

小柴胡汤对非酒精性脂肪性肝炎模型小鼠的保护作用研究

刘 静^{1,3}, 孙 蓉^{2,3*}

1. 山东中医药大学, 山东 济南 250355

2. 山东大学齐鲁医学院高等医学研究院, 山东 济南 250012

3. 山东大学齐鲁医学院第二医院基础医学研究所, 山东 济南 250033

摘要: **目的** 通过构建蛋氨酸-胆碱缺乏 (MCD) 饮食诱导的小鼠非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 模型, 研究小柴胡汤对 NASH 模型小鼠的保护作用。 **方法** 选择 C57BL/6 小鼠为研究对象, 将其随机分为对照组、模型组、小柴胡汤 (高、中、低剂量) 组、易善复组和强肝胶囊组。通过饲喂 MCD 饲料建立 NASH 模型, 造模同时按分组给予不同药物进行干预; 实验过程中记录小鼠体重、日摄食量、日饮水量变化, 实验结束对肝组织进行 HE 染色观察病理变化, 检测血清生化指标丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)、白细胞介素 6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的水平变化, 检测肝组织中 TC、TG 的水平变化, 利用 qRT-PCR 技术检测肝组织脂肪酸合成酶 (FAS) 和固醇调节元件结合蛋白 1c (SREBP-1c) 的表达水平。 **结果** 小鼠体重、日摄食量、日饮水量及肝脏系数等数据显示 MCD 饮食诱导的模型组小鼠会出现体重降低、摄入量减少及肝脏湿质量下降的特点, 而小柴胡汤给药组小鼠体重、摄入量及肝脏系数较模型组小鼠显著升高; HE 染色结果显示小柴胡汤可明显减轻肝组织脂肪变性和炎症程度, 改善肝细胞的形态和结构; 生化指标检测结果显示小柴胡汤能显著降低 NASH 模型小鼠血清及肝组织 TG、TC 水平, 升高血清中 HDL-C 水平, 降低血清中 AST、ALT、IL-6、TNF- α 水平; qRT-PCR 结果显示模型组小鼠肝组织 FAS 和 SREBP-1c 的基因表达水平明显升高, 小柴胡汤可显著降低 FAS 和 SREBP-1c 的基因表达水平。 **结论** 小柴胡汤对 MCD 饮食诱导的 NASH 模型小鼠有明显保护作用, 其机制可能通过调控抑制脂肪酸合成基因 (FAS、SREBP-1c) 的表达, 减少脂肪堆积, 实现调脂作用, 并通过抑制炎症因子的表达改善肝组织的损伤。

关键词: 小柴胡汤; 非酒精性脂肪性肝炎; 蛋氨酸-胆碱缺乏饮食; 脂肪酸合成酶; 固醇调节元件结合蛋白 1c

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)14-3708-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.14.014

Protective effect of Xiaochaihu Decoction on non-alcoholic steatohepatitis model mice

LIU Jing^{1,3}, SUN Rong^{2,3}

1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. Advanced Medical Research Institute, Cheeloo College of Medicine, Shandong University, Jinan 250012, China

3. Institute of Medical Sciences, The Second Hospital, Cheeloo College of Medicine, Shandong University, Jinan 250033, China

Abstract: Objective The protective effect of Xiaochaihu Decoction on non-alcoholic steatohepatitis (NASH) model mice was studied by constructing a methionine-choline deficiency (MCD) diet-induced NASH model in mice. **Methods** C57BL/6 mice, as the research objects, were randomly divided into normal control group, model group, Xiaochaihu Decoction (high, medium and low doses) group, Yishanfu group and Qianggan Capsule group. The NASH model was established by feeding MCD feeds, and model intervention was carried out at the same time by giving different drugs in groups; Changes in body weight, daily food intake, and daily water volume of the mice were recorded during the experiment. HE staining of liver tissue was performed at the end of the experiment to observe pathological changes. and the levels of biochemical indicator of alanine aminotransferase (ALT), Aspartate aminotransferase (AST), total cholesterol (TC), triglycerides (TG), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), interleukin 6 (IL-6), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum, and the changes of TC and TG levels in liver tissue were detected, RT-PCR was

收稿日期: 2020-03-28

基金项目: 山东省重点研发计划 (重大关键技术) 项目 (2017CXGC1301); 山东省重点研发计划 (重大关键技术) 项目 (2016ZDJS07A21); 泰山学者工程专项经费项目 (ts201511107)

作者简介: 刘 静, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药理与毒理。Tel: 13553183583 E-mail: 13553183583@163.com

*通信作者 孙 蓉, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药药理与毒理研究。Tel: 13605311799 E-mail: sunrong107@163.com

used to detect the expression levels of fatty acid synthase (FAS) and sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP-1c) in liver tissues. **Results** Data such as mouse weight, daily food intake, daily water intake, and organ coefficients indicated that MCD diet-induced model mice showed weight loss, decreased intake, and decreased liver wet weight. The weight, intake and liver coefficient of mice in Xiaochaihu Decoction group were significantly higher than those in the model group; The results of HE staining showed that Xiaochaihu Decoction could significantly reduce the degree of steatosis and inflammation of liver tissue, and improve the morphology and structure of liver cells; The results of serum biochemical indicators showed that Xiaochaihu Decoction significantly reduced the levels of TG, TC, AST, ALT, IL-6, TNF- α and increased the level of HDL-C in NASH model mice; RT-PCR results showed that the gene expression levels of FAS and SREBP-1c in the liver tissue of the model group mice were significantly increased, and the administration of Xiaochaihu Decoction could significantly reduce the gene expression levels of FAS and SREBP-1c. **Conclusion** Xiaochaihu Decoction has obvious protective effect on NASH mouse model induced by MCD diet. It may play a lipid-lowering role by regulating the expression of inhibitors of fatty acid synthetase genes (FAS, SREBP-1c), reducing fat accumulation, and inhibiting the expression of inflammatory factors to improve liver tissue damage.

