

参苓白术散对 NAFLD 大鼠肝组织 Nrf2/ARE 信号通路的影响

金 玲¹, 杨钦河², 张玉佩², 王观龙², 韩 莉¹, 梁荫基², 何毅芳², 李媛媛²(1. 暨南大学附属第一医院, 广东 广州 510632; 2. 暨南大学医学院, 广东 广州 510632)

摘要: **目的** 观察参苓白术散对高脂饮食诱导的非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 大鼠肝组织核因子 E₂ 相关因子 2/抗氧化反应元件(Nrf2/ARE)信号通路相关蛋白表达的影响。**方法** 取 SD 大鼠 32 只, 随机分为正常组、模型组、参苓白术散高、低剂量组(30, 10 g·kg⁻¹), 每组 8 只。采用高脂饲料喂养 16 周, 建立 NAFLD 大鼠模型, 给药组大鼠同时灌服参苓白术散浸膏剂进行干预, 16 周后取血和肝组织样本, 全自动生化仪检测血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL-C)、低密度脂蛋白(LDL-C)、血清丙氨酸转氨酶(ALT)和天门冬氨酸转氨酶(AST)含量; 油红 O 染色观察肝组织脂质蓄积程度; Western Blotting 法检测肝组织 Nrf2/ARE 信号通路相关蛋白(Nrf2)、醌氧化还原酶(NQO1)和血红素氧合酶-1(HO-1)蛋白的表达水平。**结果** 模型组大鼠肝组织油红 O 染色结果表明肝组织脂质蓄积严重, 提示高脂饲料诱导的 NAFLD 大鼠模型建立成功。与正常组比较, 模型组大鼠血清 TC、TG、LDL-C、AST 水平显著升高 ($P < 0.01$), HDL-C 水平显著降低 ($P < 0.01$); 肝组织 Nrf2、NQO1、HO-1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 参苓白术散高、低剂量组大鼠肝组织脂质蓄积程度明显改善, 两组血清 TC、TG、LDL-C 含量及 AST 水平均呈不同程度下降, 血清 HDL-C 及肝组织 Nrf2、NQO1、HO-1 蛋白表达水平呈不同程度升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 其中参苓白术散高剂量组变化更为显著。**结论** 参苓白术散能够改善高脂饮食诱导的 NAFLD 大鼠肝脏脂肪代谢紊乱, 减轻肝脏脂质蓄积, 其作用机制可能与其激活 Nrf2/ARE 信号通路有关。

关键词: 参苓白术散; 非酒精性脂肪性肝病; Nrf2/ARE 信号通路; 脂质代谢

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2016)03-0327-06

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2016.03.004

Effects of Shenling Baizhu Powder on Nrf2/ARE Pathway in Liver Tissues of Nonalcoholic Fatty Liver Disease Rats

JIN Ling¹, YANG Qinhe², ZHANG Yupei², WANG Guanlong², HAN Li¹, LIANG Yinji², HE Yifang², LI Yuanyuan² (1. The First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510632 Guangdong, China; 2. Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632 Guangdong, China)

Abstract: Objective To observe the effects of Shenling Baizhu Powder(SBP) on the nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2)/antioxidant responsive element (ARE) pathway in liver tissues of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) rats induced by high fat diet. **Methods** Thirty-two SPF SD rats were randomly divided into 4 groups, normal control group, model group, high-dose SBP group (30.0 g·kg⁻¹·d⁻¹), and low-dose SBP group (10.0 g·kg⁻¹·d⁻¹), 8 rats in each group. The rats of NAFLD model were established by feeding a high-fat-diet for 16 weeks, and the SBP treatment groups were fed with SBP extract of high and low dose respectively. After treatment for 16 weeks, blood and liver samples of rats were collected. Total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high-density

