

当归芍药散对非酒精性脂肪肝大鼠TLR4/MyD88/JNK 信号通路的影响

李易水¹, 储心乔², 彪雅宁¹, 张睦清³, 韩一鹭¹, 李子璇¹, 张一昕^{1*}

(1. 河北中医学院药学院, 河北省高校中药组方制剂应用技术研究中心, 石家庄 050200;

2. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053; 3. 河北省中医院, 石家庄 050911)

[摘要] 目的:探讨当归芍药散对非酒精性脂肪肝(NAFLD)大鼠的治疗作用及其机制。方法:60只清洁级SD雄性大鼠随机分为正常组、模型组、易善复组(0.144 g·kg⁻¹)及当归芍药散低、中、高剂量组(2.44, 4.88, 9.76 g·kg⁻¹)。通过喂饲高脂饲料复制NAFLD大鼠模型,造模同时给予相应药物治疗,8周后,采集血清和肝组织标本,检测血清中胆固醇(TC),甘油三酯(TG),丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-10(IL-10)的含量或活性变化及肝脏TC, TG, 游离脂肪酸(FFA)的含量变化;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肝脏中Toll样受体4(TLR4),髓样分化因子88(MyD88), c-Jun氨基末端激酶(JNK)的基因和蛋白表达及1磷酸化JNK(p-JNK)的蛋白表达情况;苏木素-伊红(HE)染色和油红O染色观察肝脏病理形态学变化。结果:与正常组比较,模型组大鼠血清中TC, TG, ALT, AST, TNF- α 以及肝组织中TC, TG, FFA的含量或活性、肝脏中TLR4, MyD88和JNK的mRNA和蛋白表达及p-JNK的蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$), IL-10的含量均显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,当归芍药散各剂量组大鼠血清中TC, TG, ALT, AST, TNF- α 和肝组织中TC, TG, FFA的含量或活性、肝脏中TLR4, MyD88, JNK的mRNA和蛋白表达及p-JNK的蛋白表达水平均明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$), IL-10的含量均明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$), HE染色和油红O染色结果提示其能明显减轻肝脏脂肪变性程度。结论:当归芍药散可能通过抑制TLR4/MyD88/JNK信号通路,减轻炎症反应来治疗NAFLD。

[关键词] 当归芍药散; 非酒精性脂肪肝; Toll样受体4(TLR4); 髓样分化因子88(MyD88); c-Jun氨基末端激酶(JNK)

[中图分类号] R2-0; R289; R33; R589.2 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)17-0024-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211737

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210706.1726.005.html>

[网络出版日期] 2021-07-07 10:02

Effect of Danggui Shaoyaoan on TLR4/MyD88/JNK Signaling Pathway on Rats with Nonalcoholic Fatty Liver Disease

LI Yi-shui¹, CHU Xin-qiao², BIAO Ya-ning¹, ZHANG Mu-qing³, HAN Yi-lu¹,

LI Zi-xuan¹, ZHANG Yi-xin^{1*}

(1. School of Pharmacy, Application Technology Research Center of Traditional Chinese Medicine (TCM)

Prescription in University of Hebei Province, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200,

China; 2. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China;

3. Hebei Provincial Hospital of TCM, Shijiazhuang 050911, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the efficacy and mechanism of Danggui Shaoyaoan on rats of

[收稿日期] 20210512(003)

[基金项目] 河北省自然科学基金面上项目(H2020423028);河北省高等学校科学研究计划重点项目(ZD2021079);中央财政公共卫生专项“2018年中药资源”普查项目(Z13508000022);国家级大学生创新创业训练计划项目(202114432006)

