

龙胆苦苷对非酒精性脂肪肝病大鼠 AMPK 信号通路的调节作用

武俊紫¹, 杨斌², 宋波¹, 姚政¹, 陈文慧^{1*}

1. 云南中医学院基础医学院, 云南 昆明 650504

2. 武警云南省总队医院 急诊科, 云南 昆明 650111

摘要: **目的** 分析龙胆苦苷对高脂高糖饮食构建的非酒精性脂肪肝病 (NAFLD) 大鼠的干预作用及其机制。**方法** 60 只 SD 大鼠按照随机数字法分为对照组、模型组、阳性药物多烯磷脂酰胆碱组及龙胆苦苷低、中、高剂量组, 高脂高糖饮食 12 周建立 NAFLD 大鼠模型, 龙胆苦苷低、中、高剂量组分别 ig 给予龙胆苦苷 50、100、200 mg/kg, 多烯磷脂酰胆碱组 ig 给予多烯磷脂酰胆碱 23 mg/kg, 对照组和模型组给予 500 μ L/kg 生理盐水, 治疗 8 周后, 收集各组大鼠血清, 检测肝功能、血脂、血清氧化和抗氧化能力以及炎症因子相关指标, 进行肝脏 HE 染色观察病理学改变, Western blotting 和 qRT-PCR 检测肝脏组织中腺苷酸活化蛋白激酶 α (AMPK α) 和磷酸化的腺苷酸活化蛋白激酶 α (p-AMPK α) 的表达特点。**结果** HE 染色显示对照组大鼠肝脏细胞大小均一, 细胞核呈均匀分布, 模型组有明显脂肪空泡, 且有一定的炎症反应浸润, 与模型组相比, 多烯磷脂酰胆碱和龙胆苦苷均有明显的改善作用, 特别是龙胆苦苷中剂量和高剂量组已明显好转, 但与对照组仍有一定差异; 与对照组相比, 模型组大鼠肝功能指标天冬氨酸转氨酶 (AST) 和丙氨酸转氨酶 (ALT)、血脂高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 和低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、氧化指标丙二醛 (MDA) 以及炎症因子白细胞介素-1 (IL-1) 和 IL-6 水平明显升高 ($P < 0.05$), 抗氧化指标过氧化物歧化酶 (SOD) 活性明显下降 ($P < 0.05$), 龙胆苦苷治疗后, AST、ALT、MDA、IL-1 和 IL-6 明显降低 ($P < 0.05$), SOD 明显升高 ($P < 0.05$), HDL-C 和 LDL-C 也有一定的降低, 但没有统计学意义, 多烯磷脂酰胆碱则对上述指标均有明显的改善作用; 与对照组相比, 模型组 p-AMPK α 蛋白和 AMPK mRNA 明显降低 ($P < 0.05$); 使用多烯磷脂酰胆碱和龙胆苦苷治疗后, 均明显升高 ($P < 0.05$), 且龙胆苦苷 3 个剂量组有明显的剂量依赖性, 同时中剂量和高剂量组要好于多烯磷脂酰胆碱组 ($P < 0.05$), 而 AMPK α 蛋白表达在整个治疗过程中没有明显差异。**结论** 高脂高糖饮食 12 周构建的 NAFLD 大鼠有明显肝脏脂肪浸润, 同时肝功能指标升高、血脂异常、炎症因子升高和抗氧化能力降低, 龙胆苦苷则可以明显改善上述症状, 这可能是龙胆苦苷增加大鼠肝脏组织中 p-AMPK α 蛋白表达实现的。

关键词: 龙胆苦苷; 非酒精性脂肪肝病; 炎症细胞因子; 氧化应激; 腺苷酸活化蛋白激酶

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)21-5142-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.21.027

Effect of gentiopicroside on AMPK α signaling pathway of rats with non-alcoholic fatty liver disease

WU Jun-zi¹, YANG Bin², SONG Bo¹, YAO Zheng¹, CHEN Wen-hui¹

1. College of Basic Medicine, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650504, China

2. Department of Emergency, The Armed Police Team Hospital of Yunnan, Kunming 650111, China

Abstract: **Objective** To investigate the therapeutic effect of gentiopicroside has a on rats with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) induced by high-fat and high-sucrose diet, and explore its mechanism. **Methods** After 10 d adaptive feeding, 60 male SD rats were randomly divided into the normal group, model group, gentiopicroside low, medium, high dose treatment groups, and positive drug polyeno phosphoryl choline (PPC) intervention group. Except for the normal group, the rats in other groups were received a high fat and glucose diet for 12 weeks to establish NAFLD model; After model successfully established, gentiopicroside low, medium, and high dosetreatment groups were given 50, 100, and 200 mg/(kg·d) gentiopicroside, PPC group was ig given 23 mg/(kg·d) PPC, and 500 μ L/(kg·d) saline was given to the normal and model groups. After treated for eight weeks, the rats were sacrificed, and the serum was collected from rats to detect the liver function, blood lipid, serum oxidation, antioxidant capacity, and inflammatory factors. HE