收稿日期: 2015-12-22

作者简介: 金玲, 女, 博士, 讲师, 研究方向: 中医药防治慢性肝病及肿瘤研究。Email: zyp6115@163.com。通信作者: 杨钦河, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 慢性肝病及脂代谢疾病的中药研究与开发。Email: tyangqh@jnu.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81273617, 81302878); 中国肝炎防治基金会天晴肝病研究基金(cfhp20132184); 暨南大学第一临床医学院科研培育专项基金(2014205); 广东省科技计划项目(2013B021800164)。

lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) levels in blood serum were detected with automatic biochemical analyzer. The liver tissues were observed after oil red O staining. The protein expression levels of Nrf2, quinone oxidoreductase (NQO1), and heme oxygenase-1 (HO-1) in liver tissues were detected by Western blot. **Results** Compared with the normal control group, severe hepatic lipid accumulation was shown in liver tissues of the model group under microscope after oil red O staining, indicating the successful establishment of NAFLD model. Compared with the normal control group, the serum levels of TC, TG, LDL-C and AST were increased significantly ($P < 0.01$), HDL-C level was decreased significantly ($P < 0.01$), and the expression levels of Nrf2, NQO1, and HO-1 of liver tissues were increased significantly ($P < 0.01$) in the model group. Compared with the model group, the hepatic lipid accumulation of the two SBP groups was relieved significantly, the serum levels of TC, TG, LDL-C and AST were decreased in different degrees, HDL-C level was increased in different degrees, and the expression levels of Nrf2, NQO1, and HO-1 of liver tissues were increased in different degrees ($P < 0.05$, $P < 0.01$). High-dose SBP group showed better effect than low-dose SBP group. **Conclusion** SBP can improve lipid metabolism disorder and reduce hepatic lipid accumulation of the NAFLD rats induced by feeding a high-fat-diet for 16 weeks, and the mechanism may be related to the activation of Nrf2/ARE pathway in hepatocytes.

Keywords: Shenling Baizhu Powder; nonalcoholic fatty liver disease; Nrf2-ARE pathway; ~~rats~~; lipid metabolism

非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)是一种遗传-环境-代谢应激相关性疾病,表现为肝细胞弥漫性脂肪病变为主要特征的临床病理综合征^[1]。NAFLD的机制极为复杂,目前占主导地位的“二次打击”学说^[2]认为胰岛素抵抗(IR)和脂质代谢紊乱所导致的肝细胞脂肪变性引起肝脏脂质贮积,形成单纯性脂肪肝为“初次打击”;氧化应激、脂质过氧化及炎症性细胞因子释放等因素引起的脂肪性肝炎为“二次打击”;炎症反应持续存在,进一步发生炎症-坏死循环,形成脂肪性肝纤维化或肝硬化。氧化应激在NAFLD疾病的发生发展中起着重要作用^[3],核因子E2相关因子2(Nuclear factor erythroid-2-related factor 2, Nrf2)属于Cap-n-Collar(CNC)家族^[4],是抗氧化应激反应的重要转录因子,Nrf2被氧化应激或亲电物质激活后,与抗氧化蛋白启动子区域的抗氧化反应元件(antioxidant responsive element, ARE)结合,启动下游多个抗氧化、抗炎蛋白及解毒酶,如血红素氧合酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)、醌氧化还原酶[NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1, NQO1]等的表达,增强机体的抗氧化能力并加速机体毒物的外排。

近年来,我们研究发现参苓白术散防治NAFLD的疗效确切^[5-6],本研究拟从抗氧化应激角度探讨参苓白术散防治NAFLD的作用机制,进一步阐明其作用靶点,为其临床防治NAFLD的应用提供理论

依据。

1 材料与方法

1.1 动物及饲料 6~7周龄雄性SD大鼠32只,SPF级,体质量(200 ± 20)g,由广州中医药大学实验动物中心提供,动物许可证号:SCXK(粤)2013-0034。大鼠在暨南大学实验动物管理中心饲养,饲养环境合格证号:SYXK(粤)2012-0117。基础维持饲料由暨南大学实验动物管理中心提供,高脂饲料由广东省医学实验动物中心制备和提供,许可证号:SCXK(粤)2013-0002。高脂饲料由维持饲料、猪油、胆固醇、III号胆盐等组成,按88:10:1.5:0.5比例均匀混合,并进行钴60辐照。

1.2 药物 参苓白术散组成:人参15g,茯苓15g,白术15g,砂仁6g,薏苡仁9g,山药15g,桔梗6g,白扁豆12g,莲子9g,炙甘草9g。根据药物剂量比制备参苓白术散投料处方,按照挥发油提取工艺、醇提取工艺和水提取工艺等操作流程,萃取和提纯药物活性成分,浓缩、干燥并制备成参苓白术散浸膏剂。本药物由广东省中医药工程技术研究院制备和提供,批号:20140509。

