

傣百解醇提物调控趋化素表达发挥对非酒精性脂肪肝大鼠治疗作用

李松梅¹, 夏杰^{1*}, 张贵华¹, 吕花荣², 蔡豪², 王菱¹, 仇嘉¹, 普莉¹

1. 云南省中医医院, 云南昆明 650021

2. 武警云南省总队医院, 云南昆明 650000

摘要: 目的 研究傣百解醇提物对非酒精性脂肪肝大鼠的治疗作用, 并探讨其调控趋化素 (Chemerin) 及其受体 (CMKLRI) 表达的作用机制。方法 高脂饲料喂养8周建立非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 大鼠模型, 验证造模成功后改善通饲料喂养, 并随机分为模型组、非诺贝特胶囊组 (阳性药, 0.2 g/kg) 和傣百解醇提物低、高 (2.6、4.5 g/kg) 剂量组, 每组10只, 给药组每天ig给药1次, 连续4周; 对照组大鼠一直饲予普通饲料, 对照、模型组给予等体积纯水。最后1次给药后大鼠禁食不禁水12 h, 腹主动脉取血收集血清, 于全自动生化分析仪上测定血清总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、游离脂肪酸 (FFA)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)、空腹血糖 (FBG) 水平; ELISA法检测血清空腹胰岛素 (FINS) 的浓度; 计算胰岛素敏感指数 (ISI) 和胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR)。取肝组织进行HE染色, 光学显微镜下观察肝组织病理学改变。实时荧光定量PCR (qRT-PCR) 法检测肝组织 Chemerin 及 CMKLRI mRNA 表达水平。结果 与模型组比较, 傣百解醇提物高、低剂量组血清 TC 水平均显著降低 ($P < 0.05$), 低剂量组 HDL-C 含量显著升高 ($P < 0.05$); 各剂量组 HOMA-IR 水平均降低, 其中高剂量组差异显著 ($P < 0.05$); 各剂量组 ISI 均有所升高, 但作用均无统计学差异; 高、低剂量组肝脏脂质沉积等病理学改变有所改善; 各剂量组 Chemerin 及 CMKLRI mRNA 表达均有所下调, 其中高剂量组下调 Chemerin mRNA 表达作用显著 ($P < 0.05$)。结论 傣百解醇提物对大鼠 NAFLD 具有降低 LDL-C、升高 HDL-C 含量、降低 HOMA-IR 水平和保肝作用, 其作用机制可能与下调 chemerin mRNA 表达有关。

关键词: 傣百解; 醇提物; 通光散; 非酒精性脂肪肝; 胰岛素抵抗

中图分类号: R965

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376 (2018) 11-1976-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.11.008

Effect of Dai Baijie Ethanol Extract on Chemerin and its receptors in rats with nonalcoholic fatty liver

LI Songmei¹, XIA Jie¹, ZHANG Guihua¹, LV Huarong², CAI Hao², WANG An¹, QIU Jia¹, PU Li¹

1. Yunnan Provincial Hospital of traditional Chinese medicine, kunming, 650021, China

2. Yunnan Provincial hospital of armed police force, kunming, 650000, China

Abstract: Objective To study the therapeutic effect of ethanol extract of Dai Baijie (Ya Jie Xian Da) on non-alcoholic fatty liver rats, and to explore the mechanism of its regulation of Chemokine and its receptor (CMKLRI) expression. **Method** Non-alcoholic fatty liver (NAFLD) rat model was established by feeding high-fat diet for eight weeks. The rats were fed with normal diet after successful modeling. The rats were randomly divided into model group, fenofibrate capsule group (positive drug, 0.2 g/kg) and Dai Baijie alcohol extract low and high dose group (2.6 and 4.5 g/kg). Each group had 10 rats, and the treatment group was ig given once a day for four weeks, rats in control group were fed normal diet, and the control group and model group were given equal volume pure water. After fasting for 12 hours, blood samples were collected from abdominal aorta. Total cholesterol (TC), triglyceride (TG), free fatty acid (FFA), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and fasting blood glucose (FBG) were measured by automatic biochemical analyzer. Levels of insulin, fasting insulin (FINS) and insulin sensitivity index (ISI) and insulin resistance index (HOMA-IR) were measured by ELISA. Liver tissues were stained with HE, and pathological changes of liver tissues were observed under light microscope. Real time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression level of Chemerin and CMKLRI mRNA in liver tissue. **Results** Comparison with the model

