

血府逐瘀汤与加味二陈汤对小鼠非酒精性脂肪肝的作用比较

郭宏雅¹, 付远飞², 刘惠婷^{1,2}, 王剑^{1,2*}

(1. 广州中医药大学 基础医学院, 广州 510006;

2. 广州中医药大学 中西医结合基础研究中心, 广州 510006)

[摘要] 目的:观察比较血府逐瘀汤和加味二陈汤对高脂饮食诱导的载脂蛋白E敲除(ApoE^{-/-})小鼠非酒精性脂肪肝(NAFLD)的改善作用及机制。方法:10只C57/BL6J小鼠为正常组,以一般饲料喂养,30只ApoE^{-/-}小鼠为造模组,以高脂饲料喂养4周,后分为模型组、血府逐瘀汤组(以下简称为活血组)和加味二陈汤组(以下简称为化痰组),每组10只。正常组及模型组灌胃生理盐水,给药组以成人剂量的10倍予以灌胃,每天1次,共8周,于12周实验结束后取小鼠血清和肝脏。蛋白免疫印迹法(Western blot)与实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)测定各组血清血脂和肝功水平,观察肝脏病理形态,检测肝脏炎症介质白细胞介素-1 β (IL-1 β),肿瘤坏死因子- α (TNF- α),基质金属蛋白酶-9(MMP-9),单核细胞趋化因子-1(MCP-1)蛋白和mRNA表达水平。结果:血清血脂与肝功结果显示,与正常组比较,模型组小鼠血清总胆固醇(TC),甘油三酯(TG),低密度脂蛋白(LDL),天门冬氨酸氨基转移酶(AST),丙氨酸氨基转移酶(ALT)显著升高,高密度脂蛋白(HDL)显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,活血组小鼠血清TG,LDL,ALT明显降低,HDL明显升高($P < 0.05$);化痰组小鼠血清TC,TG,LDL,AST,ALT明显降低,HDL明显升高($P < 0.05, P < 0.01$),其中化痰组小鼠血清HDL升高幅度较活血组高,活血组小鼠血清ALT降低幅度较化痰组大。病理学观察显示,与正常组比较,模型组肝细胞脂肪变性严重,存在许多脂滴空泡,提示小鼠NAFLD模型成功;与模型组比较,各给药组均减轻肝细胞脂肪性变,两给药组间并无显著差异。Western blot与Real-time PCR结果显示,与正常组比较,模型组TNF- α ,IL-1 β ,MCP-1,MMP-9的蛋白与mRNA表达水平明显升高($P < 0.05, P < 0.01$);与模型组比较,活血组可明显下调IL-1 β ,MCP-1蛋白和MCP-1 mRNA的表达($P < 0.05, P < 0.01$),化痰组可明显降低IL-1 β ,TNF- α ,MMP-9,MCP-1蛋白和TNF- α ,MMP-9 mRNA的表达($P < 0.05, P < 0.01$)。结论:加味二陈汤和血府逐瘀汤均可在一定程度上对NAFLD小鼠起到治疗改善的作用,其中加味二陈汤的治疗效果更佳。

[关键词] 血府逐瘀汤; 加味二陈汤; 非酒精性脂肪肝; 白细胞介素-1 β (IL-1 β); 肿瘤坏死因子- α (TNF- α); 基质金属蛋白酶-9(MMP-9); 单核细胞趋化因子-1(MCP-1)

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2020)12-0071-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201103

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200304.1247.002.html>

[网络出版日期] 2020-3-4 15:13

Comparation on Effect of Xuefu Zhuyutang and Modified Erchentang on Nonalcoholic Fatty Liver in Mice

GUO Hong-ya¹, FU Yuan-fei², LIU Hui-ting^{1,2}, WANG Jian^{1,2*}

(1. Basic Medical School, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. Basic Research Center of integrated Chinese and Western Medicines, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the effect and mechanisms of modified Erchentang and Xuefu Zhuyutang on high-fat diet-induced apolipoprotein-E knockout (ApoE^{-/-}) mice nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Method:** Ten C57/BL6J mice were taken as normal control group and fed with normal feed. Totally

[收稿日期] 20191011(018)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(8187151662)