1.3 试剂与仪器 油红O试剂盒(南京建成科技有限公司);BCA蛋白浓度试剂盒(中国碧云天生物技术有限公司);内参照GAPDH蛋白抗体(美国Cell Signaling

公司); 兔抗鼠 Nrf2、HO-1、NQO1 多克隆抗体(英国 Abcam 公司); CM-1860 型冰冻切片机(德国 Leica 公司); 7020 型全自动生化分析仪(日本日立公司); 小型蛋白垂直电泳及转印系统(美国 Bio-rad 公司)。

1.4 分组及给药 大鼠适应性喂养 1 周后, 按随机数字表法分为正常组、模型组、参苓白术散高、低剂量组, 每组 8 只。参照课题组已有造模方法^[7], 建立 NAFLD 大鼠模型, 即正常组大鼠给予基础饲料, 其余各组大鼠均以高脂饲料诱导造模, 同时各组按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌服相应剂量的参苓白术散浸膏剂或实验动物饮用水, $1 \text{ 次} \cdot \text{d}^{-1}$, 连续 16 周。参苓白术散灌服剂量参照课题组前期确定的干预剂量^[9], 参苓白术散高剂量组为 $30 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (3 倍临床等效剂量, 含生药量 $3 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 参苓白术散低剂量组为 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (临床等效剂量, 含生药量 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。各组大鼠自由饮水进食, 分笼饲养在明暗各 12 h, $22^{\circ}\text{C} \sim 26^{\circ}\text{C}$ 的标准动物房内。

1.5 标本采集 在连续用药 16 周后, 各组大鼠禁食不禁水 12 h, 采用 3% 戊巴比妥钠 ($1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$) 腹腔注射麻醉, 使用采血针在腹主动脉采血; 另取大鼠肝右叶相同部位组织(距离肝边缘 2 cm 处)若干, 用于相关检测。

1.6 肝组织病理学观察 取新鲜肝组织样本 3~4 块, 大小约为 $1.0 \text{ cm} \times 1.0 \text{ cm} \times 1.0 \text{ cm}$, OTC 固定液在冰冻切片机上固定肝组织小块 15 min, 切片厚度为 $10 \mu\text{m} \sim 15 \mu\text{m}$, 进行常规油红 O 染色, 光镜下观察肝脏脂滴分布情况。

1.7 血清 TG、TC、HDL-C、LDL-C、ALT、AST 含量检测 腹主动脉采血, 室温静置 30 min 后, 4°C , $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 采集上层血清, 置于 EP 管中, 用全自动生化分析仪检测血清 TG、TC、HDL-C、LDL-C、ALT、AST 的含量变化。

1.8 Western Blotting 法检测肝组织 Nrf2、NQO1、HO-1 蛋白表达水平 取肝组织约 100mg, 加入 $500 \mu\text{L}$ 含 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PMSF 的 RIPA 裂解液, 放于组织研磨器进行研磨, 充分裂解, 配平后给予 4°C ,

$14000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 收集上清液, 根据碧云天 BCA 蛋白浓度试剂盒说明书对蛋白含量进行测定。将待测样本经 SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 然后转移至 PVDF 膜上, 加 5% 脱脂奶粉封闭液, 室温下平摇 1 h; 洗膜, 加一抗稀释液 4°C 过夜孵育, 洗膜, 加二抗稀释液 4°C 室温孵育 1 h, 充分洗涤, 然后于暗室曝光在 X 光片上显影, 用 Quantity One 软件扫描各条带的吸光度值并分析结果。

1.9 统计学处理方法 数据采用 SPSS 17.0 统计学软件进行分析, 计量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间均数比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 方差齐时用 S-N-K 法或者 Bonferroni 等方法进行组间比较, 方差不齐时用 Tamhane's T_2 法检验, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般情况观察 正常组大鼠精神状态良好, 形体正常, 反应灵敏, 活动自如, 体毛致密、有光泽, 进食、饮水均正常, 大便黑褐色、质硬、鼠笼垫料湿度一般。模型组大鼠精神倦怠, 形体肥胖, 反应迟钝, 动作较迟缓, 体毛干枯而黄、且脱落较明显, 进食、饮水量大, 大便质软而有油腻感, 垫料湿度大, 类似于中医脾虚证的表现。参苓白术散高、低剂量组大鼠的精神状态、形体、反应、活动、毛发光泽度、进食饮水、排泄物等情况均较模型组改善, 尤以参苓白术散高剂量组改善更为明显。

