

# 白芍总苷对 NAFLD 大鼠 HMGB1, TLR4 通路的干预作用

杨以琳<sup>1</sup>, 魏毅<sup>2\*</sup>, 张贵平<sup>2</sup>, 谭淑珍<sup>1</sup>, 潘竞锵<sup>3</sup>, 郑琳颖<sup>1</sup>

(1. 广州市中医医院, 广州 510130; 2. 广州医科大学, 广州 511436;  
3. 广州市中医中药研究所, 广州 510130)

**[摘要]** **目的:**探讨白芍总苷(TGP)对高脂-果糖诱导非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)大鼠肝组织中高迁移率族蛋白1(HMGB1), Toll样受体4(TLR4)信号通路的影响及其作用机制。**方法:**用高脂-高果糖餐诱导NAFLD大鼠模型, 除设正常组外, 将模型大鼠随机分为模型组, 水飞蓟宾组, 二甲双胍组(200 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), TGP高、低剂量组(200, 100 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)。用药6周后观察各组大鼠空腹血糖(FBG), 餐后2 h血糖(2 hBG), 胰岛素(Fins), 总胆固醇(TC), 低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C), 高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C), 甘油三酯(TG), 游离脂肪酸(FFA), 丙氨酸氨基转移酶(ALT), 天门冬氨酸氨基转移酶(AST)水平, 计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)和肝脏指数; 并以免疫蛋白印迹法(Western blot)检测肝组织中HMGB1, TLR4蛋白的表达。**结果:**与正常组比较, 模型组转氨酶, 肝脏指数, 血脂, 2 hBG, Fins, HOMA-IR及TLR4, HMGB1蛋白均明显升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 与模型组比较, TGP高、低剂量组2 hBG, Fins, HOMA-IR, LDL-C, TG, TC, FFA, ALT, AST均明显降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 高、低剂量TGP在拮抗胰岛素抵抗、降糖降脂, 改善肝功能有较显著的作用, TGP高、低剂量组均可下调HMGB1, TLR4蛋白的表达( $P < 0.01$ )。**结论:**在NAFLD病程进展中, HMGB1, TLR4是导致炎症的其中一条通路, TGP通过下调HMGB1, TLR4信号通路的表达而起到抑制大鼠NAFLD炎症发展的作用。

**[关键词]** 白芍总苷; 非酒精性脂肪性肝病; 信号通路; 高迁移率族蛋白1; Toll样受体4

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)14-0146-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017140146

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170427.1119.038.html>

**[网络出版时间]** 2017-04-27 11:19

## Effect of Total Glucosides from *Paeoniae Radix Alba* on HMGB1, TLR4 Pathway in Rats with Nonalcoholic Fatty Liver Disease

YANG Yi-lin<sup>1</sup>, WEI Yi<sup>2\*</sup>, ZHANG Gui-ping<sup>2</sup>, TAN Shu-zhen<sup>1</sup>, PAN Jing-qiang<sup>3</sup>, ZHENG Lin-ying<sup>1</sup>

(1. *Guangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine (TCM), Guangzhou 510130, China;*  
2. *Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China;*  
3. *Guangzhou Institute of TCM & Materia Medica, Guangzhou 510130, China*)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect and mechanism of total glucosides from *Paeoniae Radix Alba* (TGP) on high mobility group protein 1 (HMGB1), Toll like receptor 4 (TLR4) signal pathway in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) rats induced by high fat and fructose feed. **Method:** high fat and high fructose diet was used to establish NAFLD rat models. All the rats except those in normal group were randomly divided into model group, silymarin group (200 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), metformin group (200 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), TGP high and low dose groups (200, 100 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>). Rats were observed after 6 weeks of treatment, including fasting blood glucose (FBG), 2 hour postprandial blood glucose (2 hBG), insulin (Fins), cholesterol (TC), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), triglyceride (TG), free fatty acid