收稿日期: 2018-03-25

基金项目: 国家自然科学基金面上项目资助 (81160492)

作者简介: 武俊紫 (1986—), 男, 博士, 主要研究方向为代谢性疾病的治疗及纳米药物的开发。Tel: 18788557524 E-mail: beached@126.com

*通信作者 陈文慧, 女, 教授, 主要研究方向为非酒精性脂肪肝病的中医药治疗。Tel: (0871)63155872 E-mail: 694415176@qq.com

staining was used to observe pathological changes of liver. In addition, western blotting and qRT-PCR were used to detect the expression of AMPK α and p-AMPK α . **Results** HE staining showed that the size of liver cells in the normal group was uniform and the nuclei were evenly distributed, there were obvious vacuoles and a certain inflammatory reaction in the model group. Compared with the model group, gentiopicroside treatment group and PPC group (especially the gentiopicroside middle and high dose group) had a significant improvement, but there were still some differences compared with the normal group; Compared with the normal group, the AST, ALT, HDL-C, LDL-C, MDA, IL-1, and IL-6 in the model group were significantly increased ($P < 0.05$), the levels of AST, ALT, MDA, IL-1, and IL-6 were significantly decreased ($P < 0.05$), SOD was significantly increased ($P < 0.05$), and HDL-C and LDL-C were decreased in the model group ($P > 0.05$); The results of Western blotting and qRT-PCR showed that compared with the normal group, the expression of p-AMPK α protein and AMPK α mRNA in the model group was significantly decreased ($P < 0.05$). After gentiopicroside and PPC administration, they were significantly increased ($P < 0.05$), and gentiopicroside groups showed a significant dose-dependent manner, and the middle dose and high dose of gentiopicroside groups were better than the PPC group ($P < 0.05$), while the expression of AMPK α protein has no significant difference in each group ($P < 0.05$). **Conclusion** The NAFLD rats showed a obvious hepatic fat infiltration and dyslipidemia, the liver function index and inflammatory factors levels were elevated, and the anti-oxidant capacity was decreased. Gentiopicroside significantly improved above symptoms, which may be associated with the increased expression of p-AMPK α in liver tissue of NAFLD rats by gentiopicroside.

Key words: gentiopicroside; non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD); inflammatory factors; oxidation; adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase (AMPK)

非酒精性脂肪肝病 (NAFLD) 是临床中常见的代谢性疾病之一, 近年来随着人们饮食谱的变化, 本病的发生率逐年升高^[1]。以我国为例, 目前 NAFLD 呈高发的态势, 城市人群发病率高达 24%, 农村地区人群也高达 12%, 这严重威胁着人们的健康^[2]。本病疾病谱较广, 其病理和病程包括肝脏脂肪变性、脂肪性肝炎、肝纤维化、肝硬化甚至脂肪肝引起的肝癌等, 病理特征主要包括略微升高的血糖、异常的血脂、抗氧化能力的降低以及炎症因子的浸润等^[3]。关于 NAFLD 的发病机制, 目前公认的为二次打击学说, 其中第 1 次打击主要是指正常基因病变或者高脂高糖饮食摄入的增加, 最终造成胰岛素抵抗增加, 而胰岛素抵抗的增加则会引起肝脏脂肪细胞浸润, 第 2 次打击基于第 1 次打击, 肝细胞在受损后可以引起体内炎性因子的增加, 抗氧化能力的失衡等, 最终反向加重了脂肪肝病的进展^[4]。在二次打击过程中, 腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 信号通路作为能量的调节代谢酶几乎参与了 NAFLD 整个过程的发生和发展。AMPK 信号通路相关蛋白不仅可以有效地平衡进食和能量的消耗, 还能够促进线粒体的生成, 进而促进葡萄糖和脂肪酸的代谢, 此外, AMPK 信号通路相关蛋白还可以有效地减少活性氧簇 (ROS) 和促炎细胞因子的生成, 最终抑制脂肪肝进展^[5]。