[第一作者] 郭宏雅,在读硕士,从事中医药防治心血管病的研究,E-mail:986502321@qq.com

[通信作者] *王剑,博士,教授,从事中医药延缓衰老的研究,E-mail:zswj@gzucm.edu.cn

30 ApoE^{-/-} mice were fed with high-fat diet to establish a disease model for 4 weeks. After 4 weeks, the 30 ApoE^{-/-} mice were divided into model group, Xuefu Zhuyutang group (hereinafter referred to as Huoxue group) and modified Erchentang group (hereinafter referred to as Huatan group) by random number table method, with 10 in each group. The normal group and the model group were intragastrically administered with normal saline. The drug-administered group was intragastrically administered at a dosage that was ten times of the adult dose, once a day, for 8 weeks. Serum and liver were collected after the end of the 12-week experiment. The serum lipid and liver function levels of each group were measured, and the liver pathological morphology was observed. Protein and mRNA expressions of liver inflammatory mediators interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), monocyte chemotactic factor-1 (MCP-1) were detected by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot. **Result:** The results of serum lipids and liver function showed that compared with the normal group, serum total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low-density lipoprotein (LDL), aspartate aminotransferase (AST), and alanine aminotransferase (ALT) in the model group were significantly increased, while serum high-density lipoprotein (HDL) was significantly reduced ($P < 0.01$). Compared with the model group, serum TG, LDL and ALT were significantly decreased, HDL was significantly increased in the Huoxue group ($P < 0.05$). The serum levels of TC, TG, LDL, AST and ALT in the Huatan group were significantly decreased, HDL was significantly increased ($P < 0.05, P < 0.01$), and TG was decreased. The mice serum HDL in the Huatan group was higher than that in the Huoxue group. The serum ALT in the Huoxue group was lower than that in the Huatan group. The pathological observation showed that compared with the normal group, hepatocytes in the model group had severe steatosis with many lipid droplet vacuoles, suggesting that the mouse NAFLD model was successful. Compared with the model group, each administration group alleviated hepatocyte steatosis, with no significant difference between the two administration groups. Western blot and Real-time PCR results showed that compared with the normal group, protein and mRNA expression levels of TNF- α , IL-1 β , MCP-1, and MMP-9 in the model group were significantly increased ($P < 0.05, P < 0.01$). Compared with the model group, the Huoxue group significantly down-regulated the expressions of IL-1 β , MCP-1 protein and MCP-1 mRNA ($P < 0.05, P < 0.01$). The Huatan group significantly reduced the expressions of IL-1 β , TNF- α , MMP-9, MCP-1 protein, TNF- α and MMP-9 mRNA ($P < 0.05, P < 0.01$). **Conclusion:** Modified Erchentang and Xuefu Zhuyutang can alleviate the therapeutic effect of NAFLD mice to a certain extent, modified Erchentang has a better therapeutic effect.

[Key words] Xuefu Zhuyutang; modified Erchentang; nonalcoholic fatty liver; interleukin-1 β (IL-1 β); tumor necrosis factor- α (TNF- α); matrix metalloproteinase-9 (MMP-9); cell chemokine-1 (MCP-1)

非酒精性脂肪肝病(NAFLD)是指无饮酒史及其他明显损肝因素所导致的以肝细胞弥漫样脂肪变为病理特征的临床慢性综合症。其中炎症在病变过程中发挥重要病理作用。现代生活节奏快,压力大,人们饮食结构不合理,都无疑给肝脏健康带来巨大威胁,NAFLD已成为影响人们健康的危险因素之一,成为我国仅次于病毒性肝炎的第2大肝病,因此,NAFLD日益引起了人们的关注和重视,而目前尚无有确切疗效的药物可供选择,临床上治疗NAFLD的常用药物为他汀类降脂药物,但这类药物具有加重肝脏负担的危害^[1],寻找能够改善脂肪肝的药物成了研究的热点。

中医没有专门针对NAFLD标准统一的病名,现代中医根据其临床表现和病位,将其归为“胁痛”“痞满”“湿阻”“肥气”“积证”“痰证”等范畴^[2]，“痰瘀互结”为其基本病机^[3]。根据这些理论,本次实验选用了经典化痰方剂二陈汤另加化痰中药瓜蒌与薤白,和经典活血方剂血府逐瘀汤对模型小鼠进行治疗。二陈汤出自《太平惠民和剂局方》,由法半夏、橘皮、白茯苓、炙甘草、生姜、乌梅组成,具有健脾燥湿化痰,理气和中的功效,本方另加瓜蒌、薤白,增强化痰散结之力。血府逐瘀汤出自王清任的《医林改错》,由桃仁、红花、生地黄、当归、牛膝、赤芍、枳壳、甘草片、川芎、桔梗、北柴胡组成,具有活血化