**[收稿日期]** 20170225(008)

**[基金项目]** 2013年广东省科学技术厅科技计划项目(第二批-18);广州市卫生局中医药中西医结合科技项目(20142A011003)

**[第一作者]** 杨以琳, 硕士, 副主任中医师, 从事肝病和消化道疾病研究的工作, Tel:020-81226221, E-mail:861201453@qq.com

**[通讯作者]** \*魏毅, 硕士, 副教授, 从事血脂代谢与肝病、心血管疾病的药理研究的工作, Tel:020-37103269, E-mail:weiyike@21cn.com

(FFA), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) level and insulin resistance index (HOMA-IR) and liver index. In addition, HMGB1 and TLR4 protein expression levels in liver tissues were detected by Western blot. **Result:** The aminotransferase, liver index, blood lipid, 2 hBG, insulin, HOMA-IR and TLR4, HMGB1 protein in model group were significantly higher than those in the normal group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). As compared with the model group, 2 hBG, Fins, HOMA-IR, LDL-C, TC, TG, FFA, ALT and AST levels were significantly lower in both TGP high dose and low dose groups ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ). Both high dose and low dose TGP showed significant effects in antagonizing insulin resistance, lipid-lowering, glucose-lowering, and improving liver function, and could down-regulate HMGB1/TLR4 protein expression levels ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** In the course of NAFLD progression, HMGB1, TLR4 is one of the pathways leading to inflammation, and TGP plays a role in inhibiting the development of NAFLD in rats by down regulating the expression of HMGB1, TLR4 signaling pathway.

[**Key words**] total glucosides of paeoniae Radix Alba; nonalcoholic fatty liver disease; signal pathway; high mobility group protein 1; Toll like receptor 4 protein

在我国,伴随着人们生活饮食结构的变化以及医学影像检查技术的提高,脂肪性肝病已成为仅次于病毒性肝炎的第 2 大高发肝病。我国脂肪肝的患病率在过去的 20 年将近翻了一番,目前,在中国发达地区成人非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 患病率为 15%;儿童 NAFLD 的患病率是 2.1%,而在肥胖儿童患病率增加到 68.2%<sup>[1-2]</sup>。

NAFLD 根据临床和组织学表现可分为非酒精性单纯性脂肪肝 (NAFL) 和非酒精性脂肪性肝炎 (NASH),后者可进展为肝硬化甚至肝细胞癌,是 NAFLD 病情发展的较早期及重要阶段,因此,在 NASH 阶段及早进行干预对防治 NAFLD 的发展有十分重要的意义。

鉴于 NAFLD 为代谢综合征的重要组成部分,治疗 NAFLD 的首要目标为改善 IR,防治代谢综合征及相关终末期器官病变,从而改善患者生活质量和延长存活时间;次要目标为减少肝脏脂肪沉积并避免因“二次打击”而导致 NASH 和肝功能失代偿<sup>[3]</sup>。迄今,尚无对 NAFLD/NASH 治疗的特效药。对某一靶点临床试验获得的阳性结果的药物,其疗效远不能适合临床结局的需要。为改变这种结局,需发展多层次靶向治疗新策略<sup>[4]</sup>。因此,寻找既能改善胰岛素抵抗又能保肝抗炎,从多靶点/生物通路进行干预的药物是今后研究的方向。

白芍是常用的传统中药,性苦味酸,微寒;归肝、脾经;具有养血、柔肝、敛阴、收汗、缓急止痛等功效,是治疗急、慢性肝炎、肝硬化的方剂中的重要组方。白芍总苷是从毛茛科植物芍药中提取的有效成分。以往的药理研究集中于白芍及其有效成分对免疫系统和神经系统的疗效,近期研究发现白芍总苷在治

疗消化系统疾病中也发挥了重要的作用。白芍总苷对化学性、酒精性和非酒精性、免疫性、药源性、生物性的多种肝损伤模型显示保护效应;白芍对胃肠道的作用随加工方法、配伍和其他实验条件改变,既有促进胃肠蠕动,镇痛、也有抑制胃肠排空的报道,白芍总苷的药理研究也有类似的情况<sup>[5]</sup>。课题组在以往研究发现白芍总苷通过提高胰岛素敏感性、降低血脂和增强抗氧化能力而对 NAFLD 起到降脂和保肝的作用<sup>[6-8]</sup>,有可能成为治疗 NAFLD 的理想药物。