龙胆苦苷是从龙胆草中提取的 1 种皂苷类单体, 而龙胆草是广泛用于治疗肝脏疾病的代表方龙胆泻肝丸的主要中药组成之一, 其主清热除燥, 入

肝胆经, 对肝脏有着很好的保护作用^[6]。关于龙胆泻肝方治疗脂肪肝的研究众多, 如张立红^[7]采用龙胆泻肝软胶囊治疗脂肪肝病患者, 发现其治疗总有效率高达 95%; 此外余红军等^[8]采用龙胆泻肝汤联合水飞蓟宾胶囊治疗 NAFLD 患者, 其总有效率也高达 92.73%。作为龙胆草的有效成分之一, 关于龙胆苦苷治疗肝病的研究早有研究报道^[9-13], 如在 2002 年刘占文等^[9]报道龙胆苦苷可以明显地改善 CCl₄ 和 D-GlaN 急性肝损伤大鼠模型, 还有李夏等^[11]研究报道, 龙胆苦苷可通过 AMPK-PPAR α 信号通路改善酒精性脂肪肝病症, 但是目前关于龙胆苦苷治疗 NAFLD 的研究还没有研究报道。

本研究以 AMPK α 和 p-AMPK α 为 NAFLD 治疗靶点, 考察龙胆苦苷对 AMPK 信号通路的作用, 为 NAFLD 治疗药物的开发及应用提供依据。

1 材料

1.1 实验动物

雄性 SD 大鼠 (SPF 级) 60 只, 购于昆明医科大学动物实验部, 体质量 160~200 g, 合格证号 (2011-004), 动物使用许可证号 R082018044; 饲养用普通饲料以及垫料购自昆明医科大学动物实验部。

1.2 药品与试剂

龙胆苦苷购于四川省德阳市禾益康生物科技有限公司 (CAS20831-76-9, 质量分数 98%, 批号 H20161108); 多烯磷脂酰胆碱注射液 (成都天台山制药有限公司, 批号 160220); 猪油市场自购; 脱氧胆酸钠购于北京华威锐科化工有限公司; 批号

H20160815; 天冬氨酸转氨酶 (AST)、丙氨酸转氨酶 (ALT)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、丙二醛 (MDA)、过氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒购于南京建成生物工程研究所; 白细胞介素-1 (IL-1) 和 IL-6 试剂盒购于武汉博士德生物有限公司, BCA 蛋白定量试剂盒购于天根生化科技 (北京) 有限公司, 总蛋白提取试剂盒购于行知生物科技有限公司, PVDF 膜购于赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; 腺苷酸活化蛋白激酶 α (AMPK α) 和磷酸化的腺苷酸活化蛋白激酶 α (p-AMPK α) 抗体购于美国 Santa 公司; 二抗购于北京中杉金桥生物科技公司; 增强型 ECL 发光试剂盒购于南京诺唯赞生物科技有限公司; 胶片购于乐凯胶片股份有限公司; 总 RNA 提取试剂盒购于天根生化科技 (北京) 有限公司; 引物由上海英俊公司生产。

1.3 主要仪器

FA1004J 型电子天平 (常州万泰天平仪器有限公司); TGF-9140A 型电热恒温鼓风干燥箱 (上海喆图科学仪器有限公司); DW-25L262 型-20 °C 冰箱 (中国海尔公司); TH-86-500-LA 型-86 °C 超低温冰箱 (中国美的公司); 高速冷冻离心机、550 型酶标仪 [赛伯乐 (北京) 仪器有限公司]; V-1100 型分光光度计 (上海美析仪器有限公司); 蛋白电泳仪 (美国伯乐公司); GelTower 简约型凝胶成像仪 (德国耶拿分析仪器股份公司); LightCycler® 96 型 qRT-PCR 仪 [罗氏诊断产品 (上海) 有限公司]。

2 方法

2.1 分组、造模和给药

大鼠在购买后均适应性喂养 10 d, 然后按照随机数字法, 将大鼠分为 6 组, 分别为对照组、模型组、阳性药物多烯磷脂酰胆碱 (23 mg/kg) 组及龙胆苦苷低、中、高剂量 (50、100、200 mg/kg) 组, 每组 10 只。除对照组外, 其余 5 组大鼠造模方法参照文献报道方法^[14], 即采用高脂饲料自由食用+日常红糖水 (10%) 自由饮用相结合的方法, 造模时间为 12 周, 高脂饲料为 70% 普通饲料+29.9% 猪油+0.1% 脱氧胆酸钠 (由昆明医科大学动物实验部配制)。12 周后每组随机各取 2 只大鼠检测造模是否成功, 造模成功的标准为肝脏细胞有明显的脂肪颗粒浸润, 此外肝功能检测指标有明显的异常。

造模成功后, 立即给予相应药物治疗, 龙胆苦苷低、中、高剂量组分别 ig 给予龙胆苦苷 50、100、200 mg/kg, 多烯磷脂酰胆碱组 ig 给予多烯磷脂酰