Key words: Xiaochaihu Decoction; non-alcoholic steatohepatitis; methionine-choline deficiency diet; fatty acid synthetase; sterol regulatory element binding protein 1c

非酒精性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH) 又称代谢性脂肪性肝炎, 是非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 的进一步进展, 以脂肪变性、肝细胞气球样化和小叶炎症为特征^[1-2]。普通成人 NASH 患病率为 3%~6%, 并已成为肝硬化、肝细胞癌和肝移植愈来愈重要的危险因素, 目前 NASH 全球患病率逐年增加, 已成为严重的全球性公共健康问题^[3]。传统医学并无 NASH 的病名, 根据其临床表现, 将其归于“胁痛”“痞满”“肝胀”“肝痞”“肝癖”“肝着”“积聚”“痰证”“痰浊”“湿阻”“瘕证”“肥气”“积证”等范畴^[4-5], 多因饮食不节、劳逸失度、情志失调、久病体虚、禀赋不足伤及肝、脾、肾等脏腑; 以肝体用失调、脾胃亏虚为主要特点, 痰、湿、浊、瘀、热为主要病理因素; 中医治疗多以疏肝解郁、祛湿化痰、活血化瘀为主, 根据病情佐以清热、解毒、养肝、利胆、化积等方法。

小柴胡汤出自张仲景《伤寒杂病论》少阳病篇第 96 条, 为“少阳枢机之剂, 和解表里总方”, 由柴胡、黄芩、人参、半夏、甘草、生姜、大枣 7 味药组成, 具有和解少阳之功, 主治伤寒少阳证, 症见寒热往来、胸胁苦满、默默不欲饮食、心烦喜呕、口苦、咽干、目眩、舌苔薄白、脉弦者^[6]。现代临床可用于 NAFLD 及病毒性肝炎、酒精性肝炎等的治疗^[7-11], 实验研究证明小柴胡汤具有解热、抗菌、抗炎、抗病毒、保肝、调节脂质代谢、抗氧化及免疫调节等药理作用^[12-15]。小柴胡汤可疏解气郁、调达枢机, 方中柴胡、黄芩疏利肝胆、清热燥湿; 半夏、生姜化痰降浊、和胃止呕; 人参、大枣、甘草健脾和中、益气生津, 以达疏肝利胆、清解湿热的

功效恢复肝脏生理功能。因此, 本实验观察小柴胡汤对蛋氨酸-胆碱缺乏 (methionine-choline-deficient, MCD) 饮食诱导的 NASH 模型小鼠的药效作用及其机制, 为其临床应用提供依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级的 C57BL/6 雄性小鼠共 70 只, 6~7 周龄, 体质量 18~22 g, 购买于北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号 [SCXK (京) 2016-0006], 饲养条件: 室温 20~25 °C, 通风性良好。实验动物福利伦理批准号 [KYLL-2018 (KJ) A-0089], 所有动物实验流程均严格遵循中国实验动物管理协会的伦理准则给予人道主义关怀。

1.2 药品

小柴胡汤中柴胡、黄芩、人参、甘草、半夏、生姜、大枣购自山东百味堂中药饮片有限公司, 由山东省中医药研究院林慧彬研究员鉴定, 分别为伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 的干燥根、黄芩属植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根、五加科人参属植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的根、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎、天南星科半夏属植物半夏 *Pinellia ternate* (Thunb.) Breit. 的块茎、姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的新鲜根茎、鼠李科植物枣 *Ziziphus jujuba* Mill. 的干燥成熟果实, 按《中国药典》2015 年版柴胡、黄芩、人参、甘草、半夏、生姜、大枣项下检查, 符合各项规定。多烯磷脂酰胆碱胶囊 (易善复), 赛诺菲 (北京) 制药有限公司生产, 批号 5JD189; 强肝胶囊, 石家庄东方药业有限

公司生产, 批号 20190515。

1.3 试剂

MCD 和蛋氨酸-胆碱充足饲料 (methionine-choline-sufficient, MCS) 购自南通特洛菲饲料科技有限公司; 丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 试剂盒购买于南京建成生物工程研究所; 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 酶联免疫试剂盒和白细胞介素-6 (IL-6) 酶联免疫试剂盒购于上海易利生物科技有限公司; 脂肪酸合成酶 (FAS) 和固醇调节元件结合蛋白 1c (SREBP-1c)、GAPDH 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成; HiScript Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) 和 AceQ qPCR SYBR Green Master Mix 购自南京诺唯赞生物科技有限公司。

1.4 仪器

TDZ5-WS 型台式低速离心机, 湘仪 (湖南) 离心机仪器有限公司; Multiskan Go-1510 全波长酶标仪, 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; 可调式移液器, 上海赛默飞世尔仪器有限公司; PCR 扩增仪、实时定量 PCR 仪, 德国艾本德股份公司。

2 方法

2.1 小柴胡汤煎剂的制备

按照《伤寒论》原方比例: 柴胡半斤 (24 g)、黄芩三两 (9 g)、人参三两 (9 g)、甘草三两 (9 g)、半夏半升 (9 g)、生姜三两 (9 g)、大枣四枚, 称取小柴胡汤各药味, 加入 10 倍量水, 加热回流提取 2 次, 每次提取时间为 1.5 h, 合并滤液, 浓缩药液至所需浓度。

2.2 分组、造模及给药

将 70 只 SPF 级的 C57BL/6 雄性小鼠分为对照组, 模型组, 小柴胡汤高、中、低剂量 (其剂量设置参考高等医药院校教材《方剂学》以及《伤寒论》中小柴胡汤药味用量, 即 70 kg 成人日服用量为 78 g, 按小鼠与人体表面积比值进行计算: 小鼠 ig 给药小柴胡汤高、中、低剂量分别为 40.56、20.28、10.14 g/kg, 分别相当于人日用量的 4、2、1 倍) 组, 易善复 (多烯磷脂酰胆碱胶囊, 其成人日用量最高为 1.37 g, 按小鼠与人体表面积比值折算, 小鼠 ig 给药剂量为 0.18 g/kg) 组, 强肝胶囊 (其成人日用量最高为 4 g, 按小鼠与人体表面积比值计算, 小鼠 ig 给药剂量为 0.52 g/kg) 组; 每组 10 只。对照组小鼠予以 MCS 饲料, 模型组及各给药组小鼠均将

MCS 和 MCD 饲料按一定比例适应性喂养 1 周后, 给以完全 MCD 饲料, 持续 4 周, 制备 NASH 模型。自造模同时, 各给药组按给药剂量 ig 给药, 给药体积 10 mL/kg, 对照组和模型组小鼠均 ig 等体积蒸馏水。

2.3 指标检测

2.3.1 摄食量、饮水量及体质量测定 每 4 天对各组小鼠摄入量及体质量进行测定并记录, 计算小鼠体质量自身变化率及日摄食量、日饮水量的变化。

2.3.2 血清及肝生化指标测定 给药干预 4 周后, 小鼠提前 12 h 禁食, 麻醉动物, 摘除眼球采血于 1.5 mL EP 管中, 静置 2 h, 在 4 °C 预冷的离心机 3 500 r/min 离心 10 min 后, 吸取上清液, 测定血清中 ALT、AST、TC、TG、HDL-C、IL-6 和 TNF- α 的浓度。制备肝组织匀浆, 检测肝组织 TC、TG 的浓度。取肝称质量并计算肝脏系数, 取各组小鼠相同部位的部分肝大叶于 1.5 mL EP 管中-80 °C 冻存, 用于后续实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 实验。

