

下瘀血汤对胆碱蛋氨酸缺乏诱导的小鼠非酒精性脂肪性肝炎的抑制作用

吴柳^{1,2}, 张洁^{1,2}, 马文婷^{1,2}, 潘凯^{1,2}, 张玮³, 陶乐^{1,2}, 刘成^{1,3} (1.上海中医药大学附属普陀医院 肝病实验室, 上海 200062; 2.上海中医药大学附属普陀医院 感染科, 上海 200062; 3.上海中医药大学附属普陀医院 中心实验室, 上海 200062)

摘要: 目的 探讨下瘀血汤对胆碱蛋氨酸缺乏 (methionine-choline-deficient, MCD) 诱导的小鼠非酒精性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH) 的抑制作用。方法 将24只雄性C57/BL6小鼠按照1:2的比例随机采用蛋氨酸胆碱充足 (methionine-choline-sufficient, MCS, 8只) 或MCD饲料喂养 (16只)。造模第4周第1天, 将采用MCD喂养的16只小鼠随机分为MCD对照组 (简称MCD组, 8只) 及MCD-下瘀血汤 (Xiayuxue decoction, XYXD) 组 (简称XYXD组, 8只)。XYXD组小鼠按70 kg成人临床用量等体重的10倍量经口灌胃XYXD 3周, MCD对照组小鼠以等量无菌水灌胃, 6周末取血清和肝组织, 检测各组小鼠的肝功能、甘油三酯 (triglyceride, TG) 和总胆固醇 (total cholesterol, TC) 水平。采用免疫印迹和RT-PCR检测核苷酸结合寡聚化结构域蛋白样受体6 (nucleotide-binding oligomerization-domain protein-like receptors protein 6, NLRP6)、簇分化抗原68 (cluster of differentiation-68, CD68)、单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 及转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 等的表达。采用激光共聚焦检测CD68与NLRP6的共定位。**结果** 与MCS组相比, MCD组小鼠血清ALT、肝内TG和TC水平显著升高 ($P < 0.05$), HE及油红染色结果表明: 肝组织脂肪变明显, NAS评分显著升高; RT-PCR显示: MCD组小鼠巨噬细胞标志物CD68、MCP-1等炎症相关因子和TGF- β 1等致纤维化因子mRNA的相对表达量显著升高 ($P < 0.05$); 免疫印迹结果显示: MCD组小鼠NLRP6蛋白表达显著下调, 而p-NF- κ B p65水平显著上调; 激光共聚焦结果显示MCD组小鼠NLRP6与CD68共定位显著降低。与MCD组相比, XYXD组小鼠的肝功能显著改善, 肝组织炎症及纤维化反应显著降低, NLRP6下调被抑制。**结论** 下瘀血汤对MCD诱导的小鼠NASH有显著改善作用; 调控巨噬细胞NLRP6的表达是下瘀血汤改善NASH的作用机制之一。**关键词:** 下瘀血汤; 脂肪性肝炎, 非酒精性; 胆碱蛋氨酸缺乏; 核苷酸结合寡聚化结构域蛋白样受体6

Xiayuxue decoction inhibits methionine-choline-deficient-induced nonalcoholic steatohepatitis in mice

WU Liu^{1,2}, ZHANG Jie^{1,2}, MA Wen-ting^{1,2}, PAN Kai^{1,2}, ZHANG Wei³, TAO Le^{1,2}, LIU Cheng^{1,3} (1.Laboratory of Liver Disease, Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China; 2.Department of Infectious Diseases, Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China; 3.Central Laboratory, Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China)

Abstract: Objective To explore the inhibitory effects of the Xiayuxue decoction (XYXD) on methionine-choline-deficient (MCD)-induced non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in mice. **Methods** Total of 24 male C57/BL6 mice were randomly fed with methionine-choline-sufficient (MCS) diet (8 mice) and MCD diet (16 mice) according to 1 : 2 ratio. At the first day of the fourth week, the mice fed with MCD diet were randomly divided into MCD-water group (MCD group in short, 8 mice) and MCD-XYXD group (XYXD group in short, 8 mice). Mice in XYXD group were given XYXD intragastrically at a dose of 10 times the body weight of 70 kg of adult once a day for 3 weeks, and mice in MCD group were given the same amount of water intragastrically. At the end of the sixth week, liver function and levels of triglyceride (TG) and total cholesterol (TC) were detected. The expression of nucleotide-binding

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7380.2018.03.009

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81673788); 上海市卫计委青年项目 (20144Y0185); 上海中医药大学中医学高峰学科项目 (A-U151902); 上海中医药大学预算内项目 (2014YSN67); 普陀医院人才类项目 (2016204B、2017207A)

通讯作者: 刘成 E-mail: liucheng0082010@163.com

oligomerization-domain protein-like receptors protein 6 (NLRP6), cluster of differentiation-68 (CD68), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and transforming growth factor- β (TGF- β) were detected by RT-PCR and Western blot. Confocal laser scanning was used to detect the co-location of CD68 and NLRP6. **Results** Compared with mice in MCS group, the levels of serum ALT, liver TG and TC of mice in MCD group increased significantly ($P < 0.05$); HE and oil red staining showed that the fatty degeneration of liver tissue and NAS score of mice in MCD group increased significantly; RT-PCR showed that the relative expression of mRNA of macrophage markers CD68, MCP-1 and fibrosis factors like TGF- β 1 of mice in MCD group increased significantly ($P < 0.05$); Western blot showed that the expression of NLRP6 decreased significantly, whereas the expression of p-NF- κ B p65 up-regulated significantly of mice in MCD group. Laser confocal microscopy showed that the co-localization of NLRP6 and CD68 decreased significantly of mice in MCD group. Compared with mice in MCD group, inflammation and fibrosis in liver tissue reduced significantly and the downregulation of NLRP6 was inhibited in XYXD group. **Conclusions** Xiayuxue decoction can significantly improve NASH induced by MCD in mice. Regulating the expression of NLRP6 in macrophages is one of the mechanisms of Xiayuxue decoction in improving NASH.

