

祛痰活血颗粒对 NAFLD 模型大鼠脂肪组织 AQP7, p38MAPK 表达的影响

杨香香, 朱晓宁, 彭孟云, 汪静*

(西南医科大学 附属中医医院, 四川 泸州 646000)

[摘要] **目的:**探讨祛痰活血颗粒治疗非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)大鼠的作用,并探讨其相关的作用机制。**方法:**40只SD大鼠随机分成正常组(6只),模型组(34只);除正常组外,采用高脂饮食诱导的方法诱导NAFLD大鼠模型,确认建模成功后,将剩余模型组(30只)随机分为5组,每组6只,分别为模型组,祛痰活血颗粒高、中、低剂量组($10, 5, 2.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), SB203580组($3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),分别予以灌胃祛痰活血颗粒及腹腔注射p38MAPK抑制剂SB203580,连续干预4周。苏木素-伊红(HE)及油红O染色观察肝脏病理变化;试剂盒测定血清甘油三酯(TG),总胆固醇(TC),天门冬氨酸氨基转移酶(AST),丙氨酸氨基转移酶(ALT),肝脏TG;实时荧光定量PCR(Real-time PCR)检测脂肪组织水通道蛋白7(AQP7)及p38分裂原激活的蛋白激酶(p38MAPK)mRNA表达,酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测肝脏游离脂肪酸(FFA),脂肪组织AQP7和磷酸化p38MAPK(p-p38MAPK)的表达。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠肝脏脂肪变性明显,血清TG,TC,AST,ALT和肝脏TG,FFA明显升高,脂肪组织中AQP7 mRNA及AQP7含量表达降低,p38MAPK mRNA及p-p38MAPK含量升高($P < 0.05$);与模型组比较,祛痰活血颗粒和SB203580可减轻NAFLD大鼠肝脏脂肪变性程度;明显降低NAFLD大鼠的血清TG,TC,AST,ALT,肝脏TG,FFA($P < 0.05$);各中药组和SB203580组大鼠脂肪组织AQP7 mRNA和AQP7含量表达明显升高,p38MAPK mRNA和p-p38MAPK含量明显降低($P < 0.05$)。**结论:**祛痰活血颗粒能减轻或者逆转肝脏的脂肪变性,其机制可能与抑制脂肪组织p38MAPK活化、上调AQP7表达,增加甘油入血代谢,减少进入肝脏的FFA,从而降低肝脏TG蓄积有关。

[关键词] 非酒精性脂肪性肝病; 脂肪组织; 水通道蛋白7; p38MAPK通路; 作用机制

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)16-0145-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017160145

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170526.1012.034.html>

[网络出版时间] 2017-05-26 10:12

Effect of Qutan Huoxue Granules on Expression of AQP7 and p38MAPK in Adipose Tissues of NAFLD Model Rats

YANG Xiang-xiang, ZHU Xiao-ning, PENG Meng-yun, WANG Jing*

(Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism of Qutan Huoxue granules in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in rats. **Method:** The 40 SD rats were randomly divided into normal group ($n = 6$) and model group ($n = 34$). NAFLD rat models were induced by high fat diet, and after successful modeling, the successful modeling group ($n = 30$) were further randomly divided into 5 groups, 6 in each group: model group, Qutan Huoxue granules high, middle and low dose groups ($10, 5, 2.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) and SB203580 group ($3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). Intragastric administration of Qutan Huoxue granules and intraperitoneal injection of p38MAPK inhibitor SB203580 were given respectively for 4 weeks. Then the pathological changes of liver were observed by htoxylin-eosin (HE) staining and oil red O staining; Kits were used to detect the triglyceride (TG),

[收稿日期] 20170313(008)

[基金项目] 四川省教育厅2014年度理科重点项目(14ZA0144);四川省教育厅2015年度理科一般项目(15ZB0156);泸州市科技局2016年度项目[2016-R-70(23/24)]