2.3.3 肝组织病理检查 将每只小鼠相同部位肝组织置于 4% 多聚甲醛中固定, 后续脱水、包埋和切片, 进行 HE 染色, 观察肝脏病理变化, 对 NAFLD 活动度积分进行统计学评价^[16]。

2.3.4 qRT-PCR 检测相关基因 取各组小鼠冻存的部分肝组织, 按照说明书提取总 RNA, 并逆转录合成 cDNA。对 FAS、SREBP-1c 采用实时荧光定量 PCR 仪进行相对定量分析, 目标基因的相对定量用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 公式计算, 实验所需各引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 反应引物序列
Table 1 Sequences of each primer in qRT-PCR

基因名称	引物序列
GAPDH	正向引物: GAGCCAAAAGGGTCATCATCT 反向引物: AGGGGCCATCCACAGTCTTC
FAS	正向引物: TCCTGCCTCTGGTGCTTGCT 反向引物: AGTTTCACGAACCCGCCTCCT
SREBP-1c	正向引物: GGAGGGGTAGGGCCAACGGCCT 反向引物: CATGTCTTCGAAAGTGCAATCAC

2.4 统计学分析

应用 GraphPad Prism7 统计软件进行统计学分析, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间进行单因素方差分析。

3 结果

3.1 小柴胡汤对 NASH 模型小鼠体质量、日摄食量、日饮水量和肝脏系数的影响

实验期间, 小鼠的体质量变化及自身变化率结

果见图 1-A, 对照组小鼠体质量增长稳定, 模型组小鼠体质量出现明显下降; 与模型组相比, 小柴胡汤高剂量组及易善复组、强肝胶囊组给药 12 d 后, 小鼠体质量出现增长情况, 小柴胡汤中剂量组小鼠体质量稳定, 小柴胡汤低剂量组小鼠体质量降低。

各组小鼠的日摄食量、日饮水量结果见图 1-B, 对照组小鼠进食正常, 与对照组比较, MCD 饲料喂养后, 模型组和各给药组小鼠摄入量显著降低, 自给药 12 d 后, 各给药组小鼠摄入量稳定但均低于对照组。

实验结束, 小鼠的肝脏湿质量及肝脏系数结果见图 1-C, 对照组小鼠肝湿质量和肝脏系数分别为 (1.06 ± 0.09) g、 (4.40 ± 0.36) %, 模型组小鼠肝湿质量和肝脏系数分别为 (0.93 ± 0.08) g、 (5.20 ± 0.48) %。与模型组相比, 各给药组小鼠肝脏系数显著降低 ($P < 0.05$), 以上数据说明 MCD 饮食诱导的小鼠模型会出现体质量降低、摄入量减少及肝脏湿质量下降的特点, 小柴胡汤可显著改变 NASH 模型小鼠体质量、摄入量及肝脏系数。

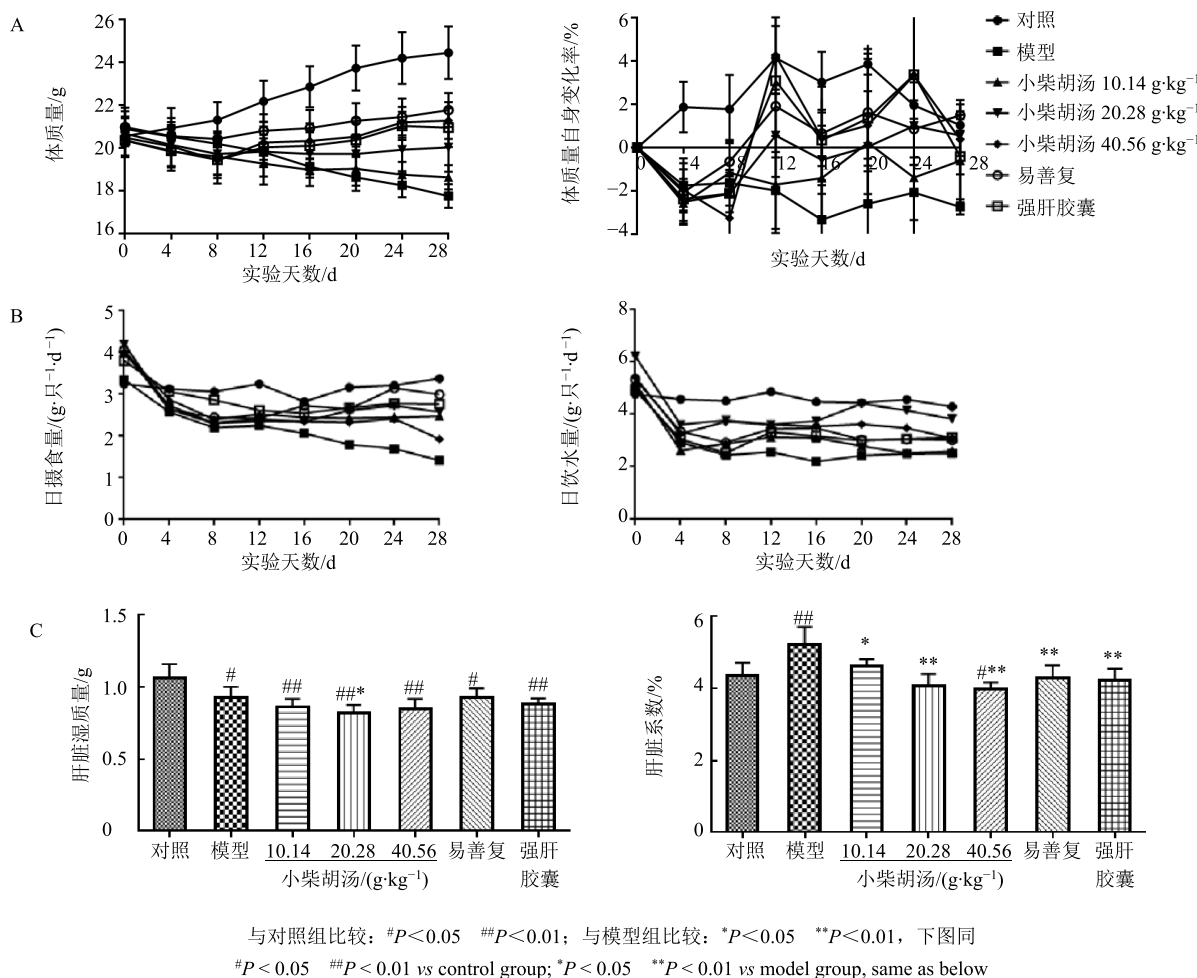


图 1 小柴胡汤对 NASH 模型小鼠体质量 (A)、日摄食量和日饮水量 (B)、肝脏湿质量和肝脏系数 (C) 的影响 ($n = 10$)
Fig. 1 Effects of Xiaochaihu Decoction on body weight, daily food intake, daily water intake and liver coefficient of NASH model mice ($n = 10$)