2.2 各组大鼠肝组织病理变化 显微镜下正常组大鼠肝细胞核呈蓝色, 肝细胞内未见明显橘红色脂滴, 肝细胞间隙清晰, 肝窦结构正常。模型组大鼠肝细胞明显肿大, 视野内出现弥漫性的红染脂滴, 可见相邻肝细胞内脂滴融合, 肝细胞核多被橘红色脂滴挤压偏于一侧。参苓白术散高、低剂量组橘红色脂滴显著少于模型组, 其中以参苓白术散高剂量组改善较显著。见图 1。

2.3 各组大鼠血清 TG、TC、HDL-C、LDL-C 含量

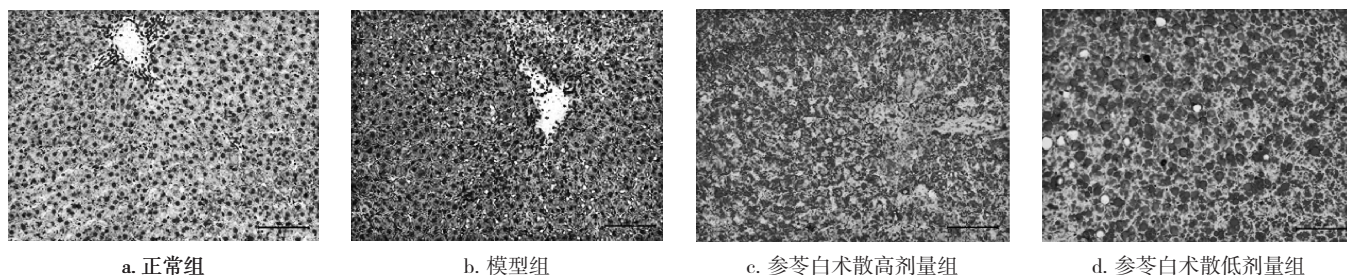


图 1 各组大鼠肝组织病理变化(油红 O 染色, $\times 200$)

Figure 1 Histopathological changes of hepatic tissues with oil red O staining in each group($\times 200$)

的变化 与正常组比较, 模型组大鼠血清 TC、TG、LDL-C 含量均显著升高, HDL-C 含量显著降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 与模型组比较, 参苓白术散高、低剂量组血清 TC、TG 和 LDL-C 含量均呈不同程度下降, HDL-C 含量呈不同程度升高, 其中参苓白术散高剂量组 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 变化均有显著差异($P < 0.05$, $P < 0.01$), 参苓白术散低剂量组 TG 变化有显著差异($P < 0.05$), 而 TC、LDL-C 和 HDL-C 变化无显著差异; 与参苓白术散高剂量组比较, 参苓白术散低剂量组 LDL-C 升高、HDL-C 降低($P < 0.01$, $P < 0.05$), TC、TG 的差异无统计学意义。表明参苓白术散具有明显降低 NAFLD 大鼠血清 TC、TG 和 LDL-C, 升高 HDL-C 的作用, 并呈一定的量效关系。见表 1。

表 1 各组大鼠血清 TC、TG、HDL-C 和 LDL-C 含量比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 1 Comparison of serum TC, TG, HDL-C and LDL-C in each group

组别	剂量 / $g \cdot kg^{-1}$	TC / $mmol \cdot mL^{-1}$	TG / $mmol \cdot mL^{-1}$	HDL-C / $mmol \cdot mL^{-1}$	LDL-C / $mmol \cdot mL^{-1}$
正常组	-	1.56 ± 0.28	0.66 ± 0.20	1.13 ± 0.32	0.93 ± 0.21
模型组	-	$3.69 \pm 0.87^{**}$	$1.34 \pm 0.35^{**}$	$0.39 \pm 0.10^{**}$	$2.33 \pm 0.23^{**}$
参苓白术散高剂量组	30	$2.65 \pm 0.61^{\Delta}$	$0.88 \pm 0.14^{\Delta}$	$0.89 \pm 0.20^{\Delta\Delta}$	$1.39 \pm 0.22^{\Delta\Delta}$
参苓白术散低剂量组	10	3.11 ± 0.78	$0.94 \pm 0.33^{\Delta}$	$0.56 \pm 0.12^{\Delta}$	$2.07 \pm 0.28^{\Delta\Delta}$

