

· 药理 ·

## 苓桂术甘汤与茵陈蒿汤合方对非酒精性脂肪 性肝炎大鼠 Nrf2/ARE 信号通路的影响

郭一, 李军祥, 毛堂友, 陈晨, 谢添弘, 韩亚飞, 石磊, 谭祥, 韩海啸\*  
(北京中医药大学 东方医院, 北京 100078)

**[摘要]** 目的:从氧化应激的角度,观察苓桂术甘汤与茵陈蒿汤合方对非酒精性脂肪性肝炎(NASH)大鼠的干预效应,并通过 Nrf2/ARE 信号通路探讨合方对非酒精性脂肪性肝炎(NASH)大鼠的作用机制。方法:将 SPF 级 SD 大鼠随机分为正常组,模型组,合方组(6.93 g·kg<sup>-1</sup>),苓桂术甘汤组(3.465 g·kg<sup>-1</sup>),茵陈蒿汤组(3.465 g·kg<sup>-1</sup>),莱菔硫烷组(0.5 mg·kg<sup>-1</sup>),采用高脂饲料法建立 NASH 模型;高脂饲料饲养 8 周并同时给药,取材检测大鼠血清丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST)以及血脂总胆固醇(total cholesterol, TC),甘油三酯(triglyceride, TG),高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein, HDL-C),低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein, LDL-C)水平,取部分肝组织进行苏木素-伊红(HE)染色,蛋白质免疫印迹(Western blot)与逆转录 PCR(RT-PCR)法测定肝脏细胞质接头蛋白 1(Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1),核因子 E2-关联因子 2(nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2),醌氧化还原酶 1(quinone oxidoreductase-1, NQO1),血红素加氧酶 1(heme oxygenase-1, HO-1)蛋白与 mRNA 表达水平。结果:给药后,与正常组比较,模型组大鼠血脂 TC, TG, HDL-C, LDL-C 及血清 ALT, AST 水平升高,肝脏脂肪变明显,肝脏 Keap1 表达量降低, Nrf2, NQO1, HO-1 蛋白与 mRNA 表达量升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,各给药组血脂 TC, TG, HDL-C, LDL-C 及血清 ALT, AST 水平有不同程度降低,肝脏病理学也有不同程度改善,除茵陈蒿汤组变化不明显外,各给药组大鼠肝脏 Nrf2, NQO1, HO-1 蛋白与 mRNA 表达量均有不同程度升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );但对于 Keap1 的表达无明显作用。结论:苓桂术甘汤以及合方可能通过激活 Nrf2/ARE 信号通路,从而达到改善氧化应激,防治非酒精性脂肪性肝炎的目的。

**[关键词]** 苓桂术甘汤;茵陈蒿汤;非酒精性脂肪性肝炎;氧化应激;温运清利法

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)16-0108-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017160108

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170526.1030.048.html>

**[网络出版时间]** 2017-05-26 10:30

### Effect of Combined Prescription of Lingui Zhugan Tang and Yinchenhao Tang on Nrf2/ARE Signaling Pathway in Rats with Non-alcoholic Steatohepatitis

GUO Yi, LI Jun-xiang, MAO Tang-you, CHEN Chen, XIE Tian-hong,  
HAN Ya-fei, SHI Lei, TAN Xiang, HAN Hai-xiao  
(1. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effects of combined prescription of Lingui Zhugan Tang (LGZGT) and Yinchenhao Tang (YCHT) on Nrf2/ARE signaling pathway in rats with non-alcoholic steatohepatitis (NASH) from the perspective of oxidative stress, and investigate its mechanism for treating non-alcoholic steatohepatitis. **Method:** SPF grade SD rats were randomly divided into normal control group, model group, sulforaphane group

**[收稿日期]** 20170329(017)

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金项目(81503549);北京中医药大学自主选题中青年基金项目(2015-JYB-JSMS-110);北京中医药大学自主选题在读研究生项目(2016-JYB-XS170)