本实验继续以高脂-高果糖餐诱导 IR-NAFLD 的动物模型,探讨白芍总苷在 NAFLD 疾病的进展过程中是否通过干预高迁移率族蛋白 1 (HMGB1), Toll 样受体 4 (TLR4) 信号通路的转导而抑制病情的发展,明确白芍总苷的部分作用机制,为临床应用提供依据。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF 级 SD 大鼠,54 只,雌雄各半;检疫结束后动物体重:雌 174.3 ~ 194.0 g,雄 172.4 ~ 222.4 g。由广东省医学实验动物中心提供,实验动物生产合格证号 SCXK(粤)2013-0002,本研究所涉及的动物相关操作均在广州医科大学动物伦理委员会的批准下进行(编号 B201502-1)。

**1.2 药物及试剂** 白芍总苷胶囊(宁波立华制药有限公司,批号 140920);盐酸二甲双胍片(深圳市中联制药有限公司,批号 1407303);水飞蓟宾葡甲胺片(江苏中兴药业有限公司,批号 141101143);纯净水(广东省医学实验动物中心);Anti-HMGB1 抗体, Anti-TLR4 抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab79823, ab8376);丙氨酸氨基转移酶 (ALT), 天门

冬氨酸氨基转移酶 (AST), 低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C), 高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 试剂 (四川迈克公司, 批号分别为 1116081, 1216071, 0616101, 0516092); 胰岛素 (Fins) 试剂盒 (北京北方生物技术研究所, 批号 20150820); 总胆固醇 (TC), 甘油三酯 (TG) 试剂 (北京中生北控生物科技公司, 批号分别为 161441, 160891); 游离脂肪酸 (FFA) 试剂 (德赛诊断系统 (上海) 有限公司, 批号 0502-2013); 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na, 天津市福晨化学试剂厂, 批号 131022); 聚山梨酯-80 (天津市大茂化学试剂厂, 批号 050119); 丙二醇 (广州化学试剂二厂, 批号 20131001)。

**1.3 仪器** BS-3000A 型电子天平 (上海友声衡器有限公司), YP3001N 型电子天平 (上海精密科学仪器有限公司), BS224S 型电子分析天平 (德国 Sartorius 公司), 强生稳豪倍优型血糖仪 (强生公司), KDC-2046 型低速冷冻离心机 (科大创新股份有限公司中佳分公司), 自动放免仪 (中国科大中佳公司), A101439 型电泳系统及半干转印系统 (美国 Bio-Rad 公司), 7600 型全自动生化分析仪 (日本日立公司)。

## 2 方法

### 2.1 实验动物模型的建立

**2.1.1 第 1 次分组** 取 54 只 SPF 级 SD 大鼠, 雌雄各半, 检疫结束后的大鼠随机分成模型组 46 只, 正常组 8 只。造模期间: 造模组大鼠喂饲高脂饲料, 饮 10% 果糖水至实验结束, 复制非酒精性脂肪肝 NAFLD 模型; 正常组大鼠喂饲普通饲料, 饮纯净水, 造模方法参照参考文献 [6-8]。

**2.1.2 验证模型** 造模 6 周后, 抽取造模组其中 6 只 (3 雌 3 雄), 隔夜禁食不禁纯净水, 尾尖断尾取血糖仪检测空腹血糖值, 按  $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  体重灌胃给予  $0.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 50% 葡萄糖溶液并记录灌胃时间, 灌胃 2 h 后, 尾尖断尾取血测定餐后 2 h 血糖。测定完毕, 给回饲料和果糖水。当天晚上禁食不禁水, 第 2 天, 麻醉后腹主动脉采血、分离血清, 解剖取肝脏。分离的血清进行血脂、肝功、胰岛素等血清学检测, 指标分别为 ALT, AST, Fins, FFA, TG, TC, HDL-C, LDL-C。