注: 与正常组比较, $^{**}P < 0.01$; 与模型组比较, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$; 与参苓白术散高剂量组比较, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ 。

2.4 各组大鼠血清 ALT、AST 水平的变化 与正常组比较, 模型组大鼠血清 AST 水平显著升高, 差异有统计学意义($P < 0.01$), ALT 水平无明显变化。与模型组比较, 参苓白术散高、低剂量组血清 ALT、AST 均呈不同程度的下降, 其中高剂量组 AST 下降较为显著($P < 0.05$); 与低剂量组比较, 高剂量组 AST 水平下降明显, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。表明参苓白术散具有降低 NAFLD 大鼠 AST 水平的作用, 并存在一定的量效关系。见表 2。

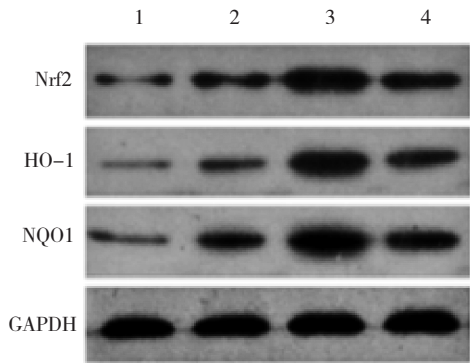
表 2 各组大鼠血清 ALT、AST 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 2 Comparison of serum ALT and AST in each group

组别	剂量 / $g \cdot kg^{-1}$	ALT / $U \cdot mL^{-1}$	AST / $U \cdot mL^{-1}$
正常组	-	52.62 ± 18.64	70.75 ± 8.49
模型组	-	74.86 ± 15.17	$201.85 \pm 39.98^{**}$
参苓白术散高剂量组	30	55.75 ± 14.93	$139.13 \pm 21.37^{\Delta\Delta}$
参苓白术散低剂量组	10	61.50 ± 13.66	176.25 ± 24.27

注: 与正常组比较, $^{**}P < 0.01$; 与模型组比较, $^{\Delta}P < 0.05$; 与参苓白术散低剂量组比较, $^{\Delta}P < 0.05$ 。

2.5 对各组大鼠肝组织 Nrf2、NQO1、HO-1 蛋白表达水平的影响 与正常组比较, 模型组肝细胞 Nrf2、NQO1、HO-1 蛋白表达水平均显著上升, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 与模型组比较, 参苓白术散高、低剂量组 Nrf2、NQO1、HO-1 蛋白表达均明显上调, 差异有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$)。提示 NAFLD 大鼠肝细胞氧化 - 抗氧化失衡可能激活肝细胞 Nrf2、NQO1、HO-1 蛋白表达水平明显上调, 而参苓白术散高、低剂量组对大鼠肝细胞 Nrf2、NQO1、HO-1 蛋白具有明显的诱导作用, 高剂量组表现更为明显。见图 2, 表 3。



注: 1. 正常组; 2. 模型组; 3. 参苓白术散高剂量组; 4. 参苓白术散低剂量组

图 2 对各组大鼠肝组织 Nrf2、NQO1、HO-1 蛋白表达水平的影响

Figure 2 Expression of Nrf2, NQO1 and HO-1 protein in rat hepatic tissues of each group

表 3 各组大鼠肝组织 Nrf2、NQO1、HO-1 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 3 Expression of Nrf2, NQO1 and HO-1 protein in rat hepatic tissues of each group

组别	剂量 / $g \cdot kg^{-1}$	Nrf2/GAPDH	NQO1/GAPDH	HO-1/GAPDH
正常组	-	0.14 ± 0.02	0.13 ± 0.03	0.15 ± 0.03
模型组	-	$0.26 \pm 0.05^{**}$	$0.25 \pm 0.02^{**}$	$0.26 \pm 0.02^{**}$
参苓白术散高剂量组	30	$0.47 \pm 0.07^{\Delta\Delta}$	$0.48 \pm 0.08^{\Delta\Delta}$	$0.49 \pm 0.08^{\Delta\Delta}$
参苓白术散低剂量组	10	$0.40 \pm 0.08^{\Delta}$	$0.39 \pm 0.07^{\Delta}$	$0.41 \pm 0.07^{\Delta}$

注: 与正常组比较, $^{**}P < 0.01$; 与模型组比较, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ 。