**[第一作者]** 郭一,在读博士,从事中西医结合防治消化系统疾病研究, Tel:010-67689751, E-mail: guoyixtdy@sina.com

**[通讯作者]** \*韩海啸,博士,副主任医师,从事中西医结合防治消化系统疾病研究, Tel:010-67689751, E-mail: hujiaofen@163.com

( $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), LGZGT group ( $3.465 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), YCHT group ( $3.465 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) and LGZGT + YCHT combination group ( $6.93 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). High-fat diet was given to establish NASH models, and the treatment was given at the same time for 8 weeks. Then the serum was harvested separately to detect the levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high-density lipoprotein (HDL-C), and low density lipoprotein (LDL-C); part liver tissues were taken for HE staining; Western blot and reverse transcription PCR were used respectively to detect the protein and mRNA expression levels of Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2), quinone oxidoreductase-1 (NQO1), and heme oxygenase-1 (HO-1). **Result:** As compared with normal control group, the levels of TC, TG, HDL-C and LDL-C in blood lipid and ALT, AST levels in serum were increased; liver fat became obvious; the expression level of Keap1 in liver was decreased; and, Nrf2, NQO1, HO-1 protein and mRNA expression levels were increased in the model group ( $P < 0.05$ ). As compared with the model group, the levels of TC, TG, HDL-C and LDL-C in blood lipid and ALT, AST levels in serum were decreased in various treatment groups, liver pathology was also improved to some extent; and Nrf2, NQO1, HO-1 protein and mRNA expression levels were increased in treatment groups ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ) except YCHT group. However, the levels of Keap1 didn't show obvious differences among the treatment groups. **Conclusion:** LGZGT and its combination formula may improve oxidative stress to prevent and treat NASH via activating Nrf2/ARE signaling pathway in the liver.

[**Key words**] Linggui Zhugan Tang; Yinchenhao Tang; non-alcoholic steatohepatitis; oxidative stress; Wenyun Qingli method

非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 是由多种原因引起的,以肝实质细胞脂肪变性和脂肪蓄积为特征的一类疾病,包括非酒精性单纯性脂肪肝 (NAFL),非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 及其相关的肝硬化 (NAC)。其中,NASH 是单纯性脂肪肝向肝癌转变过程中的重要限速环节。近年来,NAFLD 的患病率逐渐升高,普通成人 NAFLD 患病率达 20% ~ 33%<sup>[1]</sup>,目前认为胰岛素抵抗、氧化应激、脂质代谢紊乱是 NAFLD 的发生发展的主要因素<sup>[2]</sup>;核因子 E2-关联因子 2 (Nrf2)/Nrf2 识别抗氧化反应元件 (ARE) 通路是内源性抗氧化应答机制中重要的信号通路之一,其可以有效地改善机体氧化应激水平,调控抗氧化基因的表达,降低氧化活性物质对肝细胞的损伤,茵陈蒿汤与苓桂术甘汤作为《伤寒论》中的经典方剂,多年来被广泛应用于 NAFLD 的临床治疗中,疗效显著,本课题组前期研究表明,苓桂术甘汤与茵陈蒿汤在降低 NASH 大鼠血脂及肝功能水平,改善脂质代谢有一定作用<sup>[3-5]</sup>,但其机制尚缺乏深入研究,本研究拟通过研究 Nrf2/ARE 信号通路及下游相关基因及蛋白的表达,进一步探讨苓桂术甘汤与茵陈蒿汤合方对 NASH 的作用机制,为其临床应用提供科学依据。

## 1 材料

1.1 动物及饲料 雄性 SD 大鼠 60 只,体重

( $100 \pm 20$ ) g。购于北京斯贝福实验动物技术有限公司,动物合格证号 SCXK(京)2015-0006。本研究获得北京中医药大学实验动物伦理委员会(编号 BUCM-4-2016041201-2001)批准,符合中国伦理委员会有关动物研究指导原则。正常组采用普通饲料喂养,高脂饲料组配方为 88% 基础饲料 + 2% 胆固醇 + 10% 猪油,由科澳协力饲料有限公司生产,合格证号 SCXK(京)2014-0010。

1.2 药物及试剂 茵陈蒿汤(茵陈蒿 18 g, 栀子 9 g, 大黄 6 g);苓桂术甘汤(茯苓 12 g, 桂枝 9 g, 白术 6 g, 炙甘草 6 g),合方为 2 方剂量之和,均采用中药配方颗粒,由北京中医药大学东方医院颗粒药房提供;阳性药莱菔硫烷(美国 LKT Laboratories 公司,批号 L0036);总胆固醇(TC),甘油三酯(TG),高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C),低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C),丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂盒(英科新创科技有限公司,批号分别为 20160427,20160429,20160513,20160520,20160507,20160503);兔源细胞质接头蛋白 1 (Keap1)一抗,兔源 Nrf2 一抗,兔源醌氧化还原酶 1 (NQO1)一抗(英国 Abcam 公司,批号分别为 GR1815461,GR1916753,GR1915522);兔源血红素加氧酶 1 (HO-1)一抗(美国 Proteintech 公司,批号 AP1244)。