### 2.2 分组及给药方法

**2.2.1 第 2 次分组** 造模成功后, 将造模组剩余 40 只按每组 8 只, 雌雄各半, 随机分为模型组, 水飞蓟宾组  $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , 二甲双胍组  $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , 白芍总苷低剂量组  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , 白芍总苷

高剂量组  $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

**2.2.2 给药** 正常组和模型组灌胃 0.5% CMC-Na 溶液, 二甲双胍组灌胃  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的盐酸二甲双胍混悬液、水飞蓟宾组灌胃  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的水飞蓟宾葡甲胺混悬液、白芍总苷高剂量组灌胃  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的白芍总苷混悬液、白芍总苷低剂量组灌胃  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的白芍总苷混悬液, 灌胃体积  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 每天 1 次, 连续 6 周。

### 2.3 标本采集

**2.3.1 血糖检测** 方法同 2.1.2 项验证模型。

**2.3.2 采血** 动物称重, 3% 戊巴比妥钠麻醉动物后, 腹主动脉采血,  $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 分离血清,  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  保存, 以酶法测定 AST, ALT, FFA, TC, TG, HDL-C, LDL-C, 以放射免疫法测定 Fins 的水平。

**2.3.3 取脏器** 采血完毕, 放血处死动物, 解剖取肝脏, 称质量, 计算肝脏系数 = 肝脏质量/体重  $\times 100$ 。切取一小块于冻存管中 (分装两管), 液氮速冻, 备用。

**2.4 大鼠空腹血糖 (FBG), 餐后 2 h 血糖 (2 hBG), Fins, 胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR) 检测** 分别按照试剂盒说明书进行 FBG, 2 hBG, Fins 检测, 按照公式计算 HOMA-IR。

$$\text{HOMA-IR} = \text{空腹 Fins} \times \text{FBG} / 22.5$$

**2.5 蛋白质免疫印迹 (Western blot) 检测 HMGB1, TLR4 蛋白** 取大鼠肝脏组织 50 mg, 组织剪碎加入蛋白裂解液  $150 \mu\text{L}$ , 涡旋仪上涡旋 8 ~ 10 次, 冰上裂解 35 ~ 40 min, 于  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  下  $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, BCA 方法检测蛋白浓度, 各样本中加入  $4 \times$  loading buffer,  $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$  变性 5 min。配置 10% 的分离胶和 5% 的浓缩胶, 每孔上样总蛋白 100 mg, 电泳设置 15 mA 恒流电源, 跑胶至目的蛋白处于分离胶面的下 1/3 的位置,  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  湿转 80 mA 3 h, 转膜后室温 5% 脱脂奶粉 + TBST 封闭 2 h, 一抗按相应倍数 [TLR4 1:2 000, HMGB1 1:1 万, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 1:1 万]  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  过夜后足量体积 TBST 于摇床上清洗, 每次 10 min, 连续 3 次。二抗 (1:5 000) 室温孵育 1 h, ECL Reagent 发光孵育 5 min 后, 采用 Quantity One 图像分析软件分析各样品目的条带的灰度值, 以目的蛋白与 GAPDH 条带灰度比值表示目的蛋白的相对表达量。

**2.6 统计学分析** 采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析, 所有数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 计量资料数据若方差齐, 则采用单因素方差分析, 组间比较用 LSD 法, 若方差不齐, 数据经转换后方差仍不齐, 采用秩和检验进

行统计分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 一般状态观察** 造模组动物饮 10% 果糖水量明显增多,灌胃期间白芍总苷高剂量组死亡一只,大体解剖肺内少量液体,考虑死亡原因为灌胃意外。其余动物试验期间未见明显异常。