[第一作者] 李易水,在读硕士,从事中药防治代谢性疾病的机制研究, E-mail: 15512127882@163.com

[通信作者] *张一昕,博士,教授,博士生导师,从事代谢性疾病的中医药防治和机制研究, E-mail: hbzyx123@163.com

nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Method:** Sixty SPF SD male rats were randomly divided into normal group, model group, essential (0.144 g·kg⁻¹) and low, middle and high-dose of Danggui Shaoyaosan groups (2.44, 4.88, 9.76 g·kg⁻¹). High fat diet were fed to build the NAFLD model, and each treatment group was given corresponding drugs at the same time. After 8 weeks, the serum and liver tissue were collected to detect the contents or activities of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), alanine aminotransferase (ALT), aspartic acid aminotransferase (AST), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-10 (IL-10) in serum, the contents of TC, TG and free fatty acid (FFA) in liver tissue, Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot were used to observe the gene and protein expressions of Toll-like receptor 4 (TLR4), myeloid different factory 88 (MyD88) and c-Jun n-terminal kinase (JNK) and the protein expression of phosphorylation JNK(p-JNK) in liver tissue. Hematoxylin-eosin (HE) staining and Oil red staining to observe the pathological morphological changes of liver. **Result:** Compared with control group, the contents or activities of TC, TG, ALT, AST and TNF- α in serum, the contents of TC, TG and FFA in liver and the gene and protein expressions of TLR4, MyD88, JNK, and the protein expression of p-JNK in liver tissue of model group were distinctly increased ($P < 0.01$), the content of IL-10 was significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with model group, the contents or activities of TC, TG, ALT, AST and TNF- α in serum, the contents of TC, TG and FFA in liver and the mRNA and protein expressions of TLR4, MyD88 and JNK, and the protein expression of p-JNK in liver tissue of Danggui Shaoyaosan groups were significantly reduced ($P < 0.05, P < 0.01$), the content of IL-10 in serum of Danggui Shaoyaosan groups was distinctly increased ($P < 0.05, P < 0.01$), HE staining and Oil red staining show that the degree of liver steatosis was alleviated obviously by Danggui Shaoyaosan. **Conclusion:** Danggui Shaoyaosan has a better treatment on NAFLD by inhibiting TLR4/MyD88/JNK pathway and alleviating the inflammation response.

[**Keywords**] Danggui Shaoyaosan; nonalcoholic fatty liver disease; Toll-like receptor 4 (TLR4); myeloid different factory 88 (MyD88); c-Jun N-terminal kinase (JNK)

非酒精性脂肪肝(NAFLD)是一种与胰岛素抵抗和遗传易感密切相关的代谢应激性肝损伤,疾病谱包括非酒精性肝脂肪变、非酒精性脂肪性肝炎、肝硬化和肝细胞癌^[1]。NAFLD影响着全球25%的普通人群和85%~98%的病态肥胖患者,已被公认为是引发成人和儿童慢性肝脏疾病的首要病因^[2-3]。NAFLD发病机制尚不明确,目前“二次打击学说”已被众多学者所接受,脂质在肝细胞内过度堆积(一次打击)会引发一系列细胞毒性反应(二次打击),导致肝脏炎症损伤,而炎症因子失衡是导致NAFLD发生与发展的主要病因之一^[4]。Toll样受体4(TLR4)通路在NAFLD发病中发挥着重要作用,其被激活后可通过活化髓样分化因子88(MyD88)和c-Jun氨基末端激酶(JNK)信号通路,级联放大炎症反应,促进炎症因子释放,加重肝细胞损伤。

目前临床上尚无明确治疗NAFLD的药物,一般选用降脂药、胰岛素抑制剂、抗氧化剂等^[5],虽有一定的治疗效果,但长期服用会导致肝功能受损、脂质代谢障碍、足部水肿、骨质流失和充血性心力