胆碱 23 mg/kg, 对照组和模型组 ig 给予 500 μ L/kg 生理盐水, 连续给药 8 周。

2.2 血液和组织样本采集

给药结束后大鼠禁食禁水 12 h, 每只大鼠 ip 1.0% 的水合氯醛 4 mL 麻醉, 将大鼠固定于解剖板, 剖开腹腔, 找到胸膈膜后剖开, 用 10 mL 注射器采用心脏取血法收集大鼠血液, 血液收集后置于预先降温的 4 °C 离心机中, 4 000 r/min 离心, 离心时间 5 min, 离心半径 3 cm, 完成后收集上清液冻存于超低温冰箱中保存, 用于相关指标的检测。将大鼠肝脏取出, 统一切取肝左叶组织置入 10% 中性福尔马林溶液中保存, 用于病理学检测, 其余组织放入 -80 °C 冰箱内保存, 用于 p-AMPK α 和 (或) AMPK α 蛋白与 mRNA 的检测。

2.3 相关生化指标检测

血液相关生化指标的检测按照试剂盒提供的说明书严格操作进行, 其中 AST、ALT、HDL-C、LDL-C、MDA 的检测为酶法, 检测仪器为分光光度计; IL-1、IL-6 和 SOD 的检测方法为 ELISA 法, 检测仪器为酶标仪。

2.4 肝脏组织病理学检测

大鼠肝脏组织病理学检测方法为 HE 染色法, 将福尔马林固定后的肝脏组织取出, 采用流水反复冲洗 12 h, 切取成 0.5 cm $\times$ 0.5 cm $\times$ 0.5 cm 大小, 使用 80%、90%、95%、100% 的梯度酒精各脱水 2 h, 二甲苯透明后石蜡包埋, 切成 4 μ m 左右厚度的薄片, 贴片后二甲苯透明, 给予 100%、95%、85%、75% 梯度酒精复水, HE 染色, 封片, 显微镜下观察采集图像即可。

2.5 AMPK α 和 p-AMPK α 蛋白检测

大鼠肝脏组织中 AMPK α 和 p-AMPK α 蛋白的检测采用 Western blotting 法。取 1 g 肝脏组织, 用组织蛋白提取液提取总蛋白后, BCA 试剂对其进行定量, 定量后调平, 每组各取 30 μ g 进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳完成后转移至 PVDF 膜, 转膜成功后使用 5% 的脱脂牛奶封闭 2 h, 洗涤 3 次后加入一抗过夜, 次日取出后洗涤 3 次, 加入 2 抗洗涤 3 次, 完成后, 置于暗室中使用 ECL 发光试剂曝光压片、显影定影后扫描仪收集图像, 采用 Image J 软件计算各条带的灰度值, 结果以 AMPK 或 p-AMPK 灰度值/ β -actin 的灰度值表示蛋白相对表达量, 每组条带进行 3 次重复实验, 取平均值进行分析。

2.6 AMPK α mRNA 检测

大鼠肝脏组织中 AMPK α mRNA 的检测采用

qRT-PCR 法,准确称取 20 mg 肝脏组织,采用总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA 后,定量后调平,每组各取 2 μ g 进行逆转录合成 cDNA,完成后进行扩增即可,扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s,退火 60 $^{\circ}$ C、30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 35 s,循环次数 35 次,结果比较采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法。AMPK α 上游引物为 5'-CCTCAGTATTTGAATCCCTC-3',下游引物为 5'-CCTGGTGGTTTCTGTTGTA-3'; β -actin 上游引物为 5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3',下游引物为 5'-CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA-3'。

2.7 统计分析

数据录入采用 Excel 2003,数据处理采用 SPSS 20.0 软件,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,在方差齐性检验后进行单因素方差分析,两组间比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 各组大鼠一般情况

各组大鼠日常活动和饮食没有明显差异,但毛色和体质量差异较大,对照组大鼠毛色发白光滑,

而模型组大鼠毛色发黄,可能为沾有的尿液,各给药组情况相较于模型组毛色有一定改善,但和对照组比较仍有一定的差异,此外对照组大鼠体质量正常,而模型组大鼠则出现明显的肥胖症状。

3.2 各组大鼠肝功能及血脂指标变化

与对照组相比,模型组大鼠肝功能指标 AST 和 ALT 均明显升高 ($P < 0.05$),而多烯磷脂酰胆碱和龙胆苦苷均可以有效降低 AST 和 ALT 水平 ($P < 0.05$);龙胆苦苷中、高剂量组大鼠 AST 水平明显低于多烯磷脂酰胆碱组 ($P < 0.05$),龙胆苦苷高剂量组大鼠 ALT 水平明显低于多烯磷脂酰胆碱组 ($P < 0.05$);AST 和 ALT 水平均随龙胆苦苷给药剂量的增加而明显降低。与对照组相比,模型组大鼠血脂指标 HDL-C 明显降低 ($P < 0.05$),LDL-C 明显升高 ($P < 0.05$),采用多烯磷脂酰胆碱和龙胆苦苷治疗后,大鼠 HDL-C 水平明显升高 ($P < 0.05$),而 LDL-C 水平明显降低 ($P < 0.05$),但多烯磷脂酰胆碱组和龙胆苦苷 3 个剂量组间并没有明显差异,结果见表 1。