Key words: Xiayuxue decoction; Steatohepatitis, non-alcoholic; Methionine-choline-deficient; Nucleotide-binding oligomerization-domain protein-like receptors protein 6

非酒精性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH) 是非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 发病过程中由单纯性脂肪肝发展至肝纤维化的重要中间阶段^[1], 超过20%NASH患者肝脏脂肪变性伴发炎症, 易发展为肝硬化、肝功能衰竭和肝脏恶性肿瘤^[2,3]。中医治疗NASH主要以清热祛湿药物为主。下瘀血汤出自东汉医圣张仲景的《金匮要略》, 研究发现下瘀血汤对肝纤维化具有显著抑制作用^[4], 但在NASH中的作用尚未明确。核苷酸结合寡聚化结构域蛋白样受体6 (nucleotide-binding oligomerization-domain protein-like receptors protein 6, NLRP6) 是第1个被发现的抑制天然免疫反应相关的NLR蛋白家族成员^[5], NLRP6能够抑制NASH的病理进程, 是抑制NASH进展的潜在靶点^[6]。本研究旨在观察下瘀血汤是否通过调控NLRP6抑制NASH进展。

1 资料与方法

1.1 实验动物 清洁级 C57BL/6 雄性小鼠, 6~8 周龄, 体重 20 g 左右。饲养于上海中医药大学附属普陀医院实验动物中心, 室温 (22 ± 1) °C, 相对湿度 30%~60%, 12 小时光照/12 小时黑暗, 自由进食和饮水。

1.2 实验药物 下瘀血汤所使用的生药大黄、桃仁和地鳖虫均购自上海华宇药业有限公司, 有明确的原产地并经生药学专家鉴定, 由上海中医药大学附属曙光医药制备。制备方法: 大黄 2.0 kg, 桃仁 2.0 kg, 地鳖虫 1.2 kg, 分别制成粗粉末, 分别加 8 倍量 20% 乙醇, 浸泡 1 小时, 回流提取 2 次, 第 1 次加 20% 乙醇回流提取 30 分钟, 滤过取汁; 药渣再加 6 倍量 20% 乙醇回流提取 1 小时, 滤过取汁, 合并 2 次提取液。

1.3 主要试剂 ALT (C009-1)、甘油三酯 (triglyceride, TG) (P001) 和总胆固醇 (total cholesterol, TC) (P002) 检测试剂盒购自南京建成生物科技有限公司; RNA 抽提 Trizol (9109)、High-Capacity cDNA 反转录试剂盒 (RR037A) 及 SYBR 荧光染料 (RR420) 均购自日本 TaKaRa 公司; 天狼猩红购自北京雷根生物技术有限公司 (BD1150), 油红购自国药集团化学试剂有限公司 (No.20161128)。BCA 蛋白定量试剂盒购自 Thermo Scientific 公司 (23227)。PVDF 膜购自 Merck Millipore 公司 (IPVH00010)。NLRP6 抗体购自 Biorbyt 公司 (P59044), CD68 抗体购自 Abcam 公司 (ab31630), NF- κ B 购自 Santa Cruz 公司 (sc-8008), p-NF- κ B 购自 CST 公司 (S536 93H1), GAPDH 抗体购自 Bioworld 公司 (AP0063)。DAPI 购自 Sigma 公司 (D9542)。胆碱蛋氨酸缺乏 (methionine-choline-deficient, MCD) 饲料 (TP 3005G) 和对照胆碱蛋氨酸充足 (methionine-choline-sufficient, MCS) 饲料 (TP 3005GS) 购自南通特洛菲饲料科技有限公司。

1.4 主要仪器 超声波细胞粉碎机 (宁波新芝科器研究所, JY92-II), 多功能酶标仪 (Thermo Varioskan LUX), 超微量分光光度计 (Berthold Detection Systems, colibri), 普通 PCR 仪 (Bio-RAD, T100), 实时荧光定量 PCR 仪 (ABI, VIIA 7 DX), 电泳仪 (Bio-Rad, PowerPac™ Basic 041BR127719), 化学发光凝胶成像分析系统 (上海培清科技有限公司, JS-1060), 冰冻切片机 (Leica, CM1950), 半自动轮转式切片机 (Leica, RM2245), 自动脱水机 (Leica, TP1020), 包埋机 (Leica, EG1150H), 全自动染色机 (Leica, ST5010), 自动封片机 (Leica,