**1.3 仪器** Rm-2235 型石蜡切片机, EG1150H 型包埋机(德国莱卡公司); X71 型光学显微镜(日本 Olympus 公司); MULTISKAN MK3 型多功能酶标仪(美国 Thermo 公司); BYQ6072 型荧光定量 PCR 仪(博日 lineGene 公司); UVCI-01 型机载凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 造模与分组** 动物按体重随机分为 6 组, 分别为苓桂术甘汤组( $3.465 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), 茵陈蒿汤组( $3.465 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 合方组( $6.93 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 正常组, 模型组, 莱菔硫烷组( $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 每组 10 只。适应性喂养 7 d 后, 除正常组给予普通饲料外, 其余各组喂饲高脂饲料 8 周, 自由摄食饮水, 建立 NASH 模型<sup>[6]</sup>。造模同时给药, 给药 8 周, 正常组与模型组给予等体积蒸馏水灌胃, 给药容积  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 给药剂量根据动物体表面积比值核算, 给药期间继续高脂饲料喂养到给药结束, 取材, 检测各项指标。

**2.2 肝组织观察及血清生化指标检测** 取部分大鼠肝组织, 于 10% 福尔马林溶液中固定, 脱水, 包埋, 切片, 行苏木素-伊红(HE)染色观察 NASH 大鼠肝脏病理学改变; 腹主动脉取血, 收集大鼠全血, 静置后  $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min 后取上清, 根据试剂盒说明书检测血清酶学(ALT, AST)以及血脂水平(TG, TC, HDL, LDL)。

**2.3 蛋白免疫印迹(western blot)检测大鼠 Nrf2/ARE 通路蛋白表达的影响** 提取肝组织总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 取蛋白  $50 \mu\text{g}$  进行 10% 聚丙烯酰胺电泳, 湿法电转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1.5 h 后, 加入稀释的 Keap1 (1:1 000), Nrf2 (1:1 000), NQO1 (1:1 000), HO-1 (1:1 000) 一抗,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  摇床过夜, 洗膜后加入 1:1 万稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育 1 h, 最终用增强化学发光法(ECL)检测, PVDF 膜与化学发光底物孵育后, 经 X 胶片曝光显影。用凝胶成像仪机载 Labworks 软件分析, 以目的蛋白的灰度值与  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)的灰度值比值表示该样品的目的蛋白相对含量。

**2.4 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 法检测 Keap1, Nrf2, NQO1, HO-1 mRNA 的表达** 取组织约 100 mg, 用 TRIzol 一步法提取总 RNA 并测定浓度, 取总 RNA  $2 \mu\text{g}$ , 加入 RT 反应体系(含 AMV Buffer, dNTPs, Oligo dT Primer, AMV, Rnase Inhibitor)管中, 并用 DEPC 处理水补足到反应液体积  $50 \mu\text{L}$ , 震荡混匀后短暂离心, 加少许矿物油于 PCR 仪  $42 \text{ }^\circ\text{C}$  30 min (cDNA 合成),  $99 \text{ }^\circ\text{C}$  5 min (逆转录酶失活),  $5 \text{ }^\circ\text{C}$

$5 \text{ min}$ ,  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  保存备用。Keap1 引物上游引物 5'-TAACCGCTTAACTCGGCAG-3', 下游引物 5'-GGAGGCTACGAAAGTCCAGG-3', 扩增长度 205 bp; Nrf2 引物上游引物 5'-AGCAGGCTGAGACTACCACT-3', 下游引物 5'-TCCACTGAGGGGATCGATGA-3', 扩增长度 94 bp; NQO1 引物上游引物 5'-GATTGTATTGGCCCACGCAG-3', 下游引物 5'-GATTCGACCACCTCCCATCC-3', 扩增长度 99 bp; HO-1 引物上游引物 5'-GGGTCCTCACACTCAGTTTC-3', 下游引物 5'-CCAGGCATCTCCTTCCATTC-3', 扩增长度 184 bp;  $\beta$ -actin 引物上游引物: 5'-CCCATCTATGAGGGTTACG-3', 下游引物: 5'-TTTAATGTCACGCACGATTTTC-3', 扩增长度 150 bp, 反应参数为  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  10 min, ( $95 \text{ }^\circ\text{C}$  15 s,  $59 \text{ }^\circ\text{C}$  60 s), 共 45 个循环。实验重复 3 次, 以  $\beta$ -actin 作为内参; 取  $5 \mu\text{L}$  PCR 反应产物于 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 电压 120V, 用紫外透射仪观察并摄取图像, 用 Quantity One 4.6.2 凝胶定量分析软件进行半定量分析, 测定图像灰度值。各目的基因的光密度与  $\beta$ -actin 条带灰度值的比值作为 mRNA 表达水平参数。