表 1 各组大鼠血清 ALT、AST、HDL-C、LDL-C 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Levels of AST, ALT, HDL-C, and LDL-C in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	HDL-C/(mmol·L ⁻¹)	LDL-C/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	38.25 $\pm$ 2.54	42.14 $\pm$ 3.09	0.54 $\pm$ 0.11	0.16 $\pm$ 0.05
模型	—	67.65 $\pm$ 5.65*	71.59 $\pm$ 4.72*	0.38 $\pm$ 0.09*	0.31 $\pm$ 0.08*
多烯磷脂酰胆碱	23	52.34 $\pm$ 5.12 [#]	49.67 $\pm$ 4.15 [#]	0.47 $\pm$ 0.13 [#]	0.17 $\pm$ 0.05 [#]
龙胆苦苷	50	49.36 $\pm$ 4.29 [#]	51.23 $\pm$ 4.08 [#]	0.44 $\pm$ 0.07 [#]	0.18 $\pm$ 0.04 [#]
	100	45.44 $\pm$ 4.59 ^{#△}	46.42 $\pm$ 3.78 [#]	0.46 $\pm$ 0.11 [#]	0.16 $\pm$ 0.03 [#]
	200	42.26 $\pm$ 3.89 ^{#△}	44.35 $\pm$ 2.76 ^{#△}	0.48 $\pm$ 0.08 [#]	0.16 $\pm$ 0.04 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与多烯磷脂酰胆碱组比较: [△] $P < 0.05$, 下同

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [△] $P < 0.05$ vs PPC group, same as below

3.3 各组大鼠血清氧化及炎症因子相关指标变化

与对照组相比,模型组大鼠血清 SOD 活性明显降低 ($P < 0.05$),MDA 水平明显升高 ($P < 0.05$),采用多烯磷脂酰胆碱和龙胆苦苷治疗后,大鼠 SOD 活性明显升高 ($P < 0.05$),而 MDA 水平明显下降 ($P < 0.05$),龙胆苦苷 3 个剂量组大鼠血清 SOD 活性均高于多烯磷脂酰胆碱组 ($P < 0.05$),且随着龙胆苦苷给药剂量的增加,SOD 活性逐渐升高;而龙胆苦苷 3 个剂量组大鼠血清 MDA 水平均低于多烯磷脂酰胆碱组 ($P < 0.05$),且随着给药剂量的增加,MDA 水平逐渐降低。与对照组比较,模型组大鼠血清 IL-1 和 IL-6 水平明显升高 ($P < 0.05$);与模型组相比,多烯磷脂酰胆碱组和龙胆苦苷 3 个剂量组大鼠血清

IL-1 和 IL-6 均明显降低 ($P < 0.05$);与多烯磷脂酰胆碱组相比,龙胆苦苷 3 个剂量组大鼠血清 IL-1 均明显降低,而 IL-6 没有明显变化,结果见表 2。

3.4 各组大鼠肝组织 HE 染色结果

肝脏组织病理学观察可见,对照组大鼠切片细胞核分布均匀,细胞大小均一,没有任何脂肪颗粒浸润;而模型组则出现明显的脂肪空泡,细胞排列紊乱;相较于模型组,龙胆苦苷 3 个剂量组以及多烯磷脂酰胆碱组出现明显的好转;龙胆苦苷 3 个剂量组有明显的剂量依赖性,肝脏好转程度随着给药剂量的增加而明显好转,多烯磷脂酰胆碱组改善作用强于龙胆苦苷低剂量组,但弱于龙胆苦苷中剂量组,结果见图 1。

表 2 各组大鼠血清 SOD、MDA、IL-1、IL-6 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Table 2 Levels of SOD, MDA, IL-1, and IL-6 in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	SOD/(U·mL ⁻¹)	MDA/(μmol·L ⁻¹)	IL-1/(mmol·L ⁻¹)	IL-6/(μg·L ⁻¹)
对照	—	56.43 ± 3.14	4.22 ± 0.14	6.52 ± 0.32	16.69 ± 1.26
模型	—	39.87 ± 4.76*	5.56 ± 0.17*	17.24 ± 1.37*	21.25 ± 1.82*
多烯磷脂酰胆碱	23	47.76 ± 4.36 [#]	4.83 ± 0.16 [#]	10.24 ± 0.92 [#]	17.09 ± 1.19 [#]
龙胆苦苷	50	52.95 ± 4.12 ^{#△}	4.27 ± 0.19 ^{#△}	8.89 ± 0.74 ^{#△}	17.39 ± 1.14 [#]
	100	53.57 ± 3.78 ^{#△}	4.19 ± 0.14 ^{#△}	7.92 ± 0.62 ^{#△}	16.82 ± 1.18 [#]
	200	55.06 ± 3.12 ^{#△}	4.12 ± 0.16 ^{#△}	7.34 ± 0.56 ^{#△}	16.84 ± 1.27 [#]