3.2 小柴胡汤对 NASH 模型小鼠肝组织病理变化的影响

MCD 饮食由于缺乏蛋氨酸在体内无法合成低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C), 三酰甘油转移受阻而导致小鼠脂肪变性, 因此, NASH 小鼠模型出现明显的脂肪堆积和变性等病理特点^[17]。HE 染色结果显示, 对照组小鼠的肝细胞结构完整, 以中央静脉

为中心有序排列, 无明显脂滴; 模型组小鼠肝细胞基本结构被破坏, 脂质堆积面积增多, 脂滴变大, 出现严重的脂肪变性, 胞质挤满空泡, 以浸润为主的坏死性炎症, 胞核呈现固缩, 聚集的状态。与模型组相比, 小柴胡汤中、高剂量组及易善复组、强肝胶囊组在肝细胞的形态和结构上都有明显改善, 脂肪变性的空泡和炎症均可见明显减少, 细胞呈现

有序排列状态,且有明显剂量相关性,见图 2,小柴胡汤对 NASH 模型小鼠肝组织病理评分的影响见表 2。

3.3 小柴胡汤对 NASH 模型小鼠血清中 TC、TG、HDL-C 水平的影响

与对照组相比,模型组小鼠血清中 TC、TG 水平均极显著升高 ($P<0.01$),HDL-C 水平极显著降

低 ($P<0.01$);与模型组相比,小柴胡汤高剂量组、易善复组、强肝胶囊组小鼠血清中 TC、TG 水平极显著降低 ($P<0.01$),小柴胡汤中剂量组小鼠血清中 TC、TG 水平显著降低 ($P<0.05$);小柴胡汤中、高剂量组及易善复组、强肝胶囊组小鼠血清 HDL-C 水平极显著升高 ($P<0.01$),说明小柴胡汤可显著调节 NASH 小鼠的血脂水平且呈现剂量相关性。结果见图 3。

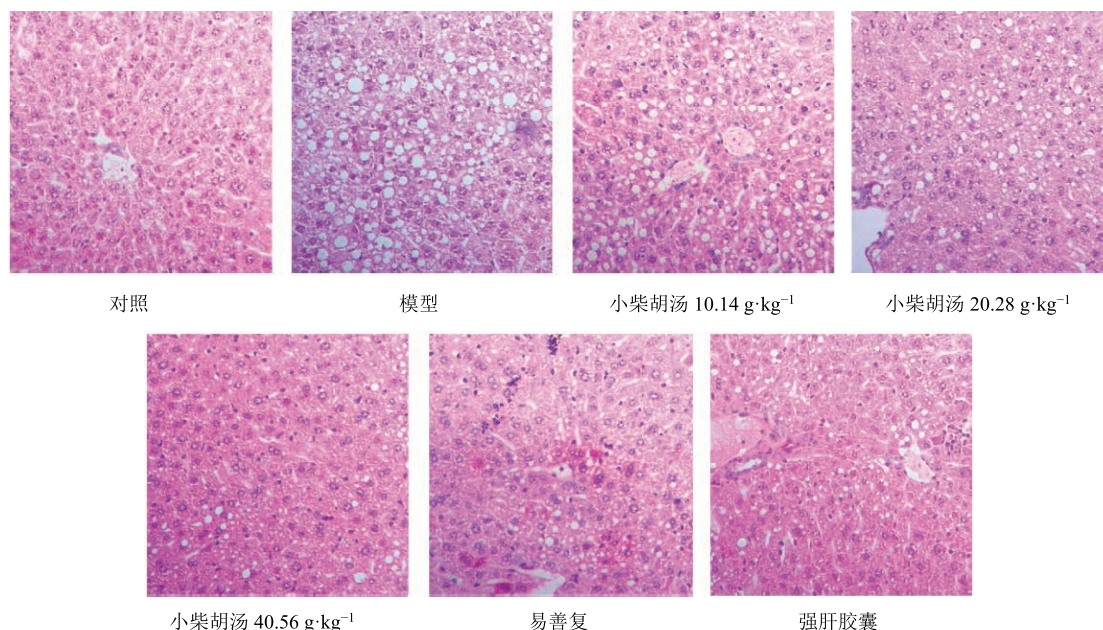


图 2 小柴胡汤对 NASH 模型小鼠肝组织病理变化的影响 (HE, $\times 200$)

Fig. 2 Effect of Xiaochaihu Decoction on pathological changes of liver tissue in NASH model mice (HE, $\times 200$)

表 2 小柴胡汤对 NASH 模型小鼠肝组织病理学评分的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Effect of Xiaochaihu Decoction on liver histopathology scores of NASH model mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	脂肪变性评分	炎症程度评分	气球样变程度评分
对照	—	0.17 $\pm$ 0.41	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
模型	—	2.67 $\pm$ 0.52 ^{##}	1.83 $\pm$ 0.41 ^{##}	1.50 $\pm$ 0.55 ^{##}
小柴胡汤	10.14	2.17 $\pm$ 0.41 ^{##}	1.67 $\pm$ 0.52 ^{##}	1.33 $\pm$ 0.52 ^{##}
	20.28	1.50 $\pm$ 0.55 ^{###}	1.33 $\pm$ 0.52 ^{##}	1.00 $\pm$ 0.00 [*]
	40.56	0.50 $\pm$ 0.55 ^{**}	0.50 $\pm$ 0.55 ^{***}	0.50 $\pm$ 0.55 [#]
易善复	0.18	0.83 $\pm$ 0.75 ^{**}	0.67 $\pm$ 0.82 [*]	0.67 $\pm$ 0.52 [#]
强肝胶囊	0.52	0.83 $\pm$ 0.41 ^{***}	0.83 $\pm$ 0.75 [#]	0.50 $\pm$ 0.55 [#]