**2.5 统计学分析** 采用 SPSS 20.0 统计软件分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 数据符合正态分布, 多个样本均数比较用单因素方差分析, 其中方差齐者用 LSD 法进行组间比较, 方差不齐者采用 Dunnett's T3 法进行组间比较; 数据不符合正态分布, 采用非参数检验, 组间比较采用两个独立样本的非参数检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学差异。

## 3 结果

**3.1 苓桂术甘汤与茵陈蒿汤及合方对 NASH 大鼠肝功能以及血脂的影响** 模型组血清 ALT, AST 水平均明显高于正常组 ( $P < 0.05$ ), 苓桂术甘汤与茵陈蒿汤及合方组与莱菔硫烷组血清 ALT, AST 水平均较模型组均明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 1。与正常组比较, 模型组血清 HDL-C 含量明显降低, 血清 LDL, TG, TC 明显增加, 均具有统计学差异 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 各给药组血清 HDL-C 含量未见明显变化, 无统计学差异; 与模型组比较, 苓桂术甘汤与合方组以及莱菔硫烷组大鼠血清 TC 含量均降低, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 除苓桂术甘汤组外, 各给药组大鼠血清 TG 含量均显著性降低, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 与模型组比较, 除苓桂术甘汤组外, 各给药组大鼠血清 LDL-C 含量均明显降低 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 1 苓桂术甘汤与茵陈蒿汤及合方对 NASH 大鼠血清 AST, ALT 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

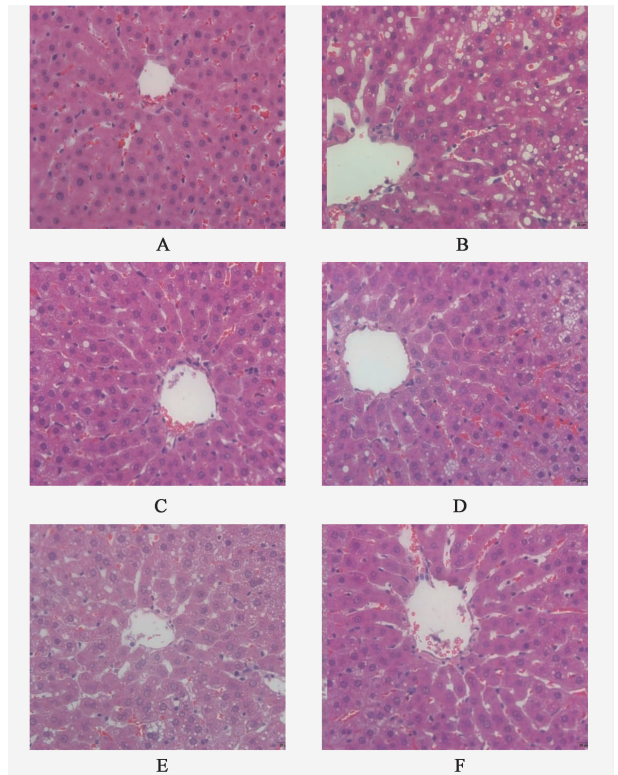
Table 1 Effect of Lingui Zhugan Tang (LGZGT), Yinchenhao Tang (YCHT) and combination on serum AST, ALT in NASH rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ ) U·L<sup>-1</sup>

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	AST	ALT
正常	-	147.26 ± 13.18	36.58 ± 11.87
模型	-	233.34 ± 10.64 <sup>1)</sup>	57.52 ± 8.85 <sup>1)</sup>
合方	6.93	136.23 ± 10.83 <sup>3)</sup>	38.14 ± 10.35 <sup>2)</sup>
苓桂术甘汤	3.465	151.36 ± 17.54 <sup>2)</sup>	41.30 ± 9.54 <sup>2)</sup>
茵陈蒿汤	3.465	183.71 ± 15.38 <sup>2)</sup>	39.97 ± 8.32 <sup>2)</sup>
莱菔硫烷	0.000 5	185.37 ± 9.57 <sup>2)</sup>	36.62 ± 10.34 <sup>2)</sup>

