

doi:10.3969/j.issn.1005-0264.2019.01.016

# 清肝化痰活血方对大鼠非酒精性脂肪性肝炎的防治作用\*

侯艺鑫 李玉鑫 杨雪 杨志云 江宇泳 王宪波<sup>△</sup>

首都医科大学附属北京地坛医院中西医结合二科 (北京, 100015)

**摘要 目的:**探讨清肝化痰活血方对 LX<sub>R</sub>a/FAS 信号通路介导的非酒精性脂肪性肝炎(NASH) 大鼠肝细胞脂肪沉积的影响。  
**方法:**选用 SPF 级雄性 SD 大鼠 70 只,分 4 组,正常组、模型组、治疗组及预防组;除正常组外其余 3 组大鼠采用高脂饮食复制 NASH 模型;造模 8 周结束。预防组大鼠从造模开始给予清肝化痰活血方灌胃,1 次/d,共 12 周;治疗组大鼠从造模结束后,开始灌胃清肝化痰活血方,而模型组、正常组大鼠灌胃等量生理盐水,均 1 次/d,共 4 周。观察各组大鼠肝脏脂肪变性程度、血清 ALT、AST、TC、TG 水平。采用实时定量 PCR 法检测肝细胞 LX<sub>R</sub>a mRNA、FAS mRNA 的表达。  
**结果:**造模 8 周时,正常组大鼠肝组织正常,其余 3 组大鼠肝脏均发生不同程度脂肪变性;模型组大鼠血清 ALT、AST 水平升高,与正常组比较,差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ ),与模型组比较,预防组大鼠血清 ALT、AST、TC、TG 水平显著下降( $P < 0.05$ );治疗组大鼠的肝脏脂肪变性程度均明显轻于模型组大鼠,其 ALT、AST、TC、TG 水平明显低于模型组( $P < 0.05$ );与正常组比较,其余 3 组大鼠肝细胞 LX<sub>R</sub>a、FAS 基因表达水平均明显升高( $P < 0.01$ ),与模型组比较,预防组和治疗组大鼠的上述基因表达水平下调明显( $P < 0.01$ )。  
**结论:**LX<sub>R</sub>a/FAS 通路是介导 NAFLD 脂质平衡代谢紊乱重要的信号通路,清肝化痰活血方能够调控肝细胞 LX<sub>R</sub>a/FAS 通路,使 NASH 大鼠肝细胞脂肪沉积趋于减轻,这可能是该方抗实验性大鼠脂肪性肝炎的作用机制之一。

**关键词** 非酒精性脂肪性肝炎;清肝化痰活血方;肝细胞;LX<sub>R</sub>a/FAS 通路;脂质代谢

## Preventive and therapeutic effects of Qinggan Huatan Huoxue Recipe on non-alcoholic steatohepatitis in rats

HOU Yi-xin, LI Yu-xin, YANG Xue, WANG Xian-bo<sup>△</sup>, et al. Beijing Ditan Hospital Capital Medical University (Beijing, 100015) China

**Abstract Objective:** To investigate the effects of Qinggan huatan huoxue Recipe on Nonalcoholic fatty liver disease in rats (NAFLD).  
**Methods:** Seventy SPF-class male SD rats were selected and divided into 4 groups: normal group, model group, treatment group and prevention group; In addition to the normal group, NAFLD rat models were replicated with high fat diet in all groups. Eight weeks of makeover. The rats in the prevention group were given the Qinggan huatan huoxue recipe method to fill their stomachs from the start of moulding. The rats in the treatment group began to pour stomach to Qinggan huatan huoxue recipe after moulding. In the model group and normal group, the same amount of saline was injected into the stomach. All once a day for 12 weeks. To observe the levels of serum ALT, AST, TC and TG were observed. The expression of LX<sub>R</sub>a mRNA and FAS mRNA in hepatocytes were detected by real time quantitative PCR method. **Results:** The normal liver tissue of rats was normal at 8 weeks. The rats in the model group had different degrees of fat degeneration. Compared with normal rats, the serum ALT and AST levels in the model group had an upward trend. After comparison, they had significant significance ( $P < 0.05$ ); Compared with the model group, serum ALT, AST, TC and TG levels decreased significantly in the prevention group ( $P < 0.05$ ); The degree of liver fatty degeneration in the treatment group was significantly lower than that in the model group. The levels of ALT, AST, TC, and TG in