衰竭等不良反应而限制了应用^[6-7]。近年来,临床观察证实中医药治疗NAFLD效果满意且不良反应较小,因此,开发安全高效的中药制剂具有应用前景和现实意义。

当归芍药散出自《金匮要略》,功能疏肝健脾、活血祛湿,原为主治“妇人妊娠腹痛”而设。该方的组方用药与NAFLD的“肝脾失调,痰瘀互结”的病机恰相吻合,临床观察提示当归芍药散及其加味方能改善NAFLD患者的症状体征和肝脏超声及计算机断层成像(CT)的病理表现,调节血脂,保护肝功能,呈现出较好的临床疗效^[8-10];实验研究也表明,该方对高脂血症大鼠和家兔具有明显的调脂护肝作用^[11-12],但关于当归芍药散治疗NAFLD的作用机制研究尚未见报道。故本实验采用高脂饮食复制NAFLD大鼠模型,观察了当归芍药散对模型大鼠TLR4/MyD88/JNK信号通路相关基因和蛋白的影响,以期为经方新用、指导临床用药提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 60只SPF级SD大鼠,雄性,体质量160~180g,购于北京维通利华实验动物技术有限公

司,合格证号SCXK(京)2016-0006。饲养于SPF级动物饲养室,温度22~24℃,湿度50%~60%,12h明暗循环。该实验经河北中医学院伦理委员会批准同意,编号DWLL2019010。

1.2 药物 当归芍药散由当归10g,白芍、赤芍、川芎、泽泻各24g,麸炒白术、茯苓各12g组成,方中所用药物均为广东一方制药有限公司生产的中药配方颗粒,生产批号分别为0090273,0085633,0093093,0096173,0093073,0091283,0100213;多烯磷脂酰胆碱胶囊(北京赛诺菲制药有限公司,商品名易善复,228mg/粒,2粒/次,3次/d,批准文号国药准字H20059010,生产批号ABJD069B)。以上药物均用100℃蒸馏水配制成所需浓度的药液。

1.3 试剂 总胆固醇(TC),甘油三酯(TG),游离脂肪酸(FFA),丙氨酸氨基转移酶(ALT),天冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司,批号分别为A111-2-1,A110-2-1,A042-1-1,C009-2-1,C010-2-1);肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-10(IL-10)试剂盒(上海森雄科技事业有限公司,批号分别为SXR063,SXR066);TLR4一抗多克隆抗体,辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠免疫球蛋白(Ig)G,HRP标记的山羊抗兔IgG, β -肌动蛋白(β -actin)小鼠单克隆抗体,聚合酶链式反应(PCR)扩增试剂盒,逆转录试剂盒,苏木素-伊红(HE)染色液,油红O染液(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为GB11519,GB1214,GB23303,GB12001,G3321,G3330,G1003,G1016);MyD88一抗多克隆抗体,JNK一抗单克隆抗体,磷酸化JNK(p-JNK)一抗单克隆抗体(武汉三鹰生物科技有限公司,批号分别为23230-1-AP,66210-1-LG,80024-1-RR)。

1.4 仪器 JJ-12J型脱水机,JB-P5型包埋机(武汉俊杰电子有限公司);CRYOSTAR NX50型冰冻切片机(美国Thermo公司);RM2016型病理切片机(上海徕卡仪器有限公司);KZ-II型研磨仪,MX-F型涡旋混合器,BV-2型垂直电泳仪(武汉赛维尔生物科技有限公司);D3024R型台式高速冷冻型微量离心机(北京大龙兴创实验仪器股份公司);Nikon Eclipse E100型正置光学显微镜,Nikon DS-U3型成像系统(日本尼康公司);AlphaEaseFC灰度分析软件(美国Alphalnotech公司);Adobe PhotoShop图像分析软件(美国Adobe计算机软件公司);CFX型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药 60只大鼠适应性喂养1周后,按照体质量随机分为正常组、模型组、易善复组、当归芍药散低、中、高剂量组,每组10只。依据《中药药理研究方法学》^[13]中人与大鼠体表面积系数法换算大鼠用药剂量,确定易善复组大鼠每天给药剂量为0.144g·kg⁻¹,当归芍药散低、中、高剂量组大鼠每天给药剂量分别为2.44,4.88,9.76g·kg⁻¹。除正常组喂养普通饲料外,其余各组均给予高脂饲料(78.8%基础饲料+15%猪油+1%胆固醇+5%蔗糖+0.2%胆酸钠)建立NAFLD模型,以实验大鼠肝细胞内出现大小不一的脂滴空泡和气球样变为造模成功的标准^[14]。造模同时各用药组给予相应药液进行灌胃,正常组和模型组给予等体积蒸馏水,给药体积为10mL·kg⁻¹。正常组予以普通饲料喂养,其余各组喂饲高脂饲料,定期称质量,调整给药体积,给药8周。