### 3.2 对 NAFLD 大鼠 AST,ALT,肝脏系数的影响

表 1 白芍总苷对 NAFLD 大鼠 ALT,AST,肝脏系数的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effect of total glucosides of *Paeoniae Radix Alba*(TGP) on ALT, AST, liver index in NAFLD rats( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	<i>n</i>	ALT/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	AST/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	肝脏指数
正常	-	8	9.88 ± 2.48	70.63 ± 24.98	2.40 ± 0.10
模型	-	8	15.88 ± 4.79 <sup>2)</sup>	105.25 ± 35.08 <sup>2)</sup>	3.42 ± 0.20 <sup>2)</sup>
白芍总苷	100	8	13.00 ± 3.37	65.88 ± 24.42 <sup>3)</sup>	3.19 ± 0.40 <sup>3)</sup>
	200	7	10.04 ± 2.86 <sup>3)</sup>	52.43 ± 15.69 <sup>4)</sup>	3.00 ± 0.20 <sup>4)</sup>
水飞蓟宾	200	8	10.75 ± 1.70 <sup>3)</sup>	71.75 ± 16.38 <sup>4)</sup>	3.20 ± 0.20 <sup>3)</sup>
二甲双胍	200	8	13.57 ± 8.94	75.28 ± 17.32 <sup>3)</sup>	3.15 ± 0.10 <sup>4)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;模型组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup> $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

**3.3 对 NAFLD 大鼠 FBG,2 hBG, Fins, HOMA-IR 的影响** 与正常组比较,模型组餐后 2 hBG,HOMA-IR 显著增高( $P < 0.01$ ),Fins 明显增高( $P < 0.05$ )。与模型组比较,二甲双胍组餐后 2 hBG 均显著降低( $P < 0.01$ );水飞蓟宾组、白芍总苷高、低剂量组降

与正常组比较,模型组 ALT,AST 及肝脏指数均显著增高( $P < 0.01$ )。AST 方面,与模型组比较,用药各组均降低( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ ),而 ALT 方面,水飞蓟宾组、白芍总苷高剂量组降低( $P < 0.05$ )。与模型组比较,实验药及阳性药的肝脏指数均有降低,其中白芍总苷高剂量组及二甲双胍组( $P < 0.01$ ),白芍总苷低剂量及水飞蓟宾组( $P < 0.05$ )。见表 1。

低( $P < 0.05$ )。二甲双胍组、水飞蓟宾组、白芍总苷高、低剂量组 Fins 均较低( $P < 0.05$ )。白芍总苷高剂量组 HOMA-IR 显著降低( $P < 0.01$ );二甲双胍组、水飞蓟宾组、白芍总苷低剂量组降低( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 白芍总苷对 NAFLD 大鼠 FBG,2 hBG, Fins, HOMA-IR 的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effect of TGP on FBG,2 hBG, Fins, HOMA-IR in NAFLD rats( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	<i>n</i>	FBG/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	2 hBG/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	Fins/ $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$	HOMA-IR
正常	-	8	5.0 ± 0.6	7.6 ± 1.4	467.8 ± 135.7	104.2 ± 33.1
模型	-	8	5.8 ± 0.5	13.9 ± 5.3 <sup>2)</sup>	656.6 ± 109.4 <sup>1)</sup>	167.1 ± 18.7 <sup>2)</sup>
白芍总苷	100	8	5.7 ± 0.7	9.0 ± 2.1 <sup>3)</sup>	469.9 ± 94.0 <sup>3)</sup>	128.5 ± 24.8 <sup>3)</sup>
	200	7	5.1 ± 0.5	8.8 ± 3.0 <sup>3)</sup>	499.1 ± 96.5 <sup>3)</sup>	111.8 ± 20.3 <sup>4)</sup>
水飞蓟宾	200	8	5.6 ± 0.5	9.4 ± 3.0 <sup>3)</sup>	498.7 ± 134.4 <sup>3)</sup>	124.5 ± 33.8 <sup>3)</sup>
二甲双胍	200	8	5.9 ± 0.5	8.7 ± 2.8 <sup>4)</sup>	484.7 ± 137.6 <sup>3)</sup>	127.5 ± 38.4 <sup>3)</sup>