瘀、行气止痛的功效^[4]。目前有文献报道二者均可改善NAFLD。包永生等^[5]总结文献发现在临床观察和药理实验中二陈汤对NAFLD有良好的治疗作用,临床观察发现二陈汤可改善患者肝功和血脂水平^[6-8],姚政等^[9]通过灌胃NAFLD模型大鼠二陈汤发现除可降低血脂和肝功外,还可显著降低解偶联蛋白2(UCP2) mRNA的表达,丁珊珊等^[10]通过实验发现二陈汤治疗NAFLD可能是通过磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路。目前血府逐瘀汤治疗NAFLD的研究多为临床研究,通过临床观察发现血府逐瘀汤可有效改善NAFLD患者的血脂和肝功^[11-13]。但对他们治疗NAFLD的作用机制研究甚少。血府逐瘀汤与加味二陈汤同为临床常用方,那么二者对NAFLD的作用机制及治疗效果有何差异,本研究从血脂、肝功、病理水平以及炎症因子的表达4个方面着手,来探讨血府逐瘀汤与加味二陈汤对NAFLD模型小鼠治疗改善的机制及疗效的差异,以期对临床用药起到一定的指导作用。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性C57/BL6J小鼠10只,8周,购自斯贝福(北京)生物科技有限公司,合格证号SCXK(京)2016-0002,SPF级雄性载脂蛋白E敲除(ApoE^{-/-})小鼠30只,8周,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,动物合格证号SCXK(京)2014-0004。动物饲养于广州中医药大学基础医学院中西医结合基础研究中心SPF动物房,12h照明,自由摄食饮水,实验过程中动物的处置方法符合广州中医药大学动物伦理委员会规范。

1.2 药物与试剂 血府逐瘀汤:桃仁36g,红花、生地、当归、牛膝27g,赤芍、枳壳、甘草片18g,川芎、桔梗13.5g,柴胡9g。加味二陈汤:法半夏、橘红、全瓜蒌、薤白45g,茯苓27g,炙甘草18g,生姜3片、乌梅3个,药材均购自广州臻品医药有限公司,批号181101,以上中药饮片均由广州中医药大学王剑教授鉴定符合2015年版《中国药典》规范。蒸馏水浸泡30min,煎煮3次,滤液浓缩为含生药量1g·mL⁻¹。高脂饲料(北京华阜康生物科技股份有限公司,批号H10141);总胆固醇(TC),甘油三酯(TG),低密度脂蛋白(LDL),高密度脂蛋白(HDL)生化试剂盒,丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST)酶联免疫吸附测定(ELISA)检测试剂盒(南京建成生物科技股份有限公司,货号分别为A111-1-1,A110-1-1,A113-1-1,A112-1-1,C009-2-1,C010-2-

1);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号C0105);基质金属蛋白酶-9(MMP-9),单核细胞趋化因子-1(MCP-1)抗体(英国Abcam公司,货号分别为ab58803,ab7202);鼠抗肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-1 β (IL-1 β)单克隆抗体(北京博奥森生物工程有限公司,货号分别为bsm-33207m,bs-0812R);抗 β -tubulin鼠单克隆抗体,山羊抗小鼠免疫球蛋白(Ig)G二抗,山羊抗兔IgG二抗,trizol总RNA提取试剂(北京康为世纪生物科技有限公司,货号分别为CW0098M,CW0102,CW0103,CW0580);全蛋白提取试剂盒(强)(北京索莱宝科技有限公司,批号BC3710);BCA蛋白定量试剂盒(广州速聚生物科技有限公司,批号UW0202C);SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(上海碧云天生物技术有限公司,批号P0015L);一步法凝胶制备试剂盒(杭州弗德生物科技有限公司,货号FD346);0.45 μ m PVDF膜(美国Millipore公司,批号IPVH00010);StarScript II cDNA第一链合成预混试剂(含去基因组),2 \times 预混实时荧光定量快速PCR反应体系(北京康润科技有限公司,货号分别为A224-02,A301-10);小鼠MMP-9,IL-1 β ,TNF- α ,MCP-1,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司设计完成,引物序列见表1。

表1 PCR引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR

引物	序列(5'-3')	长度/bp
MMP-9	上游CAAAGACCTGAAAACCTCCAAC	105
	下游GACTGCTTCTCTCCCATCATC	
TNF- α	上游GCGACGTGGAAGTGGCAGAAG	103
	下游GCCACAAGCAGGAATGAGAAGAGG	
IL-1 β	上游CTGTGGAGAAGCTGTGGCAG	178
	下游CGGAGCCTGTAGTGCAGTTG	
MCP-1	上游CCACTCACCTGCTGCTACTCATTC	83
	下游CTGCTGCTGGTGATCCTCTGTAG	
GAPDH	上游CAAGGCTGTGGGCAAGGTCATC	110
	下游TCTCCAGCGGCACGTCAG	