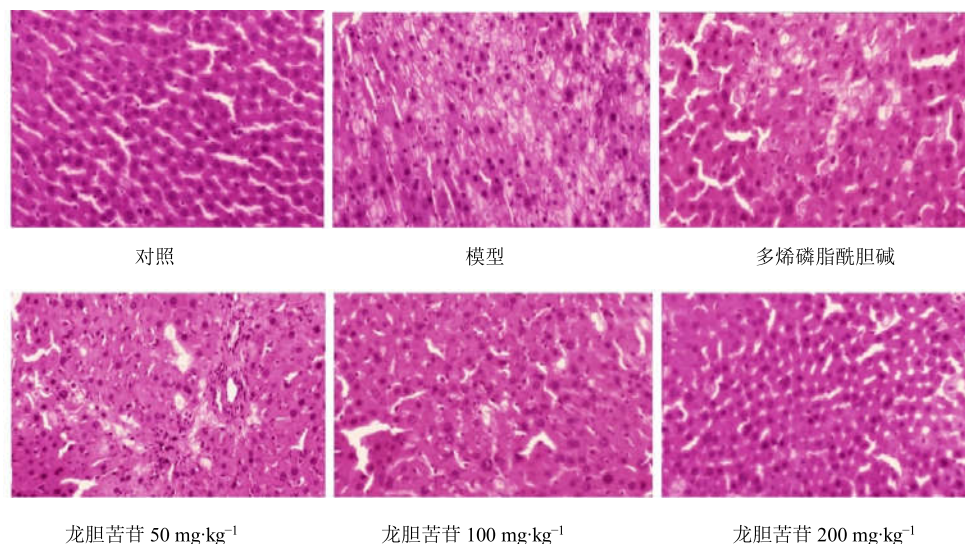


图 1 各组大鼠肝脏组织 HE 染色结果 (× 200)

Fig. 1 HE staining of liver tissue of rats in each group (× 200)

3.5 各组大鼠肝组织 AMPKα 和 p-AMPKα 蛋白表达情况

与对照组相比, 模型组大鼠肝脏组织中 p-AMPKα 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 龙胆苦苷组和多烯磷脂酰胆碱组大鼠肝脏组织中 p-AMPKα 表达水平明显升高 ($P < 0.05$), 龙胆苦苷高剂量组明显高于多烯磷脂酰胆碱组 ($P < 0.05$); 但各组大鼠肝组织 AMPKα 蛋白表达并没有明显差异, 结果见图 2 和表 3。

3.6 各组大鼠肝组织 AMPKα mRNA 表达情况

与对照组相比, 模型组大鼠肝脏组织中 AMPKα mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.05$); 龙胆苦苷和多烯磷脂酰胆碱治疗后, 其表达水平明显升高 ($P < 0.05$), 龙胆苦苷高剂量组明显高于多烯磷脂酰胆碱组 ($P < 0.05$), 见表 4。

4 讨论

为了准确地了解脂肪肝的发病机制, 同时也为了药理学实验结果更为可靠准确, 科学家们尝试构建了多种脂肪肝动物模型^[15-17]。目前研究较多的主要

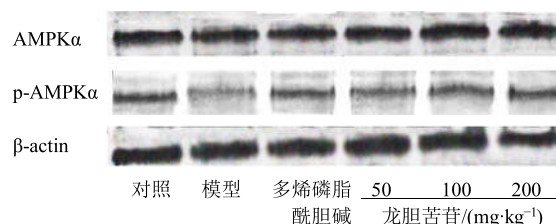


图 2 各组大鼠肝脏组织中 AMPKα 和 p-AMPKα 蛋白表达水平

Fig. 2 Expression of AMPKα and p-AMPKα protein in liver of NAFLD rats

表 3 各组大鼠肝脏组织中 AMPKα 和 p-AMPKα 蛋白相对表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Expression of AMPKα and p-AMPKα protein after treatment ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	AMPKα	p-AMPKα
对照	—	1.21 ± 0.16	0.56 ± 0.11
模型	—	1.12 ± 0.13	0.22 ± 0.03*
多烯磷脂酰胆碱	23	1.23 ± 0.13	0.30 ± 0.06 [#]
龙胆苦苷	50	1.19 ± 0.16	0.27 ± 0.05 [#]
	100	1.25 ± 0.21	0.42 ± 0.07 ^{#△}
	200	1.14 ± 0.14	0.52 ± 0.07 ^{#△}