3 讨论

NAFLD 是一种无过量饮酒史, 以肝细胞脂肪变性和脂质贮积为特征的临床病理综合征。美国肝脏疾病研究协会认为 NAFLD 是肝脂肪变性的细胞在光镜下达到肝细胞数 5% ~ 10% 以上^[8]。研究表明, 单纯性脂肪肝患者中有 10% 可发展为脂肪性肝炎, 而脂

肪性肝炎中有 8%~26% 可发展为肝纤维化,甚至部分病例发展为原发性肝癌^[9]。本研究采用高脂饮食诱导建立 NAFLD 大鼠模型,该造模方法简便易行、成功率高、重复性好,且与人类 NAFLD 发病特征相似。研究结果表明模型组大鼠血清 TC、TG、LDL-C 含量较正常组明显升高,油红 O 染色显示肝细胞脂质蓄积明显,提示 NAFLD 大鼠模型诱导成功。

祖国医学文献中无“脂肪肝”病名,根据其发病特点和临床表现可归属于胁痛、积聚、痰浊、积证、肝(痞)癖、瘕、肥气、痞满、痰证等范畴。中医学认为过食肥甘厚味,日久伤脾,脾虚不运,水湿内停,湿浊内蕴,痰浊郁结,食积膏脂不化,最终形成湿浊痰积互结,痹阻肝脉络而形成本病^[10],临床多表现为形体肥胖、少动懒言、咽中多痰、大便溏泄、舌体胖大有齿痕、舌苔厚腻等脾气亏虚的特点。本研究结果表明 NAFLD 大鼠表现为精神倦怠,形体肥胖,反应迟钝,动作较迟缓,体毛干枯而黄,大便质软而有油腻感,垫料湿度大等,类似于中医脾虚证的表现,由此可见,脾虚不运是 NAFLD 发病的关键病机之一。参苓白术散是中医治疗脾气亏虚证的经典有效方剂,近年来,临床报道参苓白术散具有调节肝脏脂质代谢、降低肝脂和减轻肝脏损伤的作用^[11-12],我们前期研究也发现参苓白术散对 NAFLD 大鼠血脂、肝脂均有显著改善作用^[13]。本研究结果表明参苓白术散高、低剂量对 NAFLD 大鼠血脂、AST 都有显著降低作用,病理结果显示其可明显减少 NAFLD 大鼠肝组织脂滴,并改善 NAFLD 大鼠精神倦怠等一系列脾虚症状,其中高剂量组效果更好,提示参苓白术散对 NAFLD 的防治疗效确切,并存在一定的量效关系。

氧化应激在 NAFLD 发病过程中起到了极为重要的作用。在 NAFLD 中随着游离脂肪酸蓄积,肝细胞脂肪变性,产生过量的活性氧,超过抗氧化系统的清除能力,导致大量过氧化产物产生,脂肪氧化进一步加重,脂肪沉积增多,变性加重,肝脏细胞分泌的炎症因子也相应增多,肝脏炎症进一步加重,病情进一步发展。研究表明,Nrf2/ARE 通路作为最重要的抗氧化调节通路,参与了各种疾病的氧化-抗氧化调节过程^[14],同样参与了 NAFLD 疾病的发生发展进程^[15-16]。Nrf2 作为 Cap-n-Collar (CNC)家族的转录因子,在肝、肾等重要解毒器官中高度表达^[17]。正常情况下,Nrf2 位于细胞质中,与 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1(kelch-like ECH associated protein 1, Keap1)结合,其活性受到抑制。当受到氧化应激因子或亲电