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

**3.2 苓桂术甘汤与茵陈蒿汤及合方对 NASH 大鼠肝组织病理学的影响** 正常组着色均匀,肝索排列整齐呈放射状,肝细胞排列整齐,呈多边形,无损坏,细胞核位于细胞中央,细胞质内无空泡;模型组存在明显的肝细胞脂肪变性,肝索结构紊乱,可见弥漫性、混合性的空泡及气球样改变;各治疗组病变较模型组均有不同程度的减轻,肝索结构较前规则,胞内脂质沉积及炎性细胞减少,肝小叶、汇管区、肝索的结构得到不同程度的恢复。见图 1。

**3.3 苓桂术甘汤与茵陈蒿汤及合方对 Nrf2/ARE 信号通路相关蛋白表达的影响** 与正常组比较,模



A. 正常组;B. 模型组;C. 合方组;D. 苓桂术甘汤组;E. 茵陈蒿汤组;F. 莱菔硫烷组(图 2 同)

图 1 苓桂术甘汤与茵陈蒿汤及合方对 NASH 大鼠肝组织病理水平的影响(HE, ×200)

Fig. 1 Effect of LGZGT, YCHT and combination on hepatic histopathology in NASH rats (HE, ×200)

表 2 苓桂术甘汤与茵陈蒿汤及合方对 NASH 大鼠血脂水平含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	HDL-C	LDL-C	TC	TG
正常	-	0.63 ± 0.06	0.38 ± 0.11	0.61 ± 0.09	0.36 ± 0.09
模型	-	0.52 ± 0.10 <sup>1)</sup>	0.46 ± 0.15 <sup>1)</sup>	0.85 ± 0.13 <sup>1)</sup>	0.82 ± 0.06 <sup>1)</sup>
合方	6.93	0.58 ± 0.12	0.30 ± 0.08 <sup>2)</sup>	0.58 ± 0.10 <sup>2)</sup>	0.47 ± 0.08 <sup>2)</sup>
苓桂术甘汤	3.465	0.53 ± 0.08	0.35 ± 0.12 <sup>2)</sup>	0.61 ± 0.15 <sup>2)</sup>	0.65 ± 0.12
茵陈蒿汤	3.465	0.55 ± 0.11	0.33 ± 0.08 <sup>2)</sup>	0.65 ± 0.12	0.61 ± 0.09 <sup>2)</sup>
莱菔硫烷	0.000 5	0.56 ± 0.06	0.36 ± 0.16 <sup>2)</sup>	0.56 ± 0.07 <sup>2)</sup>	0.40 ± 0.11 <sup>3)</sup>

型组 Keap1 蛋白表达量降低, Nrf2, NQO1, HO-1 蛋白表达量升高 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,各给药组 Keap1 蛋白表达量无明显变化;合方组与莱菔硫烷组 Nrf2 蛋白表达量明显升高 ( $P < 0.05, P <$

$0.01$ );各给药组 NQO-1 蛋白表达量较模型组有升高趋势;除茵陈蒿汤组外,各给药组 HO-1 蛋白表达量较模型组显著升高 ( $P < 0.01$ )。见表 3 及图 2。

表 3 苓桂术甘汤与茵陈蒿汤及合方对 NASH 大鼠肝组织 Nrf2/ARE 信号通路相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Keap1/β-actin	Nrf2/β-actin	NQO-1/β-actin	HO-1/β-actin
正常	-	0.56 ± 0.11	0.26 ± 0.08	0.16 ± 0.06	0.11 ± 0.08
模型	-	0.45 ± 0.09 <sup>1)</sup>	0.39 ± 0.12 <sup>1)</sup>	0.39 ± 0.05 <sup>1)</sup>	0.41 ± 0.16 <sup>1)</sup>
合方	6.93	0.40 ± 0.07	0.51 ± 0.09 <sup>2)</sup>	0.45 ± 0.09	0.68 ± 0.09 <sup>3)</sup>
苓桂术甘汤	3.465	0.45 ± 0.07	0.48 ± 0.13	0.49 ± 0.12	0.71 ± 0.11 <sup>3)</sup>
茵陈蒿汤	3.465	0.36 ± 0.15	0.40 ± 0.13	0.40 ± 0.06	0.39 ± 0.09
莱菔硫烷	0.000 5	0.42 ± 0.10	0.85 ± 0.07 <sup>3)</sup>	0.45 ± 0.11	0.65 ± 0.11 <sup>3)</sup>