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

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

3.4 小柴胡汤对 NASH 模型小鼠肝组织中 TC、TG 水平的影响

与对照组相比,模型组小鼠肝组织中 TC、TG 水平均显著升高 ($P<0.01$),说明 MCD 饮食诱导的 NASH 模型小鼠肝脏出现严重脂肪堆积。与模型组相比,小柴胡汤中剂量组、小柴胡汤高剂量组、易善复组、强肝胶囊组小鼠肝组织中 TC、TG 水平极显著降

低 ($P<0.01$);说明小柴胡汤可显著降低 NASH 小鼠的肝脏脂质含量且呈现剂量相关性。结果见图 4。

3.5 小柴胡汤对 NASH 模型小鼠血清中 ALT、AST 水平的影响

ALT 和 AST 的水平为临床常用肝脏功能检测的指标,用于评估肝脏功能或肝损伤,在急性肝炎及慢性肝炎等肝脏疾病,ALT 可以评价肝细胞损害

程度,反映肝细胞膜通透性的改变^[18],AST 则与肝细胞中的线粒体受损相关。如图 5 所示,与对照组相比,模型组小鼠血清中 ALT、AST 水平均极显著升高 ($P<0.01$),说明 MCD 饮食诱导的 NASH 模型小鼠出现严重肝脏损伤。与模型组相比,小柴胡汤低剂量组小鼠血清中 ALT 水平显著降低 ($P<0.05$)、AST 水平极显著降低 ($P<0.01$);小柴胡汤高、中剂量组及易善复组、强肝胶囊组小鼠血清中

的 ALT、AST 水平均极显著降低 ($P<0.01$),说明小柴胡汤可显著改善肝组织损伤。

3.6 小柴胡汤对 NASH 模型小鼠血清中促炎细胞因子 TNF- α 、IL-6 水平的影响

MCD 饮食由于缺乏蛋氨酸会引起氧化应激而发生肝损伤^[19],而氧化应激的发生会激活炎症反应包括 TNF- α 等炎症因子的表达^[20]。如图 6 所示,与对照组相比,模型组小鼠血清中 TNF- α 、IL-6 水平均极

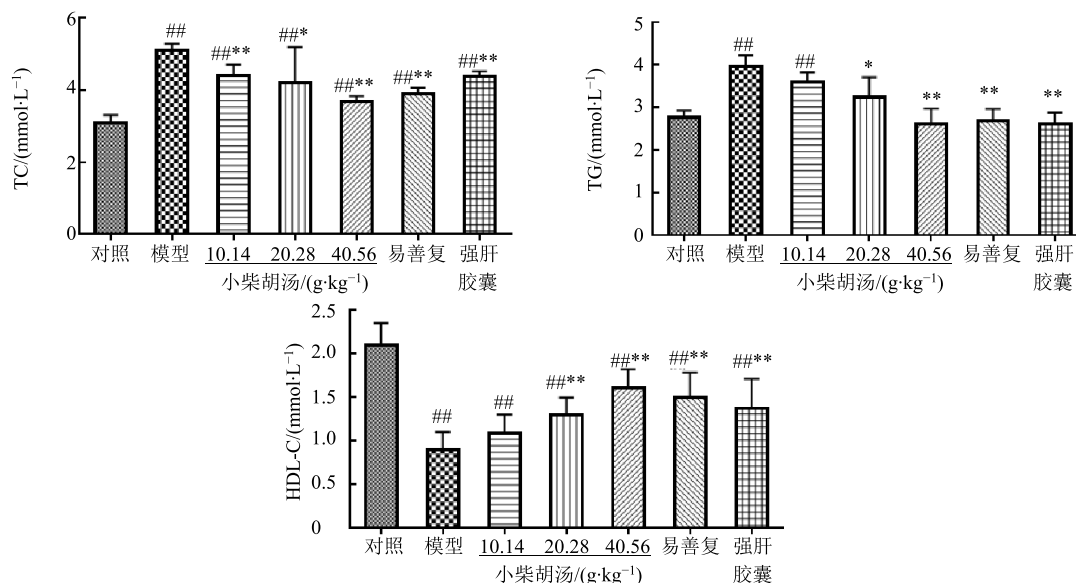


图 3 小柴胡汤对 NASH 模型小鼠血清中 TC、TG、HDL-C 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 3 Effects of Xiaochaihu Decoction on TC, TG, HDL-C levels in serum of NASH model mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

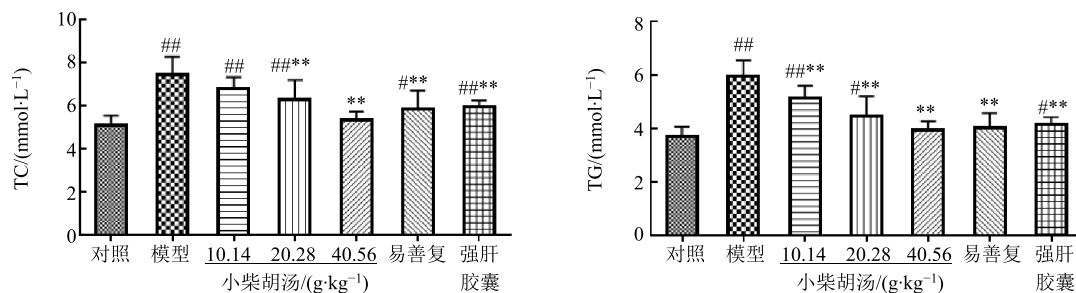


图 4 小柴胡汤对 NASH 模型小鼠肝组织中 TC、TG 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 4 Effects of Xiaochaihu Decoction on TC, TG levels in liver tissue of NASH model mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

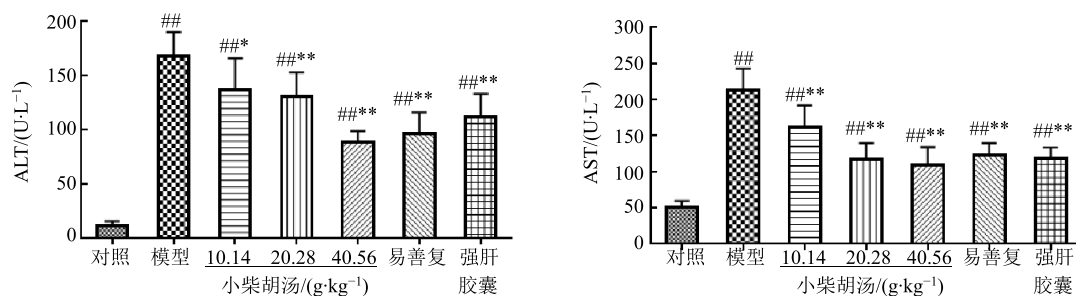


图 5 小柴胡汤对 NASH 模型小鼠血清中 ALT、AST 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 5 Effects of Xiaochaihu Decoction on ALT and AST levels in serum of NASH model mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