1.3 仪器 HR/T16M型台式高速冷冻离心机(湖南贺西仪器装备有限公司);imark型多功能酶标仪, powerpac basic型迷你型电泳仪及转膜装置, T100 Thermal Cycler型普通PCR仪,CFX Connect Optics Module型实时荧光定量PCR(Real-time PCR)仪(美国伯乐公司);HistCore Arcadia H型石蜡包埋机, RM2245型半自动轮转式石蜡切片机

(德国莱卡显微系统有限公司);BX46型显微镜,DP27型摄像头,联想 ThinkCentre M8500t-D303 电脑病理图像分析系统(日本奥林巴斯公司);Tanno5200型全自动化学发光仪(上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组及造模 参考文献[14]的方法,所有实验动物以普通饲料适应性喂养1周后,10只c57小鼠为正常组,继续以普通生长饲料喂养,30只ApoE^{-/-}小鼠为造模组,以高脂饲料喂养4周,4周后采用随机数字表法将造模组分为模型组,血府逐瘀汤组(12.99 g·kg⁻¹),加味二陈汤组(12.49 g·kg⁻¹),每组10只。正常组及模型组灌胃生理盐水,给药组以成人剂量的10倍予以灌胃,各组灌胃体积相同,每天1次,共灌胃8周,期间血府逐瘀汤组灌胃致死2只。整个实验周期为12周。在取材前12h禁食不禁水,第2天用水合氯醛麻醉,摘除眼球取血,取肝脏。

2.2 生化试剂盒检测血清TC, TG, LDL-C, HDL的含量 小鼠全血3 000 r·min⁻¹离心10 min后取血清,分别选用COD-PAP法, GPO-PAP法,双试剂直接法进行检测(严格按照南京建成试剂盒的说明进行操作),用酶标仪测定TC, TG在510 nm波长, LDL-C, HDL-C在546 nm波长的吸光度A,以此计算血清中各指标的浓度。

2.3 ELISA测定血清ALT, AST的水平 小鼠全血3 000 r·min⁻¹离心10 min后取血清,二者均选用ELISA法进行检测,严格按照试剂盒的说明进行操作,用酶标仪测定在510 nm波长的A,以此计算血清中各指标的浓度。

2.4 HE染色观察肝组织病理学变化 新鲜取下的组织经4%多聚甲醛固定后,采用乙醇梯度脱水,二甲苯透明,浸蜡后石蜡包埋,以5 μm的厚度做连续切片,行HE染色,中性树胶封片后,光学显微镜下进行组织病理学观察。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肝脏MMP-9, TNF- α , IL-1 β , MCP-1蛋白的表达 每组取肝脏组织约50 mg,采用全蛋白试剂盒进行蛋白提取,全程在冰上操作,BCA测蛋白浓度,将各样品蛋白浓度以裂解液调整一致,加入5 \times 上样缓冲液,变性5 min,200 V电压电泳后,250 mA转至PVDF膜上,5%牛奶室温封闭2 h,一抗(1:1 000)4 $^{\circ}$ C孵育过夜, TBST洗膜5 min, 5次,二抗(1:5 000)室温孵育1 h, TBST洗膜5 min, 5次, ECL显影。用Image J软件分析条带灰度值,以目标蛋白条带灰度值与

β -tublin的比值作为蛋白表达量。

2.6 Real-time PCR检测肝脏MMP-9, TNF- α , IL-1 β , MCP-1 mRNA的表达 每组取组织约30 mg于冰上匀浆,加入trizol 1 mL,室温放置5 min,加入三氯甲烷0.2 mL,剧烈摇晃15 s,室温放置3 min, 12 000 r·min⁻¹, 4 $^{\circ}$ C离心15 min,取上层水相,加入异丙醇0.5 mL,室温静置10 min, 12 000 r·min⁻¹, 4 $^{\circ}$ C离心10 min,弃上清,留沉淀,加75%乙醇1 mL洗涤,涡旋,7 500 r·min⁻¹, 4 $^{\circ}$ C离心5 min,得到总RNA,按照StarScript II cDNA第一链合成预混试剂盒的方法逆转录为cDNA,采用SYBR荧光法Real-time PCR实验,将反应混合物放入PCR仪扩增,95 $^{\circ}$ C 2 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s(40个循环)记录样本扩增反应的C_t值,运用2^{- $\Delta\Delta$ C_t}法计算基因相对表达量。