CV5030), 荧光显微镜(Olympus, BX43), 共聚焦显微镜(Zeiss, LSM800)。

1.5 方法

1.5.1 NASH小鼠模型的制备 参照MCD方法造模^[7]。

1.5.2 分组与处理 24只雄性C57/BL6小鼠按1:2的比例随机采用胆碱蛋氨酸充足(MCS)或胆碱蛋氨酸缺乏(MCD)饲料喂养, 其中8只小鼠采用MCS喂养, 16只小鼠采用MCD饲料喂养。由于MCD需要1周过渡性喂养, 故采用MCD饲料喂养的小鼠第1~3天将MCS和MCD饲料按2:1混合喂养, 第4~5天按1:1混合喂养, 第6~7天按1:2混合喂养, 1周后完全MCD饲料喂养。MCD造模第4周第1天起, 将采用MCD饲养的小鼠随机分为MCD对照组(简称MCD组)和MCD-下瘀血汤(Xiyuxue decoction, XYXD)组(简称XYXD组), 每组各8只。下瘀血汤按70 kg成人临床用量等体重的10倍量, 即以1 ml/100 g小鼠体重的剂量以相应药物灌胃至6周末, 每日1次。MCD对照组以相应剂量的无菌水灌胃。造模结束后以戊巴比妥钠注射麻醉小鼠, 抽取腹主动脉血, 取肝脏组织, 切取一叶冰冻, 一叶用10%中性福尔马林固定后用于组织学观察, 其余液氮处理后-80℃保存后用于提取RNA及蛋白质。

1.5.3 血清学及肝组织指标检测 采用南京建成生物公司相关试剂盒检测各组小鼠血清ALT、TC、TG及肝组织TC、TG水平。

1.5.4 肝组织病理学观察 选取肝右侧最厚一叶, 切取0.5 cm × 0.4 cm × 0.3 cm肝组织1块, 10%中性福尔马林固定, 自动脱水机逐级酒精脱水, 二甲苯透明, 包埋, 4 μm切片, 观察肝组织的病理变化。采用苏木素-伊红(HE)染色观察肝组织学损伤, 由本院病理科两位医师盲法阅片计算NAS评分以评判造模是否成功^[8,9]。天狼猩红染色: 将石蜡切片脱蜡至水, 蒸馏水洗3次, 每次5分钟, 滴加天狼猩红染色液, 30℃孵育30分钟, 无水乙醇冲洗, 晾干后封片。油红染色: 冰冻切片复温后以PBS冲洗2次, 每次5分钟, 60%异丙醇洗1分钟, 室温晾干, 油红稀液染色30分钟, 蒸馏水清洗5分钟, PBS洗5分钟, 封片。采用Image-pro plus 6.0软件分析病理图片的阳性染色区域。

1.5.5 RT-PCR 采用RT-PCR检测各组小鼠簇分化抗原68(cluster of differentiation-68, CD68)、肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白细胞介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)、转化生长因子β(transforming growth factor-β, TGF-β)、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant

protein-1, MCP-1)、基质金属蛋白酶抑制物-1(tissue inhibitors of metalloproteinase 1, TIMP-1)、I型胶原蛋白(collagen 1, Col-1)、平滑肌肌动蛋白α(alpha smooth muscle actin, α-SMA)、核苷酸结合寡聚化结构域蛋白样受体6(nucleotide-binding oligomerization-domain protein-like receptors protein 6, NLRP6)的表达水平, 引物由上海生工生物科技有限公司合成, 具体序列见表1。①总RNA的提取: 按照Trizol(TAKARA, 9109)法提取小鼠肝脏RNA, 将提取的总RNA溶解于DEPC处理的水中, 采用超微量分光光度计测定260 nm和280 nm的吸光度值(A), 检测RNA纯度, 并计算RNA含量; ②逆转录合成cDNA: 按TakaRa逆转录试剂盒(RR037A)说明书进行操作, 反应条件: 37℃ 15分钟, 85℃ 5秒, 4℃。③PCR扩增: 取cDNA 3 μl加SYBR Green 5 μl, 上游引物0.4 μl, 下游引物0.4 μl, ddH₂O 1.2 μl, 制成10 μl反应体系, 在Applied Biosystems实时荧光定量PCR系统中进行扩增反应。PCR扩增条件: 95℃ 30分钟预变性; 95℃ 5秒变性, 60℃ 30秒退火, 45个循环, 60℃ 1分钟延伸。PCR结束后, 采用2^{-ΔΔCt}法分析结果, 计算目的基因在各组的相对表达量。

1.5.6 激光共聚焦三染 取小鼠肝脏冰冻切片, 室温复温后以4%多聚甲醛固定10分钟, PBS洗涤3次, 每次5分钟, 5% BSA封闭30分钟。滴加一抗CD68, 37℃孵育2小时, PBS洗涤3次, 每次5分钟, 加入cy3二抗37℃孵育1小时, PBS洗涤3次, 每次5分钟。滴加一抗NLRP6, 37℃孵育2小时, PBS洗涤3次, 每次5分钟, 加入FITC二抗37℃孵育1小时。加DAPI染色1分钟, PBS洗涤3次, 每次5分钟。最后滴加封片剂1滴, 封片, 激光共聚焦显微镜观察。

1.5.7 Western blot检测蛋白表达 取0.1 mg肝组织加入预冷的RIPA(含蛋白酶抑制剂)匀浆, 4℃ 12000 rpm离心15分钟, 离心半径6 cm, 留取上清液进行蛋白定量。取20 μg样品, 12% SDS-PAGE电泳, 100 V转移1小时至PVDF膜, 封闭1小时; 一抗4℃过夜, 二抗室温孵育45分钟, ECL显影, 采用Image J分析Western blot蛋白表达灰度值。