[第一作者] 杨香香, 硕士, 从事肝胆疾病的防治, Tel:15228279650, E-mail: cryatalyang89@163.com

[通讯作者] *汪静, 硕士, 教授, 从事肝胆疾病的防治, Tel:13882726162, E-mail: lywj68@126.com

total cholesterol (TC), aspartate transaminase (AST), and alanine transferase (ALT) levels in serum, and TG levels in liver tissues; the adipose tissue aquaporin7 (AQP7) and p38 mitogen activated protein kinase (p38MAPK) mRNA expression levels were detected by Real-time PCR; enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the expression of free fatty acid (FFA) in liver, AQP7 and phosphorylated p38MAPK (p-p38MAPK) expression in adipose tissues. **Result:** As compared with the normal group, the model group showed an obvious hepatic steatosis and a significant increase in serum TG, TC, AST, ALT and liver TG, FFA levels, a significant decrease in the expression of AQP7 mRNA and AQP7 protein and an increase of p38MAPK mRNA and p-p38MAPK protein ($P < 0.05$). As compared with the model group, Qutan Huoxue granules and SB203580 can reduce the degree of liver steatosis, and significantly decrease the serum TG, TC, AST, ALT and liver TG, FFA levels in NAFLD rats ($P < 0.05$). The Chinese medicine groups and SB203580 group showed a significant increase in the expression of AQP7 mRNA and AQP7 protein and a decrease of p38MAPK mRNA and p-p38MAPK protein in adipose ($P < 0.05$). **Conclusion:** Qutan Huoxue granules can reduce or reverse the liver steatosis, and the mechanism may be related to inhibiting the activation of p38MAPK, up-regulating the expression of AQP7 in adipose tissues, increasing plasma glycerol metabolism, reducing glycerol and FFA intake into liver, hereby reducing TG accumulation in liver.

[**Key words**] nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD); adipose tissue; aquaporin7 (AQP7); p38MAPK pathway; mechanism

非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 以肝细胞过度脂质沉积为特征, 但无过量饮酒史、病毒性肝炎和其他肝病的慢性肝脏疾病, 是一种与胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 和遗传易感性紧密相关的代谢性肝损伤^[1], 疾病谱包括: 非酒精性单纯性脂肪肝 (nonalcoholic simple fatty liver, NAFL), 非酒精性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH) 及其相关肝硬化和肝细胞癌^[2]。目前, 在西方国家中, NAFLD 已经成为引起肝脏疾病的首位原因^[3], 在我国患病率仅次于病毒性肝炎, 居第 2 位^[4]。NAFLD 的发病机制复杂, 学说众多, 目前“二次打击学说”^[5] 被普遍认可, 其中 IR 引起的脂代谢紊乱, 主要是甘油三酯 (triglyceride, TG) 在肝脏的过量蓄积在 NAFLD 的发病中尤其重要。近年来, 研究发现水通道蛋白 (aquaporins, AQP) 表达异常导致甘油转运失衡, 引起 TG 合成过多沉积于肝细胞, 导致 NAFLD 的发生^[6]。有研究发现在 NAFLD 模型大鼠中, 肝脏中磷酸化 p38MAPK (p-p38MAPK) 的表达高于正常, 血液中游离脂肪酸 (FFA) 水平升高, 而在治疗后随着肝细胞脂肪变性程度减轻, 磷酸化 p38MAPK 的表达亦随之逐渐降低, 因此认为 p38MAPK 信号通路可能参与了 NAFLD 的疾病进程^[7-8]。张雅萍等^[9] 研究证实代谢综合征伴脂肪肝的大鼠, 其脂肪细胞中 p38MAPK 蛋白的表达亦显著高于对照组。祛痰活血颗粒是祛痰活血汤的颗粒制剂, 是四川名中医

孙同郊教授治疗脂肪肝的经验治法方, 通过临床病例的回顾性研究^[10], 发现运用该方治疗非酒精性脂肪性肝病, 临床疗效显著。前期的动物实验证实, 祛痰活血颗粒可改善 NAFLD 大鼠肝功能, 降低血脂, 增加脂肪组织 AQP7 及降低肝脏 AQP9 表达, 减轻 NAFLD 模型大鼠肝脂肪变性程度, 可能是其治疗 NAFLD 的作用机制之一^[11-12]。推测在 NAFLD 模型中, 肝脏与脂肪组织中 p38MAPK 通路可能均参与上述疾病形成的过程。基于上述理论与研究基础, 笔者以祛痰活血颗粒治疗 NAFLD 模型大鼠, 观察脂肪组织 p38MAPK 及 AQP7 的表达, 探讨其改善 NAFLD 的机制。

1 材料

1.1 动物 清洁级雄性 SD 大鼠, 40 只, 体重 180 ~ 220 g, 由西南医科大学实验动物中心提供。动物生产合格证号 SCXK(川)2013-0017。