2.7 统计学分析 采用SPSS 20.0统计软件对数据进行统计分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),以P<0.05为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对NAFLD小鼠血清TC, TG, LDL, HDL含量的影响 与正常组比较,模型组小鼠血清TC, TG, LDL显著升高, HDL显著降低(P<0.01);与模型组比较,血府逐瘀汤组小鼠血清TG, TC, LDL明显降低(P<0.05), HDL明显升高(P<0.05),加味二陈汤组小鼠血清TG, TC, LDL明显降低(P<0.05, P<0.01), HDL显著升高(P<0.01),其中加味二陈汤组小鼠血清HDL升高幅度高于血府逐瘀汤组。见表2。

3.2 对NAFLD小鼠血清AST, ALT水平的影响 与正常组比较,模型组小鼠血清AST, ALT水平显著升高(P<0.01);与模型组比较,血府逐瘀汤组小鼠血清ALT水平显著降低(P<0.05), AST水平的影响差异无统计学意义;加味二陈汤组小鼠血清AST, ALT水平明显降低(P<0.05, P<0.01),其中血府逐瘀汤组小鼠血清ALT水平降低幅度高于加味二陈汤组。见表3。

3.3 对NAFLD小鼠肝组织病理变化的影响 正常组小鼠肝细胞形态结构正常,肝窦清晰,肝索呈放射状排列,未见肝细胞脂肪变性。模型组小鼠肝细胞明显增大,肝组织内可见大小不等的脂滴空泡,肝小叶结构紊乱。血府逐瘀汤组与加味二陈汤组肝细胞较模型组均排列整齐,脂肪变性程度降低,二者在病理改变上未有较大差异。见图1。

表2 血府逐瘀汤与加味二陈汤对NAFLD小鼠血清TC, TG, LDL, HDL含量的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of Xuefu Zhuyutang and modified Erchentang on drug-administration group on serum TC, TG, LDL, HDL of mouse($\bar{x} \pm s$)
mmol·L⁻¹

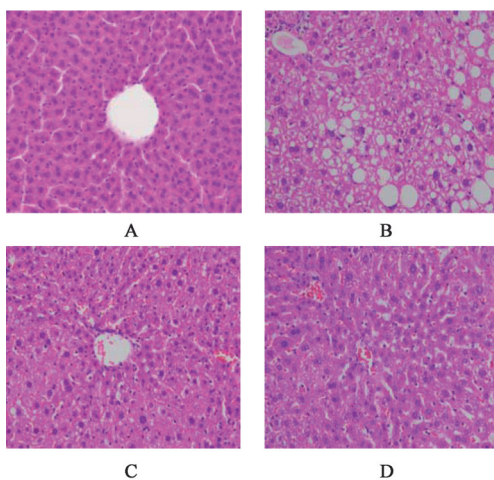
组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	TC	TG	LDL	HDL
正常	-	10	3.48±0.57	0.24±0.08	0.11±0.06	2.04±0.31
模型	-	10	23.51±4.32 ²⁾	4.00±0.86 ²⁾	3.52±0.78 ²⁾	0.98±0.42 ²⁾
血府逐瘀汤	12.99	8	19.23±4.08 ³⁾	2.50±1.14 ³⁾	2.83±1.08 ³⁾	1.59±0.77 ³⁾
加味二陈汤	12.49	10	18.23±5.07 ³⁾	3.09±1.36 ³⁾	1.51±0.68 ⁴⁾	1.98±0.77 ⁴⁾

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

表3 血府逐瘀汤与加味二陈汤对NAFLD小鼠血清AST, ALT水平的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of Xuefu Zhuyutang and modified Erchentang on serum AST, ALT levels of mouse($\bar{x} \pm s$)
U·L⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	AST	ALT
正常	-	10	25.73±10.79	9.19±2.81
模型	-	10	59.58±7.75 ²⁾	35.50±6.96 ²⁾
血府逐瘀汤	12.99	8	56.48±14.64	16.31±8.23 ³⁾
加味二陈汤	12.49	10	31.04±18.70 ⁴⁾	23.53±9.61 ³⁾



A. 正常组; B. 模型组; C. 血府逐瘀汤组; D. 加味二陈汤组(图2同)
图1 血府逐瘀汤与加味二陈汤对NAFLD小鼠肝组织病理学的影响(HE, ×400)

Fig. 1 Effect of Xuefu Zhuyutang and modified Erchentang on histological changes of mouse liver(HE, ×400)