显著升高 ($P < 0.01$), 说明 MCD 饮食诱导的 NASH 模型小鼠出现严重炎症反应。与模型组相比, 小柴胡汤高、中、低剂量组及易善复组、强肝胶囊组小鼠血清中的 TNF- α 、IL-6 水平均极显著降低 ($P < 0.01$), 说明小柴胡汤可显著降低炎症因子的释放。

3.7 小柴胡汤对 NASH 模型小鼠肝组织 FAS 和 SREBP-1c 表达水平的影响

为了明确小柴胡汤调脂机制, 利用 qRT-PCR 技术对小鼠肝脏中与脂肪代谢有关的关键基因进行分析。如图 7 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠肝组织 FAS 和 SREBP-1c 的 mRNA 水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 小柴胡汤高、中、低剂量组及易善复组、强肝胶囊组小鼠肝组织 FAS 和 SREBP-1c 的 mRNA 水平均显著降低 ($P < 0.05$); 说明小柴胡汤可

通过调控 FAS 和 SREBP-1c 发挥调脂作用。

4 讨论

目前针对 NASH 不同发病机制的多种新型靶向药物已经相继进入临床试验^[21-23], 但受限于潜在不良反应尚未得到一致认可。在“整体观念”和“辨证论治”的指导下, 中医对 NASH 认识的逐渐清晰, 治疗原则也逐渐呈现多样化。小柴胡汤可针对 NASH 痰、湿、气滞、血瘀、热的病理因素^[24], 诸药合用发挥化痰浊、畅三焦、行气机、解郁结、和枢机之功效。现有研究表明, 小柴胡汤在改善肝组织功能、调节脂质代谢上具有明显的疗效和优势^[11]。方中所含柴胡皂苷、黄芩苷等主要化学成分可发挥调节脂质代谢、抗氧化、抗凋亡、免疫调节、抗炎等功能保护肝脏组织^[25-41], 见图 8。

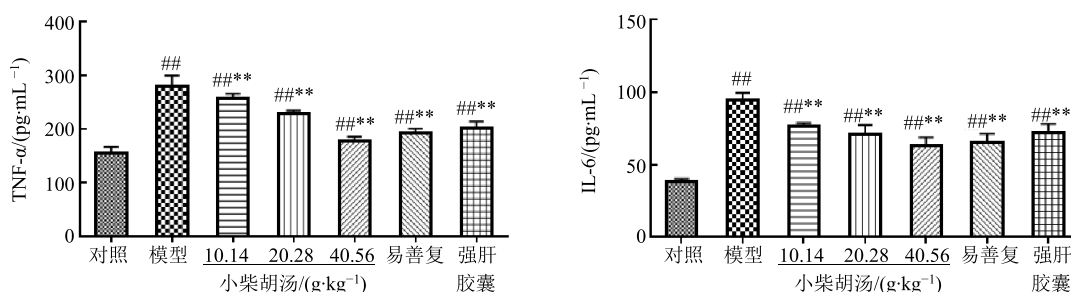


图 6 小柴胡汤对 NASH 模型小鼠血清中 TNF- α 、IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 6 Effects of Xiaochaihu Decoction on levels of TNF- α and IL-6 in serum of NASH model mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

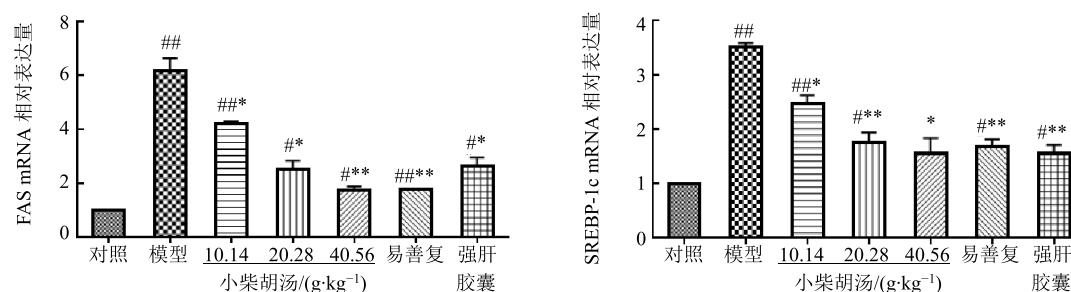


图 7 小柴胡汤对 NASH 模型小鼠肝组织 FAS 和 SREBP-1c 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 7 Effect of Xiaochaihu Decoction on expression of FAS and SREBP-1c in liver tissue of NASH model mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

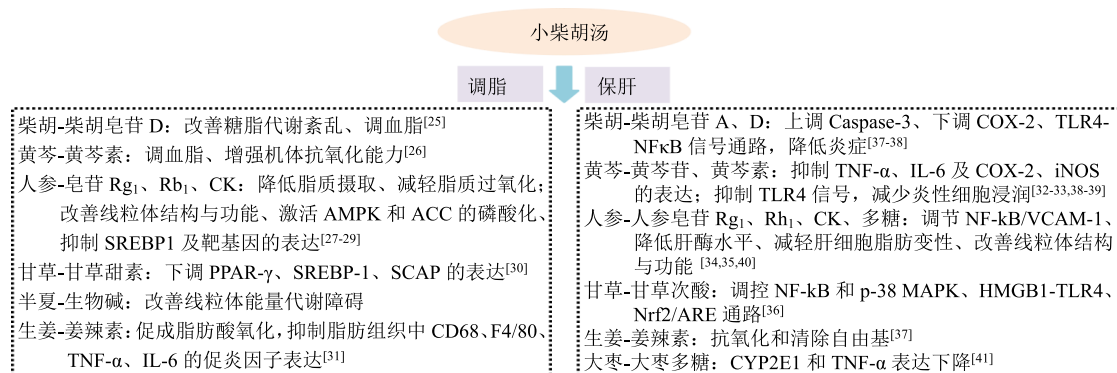


图 8 小柴胡汤中发挥调脂保肝作用化学成分及机制

Fig. 8 Chemical composition and mechanism of lipid-lowering and liver-protecting of Xiaochaihu Decoction