1.2 药物及试剂 西南医科大学附属中医医院孙同郊教授提供经验方, 祛痰活血颗粒: 陈皮 10 g, 茯苓 15 g, 法半夏 10 g, 薏苡仁 20 g, 泽泻 20 g, 郁金 15 g, 丹参 15 g, 生山楂 15 g, 柴胡 12 g, 黄芩 10 g, 决明子 15 g, 炙甘草 3 g, 以上药物来源于天植中药饮片公司, 由西南医科大学附属中医医院制剂室制备, 并由该制剂室鉴定, 批号 20151031。p38MAPK 抑制剂 SB203580 (美国 LC 实验室, 批号 ARV-112)。天门冬氨酸氨基转移酶 (AST), 丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 测定试剂盒 (上海复星长征医学科学有限公

司,批号分别为 D1610143, D1612083); TG, 总胆固醇(TC)测定试剂盒(北京九强生物技术有限公司,批号分别为 160513, 151104); TPO 测试 TG 试剂盒(购自南京建成生物工程研究所,批号 20160519); FFA, p-p38MAPK, AQP7 大鼠酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂(上海桥杜生物科技有限公司,批号 201602, 201607, 201604); 总 RNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司,批号 03505); 逆转录试剂盒和逆转录 PCR(RT-PCR)试剂盒(成都博瑞克生物技术有限公司); SYBR Green 实时荧光定量 PCR(Real-time PCR) Master Mix(日本 Toyobo 公司,批号 441900)。

1.3 高脂饲料 饲料配方: 2% 胆固醇 + 10% 猪油 + 88% 基础饲料, 购自成都达硕实验动物公司, 许可证号 SCXK(川)2014-028。

1.4 仪器 Thermo 991 型超低温冰箱(美国热电公司); Model 680 型酶标仪, Gel Doc XR 型凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司); SW-CJ 型超净工作台(苏州净化设备有限公司); TS100 型倒置显微镜(日本 Nikon 公司); Eppendorf 5424R 型台式高速冷冻离心机, Realplex2 型 PCR 扩增仪(德国 Eppendorf 公司); DHG-9140A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 分组、造模^[11-12]及给药 将 40 只大鼠普通饲料适应喂养 1 周后, 按随机法分为正常组(6 只)、模型组(34 只); 正常组普通饲料喂养, 模型组高脂饲料喂养, 各组大鼠均正常自由活动和饮用自来水。从造模第 10, 12, 16 周分别随机处死 1 只模型组大鼠, 取肝组织做石蜡切片苏木素-伊红(HE)染色, 确认造模成功后, 将剩余模型组(30 只)再次随机分为模型组(6 只), 祛痰活血颗粒高剂量组(7 只), 祛痰活血颗粒中剂量组(6 只), 祛痰活血颗粒低剂量组(6 只), p38MAPK 抑制剂组(6 只); 高、中、低中药组按 10, 5, 2.5 g·kg⁻¹·d⁻¹灌胃祛痰活血颗粒, 抑制剂组按 3 mg·kg⁻¹, 每天 1 次, 腹腔注射, 正常组、模型组及抑制剂组予以相同体积生理盐水灌胃, 除抑制剂组外, 其余各组予以腹腔注射相同体积溶媒剂, 连续干预 28 d 后, 处死大鼠。

2.2 标本采集 在给药第 4 周末, 称大鼠体重, 用 1% 戊巴比妥钠腹腔注射(10 mL·kg⁻¹)麻醉, 剖腹分离并暴露腹主动脉, 取血约 5 mL, 4 ℃ 静置 24 h 后, 3 000 r·min⁻¹离心 10 min 分离上层血清分装, 待测或 -20 ℃ 保存。大鼠脱颈椎处死, 立即摘取肝

脏, 滤纸吸干血液, 称取质量。取肝左外侧叶置于 4% 多聚甲醛中固定, 行 HE 染色; 另取肝右外侧叶约 1.0 cm × 1.0 cm × 1.0 cm 大小立即行冰冻切片, 自然晾干后, 行油红 O 染色; 然后分别再取肝脏和附睾周围脂肪组织 200 mg 左右分别放入冻存管, 放入冰盒中, -80 ℃ 保存。