3.4 对NAFLD小鼠肝组织TNF-α, IL-1β, MCP-1, MMP-9蛋白表达水平的影响

表4 血府逐瘀汤与加味二陈汤对NAFLD小鼠肝组织TNF-α, IL-1β, MCP-1, MMP-9蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Effect of Xuefu Zhuyutang and modified Erchentang on expression of TNF-α, IL-1β, MCP-1 and MMP-9 in mouse liver($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TNF-α/β-tublin	IL-1β/β-tublin	MCP-1/β-tublin	MMP-9/β-tublin
正常	-	1.586±0.169	1.274±0.131	0.714±0.148	0.993±0.103
模型	-	2.422±0.224 ²⁾	1.772±0.124 ²⁾	1.088±0.188 ¹⁾	1.275±0.103 ¹⁾
血府逐瘀汤	12.99	2.285±0.458	1.337±0.081 ⁴⁾	0.768±0.193 ³⁾	1.133±0.030
加味二陈汤	12.49	1.832±0.274 ³⁾	1.287±0.130 ⁴⁾	0.664±0.195 ⁴⁾	1.004±0.176 ³⁾

组TNF-α, IL-1β, MCP-1, MMP-9蛋白的表达明显升高(P<0.05, P<0.01);与模型组比较,血府逐瘀汤组可明显降低IL-1β, MCP-1蛋白的表达(P<0.05, P<0.01),加味二陈汤组可明显降低TNF-α, IL-1β, MCP-1, MMP-9的表达(P<0.05, P<0.01),并且加味二陈汤组对IL-1β, MCP-1的下调幅度高于血府逐瘀汤组。见图2,表4。

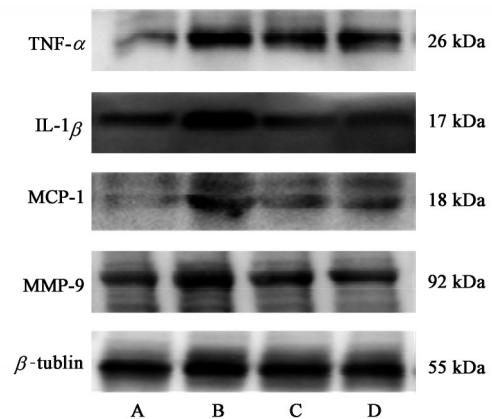


图2 小鼠肝脏TNF-α, IL-1β, MCP-1, MMP-9蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of TNF-α, IL-1β, MCP-1, MMP-9 protein express in liver of mouse

3.5 对NAFLD小鼠肝组织TNF-α, IL-1β, MCP-1, MMP-9 mRNA表达的影响

表4 血府逐瘀汤与加味二陈汤对NAFLD小鼠肝组织TNF-α, IL-1β, MCP-1, MMP-9蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Effect of Xuefu Zhuyutang and modified Erchentang on expression of TNF-α, IL-1β, MCP-1 and MMP-9 in mouse liver($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TNF-α/β-tublin	IL-1β/β-tublin	MCP-1/β-tublin	MMP-9/β-tublin
正常	-	1.586±0.169	1.274±0.131	0.714±0.148	0.993±0.103
模型	-	2.422±0.224 ²⁾	1.772±0.124 ²⁾	1.088±0.188 ¹⁾	1.275±0.103 ¹⁾
血府逐瘀汤	12.99	2.285±0.458	1.337±0.081 ⁴⁾	0.768±0.193 ³⁾	1.133±0.030
加味二陈汤	12.49	1.832±0.274 ³⁾	1.287±0.130 ⁴⁾	0.664±0.195 ⁴⁾	1.004±0.176 ³⁾

达的影响差异无明显统计学意义,加味二陈汤组 TNF- α , MMP-9 mRNA 表达水平明显降低($P < 0.05$,

$P < 0.01$), IL-1 β , MCP-1 mRNA 表达的影响差异无明显统计学意义。见表5。

表5 血府逐瘀汤与加味二陈汤对NAFLD小鼠肝组织TNF- α , IL-1 β , MCP-1, MMP-9 mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 5 Effect of Xuefu Zhuyutang and modified Erchentang on TNF- α , IL-1 β , MCP-1 and MMP-9 mRNA expression in mouse liver tissue ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TNF- α	IL-1 β	MCP-1	MMP-9
模型	-	2.936 \pm 0.725 ²⁾	1.507 \pm 0.091 ²⁾	4.003 \pm 0.338 ²⁾	3.578 \pm 0.541 ¹⁾
血府逐瘀汤	12.99	2.018 \pm 0.850	1.160 \pm 0.915	2.830 \pm 0.215 ³⁾	2.867 \pm 0.839
加味二陈汤	12.49	0.832 \pm 0.169 ⁴⁾	1.064 \pm 0.411	3.870 \pm 0.582	1.220 \pm 0.231 ³⁾