易善复在临床上常与保肝护肝药物联合使用治疗 NASH, 其主要活性成分为结构和内源性卵磷脂相同的 1,2-二酰磷脂胆碱 (DLPC), 实验数据显示易善复可在 0.07~0.23 g/kg 剂量范围内通过增加肝细胞膜的稳定性维持肝脏等器官及组织的膜功能, 通过修复受损肝细胞、加速脂肪分解达到保护肝脏的作用, 改善小鼠脂肪肝及肝损伤^[42-44]。强肝胶囊有清热利湿、补脾养血、益气解郁的功效, 临床多用于慢性肝炎、早期肝硬化病、脂肪肝、中毒性肝炎等的治疗, 并具有良好疗效^[45-47]; 全方 16 味中药协调配合, 在 0.15~0.66 g/kg 剂量范围内可抑制脂肪肝模型大鼠三酰甘油吸收, 增强脂肪分解, 改善肝脏微循环的作用, 还可通过降低氧化应激、减轻炎症坏死等来恢复肝功能^[48-49]。因此, 本实验选择易善复和强肝胶囊作为实验阳性药物。

实验结果表明小柴胡汤对 MCD 饮食诱导的 NASH 小鼠有明显保护作用。肝脏病理切片及血清生化指标结果表明小柴胡汤能明显改善肝脏脂肪变性和炎症等组织学改变; 小柴胡汤可显著降低 NASH 模型小鼠血清中 TG、TC 水平, 升高 HDL-C 水平, 减少脂肪堆积; 降低 NASH 模型小鼠血清 AST、ALT 肝损伤标志物的水平; 降低血清促炎细胞因子 IL-6 和 TNF- α 的释放; 证实了小柴胡汤在改善肝组织脂肪变性、抗肝组织炎症反应中的作用。FAS 是催化乙酰辅酶 A 和丙二酸单酰辅酶 A 为脂肪酸的关键限速酶, FAS 的表达量增加会导致 TG 在动物体内的积累^[50-51]; SREBP-1c 是一个关键的脂肪生成转录因子, 通过活化参与脂肪酸和三酰甘油合成的基因来优先调节脂肪生成的过程^[52-53]。qRT-PCR 结果显示, 模型组 FAS 和 SREBP-1c 均出现高表达, 而小柴胡汤给药组可降低 FAS 和 SREBP-1c 的表达水平, 说明小柴胡汤可能是通过抑制脂肪合成基因的表达来发挥调脂作用。

综上, 本实验表明小柴胡汤可显著调节 NASH 小鼠体内脂质水平, 通过抑制 FAS 和 SREBP-1c 等脂肪合成基因的表达减轻脂质沉积、改善脂肪变性的程度, 发挥调脂作用; 抑制 TNF- α 、IL-6 等炎症因子的释放发挥保肝作用, 以期小柴胡汤临床应用于 NASH 的治疗提供实验依据。

参考文献

[1] 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组中国医师协会脂肪性肝病专家委员会. 非酒精性脂肪性肝病防治指南 (2018 年更新版) [J]. 临床肝胆病杂志,

2018, 34(5): 947-957.

[2] 孙超, 范建高. 中外非酒精性脂肪性肝病诊疗指南解读 [J]. 中国实用内科杂志, 2019, 39(3): 235-238.

[3] Zhu J Z, Zhou Q Y, Wang Y M, *et al.* Prevalence of fatty liver disease and the economy in China: A systematic review [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(18): 5695-5706.

[4] 赵红, 谢雯. 非酒精性脂肪性肝病的中西医结合治疗现状 [J]. 中国临床医生杂志, 2020, 48(1): 16-18.

[5] 张声生, 李军祥. 非酒精性脂肪性肝病中医诊疗专家共识意见 (2017) [J]. 临床肝胆病杂志, 2017, 33(12): 2270-2274.

[6] 张仲景. 伤寒论 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005.

[7] 陈俊伟, 董竹君, 袁婷, 等. 小柴胡汤及其类方治疗脂肪性肝病研究进展 [J]. 科教导刊: 上旬刊, 2019, 11(3): 52-54.

[8] 童送文. 小柴胡汤加减治疗非酒精性脂肪肝临床疗效观察 [J]. 亚太传统医药, 2017, 13(11): 133-134.

[9] 瞿晓东. 小柴胡汤配合肝病治疗仪治疗脂肪肝临床观察 [J]. 内蒙古中医药, 2016, 35(2): 20-21.

[10] 周云, 张敏丽, 杨百京, 等. 小柴胡汤联合熊去氧胆酸胶囊治疗非酒精性脂肪肝临床观察 [J]. 内蒙古中医药, 2012, 31(22): 15-16.

[11] 谭志勇, 刘云云, 朱迪. 小柴胡汤治疗肝脏疾病的临床应用及实验研究 [J]. 亚太传统医药, 2014, 10(6): 44-45.

[12] 孙明瑜, 高琳, 谢鸣, 等. 小柴胡汤合煎液与分煎合液对 LPS 诱导大鼠发热模型的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2003, 10(12): 17-19.

[13] 顾本清, 杨家民, 赵益业, 等. 小柴胡汤抗尿道致病性大肠杆菌感染作用的初步观察 [J]. 中国中西医结合杂志, 1997, 17(10): 599-600.

[14] 白晶, 孙明瑜, 王守勇, 等. 小柴胡汤药群配伍对角叉菜胶诱导的大鼠胸膜炎模型的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2005, 28(1): 34-38.

[15] 温志坚, 彭龙玲, 曹毓, 等. 小柴胡汤提取物治疗大鼠实验性肝损伤肝硬化的研究 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2001, 11(1): 21-23.

[16] Kleiner D E, Brunt E M, 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.

[17] 黄天养, 李惠民, 封雨, 等. 绿茶水提物对蛋氨酸和胆碱缺乏饮食诱导的非酒精性脂肪性肝病小鼠的保护作用 [J]. 现代食品科技, 2019, 35(4): 9-15.