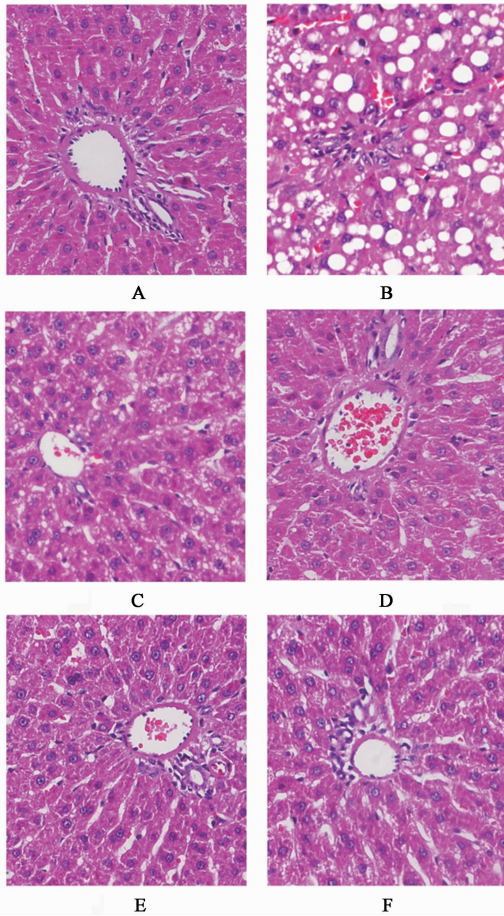
2.3 检测指标 光镜下观察肝组织 HE 染色病理结构及油红 O 染色肝内脂滴数量; 生化检测法检测血清 AST, ALT, TC, TG 水平; 取肝组织 100 mg 用无水乙醇按 1:9 匀浆, 3 000 r·min⁻¹离心 10 min, 取上清液, 采用 GPO-PAP 法测定肝脏中 TG 含量; 取肝脏(脂肪组织) 100 mg 用 pH7.4 磷酸盐缓冲液(PBS)按 1:9 匀浆, 3 000 r·min⁻¹离心 10~20 min, 取上清液, 采用 ELISA 法测定肝匀浆中 FFA 含量, 脂肪组织匀浆中 AQP7, p-p38MAPK 蛋白表达; 采用 Real-time PCR 法测定脂肪组织中 AQP7, p38MAPK mRNA 表达, 采用 RNAsimple Total RNA Kit 提取各组织总 RNA, 检测 RNA 纯度和完整性后, 将 RNA 逆转录为 cDNA, 逆转录条件为 42 ℃ 20 min, 99 ℃ 5 min, 4 ℃ 5 min; 采用 Master Mix 进行 20 μL 体系 Real-time PCR 反应, 反应条件为: 95 ℃ 5 s, 53 ℃ 10 s, 72 ℃ 15 s, 连续进行 40 个循环。以 GAPDH 为内参, 采用相对定量 2^{-ΔΔC_t}法计算。引物序列, AQP7 引物上游 5'-TCGTGACTGGGATGCTGC-3', 下游 5'-ACGGGATGGGTTGATTGC-3', 片段长度 158 bp; p38MAPK 引物上游: 5'-GGACCTAAAGCCCAGCAA-3', 下游: 5'-CAGCCCACGGACCAAATA-3', 片段长度 186 bp; GAPDH 引物上游: 5'-CCATCCACAGTCTTCTGAGT-3', 下游: 5'-CCTCAAGATTGTCAGCAAT-3', 片段长度 141 bp。设置 6 个复孔。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计分析软件进行数据处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 NAFLD 大鼠肝脏病理学改变 正常组大鼠的 HE 染色示肝细胞以中央静脉为中心向周围呈放射状排列, 肝细胞核大而圆, 位于细胞中央, 肝细胞未见明显肿胀、脂肪变性、坏死、炎细胞浸润或纤维组织增生; 油红 O 示肝细胞可见少许点状红色脂滴, 散在分布于胞浆或细胞边缘。模型组可见中-重度肝细胞脂肪变性, 肝细胞肿胀、肝小叶结构模糊, 胞浆内分布大量网格样改变或圆形空泡, 细胞核位于偏位, 部分可见少许纤维组织增生; 肝细胞内可见大量大小不等红色脂滴。祛痰活血颗粒组及

SB203580 组可见少许肝细胞脂肪变性、细胞结构稍显紊乱,未见明显坏死及纤维组织增生,其病变程度与模型组比较明显减轻;肝细胞内可见少许小脂滴,与模型组比较明显减少。见图 1,2。



A. 正常组, B. 模型组, C. 祛痰活血颗粒 2.5 g·kg⁻¹ 组, D. 祛痰活血颗粒 5 g·kg⁻¹ 组, E. 祛痰活血颗粒 10 g·kg⁻¹ 组, F. SB203580 组(图 2 同)

图 1 祛痰活血颗粒对 NAFLD 大鼠肝脏病理结构的影响(HE, ×400)
Fig.1 Effect of Qutan Huoxue granules on liver of pathological structures in NAFLD rats(HE, ×400)