2.2 标本采集 实验结束后,以3.5%水合氯醛(10mL·kg⁻¹)麻醉大鼠,股动脉取血,3000r·min⁻¹离心12min(离心半径10cm),吸取血清冷贮,用于检测血清指标;迅速剖取肝脏,取适宜大小的肝组织,置于冻存管中,液氮保存,以备检测mRNA和蛋白表达情况。另取0.5cm×0.5cm×0.5cm大小的肝组织用4%多聚甲醛固定以备病理形态学的观察。

2.3 指标检测

2.3.1 血清生化指标检测 半自动生化分析仪检测血清中TC,TG,ALT和AST的活性或含量;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清中TNF- α ,IL-10的含量,均严格按试剂盒说明进行。

2.3.2 肝脏脂质含量检测 半自动生化分析仪检测肝脏中TC和TG的含量,生化法测定肝脏FFA的含量,按试剂盒说明进行操作。

2.3.3 Real-time PCR检测肝脏TLR4,MyD88和JNK的mRNA表达 取冻存的肝脏,TRIzol提取其总RNA,反转录为cDNA后加入扩增反应体系,行Real-time PCR检测,PCR反应条件为95℃预变性15min,1个循环;95℃变性10s,58℃退火30s,72℃延伸30s,40个循环。按照相对定量方法分析,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,用2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法表示mRNA的相对表达量。引物序列由武汉赛维尔生物科技有限公司设计,见表1。

2.3.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肝脏中TLR4,MyD88,JNK和p-JNK蛋白表达 称取液氮冻存的肝脏100mg,液氮研磨,转移到中性裂解液

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
TLR4	上游 CCAGGTGTGAAATTGAGACAATTG	191
	下游 AAGCTGTCCAATATGGAAACCC	
MyD88	上游 AAGGTGTCGTCGCATGGTG	204
	下游 TTGGTGCAAGGGTTGGTATAGT	
JNK	上游 GACTCCTACCTGAAGCATACT	225
	下游 TCCTTGACACGCAGAATG	
GAPDH	上游 CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	138
	下游 GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT	

中,混匀后超声裂解,配平后 4 °C,4 000 r·min⁻¹离心 15 min(离心半径 10 cm),收集上清液体,测定蛋白含量。蛋白煮沸变性后,经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离,后转移到 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭,加入一抗 TLR4(1:1 000),MyD88(1:1 000),JNK(1:1 000)和 p-JNK(1:1 000),4 °C 孵育过夜,PBST 洗膜 3 次,将洗涤后的一抗反应膜放入二抗(1:3 000)中,室温孵育 1.5 h,PBST 洗膜 3 次,洗去游离二抗。暗室曝光,X 胶片上显影,Photoshop 整理去色,Alpha 软件处理系统分析目标带的吸光度。