1.6 统计学处理 采用Graphpad 5.0软件对数据进行统计学分析。计量资料采用单因素方差分析非参数检验, 多组间用Kruskal-Wallis检验, 两组间用Mann Whitney U检验。以P < 0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠肝脏炎症及脂肪变比较 HE染色示

MCS组小鼠肝小叶结构正常,肝细胞索围绕中央静脉呈放射状排列;MCD组小鼠肝组织可见大量脂肪变,炎症细胞浸润明显;与MCD组相比,XYXD组小鼠肝组织脂肪变显著减轻。油红染色示MCD组小鼠肝细胞内有大量红色脂滴填充,形状不规则的脂滴排列紧密,形态较大,见图1。MCD组小鼠NAS评分>4,显著高于MCS组($z = -2.676, P = 0.007$),提示NASH小鼠模型造模成功,下瘀血汤可显著降低NAS评分($z = -2.735, P = 0.006$),见图2。油红染色阳性面积统计结果显示:与MCS组相比,MCD组油红阳性面积显著增加($z = -2.324, P = 0.02$),而XYXD组阳性面积较MCD组显著减少($z = -2.739, P = 0.006$),见图3。

2.2 各组小鼠肝功能及血脂水平 与MCS小鼠相比,

MCD组小鼠ALT水平显著升高,血清TC、TG水平下降,肝组织TC、TG水平升高。与MCD组相比,XYXD组小鼠血清ALT水平和肝组织TC、TG水平显著降低($P < 0.05$),见表2。

2.3 各组小鼠炎症因子表达 RT-PCR结果显示,与MCS组小鼠相比,MCD组小鼠CD68、TNF- α 、IL-1 β 和MCP-1的mRNA相对表达量均显著升高(z 值分别为-2.46、-2.46、-2.449和-2.309, P 值分别为0.014、0.004、0.014和0.021,其中CD68 mRNA升高7.55倍,TNF- α mRNA升高18.22倍,提示MCD模型组小鼠巨噬细胞活化后分泌大量炎症因子,加重了肝细胞炎症反应。与MCD组相比,XYXD组CD68、TNF- α 、IL-1 β 和MCP-1的mRNA相对表达量均显著降低(z 值分别为-1.968、-2.449、-2.449和

表1 RT-PCR 引物序列

名称	序列	名称	序列
18S rRNA	上游引物: 5'-GTAACCCGTTGAACCCATT-3' 下游引物: 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'	MCP-1	上游引物: 5'-ATTGGGATCATCTTGCTGGT-3' 下游引物: 5'-CCTGCTGTTCACAGTTGCC-3'
NLRP6	上游引物: 5'-CTCGCTTGCTAGTGACTACAC-3' 下游引物: AGTGCAAACAGCGTCTCGTT-3'	TGF- β	上游引物: 5'-AAGTTGGCATGGTAGCCCTT-3' 下游引物: 5'-GCCCTGGATAACCACTATTGC-3'
CD68	上游引物: 5'-ACATTGTATTCCACCGCCAT-3' 下游引物: 5'-CATCCCCACCTGTCTCTC-3'	TIMP-1	上游引物: 5'-CAGAACCGCAGGGAGGAG-3' 下游引物: 5'-CCCAGGGAACCAGGAAGC-3'
TNF- α	上游引物: 5'-ATGAGAGGGAGGCCATTTG-3' 下游引物: 5'-CAGCCTCTTCTCATTCTGC-3'	COL-1	上游引物: 5'-TAGGCCATTGTGTATGCAGC-3' 下游引物: 5'-ACATGTTAGCTTTGTGGACC-3'
IL-1 β	上游引物: 5'-AGGTCAAAGGTTTGAAGCA-3' 下游引物: 5'-TGAAGCAGCTATGGCAACTG-3'	α -SMA	上游引物: 5'-GTTCAGTGGTGCCTCTGTCA-3' 下游引物: 5'-ACTGGGACGACATGGAAAAG-3'