收稿日期: 2018-04-25

基金项目: 云南省教育厅科学研究基金项目(2013Y234)

第一作者: 李松梅(1980—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药理及临床药学研究。Tel: 0871-63601871 Email: lisongmei2006@126.com

*通信作者: 夏杰(1974—), 男, 硕士生导师, 主要从事中药临床评价与药事管理研究。E-mail: xxjjkm@163.com

group, after the intervention of Dai BaiJie (Ya Jie xian da) ethanol extract, The content of TC in serum in each dose group was decreased significantly ($P < 0.05$), and the content of HDL-C in the low dose group was increased significantly ($P < 0.05$). The levels of HOMA-IR in each dose group were decreased, and the difference was found in the high dose group; the ISI in each dose group was increased, but the effect was not statistically significant; the pathological changes such as liver lipid deposition were improved in the high and low dose groups; the expressions of Chemerin and CMKLRI mRNA in each dose group were down-regulated, and the Chemerin mRNA expression down-regulated in the high dose group was remarkable. **Conclusion** Dai Baijie alcohol extract can reduce LDL-C, increase HDL-C content, decrease HOMA-IR level and protect liver in rats with NAFLD. The mechanism may be related to down-regulation of Chemerin mRNA expression.

Key words: Dai Baijie; ethanol extract; *Marsdenia tenacissima*; Rats with nonalcoholic fatty liver; Leptin; Insulin resistance

非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是现代医学的名称,中医学中没有“脂肪肝”的记载,根据其症状、体征,可归属于“胁痛”“症瘕”“湿阻”“痞满”“肝着”“肝癖”等范畴^[1]。NAFLD是以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变为主要特征的临床病理综合征,包括单纯性脂肪肝以及由其演变的脂肪性肝炎和肝硬化,胰岛素抵抗(IR)和遗传易感性与其发病关系密切。随着肥胖和糖尿病的高发,NAFLD现已成为我国常见的慢性肝病之一,严重危害人类的健康^[2]。

傣百解(雅解先打)长久以来被收载为萝藦科南山藤属苦绳的干燥根,近几年经过基源考证才被鉴别为萝藦科牛奶菜属通光散 *Marsdenia tenacissima* (Roxb.) Moon 的干燥根^[3-6],傣医将其归类于解药,味苦、性凉,归肺、肝经,可用于清热解毒、消炎、止咳、平喘、抗癌、催乳等。通过查阅文献发现,高敏等^[7]的研究结果表明傣百解对奈韦拉平(NVP)所致肝损伤有保护作用,但目前没有其治疗脂肪肝的报道。鉴于其益气健脾利湿、疏肝理气降脂之功能,本研究观察傣百解醇提物通过调控趋化素及受体介导治疗NAFLD的作用,为指导傣医解药临床应用和从傣医解药中开发民族药新药提供科学依据。

1 材料

1.1 实验动物及饲料

SPF级雄性wistar大鼠,8周龄,体质量(200±20)g,购自昆明医科大学动物试验部,实验动物生产许可证号SYXK(滇)2013-0007,至少饲养1周后使用;温度(22±1)℃,湿度(55±5)%,12 h光暗循环;饲料和水均在消毒后由动物自由摄取,所有实验均严格按照实验动物有关条例进行。

高脂饲料配方:78%普通饲料、10%猪油、2%胆固醇、10%蔗糖粉均匀拌入粉碎的大鼠颗粒饲料中重新压粒成型。其中普通饲料购自昆明医科大学动物试验部,胆固醇购自北京博奥拓达有限公司,