物质刺激后,Nrf2 与 Keap1 解离,活化的 Nrf2 从胞浆转移至细胞核中并与 ARE 结合,调控抗氧化酶基因的转录活性及下游 ARE 依赖的 II 相解毒酶,如血红素氧合酶-1 (HO-1)、谷胱甘肽 (glutathione-S-transferases, GST)、C 群链球菌 (group C Streptococcus, GCS)、醌氧化还原酶抗体(NQO1),从而有助于减轻有害外来化学物质及其代谢物对机体的毒性并加速有害物质及其代谢物的外排^[18]。研究表明,Nrf2 基因的缺失会明显加重 NAFLD 的进程^[19]。本研究结果表明,给予 16 周的高脂饲料能够诱导 NAFLD 模型大鼠肝细胞 Nrf2/ARE 通路的活化。与正常组相比,模型组大鼠肝细胞 Nrf2、NQO1、HO-1 蛋白水平显著上升 ($P < 0.01$),结合病理结果说明,长期高脂饲料能够诱导 Nrf2 蛋白的明显活化,出现 Nrf2 与 Keap-1 解离增加,解离的 Nrf2 激活下游 II 相解毒酶(HO-1)、转运蛋白基因(NQO1)的转录,导致大量有抗氧化作用的酶类物质释放,从而发挥调节氧化-抗氧化的作用。与模型组比较,参苓白术散高、低剂量组 Nrf2、NQO1、HO-1 蛋白水平不同程度升高,参苓白术散高剂量组更为明显 ($P < 0.01$),考虑参苓白术散能够进一步激活 Nrf2,使得 Nrf2 释放大量增加,大量的 Nrf2 进入细胞核与 ARE 相结合,Nrf2/ARE 形成结合体后,启动 ARE 下游基因的转录,激活下游 II 相解毒酶(HO-1)、转运蛋白基因(NQO1)的转录,促进有抗氧化作用的酶类物质的释放,从而发挥调节氧化-抗氧化的作用。Nrf2/ARE 通路可能是参苓白术散抗 NAFLD 的重要靶点之一,这为本方在临床上的科学运用提供宝贵实验依据。

参考文献:

- [1] Dongiovanni P, Romeo S, Valenti L. Hepatocellular carcinoma in nonalcoholic fatty liver: role of environmental and genetic factors[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(36): 12945-12955.
- [2] Day CP. Non-alcoholic fatty liver disease: a massive problem[J]. Clin Med, 2011, 11(2): 176-178.
- [3] Tessari P, Coracina A, Cosma A, et al. Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease[J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2009, 19 (4): 291-302.
- [4] Zhu J, Wang H, Ji X, et al. Differential Nrf2 expression between glioma stem cells and non-stem-like cells in glioblastoma[J]. Oncol Lett, 2014, 7(3): 693-698.
- [5] Yang QH, Xu YJ, Liu YZ, et al. Effects of Chaihu-Shugan-San and Shen-Ling-Bai-Zhu-San on p38 MAPK Pathway in Kupffer Cells of Nonalcoholic Steatohepatitis[J]. Evidence-Based Complementary and

- Alternative Medicine, 2014; 671013. doi: 10.1155/2014/671013.
- [6] 韩莉, 龚享文, 杨钦河, 等. 基于 NF- κ B 通路探讨疏肝健脾含药血清对 LPS 刺激下大鼠肝细胞、Kupffer 细胞炎症损伤保护作用机制研究[J]. 中成药, 2015, 37(5): 1114-1119.
- [7] Gong XW, Han L, Yang QH, et al. Effects of Soothing Liver and Invigorating Spleen Recipe on Lipid Metabolism Disorders in Kupffer Cells of NAFLD Rats by LXR α /SREBP-1c Signal Pathway [J]. Chinese Herbal Medicines, 2014, 6(4): 297-304.
- [8] Lidofsky SD. Nonalcoholic fatty liver disease: diagnosis and relation to metabolic syndrome and approach to treatment [J]. Curr Diab Rep, 2008, 8(1): 25-30.
- [9] Kantartzis K, Schick F, Haring HU, et al. Environmental and genetic determinants of fatty liver in humans [J]. Dig Dis, 2010, 28(1): 169-178.
- [10] 张玉佩, 杨钦河, 孔怡琳, 等. 从痰瘀角度探讨脂肪肝“二次打击”学说[J]. 新中医, 2010; 42(10): 11-12.
- [11] 魏继童, 姚小华. 参苓白术散加减治疗非酒精性脂肪肝 60 例疗效观察[J]. 九江学院学报(自然科学版), 2011, 26(4): 59-60.
- [12] 王峰. 加味参苓白术散对非酒精性脂肪肝疗效分析[J]. 中国中医基础医学杂志, 2013, 19(12): 1489-1504.
- [13] Yang QH, Xu YJ, Feng GF, et al. p38 Mapk signal pathway involved in anti-inflammatory effect of chaihui-shugan-san and shen-ling-bai-zhu-san on hepatocyte in non-alcoholic steatohepatitis rats[J]. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 2014, 11(1): 213-221.
- [14] Urano A, Furusawa Y, Yagishita Y, et al. The Keap1-Nrf2 system prevents onset of diabetes mellitus[J]. Mol Cell Biol, 2013, 33(15): 2996-3010.
- [15] 邵洛林, 郭建强, 许伟华. Nrf2 在肝细胞中作用的研究进展[J]. 国际消化病杂志, 2009, 29(6): 381-383.
- [16] 蔡月琴, 张利棕, 王德军, 等. Nrf2 及其相关因子在非酒精性脂肪肝形成过程中的作用[J]. 中国应用生理学杂志, 2014, 30(5): 465-470.
- [17] Zhu J, Wang H, Ji X, et al. Differential Nrf2 expression between glioma stem cells and non-stem-like cells in glioblastoma[J]. Oncol Lett, 2014, 7(3): 693-698.
- [18] Klaassen CD, Reisman SA. Nrf2 the Rescue: Effects of the Antioxidative/ Electrophilic Response on the Liver [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2010, 244(1): 57-65.
- [19] Chowdhry S, Nazmy MH, Meakin PJ, et al. Loss of Nrf2 markedly exacerbates nonalcoholic steatohepatitis [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2010, 48(2): 357-371.