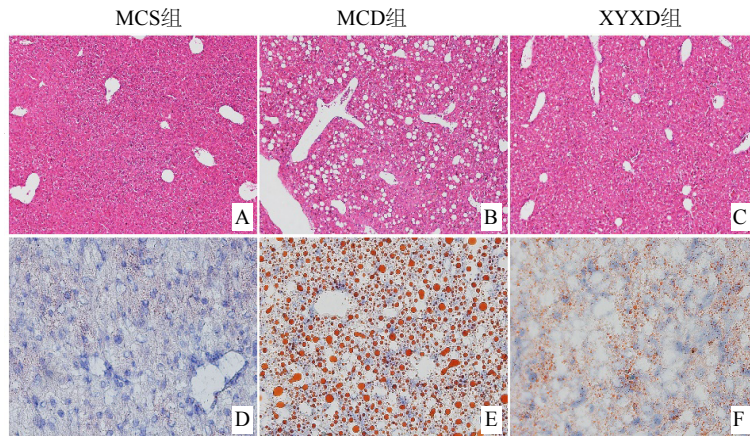


图1 小鼠肝组织 HE 及油红染色

注: A ~ C 为 HE 染色, $\times 100$; D ~ F 为油红染色, $\times 400$

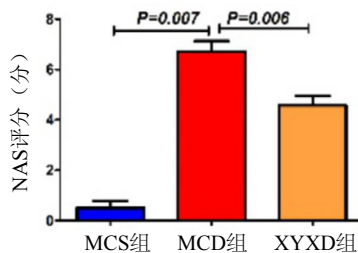


图2 小鼠肝组织 NAS 评分

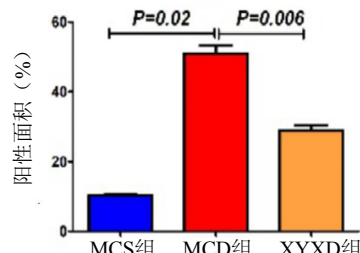


图3 油红染色阳性面积

-2.309, P 值分别为 0.049、0.014、0.014、0.021), 提示下瘀血汤可显著抑制 MCD 引起的炎症因子上调。见图 4。

2.4 各组小鼠 NLRP6 的表达 NLRP6 可抑制 NF- κ B 和丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路。RT-PCR 结果显示, 与 MCS 组相比, MCD 组 NLRP6 mRNA 相对表达量显著下降 ($z = -1.96$, $P = 0.049$), XYXD 组 NLRP6 mRNA 相对表达量显著高于 MCD 组 ($z = -2.449$, $P = 0.014$), 见图 4。免疫印迹结果与实时 RT-PCR 结果一致, 见

图 5。MCD 组 p-NF- κ B 和 CD68 表达水平显著上调 ($z = -2.882$ 、 -2.882 , $P = 0.004$ 、 0.004), XYXD 干预后均显著下调 ($z = -2.882$ 、 -2.882 , $P = 0.004$ 、 0.004), 见图 6。提示下瘀血汤可通过抑制 NLRP6 表达的下调, 从而抑制巨噬细胞和 NF- κ B 的活化, 减少相关炎症因子的释放。

2.5 激光共聚焦检测结果 采用激光共聚焦检测小鼠巨噬细胞标志物 CD68 与 NLRP6 的共定位, 结果显示: MCS 组巨噬细胞表达较低, 呈小棒状, CD68 与 NLRP6 几乎完全重合, 提示 NLRP6 表达

表 2 各组小鼠肝功能及血脂水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	血清ALT (U/L)	血清TC (mmol/L)	血清TG (mmol/L)	肝组织TG (mmol/L)	肝组织TC (mmol/L)
MCS组	30.2 ± 10.2	1.13 ± 0.23	1.77 ± 0.18	0.90 ± 0.25	0.72 ± 1.01
MCD组	179.3 ± 32.8 ^a	0.55 ± 0.26 ^b	0.64 ± 0.27 ^c	1.35 ± 0.24 ^d	1.44 ± 0.21 ^e
XYXD组	78.2 ± 43.4 ^f	0.53 ± 0.15 ^g	0.61 ± 0.12 ^h	0.87 ± 0.42 ⁱ	0.74 ± 0.20 ^j

注: 与 MCS 组相比, ^a $z = -3.13$, ^a $P = 0.002$; ^b $z = -1.663$, ^b $P = 0.096$; ^c $z = -3.13$, ^c $P = 0.003$; ^d $z = -3.003$, ^d $P = 0.003$; ^e $z = -1.208$, ^e $P = 0.035$; 与 MCD 组相比, ^f $z = -2.364$, ^f $P = 0.018$; ^g $z = -0.576$, ^g $P = 0.565$; ^h $z = -1.345$, ^h $P = 0.179$; ⁱ $z = -3.13$, ⁱ $P = 0.002$; ^j $z = 2.875$, ^j $P = 0.004$