表 4 各组大鼠肝脏组织中 AMPK α mRNA 的表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Expression of AMPK α mRNA after treatment ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	AMPK α mRNA
对照	—	1.00 ± 0.00
模型	—	0.24 ± 0.07*
多烯磷脂酰胆碱	23	0.43 ± 0.09 [#]
龙胆苦苷	50	0.39 ± 0.07 [#]
	100	0.47 ± 0.06 [#]
	200	0.64 ± 0.09 ^{#△}

为 2 大类,即脂肪酸相关基因敲除大鼠模型以及药物和(或)饮食所构建的 NAFLD 模型。对于基因敲除所构建的大鼠有 2 个缺点^[18-19],首先为其价格昂贵,此外,不适用于后天营养代谢障碍型脂肪肝病的研究,因此在基础实验中不被推广。而化学所致 NAFLD 大鼠模型,目前应用较多的为四氯化碳(CCl₄)模型:本模型造模简单,只需要每周给予 2~3 次,连续 3~4 周就可以很好地构建,但采用此方法所构建的模型存在肝纤维化的风险,此外长期的 CCl₄ 注射也给动物其他脏器带来了一定的损害^[20]。本研究采用纯高脂高糖饮食构建 NAFLD 大鼠模型,本模型造模方法简单,只需给予大鼠连续 8~12 周的高脂高糖饮食就可以构建,不会给大鼠带来过多的生理刺激,符合伦理学的要求,此外,所构建的大鼠模型有明显的氧化应激和肝脏线粒体损害,这是有利于后续药理学研究开展的。

本研究构建了 NAFLD 大鼠模型,给予龙胆苦苷治疗 8 周后,HE 染色可见,虽然经过 8 周的治疗,但其肝脏病理学结果和对照组大鼠仍然有一定的差异,但是不可否认,其可以明显地将大鼠肝脏中脂肪颗粒排出。此外,从肝功能和血脂指标可以看出,龙胆苦苷可以明显降低脂肪肝所引起的 AST 和 ALT 升高,还可以明显的升高血脂指标 HLD-C 和降低 LDL-C 以调节血脂,升高 SOD 和降低 MDA 以提高机体抗氧化能力,降低 IL-1 和 IL-6 改善炎症反应,这些都提示龙胆苦苷对 NAFLD 大鼠具有很好的保护作用。

分析龙胆苦苷作用机制,可能与 AMPK 信号通路相关蛋白有关,AMPK 是 AMP 依赖的蛋白激酶,因此关于 AMPK 信号通路与糖尿病的相关性目前研究众多^[21-23],但 AMPK 信号通路不仅是糖尿病的信号通路,其还可以调节包括糖类、脂类以及蛋白质类的代谢,因此其也是生物能量代谢调节的关键

分子,因此关于 AMPK 与 NAFLD 的研究近年来也受到了众多学者的关注^[24-26],AMPK 蛋白可表达于肝脏细胞,诸如压力、激素和代谢酶均可以刺激其异常表达,此外其还可以根据体内微环境的变化来调节机体能量,通过自身代谢调节细胞和组织的氧化应激,降低炎症反应。一般而言,AMPK 并不直接发挥作用,其发挥作用是通过 AMPK 的磷酸化实现的,AMPK 蛋白可通过自身磷酸化而变成 p-AMPK,进而导致自身结构发生变化,以促进能量代谢。因此本研究以 AMPK α 为靶点,考察龙胆苦苷治疗后,其信号通路蛋白 AMPK α 和 p-AMPK α 的表达特点,结果发现,龙胆苦苷虽然对于 AMPK α 蛋白的表达没有作用,但却可以明显提高肝脏组织中 p-AMPK α 蛋白的表达,进而提高了能量代谢和脂肪颗粒的排出,最终保护了肝脏。

综上所述,本研究结果提示,给予大鼠连续 12 周的高脂高糖饮食可以很好地构建 NAFLD 大鼠模型,龙胆苦苷可以明显提高 NAFLD 大鼠机体抗氧化能力,降低炎症反应、调节血脂、改善肝功能,这可能与龙胆苦苷可以增加大鼠肝脏 p-AMPK α 蛋白表达有关。