**3.4 对 NAFLD 大鼠血脂的影响** 与正常组比较,模型组 TC,TG,LDL,FFA 均显著增高,HDL 显著降低( $P < 0.01$ );与模型组比较,白芍总苷高剂量组、水飞蓟宾组在 TC,LDL,FFA 均显著降低( $P < 0.01$ ),二甲双胍组、白芍总苷低剂量组较低( $P < 0.05$ );在 TG,白芍总苷高剂量组显著降低( $P < 0.01$ ),二甲双胍、水飞蓟宾、白芍总苷低剂量组较低( $P < 0.05$ );而 HDL,白芍总苷及二甲双胍组、水飞蓟宾组均较模型组增高( $P < 0.05$ )。见表 3。

高( $P < 0.01$ );与模型组比较,白芍总苷高、低剂量组 HMGB1,TLR4 蛋白活性表达均显著降低( $P < 0.01$ ),而水飞蓟宾组较低( $P < 0.05$ )。见表 4 及图 1,2。

### 4 讨论

HMGB1 是存在于真核细胞核内的非组蛋白染色体结合蛋白,可作为一种炎症因子和内源性损伤相关分子模式配体促进肝脏炎症、损伤和纤维化发生信号,并参与肿瘤的发生和对肿瘤的免疫反应<sup>[9]</sup>。目前已经明确晚期糖基化终产物受体(RAGE)<sup>[10]</sup>和 Toll 样受体家族(TLRs)<sup>[11]</sup>部分成员是 HMGB1 发挥功能的重要受体。

**3.5 对 NAFLD 大鼠 HMGB1,TLR4 的影响** 与正常组比较,模型组 TLR4,HMGB1 蛋白的表达均显著增

表 3 白芍总苷对 NAFLD 大鼠 TC, TG, LDL, HDL, FFA 的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

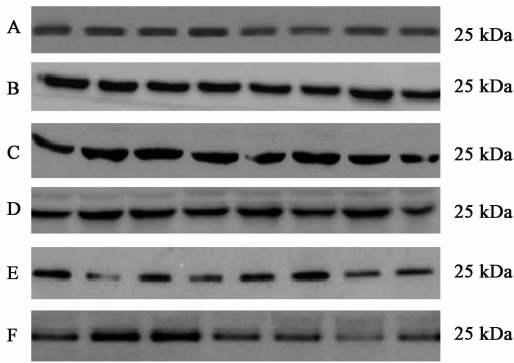
Table 3 Effect of TGP on TC, TG, LDL, HDL, FFA in NAFLD rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	n	TC/mmol·L <sup>-1</sup>	TG/mmol·L <sup>-1</sup>	LDL/mmol·L <sup>-1</sup>	HDL/mmo·L <sup>-1</sup>	FFA/μmol·L <sup>-1</sup>
正常	-	8	0.68 ± 0.51	0.62 ± 0.09	0.33 ± 0.03	1.91 ± 0.19	0.57 ± 0.11
模型	-	8	1.33 ± 0.66 <sup>2)</sup>	0.89 ± 0.20 <sup>2)</sup>	0.80 ± 0.20 <sup>2)</sup>	1.48 ± 0.09 <sup>2)</sup>	0.64 ± 0.14 <sup>2)</sup>
白芍总苷	100	8	0.92 ± 0.18 <sup>3)</sup>	0.61 ± 0.11 <sup>3)</sup>	0.48 ± 0.16 <sup>3)</sup>	1.69 ± 0.09 <sup>3)</sup>	0.50 ± 0.10 <sup>4)</sup>
	200	7	0.80 ± 0.23 <sup>4)</sup>	0.56 ± 0.11 <sup>4)</sup>	0.35 ± 0.11 <sup>4)</sup>	1.72 ± 0.12 <sup>3)</sup>	0.39 ± 0.06 <sup>4)</sup>
水飞蓟宾	200	8	0.78 ± 0.36 <sup>4)</sup>	0.61 ± 0.15 <sup>3)</sup>	0.41 ± 0.48 <sup>4)</sup>	1.65 ± 0.08 <sup>3)</sup>	0.48 ± 0.10 <sup>4)</sup>
二甲双胍	200	8	0.88 ± 0.42 <sup>3)</sup>	0.62 ± 0.26 <sup>3)</sup>	0.50 ± 0.11 <sup>3)</sup>	1.76 ± 0.08 <sup>3)</sup>	0.55 ± 0.06 <sup>3)</sup>