\* 基金项目:国家自然科学基金(No. 81774234, 81473641);首都医科大学附属北京地坛医院内桥梁计划(No. DTQL201602);北京市科学技术委员会“首都临床特色应用研究”资助项目(No. Z181100001718052);△通信作者 wangxianbo638@163.com

the treatment group were significantly lower than those in the model group ( $P < 0.05$ ); Compared with the normal group, the expression of LXRA and FAS genes in the model group increased significantly ( $P < 0.01$ ); Compared with the model group, the expression of the above gene were significantly reduced in the prevention group and the treatment group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The LXRA-FAS pathway is an important signal pathway to mediate the metabolic disorder of NAFLD lipid balance, and the LXRA-FAS pathway of liver cells can be regulated by Qinggan huatan huoxue recipe. This may be one of the mechanisms of action of this party against experimental rat fatty liver.

**Key Words:** nonalcoholic fatty liver disease; Qinggan huatan huoxue recipe; Liver cells; LXRA-FAS pathway; Lipid metabolism

非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 是指酒精性因素以外多病因引起的以肝细胞脂肪变性和脂质贮积为主要特征的临床病理综合征。其包括了单纯性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 以及相关的肝硬化、肝癌等<sup>[1]</sup>。目前 NAFLD 的发病机制尚不清楚, 但脂质代谢异常是 NAFLD 发病机制中最基础、最关键的环节之一<sup>[2,3]</sup>。肝 X 受体 (LXR) / 脂肪酸合成酶 (FAS) 通路是调控肝细胞脂肪代谢平衡的重要通路之一, 通过对肝细胞的脂肪代谢平衡的影响, 导致肝细胞脂质沉积<sup>[4]</sup>。因此, 调控 LXRA、FASmRNA 基因表达, 可能是有效防治 NAFLD 的途径之一。本课题组前期临床研究发现清肝化痰活血方能够有效降低 NASH 患者的甘油三酯及胆固醇水平, 改善肝脏脂肪沉积。本实验通过观察清肝化痰活血方对 NASH 大鼠肝细胞 LXRA、FAS 基因表达的影响, 探讨该方防治大鼠 NASH 的分子机制, 为临床防治该病提供理论及实验依据。

## 1 材料与方法

1.1 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 70 只, 体重 140 ~ 160g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司 [ 许可证号: SCXK (京) 2007 - 0001 ]。饲养在首都医科大学 SPF 级动物房。

1.2 药物 清肝化痰活血方 (茵陈蒿 18g, 茯苓、决明子、丹参各 15g, 栀子、陈皮、半夏、郁金各 10g, 大黄 6g)。

1.3 造模与分组 70 只大鼠正常喂养 1 周后随机分组, 正常组 (20 只) 大鼠以普通饲料喂养, 自由饮水; 模型组 (30 只) 和预防组 (20 只) 大鼠予高脂饲料 (即基础饲料 + 100g · L<sup>-1</sup> 猪油 + 20g · L<sup>-1</sup> 胆固醇) 喂养; 自由饮水。造模 8 周, 模型制备成功后, 随机取预防组、模型组及正常组大鼠各 10 只, 获取血清及肝组织标本。再将模型组剩余的 20 只大鼠随机分为 2 组, 即模型组 (10 只) 与治疗组 (10 只)。至此实验大鼠共分为 4 组, 即正常组 (10 只)、模型组 (10 只)、治疗组 (10 只)、预防组 (10 只)。

1.4 给药方法 预防组大鼠自造模之日起开始灌胃清肝化痰活血方汤剂 1 次/d, 共 12 周; 治疗组大鼠在造模结束时开始灌胃该中药, 1 次/d, 共 4 周, 用量均为 0.19 g/kg 体质量, 用药量相当于 60kg 成人剂量的 10 倍。模型组和正常组大鼠以等容积生理盐水灌胃 4 周。