猪油、蔗糖均为市售。

1.2 药材、药品及主要试剂

傣百解药材,购于云南西双版纳,由云南省中医医院夏杰主任药师鉴定为萝藦科牛奶菜属通光散 *Marsdenia tenacissima* (Roxb.) Moon 的干燥根。

非诺贝特胶囊,力平之,规格200 mg/粒,批号18218,购于法国利博福尼制药公司。

胰岛素、瘦素酶联免疫检测试剂盒,购自南京森贝伽生物科技有限公司;总RNA提取试剂盒,购自天根生化科技有限公司,货号DP431;TaKaRa PrimeScript RT Master Mix,货号DRR036A;TaKaRa SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus),货号DRR820A,均购于大连宝生物科技有限公司。

1.3 主要仪器

AU 640全自动生化分析仪(日本OLYMPUS);高速离心机(德国Thermo Scientific Heraeus);Epoch连续波长酶标仪(美国Bio-Tek公司);MX3000P安捷伦核酸扩增荧光检测仪(geng公司);Leica DM2500正置显微镜+图文系统(德国Leica)。

2 方法

2.1 傣百解醇提物的制备

精密称取1 500 g切碎的傣百解药材,均分为3份(各500 g)放入3个玻璃瓶罐中,每罐加入1 500 mL 95%乙醇使药材充分浸泡于乙醇中,密塞,冷浸;前6 h内时时振摇,再静置18 h,用3层纱布滤过,收集滤液,3 000 r/min离心10 min,减压浓缩得浸提物;再向瓶罐中各加入1 500 mL 95%乙醇,混匀,继续浸提72 h,期间定时振摇;过滤,收集滤液,离心,减压浓缩;将2次浓缩所得提取物合并,称量,贴上标签(注明药材量,粗提物量),置于4℃冷藏备用。

傣百解(雅解先打)药材执行标准为云南省中药材标准(2005年版)(第一册)52页,以此来保证不同批次之间药材质量,其中浸出物不得少于10%^[8]。

2.2 NAFLD模型制备、分组及给药

傣百解醇提物给药剂量的设置依据:先进行傣

百解醇提物的半数致死量(LD₅₀)实验,预试验从急毒 LD₅₀ 的 1/10~1/20 剂量开始,找到最低有效剂量(2.6 g/kg)和最大有效剂量(4.5 g/kg),根据预实验的结果设置低、高剂量组。

100 只 Wistar 大鼠适应性喂养 1 周后,随机选择 20 只为对照组,饲予普通饲料;其余 80 只饲予高脂饲料。8 周后,取普通饲料和高脂饲料喂养的各 6 只动物处死,取相同部位部分肝组织制备匀浆,经检测,造模组肝指数、血脂、肝转氨酶等显著增高,进行肝组织切片苏木精-伊红(HE)染色,肝细胞明显脂肪变性,确认模型制备成功。验证造模成功后改普通饲料喂养,并随机分为模型组、非诺贝特胶囊组(阳性药,0.2 g/kg)和傣百解醇提物低、高(2.6、4.5 g/kg)剂量组,每组 10 只。各组动物均每日按剂量 ig 给药 1 次,连续 4 周,对照、模型组给予等体积纯水。

2.3 观察指标与检测方法

2.3.1 血清生化指标、胰岛素水平检测 大鼠最后 1 次给药后,禁食不禁水 12 h,腹主动脉取血,离心收集血清,于全自动生化分析仪上测定血清总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、游离脂肪酸(FFA)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、空腹血糖(FBG)水平。按照试剂盒说明书 ELISA 法检测血清空腹胰岛素(FINS)的浓度。通过 FBG 和 FINS,运用稳态模型 HOMA,计算胰岛素敏感指数(ISI),计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR),以评价 IR 程度。