2.3.5 HE 染色观察肝组织病理学变化 将 4% 多聚甲醛液中固定的肝脏取出,常规脱水处理、石蜡包埋、切片,HE 染色,光镜下观察肝脏病理形态学

变化。

2.3.6 油红 O 染色法观察肝脏中脂质蓄积情况

将 4% 多聚甲醛液中固定的肝脏取出,30% 蔗糖溶液沉糖 48 h,脱水以后行 OCT 包埋,切片,切片入油红 O 染液浸染 8~10 min(加盖避温),弃去油红 O 染液,再经 60% 异丙醇分化,蒸馏水洗涤,苏木素复染,弃去苏木素,返蓝,蒸馏水洗涤,甘油明胶封片,光镜下观察。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料采用单因素方差分析,方差齐用最小显著性差异法(LSD)检验,方差不齐用 Dunnett'T3 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 NAFLD 大鼠血清中 TC, TG 含量和 ALT, AST 活性的影响 与正常组比较,模型组大鼠血清中 TC, TG 含量以及 ALT, AST 的活性均显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,各用药组大鼠血清中 TC, TG 含量和 ALT, AST 的活性均显著降低 ($P < 0.01$);与易善复组比较,当归芍药散中、高剂量组大鼠血清中 ALT 和高剂量组 AST 的活性均明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$);与当归芍药散低剂量组比较,当归芍药散中、高剂量组大鼠血清中 ALT 和高剂量组 AST 的活性均显著降低 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 当归芍药散对 NAFLD 大鼠血清中 TC, TG, ALT 和 AST 含量或活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of Danggui Shaoyaoan on contents or activities of TC, TG, ALT and AST in serum of NAFLD rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TC/mmol·g ⁻¹	TG/mmol·g ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹
正常		13.95±2.48	4.62±0.79	255.50±22.77	286.43±12.81
模型		58.76±8.74 ¹⁾	13.06±2.45 ¹⁾	703.66±65.07 ¹⁾	683.24±52.62 ¹⁾
易善复	0.144	21.14±3.46 ²⁾	8.32±1.54 ²⁾	364.60±41.42 ²⁾	272.21±28.60 ²⁾
当归芍药散	2.44	24.39±3.10 ²⁾	8.31±1.38 ²⁾	389.52±17.22 ²⁾	280.73±28.90 ²⁾
	4.88	23.77±4.34 ²⁾	8.18±1.44 ²⁾	296.15±18.62 ^{2,3,5)}	278.33±33.75 ²⁾
	9.76	18.54±5.22 ²⁾	6.79±1.54 ²⁾	260.09±37.17 ^{2,4,5)}	212.68±29.68 ^{2,4,5)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$;与易善复组比较³⁾ $P < 0.05, ^4)P < 0.01$;与当归芍药散低剂量组比较⁵⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对 NAFLD 大鼠肝脏中 TC, TG 和 FFA 含量的影响 与正常组比较,模型组大鼠肝脏中 TC, TG 和 FFA 的含量均显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,各用药组大鼠肝组织中 TC, TG 和 FFA 的含量均明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$);与易善复组比较,当归芍药散低剂量组大鼠肝组织中 TC 含量明显升高 ($P < 0.05$),高剂量组 TC 含量明显降低 ($P < 0.05$);与当归芍药散低剂量组比较,中、高剂量组大鼠肝组织中 TC 含量均显著降低 ($P < 0.01$)。见表 3。

3.3 对 NAFLD 大鼠血清中 TNF- α 和 IL-10 含量的影响 与正常组比较,模型组大鼠血清中 TNF- α 含量显著增多 ($P < 0.01$), IL-10 含量显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,各用药组大鼠血清中 TNF- α 含量均显著降低 ($P < 0.01$),当归芍药散各剂量组大鼠血清中 IL-10 含量均明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 4。

3.4 对 NAFLD 大鼠肝脏中 TLR4, MyD88 和 JNK 的 mRNA 表达水平的影响 与正常组比较,模型组

表 3 当归芍药散对 NAFLD 大鼠肝脏中 TC, TG 和 FFA 含量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of Danggui Shaoyaoan on contents of TC, TG and FFA in liver of NAFLD rats ($\bar{x}\pm s, n=10$) mmol·g⁻¹

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	TC	TG	FFA
正常		0.27±0.07	0.16±0.05	50.35±8.21
模型		0.62±0.06 ¹⁾	0.25±0.08 ¹⁾	81.23±11.78 ¹⁾
易善复	0.144	0.36±0.05 ³⁾	0.16±0.04 ³⁾	68.43±7.32 ³⁾
当归芍药散	2.44	0.46±0.05 ^{3,4)}	0.19±0.05 ²⁾	72.26±5.11 ²⁾
	4.88	0.36±0.04 ^{3,5)}	0.17±0.06 ²⁾	70.26±7.27 ²⁾
	9.76	0.31±0.04 ^{3,4,5)}	0.16±0.06 ³⁾	64.67±9.17 ³⁾