3.2 对 NAFLD 大鼠的血清 AST, ALT, TG, TC 的影响

与正常组比较,模型组血清 AST, ALT, TG, TC

表 1 祛痰活血颗粒对 NAFLD 大鼠血清 AST, ALT, TG, TC 的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of Qutan Huoxue granules on serum AST, ALT, TG, TC in NAFLD rats($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	TG/mmol·L ⁻¹	TC/mmol·L ⁻¹
正常	-	94.50 ± 5.96	39.67 ± 2.94	0.39 ± 0.06	0.65 ± 0.14
模型	-	184.33 ± 15.86 ¹⁾	83.33 ± 4.59 ¹⁾	1.36 ± 0.10 ¹⁾	2.04 ± 0.13 ¹⁾
祛痰活血颗粒	2.5	137.33 ± 10.56 ²⁾	59.17 ± 4.26 ²⁾	0.68 ± 0.10 ²⁾	1.42 ± 0.12 ²⁾
	5	125.17 ± 9.99 ²⁾	53.83 ± 4.96 ²⁾	0.59 ± 0.08 ²⁾	1.25 ± 0.10 ²⁾
	10	106.00 ± 10.35 ²⁾	41.83 ± 4.62 ²⁾	0.41 ± 0.06 ²⁾	0.68 ± 0.15 ²⁾
SB203580	3 × 10 ⁻³	136.00 ± 9.40 ²⁾	56.50 ± 6.09 ²⁾	0.62 ± 0.12 ²⁾	1.27 ± 0.15 ²⁾

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

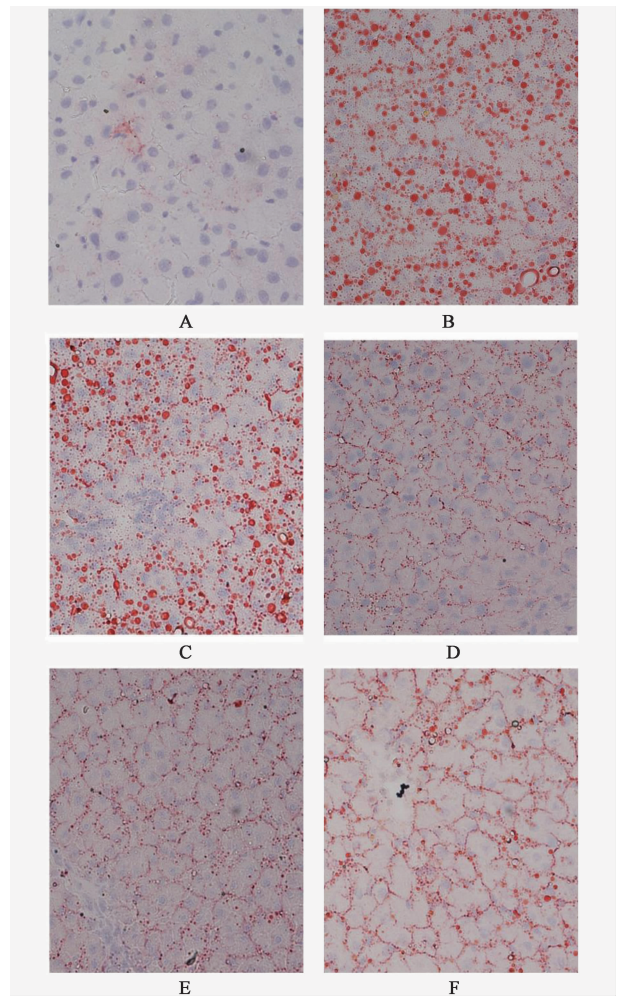


图 2 祛痰活血颗粒对 NAFLD 大鼠肝脏脂滴的影响(油红 O, ×400)

Fig.2 Effect of Qutan Huoxue granules on liver of lipid droplets in NAFLD rats(oil red O, ×400)

水平显著升高(P < 0.05);与模型组比较,祛痰活血颗粒组及 SB203580 组血清 TC, TG, AST, ALT 水平显著降低,祛痰活血颗粒高剂量组效果最好(P < 0.05);SB203580 组与祛痰活血颗粒低、中剂量组间差异无统计学意义。见表 1。

3.3 对 NAFLD 大鼠肝脏 TG, FFA 的影响 与正常组比较,模型组肝脏 TG, FFA 水平明显升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,祛痰活血颗粒组及 SB203580 组肝脏 TG, FFA 水平明显降低,SB203580 组效果最明显,祛痰活血颗粒高剂量组次之 ($P < 0.05$);祛痰活血颗粒低、中剂量组间差异无统计学意义。见表 2。