注:设正常组各mRNA表达量均为1。

4 讨论

NAFLD是指除大量饮酒和其他已明确因素外所致的肝脏脂肪变和肝脏脂肪过度蓄积为特征的病证,包括单纯性脂肪肝、非酒精性脂肪肝炎、脂肪性肝纤维化,最终可能演变为肝硬化甚至肝癌^[15-16]。它的发生发展与炎症反应密不可分,多种炎症因子在其中发挥作用,加剧肝脏病变程度。TNF- α 是介导肝脏损伤的重要炎症因子,在肝脏疾病中发挥细胞毒性作用^[17],导致肝损伤。肝脏kupffer细胞可以产生IL-1 β 而加剧肝脏炎症及脂肪变性,IL-1 β 促进胰岛细胞中一氧化氮生成和细胞凋亡而导致胰岛细胞选择性破坏,从而进一步诱导胰岛素抵抗^[18-19]。MMP-9是以中性粒细胞为代表的炎细胞所产生的,是NAFLD肝组织慢性炎性改变的标志物之一^[20],它可以降解肝脏基底膜,破坏基底膜完整性^[21]。MMP-9过表达可以破坏肝星状细胞(HSC)的正常基质环境,使HSC被活化,活化的HSC表达大量的炎症介质和致纤维化细胞因子,刺激ECM的大量合成,从而促进肝纤维化的发生发展^[22]。MMP-9活性调节促炎介质IL-1 β 和TNF- α ,激活IL-1 β 的前体,从而使IL-1 β 产生生物活性,也可激活TNF- α 的活性^[23]。反过来,IL-1 β ,TNF- α 也可以刺激MMP-9的过度产生^[24]。它们的过度表达,形成了相互之间的恶性循环,不断加重肝脏病理程度。MCP-1是一种趋化因子,是由巨噬细胞、内皮细胞、肝星状细胞和血管平滑肌细胞分泌的有效化学引诱物,可以响应IL-1 β 和TNF- α 的炎症刺激^[25-27],它与NAFLD中肝细胞的脂肪积累相关^[28]。

近年来中药在治疗肝脏疾病中有一定优势,其实验研究作用显著或临床应用疗效较好,不良反应较少,呈现了广阔的前景^[29]。中医认为NAFLD的主要病机为脾虚湿蕴,痰瘀互结。饮食不节,恣食肥甘厚腻,情志刺激,致肝脾肾功能失调,痰浊内

生,气血痰瘀相互搏结,瘀阻肝络,治疗上则以化痰活血为根本大法^[2]。本研究依据此治法,选用二陈汤和血府逐瘀汤对高脂饮食诱导的NAFLD小鼠进行干预,比较二者对NAFLD治疗效果的差异。结果显示,模型组小鼠血清TC, TG, LDL, AST, ALT水平显著升高, HDL显著降低,肝脏HE染色显示模型组肝细胞形态结果异常,并有大量脂滴沉积,提示NAFLD模型成功。用加味二陈汤与血府逐瘀汤对模型小鼠干预8周后,根据检测指标结果发现二者均可在一定程度上对NAFLD小鼠起到治疗作用,其中加味二陈汤组显示出更优异的治疗效果,相比血府逐瘀汤组,它能从更广泛、更大程度上改善NAFLD小鼠的血脂和肝功水平,降低肝脏病理恶化程度,下调肝脏炎症水平,其机制可能是通过降低MMP-9的表达,减少对IL-1 β , TNF- α 的活化,反过来减少的IL-1 β , TNF- α 也降低了对MMP-9的刺激,如此形成良性循环,低表达的IL-1 β , TNF- α 进而减少对MCP-1产生的刺激,改善肝脏炎症环境从而发挥对NAFLD的治疗作用。且加味二陈汤组治疗效果优于血府逐瘀汤组也提示NAFLD病机虽为“痰瘀互结”,但“痰”为其主要方面,临床治疗时应以化痰法为主。但是否在病程继续发展到后期时病机仍以“痰”为主有待进一步探讨。

【参考文献】

- [1] 余琳媛, 龚莉虹, 汤韵秋, 等. 基于AMPK信号通路的大黄素治疗非酒精性脂肪肝病研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(2): 203-209.
- [2] 李军祥, 陈润花, 苏冬梅, 等. 非酒精性脂肪性肝病中医治疗研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(14): 1442-1451.
- [3] 黄静娟, 刘树军, 车念聪. 论痰瘀理论对非酒精性脂肪肝病辨证与治疗的指导作用[J]. 中华中医药杂志, 2006, 21(12): 765-767.