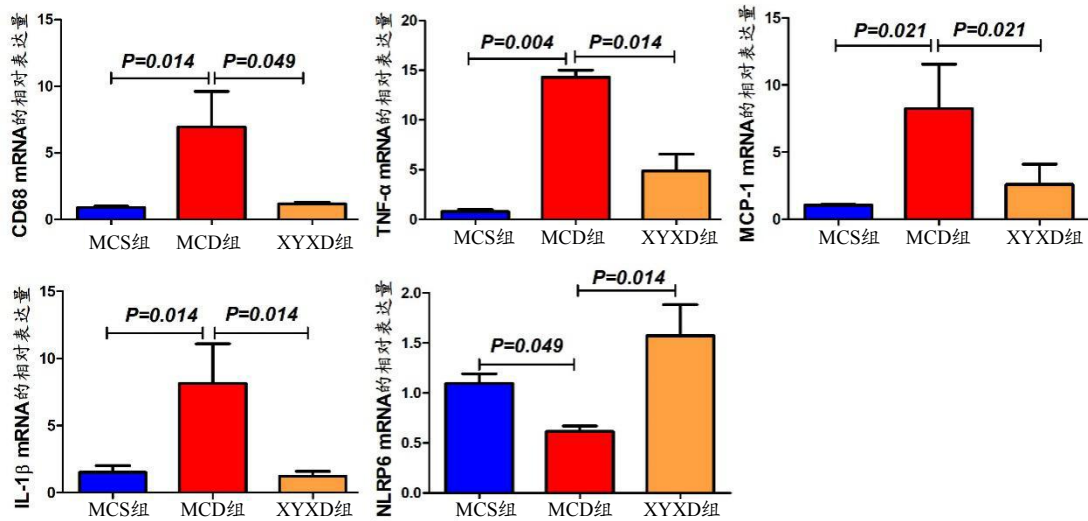


图 4 RT-PCR 检测相关炎症因子的表达

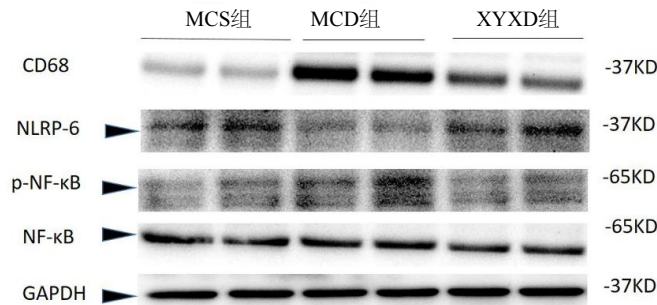


图 5 Western blot 检测炎症相关蛋白的表达

来源巨噬细胞; MCD组 CD68 表达显著升高, 而 NLRP6 的表达显著降低, 两者共定位显著减少, 提示 MCD 诱导巨噬细胞促炎症功能增强; XYXD 组 CD68 表达显著降低, CD68 与 NLRP6 共染显著增加, 提示下瘀血汤抑制巨噬细胞促炎症功能, 见图 7。
 2.6 下瘀血汤对 NASH 小鼠促肝纤维化相关因子的抑制作用 天狼猩红染色结果显示: MCS 组天狼猩红阳染主要分布于中央静脉管壁, 小叶间罕有阳染。MCD 组肝小叶间及汇管区可见胶原纤维沉积, 两组差异有统计学意义 ($z = -2.882, P = 0.004$); 与 MCD 组相比, XYXD 组天狼猩红阳染面积显

著降低 ($z = -2.558, P = 0.011$) 见图 8、图 9。实时定量 PCR 结果显示: 与 MCS 组相比, MCD 组的 TGF- β 、 α -SMA、TIMP-1 和 Col-1 的 mRNA 相对表达量显著上调 (z 值分别为 -2.449、-2.205、-2.449 和 -2.449, P 值分别为 0.014、0.027、0.014 和 0.014); 与 MCD 组相比, XYXD 组 TGF- β 、 α -SMA、TIMP-1 和 Col-1 的 mRNA 相对表达量显著下降 (z 值分别为 -2.205、-0.960、-2.449 和 -2.449, P 值分别为 0.027、0.050、0.014 和 0.014), 提示下瘀血汤可抑制 MCD 诱导的纤维化因子上调, 见图 10。

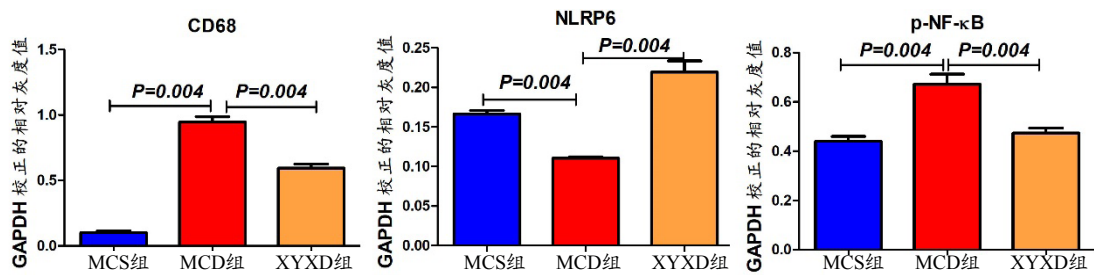


图 6 Western blot 检测相关蛋白的灰度分析

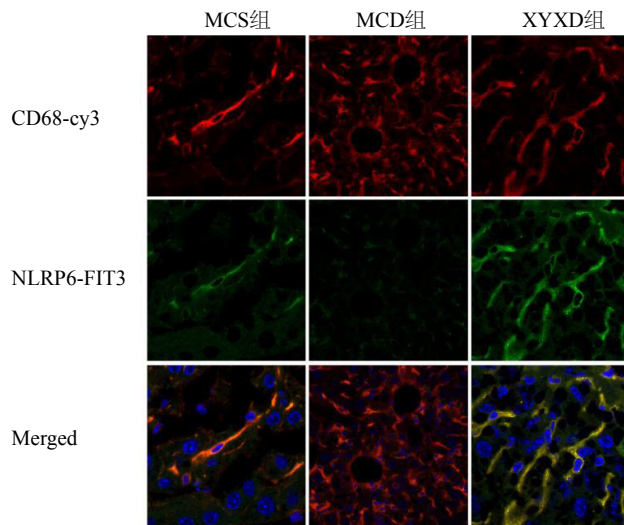


图 7 NLRP6 与 CD68 共定位于肝脏巨噬细胞

注: 红色为 Cy3 标记 CD68, 绿色为 FIT3 标记 NLRP6, 蓝色为 DAPI 标记细胞核

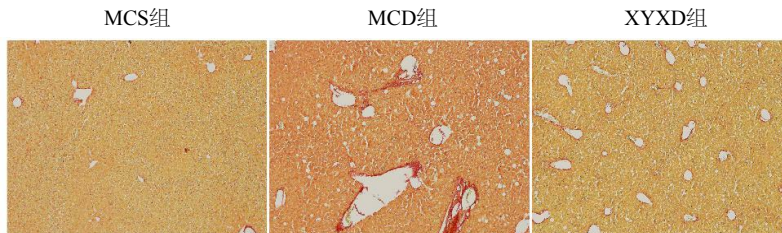


图 8 小鼠肝组织天狼猩红染色 ($\times 100$)