表 2 祛痰活血颗粒对 NAFLD 大鼠肝脏 TG, FFA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of Qutan Huoxue granules on liver TG, FFA in NAFLD rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TG/mmol·L ⁻¹	FFA/nmol·L ⁻¹
正常	-	2.00 ± 0.20	282.71 ± 34.89
模型	-	4.11 ± 0.40 ¹⁾	521.88 ± 40.95 ¹⁾
祛痰活血颗粒	2.5	3.41 ± 0.45 ²⁾	452.77 ± 25.88 ²⁾
	5	3.07 ± 0.34 ²⁾	384.20 ± 18.67 ²⁾
	10	2.19 ± 0.22 ²⁾	337.14 ± 11.31 ²⁾
SB203580	3 × 10 ⁻³	2.16 ± 0.40 ²⁾	242.62 ± 53.05 ²⁾

3.4 对 NAFLD 大鼠脂肪组织 AQP7, p38MAPK mRNA 的表达影响 与正常组比较,模型组 AQP7 mRNA 的表达明显降低,p38MAPK mRNA 的表达明显升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,祛痰活血颗粒组及 SB203580 组 AQP7 mRNA 的表达明显升高,以祛痰活血颗粒高剂量组效果最好,而 p38MAPK mRNA 的表达明显降低,以 SB203580 组表达最低,祛痰活血颗粒高剂量组次之 ($P < 0.05$);SB203580 组与祛痰活血颗粒低、中剂量组之间 AQP7 mRNA 差异无统计学意义,祛痰活血颗粒低、中剂量组间 p38MAPK mRNA 差异无统计学意义。见表 3。

表 3 祛痰活血颗粒对 NAFLD 大鼠脂肪组织 AQP7, p38MAPK mRNA 相对表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of Qutan Huoxue granules on relative expression level of AQP7 and p38MAPK mRNA in rat adipose tissue in NAFLD rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	AQP7 mRNA	p38MAPK mRNA
正常	-	1.011 ± 0.168	1.014 ± 0.172
模型	-	0.330 ± 0.072 ¹⁾	2.075 ± 0.123 ¹⁾
祛痰活血颗粒	2.5	0.566 ± 0.083 ²⁾	1.793 ± 0.099 ²⁾
	5	0.704 ± 0.076 ²⁾	1.663 ± 0.104 ²⁾
	10	0.937 ± 0.159 ²⁾	1.149 ± 0.089 ²⁾
SB203580	3 × 10 ⁻³	0.627 ± 0.142 ²⁾	0.680 ± 0.114 ²⁾

3.5 对 NAFLD 大鼠脂肪组织中 AQP7, p-p38MAPK 蛋白的表达影响 与正常组比较,模型组 AQP7 蛋

白的表达明显降低,p-p38MAPK 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,祛痰活血颗粒组及 SB203580 组 AQP7 蛋白的表达明显升高,p-p38MAPK 蛋白表达明显降低;AQP7 蛋白表达升高以祛痰活血颗粒高剂量组效果最好,p-p38MAPK 蛋白表达降低以 SB203580 组最明显,祛痰活血颗粒高剂量组次之 ($P < 0.05$);SB203580 组与祛痰活血颗粒中、低剂量组 AQP7 蛋白差异无统计学意义,祛痰活血颗粒低、中剂量组 p-p38MAPK 蛋白差异无统计学意义。见表 4。

表 4 祛痰活血颗粒对 NAFLD 大鼠脂肪组织 AQP7, p-p38MAPK 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effect of Qutan Huoxue granules on expression of AQP7, p-p38MAPK protein in rat adipose tissue in NAFLD rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	AQP7	p-p38MAPK
正常	-	583.04 ± 63.29	56.85 ± 8.24
模型	-	253.17 ± 43.90 ¹⁾	90.01 ± 6.84 ¹⁾
祛痰活血颗粒	2.5	341.59 ± 46.38 ²⁾	78.91 ± 3.21 ²⁾
	5	411.62 ± 50.75 ²⁾	72.53 ± 4.61 ²⁾
	10	501.75 ± 53.48 ²⁾	63.71 ± 4.10 ²⁾
SB203580	3 × 10 ⁻³	345.87 ± 60.91 ²⁾	37.96 ± 5.65 ²⁾