表 4 白芍总苷对 NAFLD 大鼠 TLR4, HMGB1 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 Effect of TGP on expression of TLR4, HMGB1 protein in NAFLD rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	n	TLR4	HMGB1
正常	-	8	10.12 ± 1.83	16.29 ± 2.70
模型	-	8	50.94 ± 7.61 <sup>2)</sup>	78.75 ± 7.15 <sup>2)</sup>
白芍总苷	100	8	22.14 ± 7.57 <sup>4)</sup>	22.91 ± 9.21 <sup>4)</sup>
	200	7	15.51 ± 10.10 <sup>4)</sup>	14.51 ± 6.78 <sup>4)</sup>
水飞蓟宾	200	8	33.62 ± 8.25 <sup>3)</sup>	40.51 ± 9.29 <sup>3)</sup>
二甲双胍	200	8	36.85 ± 10.02	57.88 ± 16.11



A. 正常组; B. 模型组; C. 二甲双胍组; D. 水飞蓟宾组; E. 白芍总苷 100 mg·kg<sup>-1</sup>组; F. 白芍总苷 200 mg·kg<sup>-1</sup>组(图 2 同)

图 1 各组大鼠 HMGB1 蛋白的表达

Fig.1 Expression of HMGB1 protein in all groups

在人体机体免疫中, TLR4 的过度激活会导致免疫系统紊乱, 引起严重的炎症反应。HMGB1 作为一种内源性 TLR4 配体, 能激活肝星状细胞株 JS1 细胞的 TLR4 信号, 促进 TLR4 介导的炎症发生<sup>[12-13]</sup>。最近研究报道 FFA 可促进肝细胞释放 HMGB1, 并激活肝细胞 TLR4-MyD88 信号和使核转录因子-κB65 (NF-κB65) 亚单位向细胞核内移位, 转录激活肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 和白细胞介素-6 (IL-6) 的表达; 使用 HMGB1 中和抗体可减少 FFA 诱导的 TNF-α 和 IL-6 的表达。提示 HMGB1 对 TLR4 信号途径的激

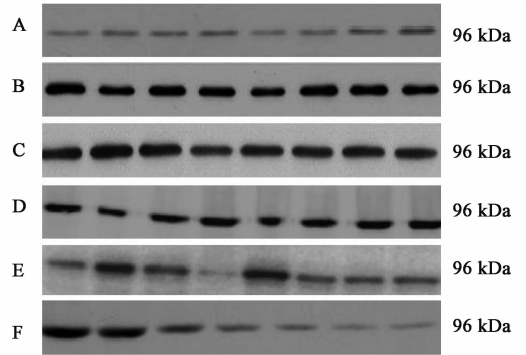


图 2 各组大鼠 TLR4 蛋白的表达

Fig.2 Expression of TLR4 protein in all groups

活参与了 NAFLD 的发生<sup>[14]</sup>。TLR4 通过下游髓样分化因子 88 (MyD88) 和 TRIF 通路活化转录因子 NF-κB 和 IRF3<sup>[15]</sup>, 增加炎症因子 (TNF-α, IL-1 等) 和 I 型干扰素的表达, 介导炎症反应以及纤维化, 促进 NAFLD 的发展。