- [4] 清·王清任. 医林改错[M]. 北京:人民卫生出版社, 2005.
- [5] 包永生, 谢文英, 王俊月. 二陈汤研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(23):9-18.
- [6] 崔玉红. 二陈汤加味治疗非酒精性脂肪肝临床疗效观察[J]. 中医临床研究, 2018, 10(4):59-60.
- [7] 赵训智. 二陈汤对非酒精性单纯性脂肪肝患者体质影响的研究[J]. 光明中医, 2017, 32(21):3098-3099.
- [8] 郭继飞. 二陈汤加味治疗非酒精性脂肪肝的临床疗效观察[J]. 内蒙古中医药, 2016, 35(13):10.
- [9] 姚政, 王佳宁, 陈滢, 等. 加味二陈汤对非酒精性脂肪肝大鼠UCP2影响的动态观察[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(11):2589-2591.
- [10] 丁珊珊, 康洁, 张凌媛, 等. 二陈汤对脂代谢紊乱小鼠Cav-1和PI3K/AKT表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(1):242-244.
- [11] 庄义昭. 血府逐瘀汤加减治疗酒精性脂肪肝的临床疗效观察[J]. 中医临床研究, 2018, 10(19):57-59.
- [12] 董桂芬. 血府逐瘀汤加减治疗非酒精性脂肪肝50例[J]. 光明中医, 2013, 28(6):1151-1152.
- [13] 张兴宏. 加味血府逐瘀汤治疗非酒精性脂肪肝疗效分析[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(10):2356-2357.
- [14] 江云, 高月求, 朱明清, 等. C57BL/6小鼠非酒精性脂肪肝模型的建立研究[J]. 蚌埠医学院学报, 2018, 43(5):573-576.
- [15] 胡中杰, 张晶. 我国非酒精性脂肪性肝病的研究现状[J]. 临床肝胆病杂志, 2016, 32(3):552-556.
- [16] 潘雨亭, 许方圆, 于希忠, 等. 中药活性成分治疗非酒精性脂肪肝作用靶点的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(6):1109-1112.
- [17] 魏永杰, 张华. 细胞因子在非酒精性脂肪性肝炎发病机制中的作用[J]. 国际消化病杂志, 2006, 26(1):14-16.
- [18] MIURA K, KODAMA Y, INOKUCHI S, et al. Toll-like receptor 9 promotes steatohepatitis by induction of interleukin-1 β in mice[J]. Gastroenterology, 2010, 139(1):323-334.
- [19] 陈艳丽, 张宝, 管石侠, 等. IL-18、IL-1 β 水平与非酒精性脂肪性肝病的关系[J]. 安徽医科大学学报, 2015, 50(2):181-184.
- [20] PARKS W C, WILSON C L, LOPEZ-BOADO Y S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity [J]. Nat Rev Immunol, 2004, 4(8):617-629.
- [21] SCHWARTZ G K. Invasion and metastases in gastric cancer: *in vitro* and *in vivo* models with clinical correlations [J]. Semin Oncol, 1996, 23(3):316-324.
- [22] 刘月白, 周义, 李昌平. 非酒精性脂肪性肝病中MMP-9作用的研究进展[J]. 现代临床医学, 2019, 45(2):81-83, 87.
- [23] SCHONBECK U, MACH F, LIBBY P. Generation of biologically active IL-1 β by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 β processing[J]. Immunol, 1998, 161:3340-3346.
- [24] VANDOOREN J, VAN DEN STEEN P E, OPDENAKKER G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): the next decade[J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2013, 48(3):222-272.
- [25] YLÄ-HERTTUALA S, LIPTON B A, ROSENFELD M E, et al. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(12):5252-5256.
- [26] YU X, DLUZ S, GRAVES D T, et al. Elevated expression of monocyte chemoattractant protein 1 by vascular smooth muscle cells in hypercholesterolemic primates [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(15):6953-6957.
- [27] NELKEN N A, COUGHLIN S R, GORDON D. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques [J]. J Clin Invest, 1991, 88(4):1121-1127.
- [28] RULL A, RODRÍGUEZ F, ARAGONÈS G, et al. Hepatic monocyte chemoattractant protein-1 is upregulated by dietary cholesterol and contributes to liver steatosis [J]. Cytokine, 2009, 48(3):273-279.
- [29] 农汝楠, 王竟静, 吴燕春, 等. 基于TLR4信号通路的中药抗肝脏疾病作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(16):201-212.

[责任编辑 周冰冰]