4 讨论

非酒精性脂肪肝的形成与肝内 TG 转出过少或合成过多导致肝脏内脂质过度聚集有关。TG 是由一分子甘油和三分子 FFA 形成的,因此甘油作为其中间物在 NAFLD 形成中具有关键作用。体内的甘油一部分来自于肠道吸收,一部分来自脂肪动员分解。脂肪动员产生的甘油通过简单扩散入血,还可通过脂肪细胞上的水通道蛋白转运入血,血液中的甘油又通过肝细胞上的水通道蛋白进入肝内参与合成 TG^[13],因此水通道蛋白在 NAFLD 的形成中至关重要,可能是其发病的关键机制之一。

水通道蛋白,位于细胞膜上,是由蛋白构成的“特异孔道”,可控制水分子进出细胞膜。水甘油通道蛋白 7 (AQP7),作为水通道蛋白中的一员,主要表达于脂肪组织,在甘油转运中起到关键作用^[14];AQP7 表达下降导致甘油入血减少,同时胞内甘油激酶活性增加而 TG 合成增多,沉积于脂肪细胞^[15];脂肪细胞内蓄积的 TG,在脂解激素作用下分解增加,甘油及 FFA 入血过多,进入肝脏的甘油以及 FFA 增加,导致 TG 合成增多,进而导致 NAFLD 的发生。前期实验发现 NAFLD 模型大鼠脂肪组织中

AQP7 表达降低,而药物干预后脂肪组织 AQP7 表达上升,肝脏脂肪变性程度降低,进一步提示 AQP7 参与 NAFLD 的形成和发展^[12]。

p38MAPK 信号通路是真核生物体内普遍存在一种信号转导通路,在渗透压改变、炎性因子等刺激下磷酸化而激活,活化的 p38MAPK 从胞质转移至细胞核中,进而影响一系列细胞因子的表达,在细胞的炎症反应和增殖、凋亡中起着重要作用^[16]。研究发现在小鼠胚胎成纤维细胞成脂分化中,p38MAPK 通路的激活引起 PPAR γ 2 表达上调,促进脂肪分化和脂肪蓄积,而使用 p38MAPK 抑制剂 SB203580 的肥胖小鼠,肥胖程度减轻^[17-18]。研究提示 NAFLD 大鼠中,脂肪中 p38MAPK 蛋白的表达亦显著高于对照组大鼠^[9]。因此认为脂肪组织 p38MAPK 通路可能参与了 NAFLD 的发生发展。

本研究结果提示,祛痰活血颗粒组与 SB203580 组中,脂肪组织中 p-p38MAPK 表达明显降低,以 SB203580 组最明显,与上述研究结果相符;相应的 AQP7 表达明显升高,但以祛痰活血颗粒高剂量组最明显,AQP7 表达升高组,其血清 TG,TC,AST,ALT,肝脏 TG,FFA 和转氨酶明显降低,病理切片提示脂滴数量减少。由此可得出,祛痰活血颗粒可能通过抑制 p38MAPK 通路的激活和促进脂肪组织 AQP7 的表达,增加甘油入血进一步代谢,而减少进入肝脏合成 TG,减轻肝脏脂肪变性程度;结合 p-p38MAPK 表达降低以 SB203580 组最明显,而 AQP7 的表达变化以中药高剂量组最明显,SB203580 组的 AQP7 表达与祛痰活血颗粒中、低剂量组相似,可知中药组与 SB203580 组中 p-p38MAPK 与 AQP7 的表达变化不一致,说明激活的 p38MAPK 通路可能通过抑制 AQP7 的表达起到调控作用,但不是主要或唯一调控 AQP7 表达的通路。

全国老中医孙同郊教授认为,NAFLD 多因患者嗜食肥甘厚味,湿热内生,脾失健运,久坐久卧兼作息不良而致,认为湿热内蕴成痰,痰湿影响肝脏疏泄功能,继而化为痰瘀,久而久之发展为病;因而确立以祛痰活血疏肝法为基础的祛痰活血汤为治疗 NAFLD 的基本方。方中半夏、陈皮、茯苓、泽泻等健脾燥湿、行气化痰,郁金、丹参、山楂活血化瘀,柴胡、黄芩疏肝行气、和解少阳,诸药合用,可达疏肝健脾,行气祛痰、活血化痰作用。在临床运用中,该方可缓解患者症状、降低血脂、改善肝功能^[10]。本实验结果显示,祛痰活血颗粒可显著降低 NAFLD 模型大鼠的血清 TG,TC,AST,ALT,肝脏 TG 和肝脏 FFA,提