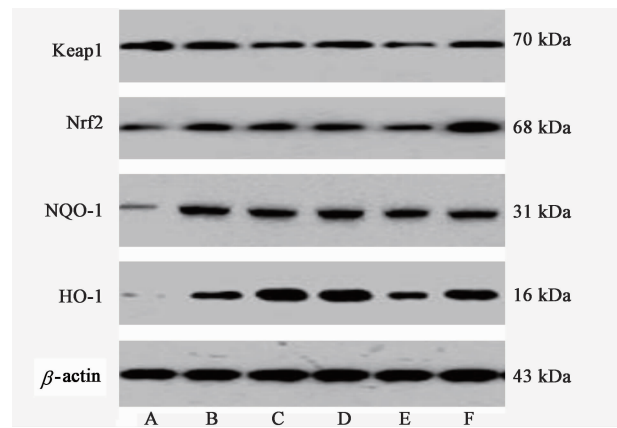


图 2 NASH 大鼠 Nrf2/ARE 信号通路蛋白的表达  
Fig. 2 Expression of proteins in Nrf2/ARE signaling pathway in NASH rats

表 4 苓桂术甘汤与茵陈蒿汤及合方对 NASH 大鼠肝组织 Nrf2/ARE 信号通路相关基因表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 4 Effect of LGZGT, YCHT and combination on genes in Nrf2/ARE signaling pathway in NASH rats ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	Keap1	Nrf2	NQO-1	HO-1
正常	-	3.11 ± 0.45	1.01 ± 0.48	0.97 ± 0.43	1.02 ± 0.53
模型	-	2.52 ± 0.57 <sup>1)</sup>	1.42 ± 0.55 <sup>1)</sup>	2.01 ± 0.54 <sup>1)</sup>	1.38 ± 0.57 <sup>1)</sup>
合方	6.93	2.35 ± 0.48	1.70 ± 0.49 <sup>2)</sup>	2.49 ± 0.47 <sup>2)</sup>	1.77 ± 0.69 <sup>2)</sup>
苓桂术甘汤	3.465	2.58 ± 0.56	1.65 ± 0.51 <sup>2)</sup>	2.35 ± 0.46 <sup>2)</sup>	1.71 ± 0.52 <sup>2)</sup>
茵陈蒿汤	3.465	2.34 ± 0.36	1.37 ± 0.65	2.05 ± 0.35	1.44 ± 0.45
莱菔硫烷	0.000 5	2.31 ± 0.55	2.26 ± 0.62 <sup>3)</sup>	2.44 ± 0.41 <sup>2)</sup>	1.86 ± 0.51 <sup>2)</sup>

常表达,氧化应激,凋亡易感性增加等多方面因素有关<sup>[7]</sup>,而较为普遍接受的“二次打击”学说。最新的研究证实,初次打击主要表现为脂质代谢紊乱和 IR<sup>[8-10]</sup>。在此基础上,许多损肝因素通过氧化应激及脂质过氧化对脂肪变的肝脏实施第二次打击,导致肝细胞发生炎症反应、变性坏死,并可向纤维化甚至肝硬化进展。在“二次打击”中,肝细胞内的脂质积聚和 IR 是基础,而氧化应激及脂质过氧化,尤其是氧化应激是 NAFL 向 NASH 发展的关键环节。当 FFA 被大量氧化,产生过多的活性氧簇(ROS),超过抗氧化系统的清除能力时,便以线粒体为中心,形成一条或多条途径,促进氧化应激,造成抗氧化/氧化系统平衡失调,从而对机体组织和细胞进行攻击,最终导致肝细胞凋亡。因此,研究抗氧化/氧化系统的平衡机制对于 NASH 的防治将起着非常重要的作用,而 Nrf2/ARE 通路参与了这个过程。

Nrf2/ARE 信号通路是内源性抗氧化应答机制中重要的信号通路之一,处于氧化应激的中心地位。Nrf2 作为该通路的一个关键蛋白,是一种在细胞内环境稳定过程中起重要作用的转录因子。Nrf2 具有 6 个 NRF2-ECH 同源区,即 Neh1-Neh6,其中 Neh1 位于 C 端,是 Nrf2 识别抗氧化反应元件(ARE)并与