注: 正常组比较¹⁾P<0.01; 与模型组比较²⁾P<0.05, ³⁾P<0.01; 与易善复组比较⁴⁾P<0.05; 与当归芍药散低剂量组比较⁵⁾P<0.01。

表 4 当归芍药散对 NAFLD 大鼠血清中 TNF-α 和 IL-10 含量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effect of Danggui Shaoyaoan on contents of TNF-α and IL-10 in serum of NAFLD rats ($\bar{x}\pm s, n=10$) ng·L⁻¹

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	TNF-α	IL-10
正常		59.72±8.90	108.01±15.63
模型		123.33±25.83 ¹⁾	80.72±12.57 ¹⁾
易善复	0.144	73.89±12.41 ³⁾	91.64±12.51
当归芍药散	2.44	71.24±12.22 ³⁾	95.33±11.03 ²⁾
	4.88	66.05±10.10 ³⁾	97.71±10.92 ³⁾
	9.76	58.23±12.53 ³⁾	100.01±11.28 ³⁾

注: 与正常组比较¹⁾P<0.01; 与模型组比较²⁾P<0.05, ³⁾P<0.01。

大鼠肝脏中 TLR4, MyD88 和 JNK 的 mRNA 表达水平均显著升高(P<0.01); 与模型组比较, 各用药组大鼠肝脏中 TLR4, MyD88 和 JNK 的 mRNA 表达水平均明显降低(P<0.05, P<0.01); 与易善复组比较, 当归芍药散低剂量组 TLR4 和 MyD88 mRNA 表达均

显著升高(P<0.01); 与当归芍药散低剂量组比较, 高剂量组 TLR4 mRNA 和中、高剂量组 MyD88 mRNA 表达均明显降低(P<0.05, P<0.01)。见表 5。

表 5 当归芍药散对 NAFLD 大鼠肝脏中 TLR4, MyD88 和 JNK mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 5 Effect of Danggui Shaoyaoan on TLR4, MyD88 and JNK gene expressions in liver tissue of NAFLD rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	TLR4	MyD88	JNK
正常		0.93±0.10	1.16±0.28	1.68±0.24
模型		1.59±0.26 ¹⁾	3.42±0.47 ¹⁾	4.26±0.65 ¹⁾
易善复	0.144	0.74±0.07 ³⁾	1.15±0.38 ³⁾	1.23±0.23 ³⁾
当归芍药散	2.44	0.99±0.11 ^{3,4)}	2.42±0.41 ^{2,4)}	1.40±0.29 ³⁾
	4.88	0.87±0.07 ³⁾	1.10±0.22 ^{3,5)}	1.04±0.21 ³⁾
	9.76	0.76±0.12 ^{3,5)}	1.02±0.17 ^{3,6)}	1.03±0.19 ³⁾

注: 与正常组比较¹⁾P<0.01; 与模型组比较²⁾P<0.05, ³⁾P<0.01; 与易善复组比较⁴⁾P<0.01; 与当归芍药散低剂量组比较⁵⁾P<0.05, ⁶⁾P<0.01。

3.5 对 NAFLD 大鼠肝脏中 TLR4, MyD88, JNK 和 p-JNK 的蛋白表达水平的影响 与正常组比较, 模型组大鼠肝脏中 TLR4, MyD88, JNK 和 p-JNK 的蛋白表达均显著升高(P<0.01); 与模型组比较, 各用药组大鼠肝脏中 TLR4, MyD88, JNK 和 p-JNK 的蛋白表达均显著降低(P<0.01); 与易善复组比较, 当归芍药散低剂量组大鼠肝脏中 TLR4 和 MyD88 蛋白表达均明显升高(P<0.05); 与当归芍药散低剂量组比较, 中、高剂量组大鼠肝脏中 TLR4, MyD88 及高剂量组 JNK 和 p-JNK 的蛋白表达均明显降低(P<0.05, P<0.01); 与当归芍药散中剂量组比较, 高剂量组大鼠肝脏中 MyD88 和 p-JNK 蛋白表达水平均明显降低(P<0.05, P<0.01)。见表 6, 图 1。