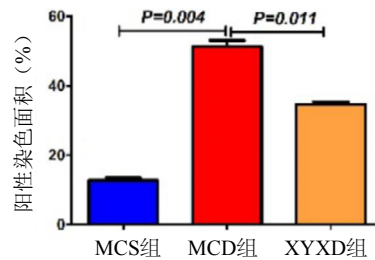


图9 小鼠肝组织天狼猩红阳性染色面积分析

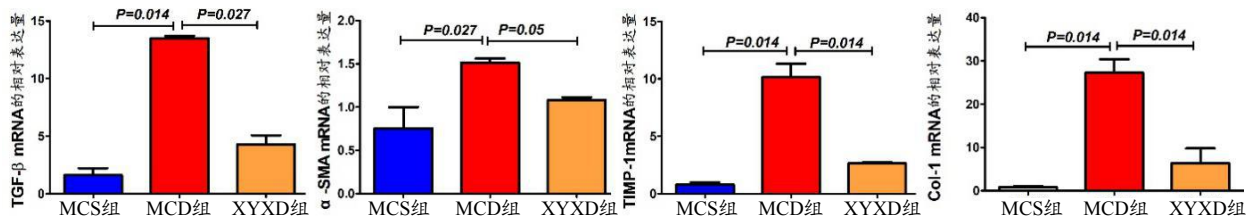


图10 RT-PCR 检测 TGF-β、α-SMA、TIMP-1 和 Col-1 的 mRNA 相对表达量

3 讨论

NASH发病机制主要有“二次打击”、“三次打击”和“多重打击”等理论^[10-12]。MCD饮食诱导NASH的原理是通过饮食中蛋氨酸与胆碱的缺乏造成线粒体β-氧化功能障碍和极低密度脂蛋白合成与分泌减少,从而使甘油三酯在肝细胞内迅速大量堆积,导致肝细胞脂肪变性,造成“第一次打击”^[13];肝细胞脂肪变导致线粒体对游离脂肪酸的摄入减少,促使游离脂肪酸β-氧化增加,导致活性氧自由基的合成和脂质过氧化,形成对肝脏的“第二次打击”^[14],进而形成NASH。本研究MCD模型的NAS评分达到4分以上,同时ALT水平及肝内TC、TG水平显著升高,符合该模型特点^[13],致炎性和肝纤维化相关因子显著升高^[15],提示造模成功。

固有免疫受体如何影响NAFLD的发生是近年的研究热点^[16]。NLRP6可抑制NF-κB和丝裂原活化蛋白激酶^[17],从而发挥促进凋亡、抑制炎症及肠道组织增殖的作用^[18,19]。小鼠模型也显示NLRP6炎症体缺陷可导致相关肠道菌群构型变化,从而激动TLR4和TLR9后流入门静脉循环,促进肝脏脂肪变性并使炎症加剧^[6,20],但也有研究认为NLRP6不会显著影响肠内微生物群在稳态中的作用^[21,22]。PPAR-δ激动剂可通过调控NLRP6等炎症小体的激活来减少脂肪酸诱导的炎症和脂肪变性^[23]。NLRP6在不同细胞的激活可能依赖不同的途径: NLRP6在结肠上皮细胞介导炎症体装配及激活; NLRP6在其他类型细胞,如巨噬细胞和中性粒细胞,并不是

通过炎症体起作用^[24,25]。总而言之,目前研究提示NLRP6具有抑制炎症作用,因此调控NLRP6表达可能对抑制NASH进展具有重要作用。

中医专家共识意见^[26]认为, NASH以肝体用失调、脾肾亏虚为主要特点,痰、湿、瘀、热等为主要病理因素,治疗方法主要为疏肝理气、健脾和胃、健脾益肾、化痰散结,佐以清热化湿。下瘀血汤出自东汉医圣张仲景之《金匮要略·妇人产后病脉证治》,方中大黄推陈致新、调和气机、通利邪毒;桃仁活血化瘀;土鳖虫逐瘀破结并开血闭。全方三药合用共奏活血化瘀以疏通经络、破瘀散结,通利六腑以荡涤胃肠、推陈致新之功,因此下瘀血汤与NASH病因病机相合,这可能是其有效的中医基础。

本研究表明,下瘀血汤可显著改善MCD所致NASH小鼠肝细胞内的脂质沉积,减少肝细胞内脂滴数量及体积,显著降低小鼠血清ALT水平并改善肝内血脂水平,提示下瘀血汤治疗NASH有效。本研究中MCD造模后NLRP6蛋白表达下调,同时CD68和p-NF-κB上调, NF-κB信号激活巨噬细胞后分泌炎症因子增加^[27], TNF-α、IL-1β、MCP-1等炎症因子表达上调,提示MCD诱导巨噬细胞和NF-κB信号的激活,进而炎症因子表达升高;下瘀血汤干预后NLRP6表达上调, CD68和p-NF-κB及炎症因子显著下调。激光共聚焦结果提示下瘀血汤显著抑制CD68上调和NLRP6下调,增加两者共定位,提示下瘀血汤可通过抑制NLRP6的下调,进而抑制NF-κB和巨噬细胞活化,减少炎症因子的释放,与前期下瘀血汤

可显著抑制NF- κ B信号的研究结果^[4]一致。此外,慢性炎症因子的增加可诱导肝脏星状细胞的激活和纤维化的发生,本研究检测的肝脏胶原沉积和致纤维化相关因子TGF- β 、 α -SMA、TIMP-1和Col-1的表达均出现了上调,下瘀血汤治疗同样具有抑制作用,与既往研究一致。