3.4 苓桂术甘汤与茵陈蒿汤及合方对 Nrf2/ARE 信号通路相关基因表达的影响 与正常组比较,模型组 Keap1 mRNA 水平降低, Nrf2, NQO1, HO-1 mRNA 表达量升高 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,各给药组 Keap1 mRNA 表达量无明显变化;合方组、苓桂术甘汤组、莱菔硫烷组 Nrf2 mRNA 表达量明显升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ );除茵陈蒿汤组外,各给药组 NQO-1 mRNA 表达量较模型组升高明显 ( $P < 0.05$ );除茵陈蒿汤组外,各给药组 HO-1 mRNA 表达量较模型组明显升高 ( $P < 0.05$ )。见表 4。

#### 4 讨论

已知 NAFLD 的发病机制与胰岛素抵抗(IR),肝内脂质积聚,炎症因子,内质网应激,脂肪因子异

之结合、启动目标基因转录的重要前提<sup>[11]</sup>。Keap1 最初被认为是一种细胞因子,其在未受刺激条件下,能够结合并隔离胞浆中的 Nrf2。在氧化应激源的作用下,Keap1 上的 2 个半胱氨酸位点 C273 和 C288 被同时修饰,致使 Keap1 与 Nrf2 的偶联减弱或消除,致使 Nrf2 与 Keap1 解偶联后转入核内,在细胞核中形成异源二聚体,并与特异性配偶体相互结合,最终激活 ARE 依赖基因的表达。ARE 是一个顺式作用增强子或调控组件,存在于多种基因的增强子区域中,能够编码抗氧化剂基因的表达,增加细胞对氧化应激的抵抗性,从而发挥保护作用。抗氧化剂基因包括 HO-1, NQO1 等。HO-1 是血红素降解的限速酶,一方面与其阻止游离血红素参与氧化反应有关,另一方面,HO-1 及其酶解产物胆红素,CO 共同发挥着抗氧化、抗炎、抑制细胞凋亡和扩血管、改善组织微循环等作用。NQO1 是绝大多数其核生物细胞中存在的一种黄素蛋白酶,可以减少氧化自由基的产生,降低氧化活性物质对细胞的损伤,有着一定的抗氧化效应。莱菔硫烷是一种广泛存在于十字花科蔬菜的异硫氰酸盐,具有抗氧化、抗肿瘤和免疫调节等多种生物学特性。其作为是一种间接的抗氧化剂,是 Nrf2/ARE 信号通路重要的激活剂,

正向调控抗氧化蛋白和Ⅱ相解毒酶的表达,清除自由基从而对机体细胞起到保护作用。

本研究结果显示,从基因与蛋白表达水平而言,与正常组比较,模型组 Keap1 表达水平降低,Nrf2,NQO-1,HO-1 水平升高,显示模型组在高脂饮食的诱导下,Nrf2/ARE 信号通路在一定程度上处于激活状态,给药后各给药组在 Keap1 的表达水平上较模型组并无明显差异,但茵陈蒿汤组外,各给药组 Nrf2,NQO-1,HO-1 的表达水平均有不同程度提高,说明苓桂术甘汤以及合方组对 Nrf2/ARE 信号通路有一定的激活作用,并且可能是通过截断 Keap1 与 Nrf2 的连接并上调 Nrf2 的表达实现的,但并未对 Keap1 的表达水平有直接影响,茵陈蒿汤在基因与蛋白 2 个层面上各指标表达水平较模型组均较模型组无明显差异,故本方降低血脂、改善肝功能水平的作用机制可能并非通过 Nrf2/ARE 信号通路实现,有待进一步研究。