[18] Miyake T, Kumagi T, Hirooka M, *et al.* Metabolic markers and ALT cutoff level for diagnosing nonalcoholic fatty liver disease: A community-based cross-sectional

- study [J]. *J Gastroenterol*, 2012, 47(6): 696-703.
- [19] 崔国祯, 余汉滨, 黄天养, 等. 胆碱和蛋氨酸缺乏饲料诱导大、小鼠非酒精脂肪性肝炎动物模型的比较研究 [J]. 遵义医学院学报, 2017, 40(3): 229-233.
- [20] Li S, Hong M, Tan H Y, *et al*. Insights into the role and interdependence of oxidative stress and inflammation in liver diseases [J]. *Oxid Med Cell Long*, 2016, doi: 10.1155/2016/4234061.
- [21] 杨莉, 王晓光, 朱英. 非酒精性脂肪性肝病药物治疗的研究进展 [J]. 大连医科大学学报, 2019, 41(4): 348-351.
- [22] 刘贝贝, 徐可树. 非酒精性脂肪性肝病的药物治疗 [J]. 中国实用内科杂志, 2019, 39(3): 214-217.
- [23] 许炎煌, 范建高. 非酒精性脂肪性肝炎的药物治疗现状与对策 [J]. 国际消化病杂志, 2019, 39(1): 4-8.
- [24] 隋晶. 非酒精性脂肪性肝炎的中医证候特点研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.
- [25] 阮君, 肖铁刚, 王兵. 柴胡皂苷 D 对非酒精性脂肪性肝炎大鼠糖脂代谢紊乱的影响 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2019, 29(5): 399-401.
- [26] 李恒华, 黄崇刚, 黄文涛, 等. 黄芩素对实验性肥胖大鼠减肥降脂作用的初步研究 [J]. 重庆中草药研究, 2017, 60(1): 34-37.
- [27] 高月, 黄文祥, 章述军, 等. 人参皂苷 Rg₁ 对非酒精性脂肪肝 HepG2 细胞脂质摄取和氧化的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(12): 100-106.
- [28] 韩晓春, 张峰, 刘长虹, 等. 人参皂苷 Rb₁ 对小鼠非酒精性脂肪肝病的治疗作用及其机制 [J]. 山东医药, 2019, 59(8): 37-40.
- [29] 张齐, 金翔宇, 权海燕. 人参皂苷 Compound K 通过 AMPK 及 SREBP1 途径改善非酒精性脂肪肝的机制研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39(8): 791-795.
- [30] 卜晓芬, 李骏, 朱虹. 甘草甜素对体外诱导的酒精性脂肪肝细胞的影响及机制研究 [J]. 重庆医学, 2018, 47(4): 436-438.
- [31] 李金秀. 6-姜辣素改善老年大鼠脂肪肝的作用机制 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2018.
- [32] 唐彬, 宋振梅, 肖琦凡. 黄芩苷对高脂-脂肪肝模型大鼠肝脏炎症改善及炎症因子表达的影响 [J]. 青岛大学医学院学报, 2017, 53(6): 659-663.
- [33] 张艳. 黄芩苷和黄芩素的抗炎和免疫调控作用研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2012.
- [34] 罗飘, 楚世峰, 彭也, 等. 人参皂苷 Rg₁ 调节 NF- κ B/VCAM-1 减轻胆汁淤积性肝纤维化 [J]. 药学报, 2019, 54(2): 321-328.
- [35] 李明珂, 陈徐佳, 武绍梅, 等. 人参皂苷 Rh₁、CK 改善酒精性肝损伤及线粒体结构的研究 [J]. 重庆医学, 2018, 47(31): 3973-3977.
- [36] 杨晓宇, 苏秀兰. 甘草次酸保肝功效的通路作用机制 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2019, 28(1): 66-70.
- [37] 卢静, 沈雪, 王昊, 等. 生姜提取物体外对小鼠肝细胞损伤的保护作用研究 [J]. 中药药理与临床, 2009, 25(4): 54-56.
- [38] 李敏, 王羲雯, 李小菲, 等. 基于 TLR4-NF κ B 的柴胡皂苷 d-黄芩苷配伍抗 CCl₄ 损伤肝细胞的作用研究 [J]. 中医药导报, 2017, 23(18): 26-29.
- [39] 杨秀秀. 柴胡皂苷 A、黄芩素及其配伍对人肝癌细胞 HepG₂ 和 SMMC-7721 体外作用的实验研究 [D]. 郑州: 河南中医学院, 2014.
- [40] 杨松, 王隶书, 刘美辰, 等. 人参多糖对氧化应激损伤肝细胞的保护作用机制研究 [J]. 食品工业科技, 2020, 41(5): 280-285.
- [41] 申军华, 李芳芳. 大枣对酒精性肝病小鼠肝组织 CYP2E1 和 TNF- α 表达的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(4): 466-470.
- [42] 陈亮, 赵琦, 欧莉. 中西医治疗非酒精性脂肪性肝炎的研究进展 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2019, 6(96): 193-194.
- [43] 黄焕贤. 多烯磷脂酰胆碱治疗非酒精性脂肪性肝炎的临床分析 [J]. 吉林医学, 2019, 40(3): 545-546.
- [44] 胡炼夫. 实脾消脂汤治疗 NASH 的临床及实验研究 [D]. 恩施: 湖北民族学院, 2015.
- [45] 郝丽红. 强肝胶囊对非酒精性脂肪肝患者临床症状改善情况及肝功能的影响 [J]. 实用临床医药杂志, 2015, 19(1): 126-127.
- [46] 郑昕, 王亚平. 非酒精性脂肪性肝炎的中医药研究进展 [J]. 陕西中医学院学报, 2011, 34(2): 86-87.
- [47] 周朝晖, 胡德昌, 余为民. 强肝胶囊治疗非酒精性脂肪性肝病的临床疗效分析 [J]. 中国临床医学, 2016, 23(4): 534-536.
- [48] 刘红芬, 范亚坤, 张淑梅, 等. 强肝胶囊治疗单纯性肥胖脂肪肝患者临床疗效及瘦素的变化特征 [J]. 河北医科大学学报, 2016, 37(11): 1257-1259.
- [49] 郝莉莉, 刘小溪. 基于 Egr-1 调控 IL-8 表达研究强肝胶囊对大鼠非酒精性脂肪肝的改善作用 [J]. 现代药物与临床, 2018, 33(2): 214-219.
- [50] 敬娜娜, 田丹, 蓝海芳, 等. 茯砖茶水提物对高脂饮食诱导肥胖小鼠肝脏脂质代谢的影响 [J]. 食品科技, 2019, 44(11): 232-237.
- [51] Smith S, Witkowski A, Joshi A K. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase [J]. *Progress Lipid Res*, 2003, 42(4): 289-317.
- [52] 尹靖东, 齐广海, 霍启光. 家禽脂类代谢调控机理的研究进展 [J]. 动物营养学报, 2000, 12(2): 1-7.
- [53] Ferre P, Foulle F. SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: Clinical perspective [J]. *Horm Res*, 2007, 68(2): 72-82.