1.5 观察指标与检测方法

1.5.1 检测大鼠肝湿重、体重、肝指数 观察大鼠肝脏形态包括重量、外形、色泽、质地, 计算肝重指数 (肝重指数 = 肝脏湿重/体重 × 100%)。

1.5.2 检测血清生化指标 大鼠经腹腔麻醉后, 立刻从腹主动脉取血, 静置 30min, 3000r/min 离心 3min, 保留血清, 采用全自动生化分析仪检测各组大鼠血清 ALT、AST、TC、TG 含量。

1.5.3 肝组织病理检测 8 周造模结束、4 周治疗结束时, 每组取 10 只大鼠, 腹腔注射 3% 戊巴比妥钠麻醉, 采集右叶 1.5cm × 1cm × 0.5cm 肝组织, 经磷酸缓冲福尔马林溶液固定, 石蜡切片, 进行苏木精-伊红染色, 观察大鼠肝组织病理情况。

1.5.4 大鼠肝细胞 LXRA 和 FASmRNA 测定 肝细胞 RNA 的提取和逆转录反应: TRIzol 提取肝细胞 RNA, 测定含量并计算浓度, 采用 Oligo (dT) 逆转录法, 将 RNA 逆转录为 cDNA。引物设计与合成: 据 Genebank 提供 LXRA (NM-031627.2)、FAS (NM-139194.2)、ACTIN (NM-031144) 基因序列, 以大鼠 ACTIN 作为内参基因, 引物由武汉塞维尔生物科技有限公司设计并合成 (见表 1)。反应体系: 2.5 × Real Master Mix/20 × SYBR-solution 9ul, 上、下游引物各 2ul, DNA 模板 1ul, 加灭菌双蒸水补至总体积 20μL。反应条件: ①95℃ 持续 1 min 预变性; ②95℃ 持续 10s 变性; ③GAPDH 60℃, LXRA60℃, FAS60℃, 退火 20 s; ④68℃ 持续 30 s 延伸, ②~④ 39 个循环; ⑤溶解曲线分析, 72 ~ 95℃, 持续 5 ~ 10 s。反应完毕, 采用 Opticon Monitor3.1 软件分析, 用公式  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法进行相对定量。

表 1 引物序列

基因	引物序列	扩增长度 (bp)
LXRa	上游引物: ACAACCCTGGGAGTGAGAGCA	304
	下游引物: ATCCGTGGGAACATCAGTCCG	
FAS	上游引物: TGGAATCCCAAGTCCTGAAAGT	60
	下游引物: TTTCGGCAGTCTCCAGATGTA	
ACTIN	上游引物: TGCTATGTTGCCCTAGACTTCG	240
	下游引物: GTTGGCATAGAGGTCTTTACGG	

1.6 统计学方法 统计学处理用 SPSS22.0 软件包进行分析, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 各组间数据比较, 采用单因素方差分析,

等级资料采用秩和检验。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况 70 只大鼠均无死亡,其中正常组大鼠饮食正常,毛发有光泽,活泼爱动;模型组大鼠体型肥胖,嗜睡懒动,毛发油腻欠光泽;预防组和治疗组大鼠饮食减少,活动量均有不同程度下降,毛发欠光泽。

2.2 各组大鼠两时段肝湿重、体重、肝指数情况 见表 2

表 2 各组大鼠两时段肝湿重、体重、肝指数比较 (x±s)

Table with 4 columns: 组别, 肝湿重(m/g), 体质量(m/g), 肝指数(%). Rows include Normal group (8w, 12w), Model group (8w, 4w), Prevention group (8w, 4w), and Treatment group (8w, 4w).

