1257.

[11] 胡冰芳,毕惠嫦,黄民. 孕烷 X 受体及组成性雄甾烷受体的研究新进展[J]. 药学学报,2011,46(10):1173-1177.

[12] Thunnille K E, Wilkinson G R. *In vitro* and *in vivo* drug interactions involving human CYP3A [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1998, 38(1):389-430.

[13] Lu Y F, Wu Q, Liang S X, et al. Evaluation of hepatotoxicity potential of cinnabar-containing An-Gong-Niu-Huang Wan, a patent traditional Chinese medicine [J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2011, 60(2):206-211.

[14] Gao J, He J, Zhai Y, et al. The constitutive androstane receptor is an anti-obesity nuclear receptor that improves insulin sensitivity [J]. J Biol Chem, 2009, 284(38):25984-25992.

[15] Dong B, Saha P K, Huang W, et al. Activation of nuclear receptor CAR ameliorates diabetes and fatty liver disease [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(44):18831-18836.

[16] Miao J, Fang S, Bae Y, et al. Functional inhibitory cross-talk between constitutive androstane receptor and hepatic nuclear factor-4 in hepatic lipid/glucose metabolism is mediated by competition for binding to the DR1 motif and to the common coactivators, GRIP-1 and PGC-1 $\alpha$  [J]. J Biol Chem, 2006, 281(21):14537-14546.

[17] Mota L C, Hernandez J P, Baldwin W S. Constitutive androgen receptor-null mice are sensitive to the toxic effects of parathion; association with reduced cytochrome P450-mediated parathion metabolism [J]. Drug Metab Dispos, 2010, 38(9):1582-1588.

[责任编辑 张丰丰]