$ISI = 1/(FBG \times FINS)$, 取其自然对数使之正态化后进行分析

$$HOMA-IR = FBG \times FINS / 22.5$$

2.3.2 肝组织病理学检查 大鼠最后 1 次给药后,禁食不禁水 12 h,取大鼠肝组织,经 10% 甲醛溶液固定后做病理切片。乙醇梯度脱水,常规石蜡包埋,连续切片(厚度约 5 mm),经 HE 染色后,光学显微镜下观察肝组织病理学改变。

2.3.3 肝组织趋化素(Chemerin)及趋化因子样受体 1(CMKLR1)mRNA 表达检测 取适量肝组织提取总

RNA 后,按照 Ta-KaRa 公司 RT-reagent 逆转录试剂盒说明书进行逆转录反应,反应体系为: Prime Script RT Master Mix 2 μL, 500 ng 样本对应的总 RNA 体积,加 ddH₂O 至 10 μL,反应条件: 37 °C 15 min, 85 °C 5 s。

并按 TaKaRa 公司 SYBR Premix Ex Taq 荧光定量试剂说明书进行实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)反应,以 SYBR Green 为荧光标记物,β-actin 为内参对照。取 1 μL cDNA 加入 20 μL 反应体系进行扩增,反应体系为: SYBR Premix Ex Taq II 10 μL, Primer F 0.3 μL, Primer R 0.3 μL, cDNA 1 μL, ddH₂O 8.4 μL。扩增条件: 95 °C 30 s; 95 °C 15 s; 62 °C 20 s; 共 40 个循环。结果采用 2^{-ΔΔCt} 法计算各基因相对表达量,引物序列见表 1。

2.4 数据处理

应用 SPSS 16.0 统计学软件,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,方差齐时组间比较采用 LSD 检验,方差不齐时组间比较采用 Dunnett's T3 检验;偏态分布用秩和检验。

3 结果

3.1 对 NAFLD 大鼠血清生化指标水平的影响

与对照组比较,模型组大鼠血清 TC、TG、LDL-C、FBG、FFA 水平均显著升高($P < 0.05$ 、 0.01), HDL-C 水平显著降低($P < 0.05$);与模型组比较,傣百解醇提物各剂量组血清 TC 水平显著降低($P < 0.05$),低剂量组 HDL-C 水平显著升高($P < 0.05$);各剂量组对血清 TG、LDL-C、FFA、FBG 水平均无明显影响。见表 2。

3.2 对 NAFLD 大鼠 HOMA-IR 及 ISI 的影响

经傣百解醇提物干预 4 周后,与对照组比较,模型组 HOMA-IR 水平显著升高,而 ISI 显著降低($P < 0.05$)。与模型组比较,傣百解醇提物高、低剂量组 HOMA-IR 水平均降低,其中高剂量组差异显著($P < 0.05$);在改善 ISI 方面,傣百解醇提物高、低剂量组 ISI 均有所升高,但作用均无统计学差异。见表 3。

3.3 对 NAFLD 大鼠肝组织 chemerin 及 CMKLR1 mRNA 表达的影响

qRT-PCR 检测结果显示,与对照组比较,模型

表 1 引物系列
Table 1 primer series

引物	正向序列	反向序列	引物大小/bp
β-actin	GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA	GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG	124
Cmk1r1	TCACCTATGCCGCTATGGACTAC	GCTGATGACAGTGAGCAGGAAGAC	116
Chemerin	TGGAGAGGGAACTCGCGT	TCTGCTCGACATCACCTGCT	136