与正常组同时段比较, \*P<0.05, \*\*P<0.01;与模型组同时段比较, ΔP<0.05, ΔΔP<0.01

2.3 各组大鼠肝脏病理变化

2.3.1 肉眼观察肝组织 正常组大鼠肝脏形态正常,肝脏为红褐色,表面光滑有光泽,实验结束时无 1 例出现异常;模型组大鼠肝脏体积明显增大,重量明显增加,切面油腻,边缘钝,表面粗糙呈现黄褐色;预防组大鼠肝脏比正常组的增大,肝脏重量增加,但比模型组的体积小,肝脏呈较淡黄褐色,但表面光滑;治疗组大鼠肝脏体积比正常组的增大,呈现砖红色,

表面光滑,但比模型组大鼠肝脏体积偏小。

2.3.2 肝脏 HE 染色结果 4 周治疗结束时,正常组大鼠肝小叶轮廓清晰、完整,肝索排列有序,肝细胞呈放射状围绕在中央静脉周围,肝细胞无脂肪变性,细胞核位于肝细胞中央,核大而圆(见插图图 1A),模型组大鼠的肝小叶结构被破坏,肝窦结构难以辨认,肝索排列不整齐,肝细胞呈弥漫性脂肪变性,胞浆内可见大小不等的大泡样脂滴,部分融合为大脂滴,与周围边界不清晰,还可见到肝细胞有点状坏死,碎屑样坏死和炎性细胞(见插图图 1B);预防组大鼠肝小叶结构完整,脂肪变性细胞数目较模型组明显减少,仅见少数细小脂滴散布于肝细胞内,肝索结构排列整齐(见插图图 1C);治疗组大鼠肝小叶结构尚清晰,肝细胞的脂肪变性数目亦明显减少,胞浆内脂滴数目减少,偶见个别大脂滴存在(见插图图 1D)。

2.4 各组大鼠两时段肝细胞 LXRα、FASmRNA 表达情况 见表 3。

表 3 各组大鼠两时段肝细胞 LXRα、FASmRNA 表达比较

Table with 4 columns: 组别, LXRα RNA, FASmRNA. Rows include Normal group (8w, 12w), Model group (8w, 4w), Prevention group (8w, 4w), and Treatment group (8w, 4w).

与正常组同时段比较, \*P<0.05, \*\*P<0.01;与模型组同时段比较, ΔP<0.05, ΔΔP<0.01

2.5 各组大鼠血清生化指标检测结果 见表 4。

表 4 各组大鼠两时段血清各生化指标比较 (x±s)

Table with 5 columns: 组别, ALT(U/L), AST(U/L), TG(mmol/L), TC(mmol/L). Rows include Normal group (8w, 12w), Model group (8w, 4w), Prevention group (8w, 4w), and Treatment group (8w, 4w).

与正常组同时段比较, \*P<0.05, \*\*P<0.01;与模型组同时段比较, ΔP<0.05, ΔΔP<0.01

### 3 讨论

肝脏脂肪沉积是 NASH 的最典型的病理特征。各种原因导致的肝脏脂质代谢紊乱和肝细胞内异常脂肪沉积;而异常的脂肪沉积又会是代谢紊乱的启动因素,从而加重肝细胞内脂质代谢紊乱和肝细胞内脂肪沉积<sup>[5]</sup>。

肝细胞脂质代谢的平衡受到多条信号通路的共同调控和影响,目前针对核受体对肝细胞内脂质平衡机制的研究越来越多<sup>[6]</sup>。本实验研究了核受体 LXRa 与靶基因 FAS 结合通过调节肝细胞脂肪酸的生成,从而影响脂肪的合成,进而导致脂肪肝的形成。LXRa 是脂肪酸生成的关键基因,FAS 是 LXRa 的下游基因,是脂肪合成的关键酶,其中 LXRa 对于 FAS 的调节,一方面是直接与 FAS 启动子结合,另一方面是间接通过 SREBP-1C 途径从而上调 FAS 基因表达来实现的<sup>[7]</sup>。SREBP-1C 的过度表达增加 FAS 基因转录,从而增强 FAS 基因活性,引起脂肪酸合成增多,进而导致肝细胞内异常脂肪沉积形成脂肪肝<sup>[8]</sup>。在缺失 LXR 基因的小鼠体内,肝细胞内 SREBP-1C 的 mRNA 基因表达水平显著下降,而 FAS mRNA 水平显著下降<sup>[5]</sup>。本研究结果表明,模型组较正常组大鼠肝细胞 LXRa、FAS 基因表达水平均明显升高( $P < 0.01$ ),本结果与既往研究结果一致,表明 LXRa、FAS 基因调控了肝细胞内脂质代谢紊乱。