NASH 的病程较长,病因病机较为复杂,在其病机演变过程中各种病因相互影响,互为因果。目前认为 NASH 的病因病机是嗜食肥甘厚味,饮食不节伤脾或多逸少动,体丰痰盛,导致脾失健运,生湿酿痰;情志失调,肝失疏泄,木克脾土,脾失健运,生湿酿痰;或禀赋不足,过劳伤肾,肾气虚弱,气化失司,均可致精微不归正化,反为痰湿瘀浊之糟粕,诸邪郁久化热,酿生湿热,壅塞肝络,结于胁下,缠绵难解。苓桂术甘汤是温化痰饮的代表方,出自《伤寒论》,为中焦阳气不足,脾失健运,湿聚为饮之证而设。痰饮为患,流动不拘,所停之处皆可为病,表现不一。痰饮留结心下,则胸胁支满;饮走肠间,则沥沥有声;流于四肢,则肢肿;痰饮停聚于肝,则发为脂肪肝。痰饮属阴,阻遏阳气,遇寒凝聚,得温则化,温药者,振奋阳气,阳气来复则阴翳得开,故“病痰饮者,当以温药和之”。柳涛等<sup>[12]</sup> 研究显示,肝郁、痰、湿、瘀、热等因素一般不独立存在,多在气虚或阳虚的基础上单独或联合致病,配伍苓桂术甘汤可以提高 NASH 的治疗效果。茵陈蒿汤是清利湿热的代表方剂,始载于《伤寒论》,具有清热、利湿、退黄之功,以“清”、“利”为法,主治湿热黄疸,作为治疗肝胆疾病的经典名方,在临床上被广泛使用。因苓桂术甘汤着眼中焦,茵陈蒿汤擅入肝胆,两方合用,兼顾肝脾,即可运化脾胃蕴积之痰浊,又可清利肝胆郁积之湿热,温运清利并用,增强疗效<sup>[13-14]</sup>。

综上所述,在高脂饮食诱导的 NASH 模型中,苓桂术甘汤以及合方通过对 Nrf2/ARE 信号通路的影

响,进而调控下游基因 NQO-1 与 HO-1 的表达,从而达到改善氧化应激,恢复机体抗氧化/氧化系统的平衡,从而发挥肝细胞的保护作用。

[参考文献]

- [1] Masarone M, Federico A, Abenavoli L, et al. Non alcoholic fatty liver: epidemiology and natural history [J]. Rev Recent Clin Trials, 2014, 9(3):126-133.
- [2] Tilg H, Moschen A R. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis [J]. Hepatology, 2010, 52(5):1836-1846.
- [3] 刘莹,张会存,段娜,等.茵陈蒿汤对高脂饮食诱导大鼠非酒精性脂肪性肝炎的药效学观察[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(13):217-222.
- [4] 刘莹,陈晓伟,李健,等.茵陈蒿汤拆方对非酒精性脂肪性肝炎的正交实验研究[J].中国中西医结合消化杂志,2013,21(4):182-188.
- [5] 毛堂友,韩海啸,赵唯含,等.苓桂术甘汤对 NASH 大鼠肝组织 DGAT2、PKC $\epsilon$  的作用研究[J].中国中西医结合消化杂志,2016,24(2):87-91.
- [6] 周媛媛,刘春杰,楚宪襄,等.大蒜素对非酒精性脂肪性肝病模型大鼠的治疗作用及 TNF- $\alpha$  蛋白、SREBP-1c 蛋白的影响[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(13):127-130.
- [7] Tilg H, Moschen A R. Evolving therapies for non-alcoholic steatohepatitis [J]. Expert Opin Drug Discov, 2014, 9(6):687-696.
- [8] Wree A, Broderick L, Canbay A, et al. From NAFLD to NASH to cirrhosis-new insights into disease mechanisms [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2013, 10(11):627-636.
- [9] Michelotti G A, Machado M V, Diehl A M. NAFLD, NASH and liver cancer [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2013, 10(11):656-665.
- [10] Kumashiro N, Erion D M, ZHANG D, et al. Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(39):16381-16385.
- [11] Chowdhry S, ZHANG Y, McMahon M, et al. Nrf2 is controlled by two distinct  $\beta$ -TrCP recognition motifs in its Neh6 domain, one of which can be modulated by GSK-3 activity [J]. Oncogene, 2012, 32(32):3765-3781.
- [12] 柳涛,唐志鹏,季光.温阳化气论治非酒精性脂肪性肝病[J].结合医学学报:英文版,2011,9(2):135-137.
- [13] 毛堂友,高康丽,赵唯含,等.温运清利法对非酒精性脂肪性肝炎大鼠肝组织 DAG-PKC $\epsilon$  信号通路的作用研究[J].环球中医药,2016,9(8):908-913.
- [14] 朱丹,孙婷婷,陈兰羽.《金匱要略》诸方治疗非酒精性脂肪性肝病进展[J].长春中医药大学学报,2016,32(2):423-425.

[责任编辑 周冰冰]