示该中药复方能减少 NAFLD 模型大鼠血液和肝脏的脂肪沉积,有效调节和改善脂质代谢平衡,起到一定的降脂、保肝作用。

可见,NAFLD 的发生发展与多种蛋白或者通路有关,本研究提示祛痰活血颗粒可能通过抑制脂肪组织 p38MAPK 通路的活化和促进 AQP7 的表达,减少脂肪组织中 TG 蓄积,平衡甘油从脂肪组织到肝脏的转运,间接影响甘油及脂肪代谢,降低 TG 在肝细胞的沉积,减少 NAFLD 模型大鼠肝细胞内的脂滴数量,减轻或逆转肝脏脂肪变性,同时改善炎症反应,起到修复作用;而脂肪组织中激活的 p38MAPK 通路可能通过抑制 AQP7 的表达起到调控作用,但不是唯一调控 AQP7 表达的信号通路;因此推测祛痰活血颗粒可能还通过其他信号通路调控 AQP7 的表达,影响脂肪-血液-肝脏途径的甘油及脂肪代谢,从而改善 NAFLD,这与中药复方是从多方位、多靶点治疗疾病有一定关系,有待进一步分子实验探索证实。

[参考文献]

- [1] Chalasani N, Younossi Z, Lavine J E, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology [J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(7): 1592-1609.
- [2] 范建高. 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): 4-10.
- [3] Review T, LaBrecque D R, Abbas Z, et al. World gastroenterology organisation global guidelines: nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis[J]. *J Clin Gastroenterol*, 2014, 48(6): 467-473.
- [4] FAN J G, Farrell G C. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease in China [J]. *J Hepatol*, 2009, 50(1): 204-210.
- [5] 董姝, 刘平, 孙明瑜. 非酒精性脂肪肝发病机制——“二次打击”学说研究进展[J]. *临床肝胆病杂志*, 2012, 28(7): 551-555.
- [6] 邱烈旺, 顾陆鸣, 吕琳, 等. 水甘油通道蛋白在非酒精性脂肪变性肝细胞模型中的表达及意义[J]. *第三军医大学学报*, 2012, 34(7): 622-626.
- [7] 杨钦河, 谢芳, 王凤珍, 等. 不同治法方药对脂肪肝大鼠肝组织 NF- κ Bp65 及 Kupffer 细胞 p38MAPK 蛋白表达的影响[J]. *广州中医药大学学报*, 2009, 26(2): 141-146.

- [8] 顾陆昀, 邱烈旺, 陈小凤, 等. 油酸通过磷脂酰肌醇-3 激酶/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶和 p38 丝裂原活化蛋白激酶途径调节水通道蛋白 3 和 9 的表达[J]. 中华肝脏病杂志, 2013, 21(10): 753-758.
- [9] 张雅萍, 祝之明, 闫振成, 等. 代谢综合征大鼠肥胖特征及 ERK1/2 和 p38MAPK 的作用研究[J]. 解放军医学杂志, 2006, 31(8): 794-797.
- [10] 刘菊容, 朱晓宁, 汪静, 等. 祛痰活血疏肝法治疗非酒精性脂肪性肝炎疗效总结[J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 16(12): 128-130.
- [11] 肖剑, 汪静, 米绍平, 等. 祛痰活血汤对非酒精性脂肪肝大鼠细胞凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(17): 183-186.
- [12] 郑丁. 基于水甘油通道蛋白理论探讨祛痰活血颗粒治疗 NAFLD 模型大鼠的作用机制[D]. 泸州: 四川医科大学, 2015.
- [13] Rodriguez A, Marinelli R A, Tesse A, et al. Sexual dimorphism of adipose and hepatic aquaglyceroporins in health and metabolic disorders [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2015, 6(9): 171.
- [14] 孙夕林, 赵周社, 李宏利, 等. 水甘油通道蛋白结构和功能与疾病研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(36): 7197-7200.
- [15] Hibuse T, Maeda N, Funahashi T, et al. Aquaporin 7 deficiency is associated with development of obesity through activation of adipose glycerol kinase [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(31): 10993-10998.
- [16] 张秀秀, 郭云涛, 黄万龙, 等. 靶向 MAPK 信号通路调控脂肪细胞分化的 microRNAs [J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(11): 2159-2166.
- [17] Takenouchi T, Takayama Y, Takazawa T. Cotreatment with dexamethasone and octanoate induces adipogenesis in 3T3-L1 cells [J]. Cell Biol Int, 2004, 28(3): 209-216.
- [18] Maekawa T, Jin W, Ishii S. The role of ATF-2 family transcription factors in adipocyte differentiation: antiobesity effects of p38 inhibitors [J]. Mol Cell Biol, 2010, 30(3): 613-25.

[责任编辑 周冰冰]