表2 傣百解醇提取物对NAFLD大鼠血脂的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of Dai Baijie ethanol extracts on blood lipids in rats with NAFLD ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	TG/ (mmol·L ⁻¹)	TC/ (mmol·L ⁻¹)	HDL-C/ (mmol·L ⁻¹)	LDL-C/ (mmol·L ⁻¹)	FFA/ (mmol·L ⁻¹)	FBG/ (mmol·L ⁻¹)
对照	—	0.78±0.26	1.28±0.22	1.15±0.19	0.78±0.18	244.28±65.22	2.58±0.32
模型	—	1.01±0.23*	2.13±0.52**	0.90±0.19*	1.59±0.75*	502.13±120.52*	3.77±0.92*
非诺贝特胶囊	0.2	0.95±0.17	1.52±0.24 [#]	1.31±0.32 [#]	0.92±0.20 [#]	261.56±120.26	2.84±0.45 [#]
傣百解醇提取物	4.5	0.98±0.12	1.55±0.62 [#]	1.17±0.35	1.58±0.55	317.51±70.67	3.40±0.63
	2.6	1.04±0.15	1.62±0.68 [#]	1.62±0.68 [#]	1.09±0.48	401.46±60.61	3.42±0.51

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group

表3 傣百解醇提取物对NAFLD大鼠HOMA-IR和ISI的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of Dai Baijie ethanol extracts on HOMA-IR and ISI of NAFLD rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	ISI	HOMA-IR
对照	—	4.13±0.33	1.38±0.42
模型	—	3.34±0.32*	2.77±0.22*
非诺贝特胶囊	0.2	3.86±0.41 [#]	1.54±0.15 [#]
傣百解醇提取物	4.5	3.51±0.20	1.40±0.23 [#]
	2.6	3.46±0.26	2.42±0.51

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group

组大鼠Chemerin及CMKLRI mRNA表达均显著上调($P < 0.01$),经傣百解醇提取物干预治疗后,高、低剂量组Chemerin及CMKLRI mRNA表达均有所下调,其中高剂量组下调Chemerin mRNA表达作用显著($P < 0.05$)。结果见表4。

3.4 各组大鼠肝脏病理观察结果

给药4周后,对照组可见肝小叶结构正常,肝索排列规则,肝细胞胞核呈圆形,形态规则,大小一致;模型组,1/3左右的肝细胞胞浆内可见大小不一的圆形脂滴空泡,严重者空泡融合将细胞核挤向胞膜下;阳性药和傣百解醇提取物高、低剂量组均可见

部分肝细胞胞浆中出现大小不一的圆形脂滴空泡,与模型组比较,肝脏脂质沉积等病理学改变有所改善,但给药组间未见明显差异。见图1。

4 讨论

“雅解沙把”是傣医“雅解(解药)”代表方药,以傣百解为代表,具有益气健脾利湿、疏肝理气降脂之功能,本实验研究了傣百解醇提取物对NAFLD的治疗作用及可能作用机制。研究结果显示,给药4周后,傣百解醇提取物可明显降低NAFLD大鼠血清TC含量、并不同程度降低FFA、FBG含量,低剂量组

表4 傣百解醇提取物对NAFLD大鼠Chemerin及CMKLRI mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 Effects of Dai Baijie ethanol extracts on the expression of Chemerin and CMKLRI mRNA in rats with NAFLD ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	Chemerin/ β-actin	CMKLRI/ β-actin
对照	—	1.02±0.06	1.01±0.11
模型	—	5.51±0.87**	6.12±1.11**
非诺贝特胶囊	0.2	3.12±0.81 [#]	4.52±0.79
傣百解醇提取物	4.5	3.76±0.56 [#]	5.42±0.58
	2.6	4.00±0.96	5.39±0.85

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

** $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group

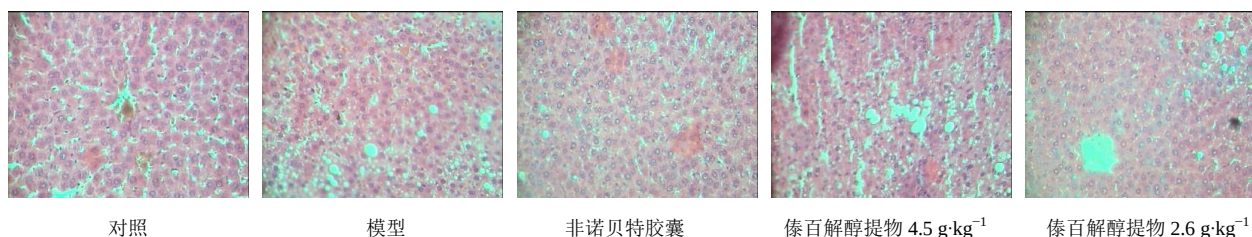


图1 傣百解醇提取物对NAFLD大鼠肝组织病理学的影响(HE, ×400)