综上,本研究表明下瘀血汤可改善MCD诱导的小鼠非酒精性脂肪性肝炎,为下瘀血汤在治疗NASH中的应用提供基础依据,但具体机制仍有待深入研究。

参考文献

- [1] de Alwis NM, Day CP. Non-alcoholic fatty liver disease:the mist gradually clears[J]. *J Hepatol*,2008,48 Suppl 1:S104-S112.
- [2] Pimpin L, Cortez-Pinto H, Negro F, et al. Burden of liver disease in Europe: epidemiology and analysis of risk factors to identify prevention policies[J]. *J Hepatol*,2018,doi: 10.1016/j.jhep.2018.05.011. [Epub ahead of print]
- [3] Wong VW, Wong GL. A LEAN treatment for non-alcoholic steatohepatitis[J]. *Lancet*,2015,387(10019):628-630.
- [4] Liu C, Yuan X, Xue DY, et al. Xia-yu-xue decoction (XYXD) reduces carbon tetrachloride (CCl₄)-induced liver fibrosis through inhibition of hepatic stellate cell activation by targeting NF- κ B and TGF- β 1 signaling pathways[J]. *BMC complementary Altern Med*,2015,15:201.
- [5] Anand PK, Malireddi RK, Lukens JR, et al. NLRP6 negatively regulates innate immunity and host defence against bacterial pathogens[J]. *Nature*,2012,488(7411):389-393.
- [6] Henao-Mejia J, Elinav E, Jin C, et al. Inflammasome mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity[J]. *Nature*,2012;482(7384):179-185.
- [7] Loyer X, Paradis V, Héniqne C, et al. Liver microRNA-21 is overexpressed in non-alcoholic steatohepatitis and contributes to the disease in experimental models by inhibiting PPAR α expression[J]. *2016*,65(11):1882-1894.
- [8] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南(2010年修订版)[J]. *中华肝脏病杂志*,2010,18(3):163-170.
- [9] Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Hepatology*,2005,41(6):1313-1321.
- [10] Diehl AM, Day C. Cause, pathogenesis, and treatment of nonalcoholic steatohepatitis[J]. *N Engl J Med*,2017,377(21):2063-2072.
- [11] Than NN, Newsome PN. A concise review of non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Atherosclerosis*,2015,239(1):192-202.
- [12] Engin A. Non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Adv Exp Med Biol*,2017,960:443-467.
- [13] Anstee QM, Goldin RD. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research[J]. *Int J Exp Pathol*,2006,87(1):1-16.
- [14] Gyamfi MA, Damjanov I, French S, et al. The pathogenesis of ethanol versus methionine and choline deficient diet-induced liver injury[J]. *Biochem Pharmacol*,2008,75(4):981-995.
- [15] Tinlakos DG. Nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis: histological diagnostic criteria and scoring systems[J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*,2010,22(6):643-650.
- [16] Jin C, Henao-Mejia J, Flavell RA. Innate immune receptors: key regulators of metabolic disease progression[J]. *Cell Metab*,2013,17(6):873-882.
- [17] Levy M, Shapiro H, Thaiss CA, et al. NLRP6: a multifaceted innate immune sensor[J]. *Trends Immunol*,2017,38(4):248-260.
- [18] Elinav E, Strowig T, Kau AL, et al. NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis[J]. *Cell*,2011,145(5):745-757.
- [19] Normand S, Delanoye-Crespin A, Bressenot A, et al. Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 6 (NLRP6) controls epithelial self-renewal and colorectal carcinogenesis upon injury[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2011,108(23):9601-9606.
- [20] Levy M, Thaiss CA, Zeevi D, et al. Microbiota-modulated metabolites shape the intestinal microenvironment by regulating NLRP6 inflammasome signaling[J]. *Cell*,2015,163(6):1428-1443.
- [21] Lemire P, Robertson SJ, Maughan H, et al. The NLR protein NLRP6 does not impact gut microbiota composition[J]. *Cell Rep*,2017,21(13):3653-3661.
- [22] Mamantopoulos M, Ronchi F, Van Hauwermeiren F, et al. Nlrp6- and ASC-dependent inflammasomes do not shape the commensal gut microbiota composition[J]. *Immunity*,2017,47(2):339-348.
- [23] Canip D, Neyrinck AM, Fava F, et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia[J]. *Diabetologia*,2007,50(11):2374-2383.
- [24] Lee HJ, Yeon JE, Ko EJ, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-delta agonist ameliorated inflammasome activation in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *World J Gastroenterol*, 2015,21(45):12787-12799.
- [25] Choik C, Hwang JM, Bang SJ, et al. Chloroform extract of alfalfa (*Medicago sativa*) inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by downregulating ERK/NF- κ B signaling and cytokine production[J]. *J Med Food*,2013,16(5):410-420.
- [26] 中华中医药学会脾胃病分会. 非酒精性脂肪性肝病中医诊疗专家共识意见(2017)[J]. *中医杂志*,2017,58(19):1706-1710.
- [27] Giby VG, Ajith TA. Role of adipokines and peroxisome proliferatoractivated receptors in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *World J Hepatol*,2014,6(8):570-579.

收稿日期: 2018-05-16

吴柳,张洁,马文婷,等. 下瘀血汤对胆碱蛋氨酸缺乏诱导的小鼠非酒精性脂肪性肝炎的抑制作用[J/CD]. *中国肝脏病杂志(电子版)*, 2018,10(3):48-55.