(编辑: 宋威, 邹元平)

养肝化瘀颗粒抗肝癌作用及其机制研究

沈阳¹, 朱方方¹, 张光际¹, 杨凡¹, 彭海燕², 时乐³, 徐立³ (1. 南京中医药大学药学院, 江苏南京 210023; 2. 南京中医药大学第一临床医学院, 江苏南京 210023; 3. 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室, 江苏南京 210023)

摘要: **目的** 探讨养肝化瘀颗粒抗肝癌作用及其机制。**方法** 建立小鼠 H22 肝癌皮下移植瘤模型, 随机分为空白对照组、模型组、5-氟尿嘧啶(5-FU, 10 mg·kg⁻¹, ip) 组和养肝化瘀颗粒高、中、低(6, 3, 1.5 g·kg⁻¹, ig) 剂量组, 连续给药 10 d。观察各组小鼠的肿瘤生长情况及血清甲胎蛋白(AFP)、肿瘤特异性生长因子(TSGF)水平; HE 染色观察瘤组织的病理改变; Western Blot 法检测 β -连环蛋白(β -catenin)、活化型半胱天冬酶-3 (Cleaved-Caspase3) 蛋白表达, 并进一步通过氯化锂(LiCl)激动 Wnt/ β -catenin 信号通路, 研究其抑癌作用机制。**结果** 养肝化瘀颗粒高、中、低剂量和阳性药 5-FU 作用后, 抑瘤率分别为 41.29, 50.03, 48.15, 52.83%; 与模型组比较, 各给药组血清肿瘤标志物 AFP 均有所下降($P < 0.01$, $P < 0.05$), TSGF 也有所下降, 其中养肝化瘀颗粒中剂量组与 5-FU 组最为明显($P < 0.01$); 瘤组织出现不同程度的坏死, 与模型组比较, 养肝化瘀颗粒中剂量组最为明显。养肝化瘀颗粒可以下调 HepG2 细胞、瘤组织中 β -catenin 蛋白表达水平, 上调 Cleaved-Caspase3 蛋白表达水平。进一步通过 LiCl 激动 Wnt/ β -catenin 信号通路, 与空白对照组比较, LiCl 组 β -catenin 蛋白表达显著上调($P < 0.05$), Cleaved-Caspase3 蛋白表达则下调($P < 0.05$); 与 LiCl 组比较, LiCl + 养肝化瘀颗粒含药血清(10, 20 % 浓度) 组 β -catenin 蛋白表达显著下调($P < 0.01$), Cleaved-Caspase3 蛋白表达则显著上调($P < 0.01$)。**结论** 养肝化瘀颗粒显著抑制小鼠 H22 皮下移植瘤的生长, 可能是通过抑制 β -catenin 蛋白表

收稿日期: 2016-01-26

作者简介: 沈阳, 女, 硕士研究生, 研究方向: 肿瘤疾病药理和毒理学研究。Email: yang20131472@163.com。通信作者: 徐立, 男, 教授, 研究方向: 肿瘤、代谢性疾病药理和毒理学研究。Email: xuliglp@126.com。

基金项目: 江苏省科技支撑计划项目(SBE201270403)。