从中医角度来看,NASH 属于“积聚、胁痛、痰湿”等范畴,病位在肝,涉及脾胃。病因或过度肥胖,或感受湿热疫毒,或过食肥甘厚味,或情致失调等。肝失疏泄,湿热内蕴,脾失健运,瘀血阻滞,痰浊内结,最终形成湿热痰瘀相互胶结,痹阻于肝脏脉络是 NASH 病机演变的基本规律<sup>[9]</sup>。文献报告表明针对单纯性脂肪肝的患者,只要注意控制饮食,加强锻炼,就能收到很好的临床效果,而对于 NASH 的患者(如血清转氨酶升高以及肝活检有炎症改变)则需要采用药物,如用清热利湿,化痰活血的药物。清肝化痰活血方是地坛医院中西医结合中心临床用于治疗 NASH 的基本方剂,由茵陈蒿汤合二陈汤加减化裁组成,具有清热利湿活血化痰功效。本次实验结果提示该方可有效地防止肥胖、防止肝内脂肪大量沉积,而且具有逆转脂肪沉积的作用,对已经发生脂肪变的肝脏有缓解作用。ALT 和 AST,是非特异性细胞内功能酶,正常时血清内含量很低,只有当肝细胞受损时,肝细胞膜通透性增加,导致其活性迅速增加,是迄今为止被认为反映肝细胞损害的重要指标。NASH 患者转氨酶升高

常以 AST 升高为主,且升高幅度不太显著<sup>[10]</sup>。本实验结果说明清肝化痰活血方对 NASH 有很好地保肝抗炎降酶作用,同时该方能够调节 LXRa/FAS 信号通路,减少脂肪合成与沉积,达到改善 NASH 大鼠肝脏病理情况,使肝细胞脂质代谢紊乱趋于正常。

清肝化痰活血方对 NASH 有较好的临床治疗作用,可在一定程度上防止肥胖、防止肝脏脂肪过度沉积、改善肝功能、改善肝细胞脂肪变性、减轻肝组织炎症、调节 LXRa/FAS 信号通路,减少肝脏脂肪沉积,此方可在临床推广运用。

### 参考文献

- [1] Latea L, Negrea S, Bolboaca S. Primary non-alcoholic fatty liver disease in hypertensive patients [J]. *Austr MedJ*, 2013, 6(6): 325-330.
- [2] Tan TC, Crawford DH, Jaskowski LA, et al. Altered lipid metabolism in Hfe-knockout mice promotes severe NAFLD and early fibrosis [J]. *Am J Physiol Gastrointest LiverPhysiol*, 2011, 301(5): 865-876.
- [3] Musso G, Gambino R, Cassader M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. *Prog Lipid Res*, 2009, 48(1): 1-26.
- [4] Yap F, Craddock L, Yang J. Mechanism of AMPK suppression of LXR dependent Srebp-1 transcription [J]. *IntJ Biol Sci*, 2011, 7(5): 645-650.
- [5] 高鑫. 肝脏脂肪沉积是代谢紊乱的启动因素 [J]. *中华医学杂志*, 2011, 91(26): 1803-1804.
- [6] 杜尧, 谢梅林. 肝细胞内脂质平衡机制及其调节药物的研究进展 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2013, 27(4): 755-759.
- [7] 王冰, 程丽静, 高政南, 等. 肝 X 受体的激活对小鼠糖尿病肝脏脂肪酸合成酶表达的调节 [J]. *中华医学杂志*, 2008, 88(12): 848-852.
- [8] 毛奇琦, 孙旭. 核受体在胆汁酸和胆固醇代谢中的作用 [J]. *国际消化病杂志*, 2008, 28(3): 243-245.
- [9] 叶放, 赵文霞. 中医对非酒精性脂肪肝的认识现状 [J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2003, 11(1): 60.
- [10] 范建高, 曾民德. 脂肪性肝病 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 336.

(收稿日期: 2018-10-07 编辑: 韦 怡)