Fig. 1 Effect of Dai Baijie alcohol extracts on pathology of liver tissue in rats with NAFLD (HE, ×400)

可升高血清HDL-C含量。同时,傣百解醇提取物高、低剂量组均可降低IR水平,其中以高剂量组作用显著,在改善ISI方面,傣百解醇提取物高、低剂量组ISI均有所升高,但作用均无统计学差异。病检结果显示,傣百解醇提取物可改善肝脏脂质沉积等病变。以上结果提示,傣百解醇提取物具有一定的降脂保肝作用。

Chemerin是一种新发现的脂肪细胞因子,是由脂肪细胞分泌的促炎症趋化因子,主要通过自分泌或旁分泌途径作用于自身受体(CMKLR1),在脂代谢、炎症、IR中起重要作用。Chemerin既是脂肪因子也是炎症因子,作为一种脂肪因子,Chemerin/CMKLR1在调节脂肪细胞代谢以及增强胰岛素信号转导、促进胰岛素刺激的葡萄糖转运等方面具有重要作用;而作为一种炎症因子,Chemerin/CMKLR1可进一步影响炎症因子分泌,趋化和募集中性粒细胞和淋巴细胞等炎性反应细胞,使之在炎症部位聚集,扩大或加剧炎性反应。研究表明Chemerin可引起胰岛素受体后信号转导通路障碍,进一步导致IR发生^[9-11]。本实验结果显示,经傣百解醇提取物干预治疗后,高、低剂量组Chemerin及CMKLR1 mRNA表达均有所下调,其中以高剂量组下调Chemerin mRNA表达作用显著。

本研究结果显示,傣百解醇提取物ig给予NAFLD大鼠,发挥一定的降脂保肝作用,下调控

Chemerin及CMKLR1 mRNA表达可能是其作用机制之一。

参考文献

- [1] 叶放. 中医对脂肪性肝病的辨证治疗方法及思路[J]. 光明中医, 2005, 20(4): 35-37.
- [2] 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪肝病诊疗指南[S]. 2006.
- [3] 中国科学院昆明植物所. 云南植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1983: 657-658.
- [4] 林艳芳, 依专, 赵映红. 中国傣医药彩色图谱[M]. 昆明: 云南民族出版社, 2000: 397-398.
- [5] 朱成兰, 赵应红, 马伟光. 傣药学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 205.
- [6] 李海涛, 康利平, 郭宝林, 等. 常用傣药"傣百解"的基原考证[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(8): 1526-1529.
- [7] 高敏, 王曙光, 倪凯, 等. 傣药雅解先打对艾滋病抗病毒药物所致肝损伤的保护作用[J]. 云南中医中药杂志, 2014, 35(4): 60-61.
- [8] 云南省食品药品监督管理局. 云南省中药材标准(2005年版)(第一册)[M]. 昆明: 云南美术出版社, 2005: 52.
- [9] 李悦, 徐丽梅. 脂肪因子趋化素的相关研究进展[J]. 安徽医药, 2017, 21(2): 215-218.
- [10] 朱榕阜, 杨颖, 陈名道. Chemerin: 一个新的脂肪因子[J]. 国际内分泌代谢杂志, 2009, 29(2): 107-109.
- [11] 金二荣, 邸阜生. Chemerin和非酒精性脂肪肝炎性反应机制[J]. 国际内分泌代谢杂志, 2011, 31(2): 119-121.