本实验结果可见 HMGB1 对 TLR4 信号转导通路的上调参与了 NAFLD 的发生, 与 LI 等的实验结果<sup>[14]</sup>一致。课题组前期的研究发现白芍总苷通过下调 apelin 和内脂素 (visfatin) 表达, 下调肝组织 p-ERK1/2, TLR9 蛋白的表达, 改善 NAFLD 大鼠糖脂代谢异常, 拮抗胰岛素抵抗, 从而改善肝功能<sup>[6-8]</sup>。本实验提示白芍总苷在干预 NAFLD 向 NASH 发展的病理生理过程中, 可能通过下调 HMGB1, TLR4 的表达而抑制机体炎症的损伤, 减轻 NAFLD 向肝纤维化、肝硬化发展的进程。白芍总苷似有从多靶点治疗 NAFLD 的作用, 有待临床进一步验证。

[参考文献]

[1] FAN J G. Epidemiology of alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease in China [J]. Gastroenterol Hepatol, 2013, 28 (1) : 11-7.  
[2] WEI B J, Rau M, Geier A. Non-alcoholic fatty liver disease [J]. Dtsch Arztebl Int, 2014, 111 (26) : 447-452.

- [ 3 ] 中华医学会肝病学会. 脂肪肝和酒精性肝病学组. 中国非酒精性脂肪性肝病诊疗指南(2010 年修订版) [J]. 中国医学前沿杂志:电子版,2012,4(7):4-9.
- [ 4 ] 曾民德. PIVENS 及其相关的后续研究与非酒精性脂肪性肝病治疗的未来方向[J]. 肝脏,2014,19(1):53-56.
- [ 5 ] 冯文林,伍海涛,罗超华. 白芍总苷在消化系统疾病中的药理研究进展[J]. 时珍国医国药,2012,23(7):1778-1779.
- [ 6 ] 赵汝霞,郑琳颖,潘竞锵,等. 白芍总苷对 NAFLD 模型大鼠肝脏保护作用的抗氧化机制[J]. 广东医学院学报,2012,28(4):430-434.
- [ 7 ] 郑琳颖,潘竞锵,杨以琳,等. 白芍总苷对非酒精性脂肪性肝病大鼠 Apelin 和 Visfatin 表达的影响[J]. 中药新药与临床药理,2013,24(1):51-54.
- [ 8 ] 郑琳颖,潘竞锵,杨以琳,等. 白芍总苷下调果糖-高脂诱导大鼠非酒精性脂肪性肝病 ERK1/2, TLR4 和 TLR9 蛋白表达的作用[J]. 中国药学杂志,2014,49(24):2168-3172.
- [ 9 ] Ugrinova I, Pasheva E. HMGB1 protein; a therapeutic target inside and outside the cell[J]. Adv Protein Chem Struct Biol, 2017,107:37-76.
- [ 10 ] CHENG L S, LI J, LIU Y, et al. HMGB1-induced autophagy: a new pathway to maintain Treg function during chronic hepatitis B virus infection[J]. Clin Sci (Lond), 2017,131(5):381-394.
- [ 11 ] Crews F T, Walter T J, Coleman L G, et al. Toll-like receptor signaling and stages of addiction [J]. Psychopharmacology (Berl), 2017, doi: 10.1007/s00213-017-4560-6. .
- [ 12 ] LUO C, LIU H, WANG H, et al. Toll-like receptor 4 signaling in high mobility group box-1 protein 1 mediated the suppression of regulatory T-cells[J]. Med Sci Monit, 2017,18(23):300-308.
- [ 13 ] Bigorgne A E, John B, Ebrahimkhani M R, et al. TLR4-dependent secretion by hepatic stellate cells of the neutrophil-Chemoattractant CXCL1 mediates liver response to Gut microbiota [J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0151063.
- [ 14 ] LI L, CHEN L, HU L, et al. Nuclear factor high-mobility group box1 mediating the activation of toll-like receptor 4 signaling in hepatocytes in the early stage of nonalcoholic fatty liver disease in mice[J]. Hepatology, 2011, 54(5):1620-1630.
- [ 15 ] SONG Y, LIU X, YUE H, et al. Anti-inflammatory effects of benzenediamine derivate FC-98 on sepsis injury in mice via suppression of JNK, NF- $\kappa$ B and IRF3 signaling pathways [J]. Mol Immunol, 2015, 67(2):183-192.

[责任编辑 周冰冰]