参考文献

- [1] 周雪,宋怡,邓波,等.我国非酒精性脂肪肝病流行现状及相关膳食营养因素探讨 [A] // 第十二届全国营养科学大会论文汇编 [C]. 北京:中国营养学会, 2015.
- [2] 武俊紫.艾塞那肽对非酒精性脂肪肝病的治疗作用研究 [D]. 昆明:昆明理工大学, 2014.
- [3] 陈菲,艾国,盛柳青,等.九味肝泰胶囊对高脂饮食诱导大鼠非酒精性脂肪肝的治疗作用 [J]. 中草药, 2015, 46(9): 1338-1342.
- [4] 武俊紫,牛世伟,贾亚敏,等.艾塞那肽通过调控 PPAR α 及 ACOX1 改善大鼠非酒精性脂肪肝病症状 [J]. 基础医学与临床, 2014, 34(4): 464-469.
- [5] Dahlhoff C, Worsch S, Sailer M, et al. Methyl-donor supplementation in obese mice prevents the progression of NAFLD, activates AMPK and decreases acyl-carnitine levels [J]. *Mol Metabol*, 2014, 3(5): 565-580.
- [6] 张林,梁茂新.龙胆草潜在功用的发掘与利用 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2015, 17(3): 675-678.
- [7] 张立红.龙胆泻肝软胶囊治疗脂肪肝 65 例观察 [J]. 实用中医药杂志, 2010, 26(3): 180-181.
- [8] 余红军,张福生.龙胆泻肝汤联合水飞蓟宾胶囊治疗非酒精性脂肪肝疗效观察 [J]. 新中医, 2017(2): 45-47.
- [9] 刘占文,陈长勋,金若敏,等.龙胆苦苷的保肝作用研

- 究 [J]. 中草药, 2002, 33(1): 47-50.
- [10] 王 露. 龙胆苦苷对人肝细胞色素 CYP450 酶的影响 [D]. 杨凌: 西北大学, 2011.
- [11] 李 夏. 龙胆苦苷基于 AMPK-PPAR α 改善酒精性脂肪肝的干预机制 [D]. 延吉: 延边大学, 2016.
- [12] 封欣婵. 龙胆苦苷对肝细胞表面膜转运蛋白 MRP3、MRP4 的表达影响 [D]. 重庆: 第三军医大学, 2014.
- [13] 郭清峰, 王 玮, 韩文清. 龙胆苦苷的药理作用进展 [J]. 广东化工, 2014, 41(17): 121.
- [14] 苏 琳, 刘玉兰. 高糖饮食及高脂饮食建立非酒精性脂肪肝大鼠模型的比较 [J]. 实验动物科学, 2009, 26(3): 14-17.
- [15] 王 振, 杨 涛, 李世朋, 等. 脂肪肝动物模型研究进展 [J]. 实用器官移植电子杂志, 2016, 4(2): 105-108.
- [16] Piña-Zentella R M, Rosado J L, Gallegos-Corona M A, *et al.* Lycopene improves diet-mediated recuperation in rat model of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *J Med Food*, 2016, 19(6): 607.
- [17] 刘月环, 吴旧生, 应华忠, 等. 长爪沙鼠 NAFLD 模型的建立及其遗传学的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(5): 9-11.
- [18] 喻 琴, 王 丽. 非酒精性脂肪性肝病动物模型研究进展 [J]. 泸州医学院学报, 2016, 39(3): 300-302.
- [19] 陈 丽. 亚麻油对高脂饲料喂养 apoE 基因敲除小鼠非酒精性脂肪肝的保护作用及其机制研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2015.
- [20] 毛志敏, 宋海燕, 杨丽丽, 等. 当药和水飞蓟提取混合物对毒性物质诱导的脂肪肝大鼠肝损伤的防治作用 [J]. *J Integr Med*, 2012, 10(2): 193-199.
- [21] Xin C, Liu J, Zhang J, *et al.* Irisin improves fatty acid oxidation and glucose utilization in type 2 diabetes by regulating the AMPK signaling pathway [J]. *Int J Obes*, 2016, 40(3): 443-451.
- [22] Yu J W, Deng Y P, Xue H, *et al.* Metformin improves the angiogenic functions of endothelial progenitor cells via activating AMPK/eNOS pathway in diabetic mice [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2016, 15(1): 1-10.
- [23] He T, Zhao J. Resveratrol inhibits renal interstitial fibrosis in diabetic nephropathy by regulating AMPK/NOX4/ROS signaling [J]. *Hong Kong J Nephrol*, 2015, 17(2): S10-S10.
- [24] Qiang X, Xu L, Zhang M, *et al.* Demethyleneberberine attenuates non-alcoholic fatty liver disease with activation of AMPK and inhibition of oxidative stress [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 472(4): 603-609.
- [25] 崔小萌, 刘 欣, 史海涛, 等. 甘草酸二铵脂质配位体对非酒精性脂肪性肝病大鼠肝组织 AMPK 信号通路的影响 [J]. 实用肝脏病杂志, 2017, 20(1): 55-59.
- [26] 姚笑睿, 夏 凡, 唐外姣, 等. 护肝清脂片对非酒精性脂肪肝大鼠肝脏中 AMPK 通路激活及 NF- κ B-p65 蛋白的影响 [J]. 南方医科大学学报, 2017, 37(1): 56-62.