表 6 当归芍药散对 NAFLD 大鼠肝脏中 TLR4, MyD88, JNK 和 p-JNK 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 6 Effect of Danggui Shaoyaoan on TLR4, MyD88, JNK and p-JNK protein expressions in liver tissue of NAFLD rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	TLR4/β-actin	MyD88/β-actin	JNK/β-actin	p-JNK/β-actin
正常		0.41±0.09	0.37±0.09	1.07±0.11	0.62±0.11
模型		1.54±0.22 ¹⁾	1.67±0.26 ¹⁾	2.36±0.30 ¹⁾	1.72±0.27 ¹⁾
易善复	0.144	0.58±0.08 ²⁾	0.71±0.15 ²⁾	1.28±0.14 ²⁾	1.04±0.11 ²⁾
当归芍药散	2.44	0.88±0.09 ^{2,3)}	1.11±0.26 ^{2,3)}	1.48±0.15 ²⁾	1.07±0.16 ²⁾
	4.88	0.63±0.06 ^{2,5)}	0.80±0.18 ^{2,4)}	1.25±0.11 ²⁾	1.04±0.23 ²⁾
	9.76	0.47±0.09 ^{2,5)}	0.42±0.09 ^{2,5,7)}	1.17±0.19 ^{2,4)}	0.75±0.10 ^{2,5,6)}

注: 与正常组比较¹⁾P<0.01; 与模型组比较²⁾P<0.01; 与易善复组比较³⁾P<0.05; 与当归芍药散低剂量组比较⁴⁾P<0.05, ⁵⁾P<0.01; 与当归芍药散中剂量组比较⁶⁾P<0.05, ⁷⁾P<0.01。

3.6 对 NAFLD 大鼠肝脏病理形态学的影响 HE 染色结果提示, 正常组大鼠肝小叶清晰, 肝细胞大

小均匀, 肝细胞索排列整齐, 以中央静脉为中心呈放射状排列, 胞浆均匀, 细胞核圆且位于中央; 模型

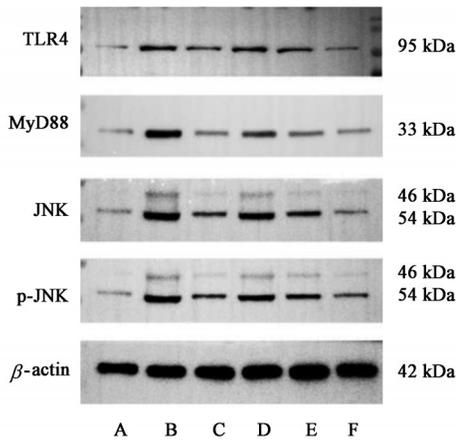


图1 各组大鼠肝组织中TLR4, MyD88, JNK和p-JNK蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of TLR4, MyD88, JNK and p-JNK protein expression in liver tissue in each groups

组大鼠肝细胞索排列紊乱,肝细胞内可见大量的脂滴空泡积聚和气球样变;与模型组比较,各用药组大鼠肝细胞的脂滴空泡积聚和气球样变均减轻,尤以高剂量组改善明显,见图2。油红O染色结果提示,正常组大鼠肝细胞核呈蓝色,肝细胞内未出现红色脂滴。模型组大鼠肝细胞内可见明显脂滴,脂滴多为大泡,占据大部分或整个细胞质。与模型组比较,各用药组大鼠肝细胞中脂质蓄积情况均有改善,尤以高剂量组改善明显。见图3。

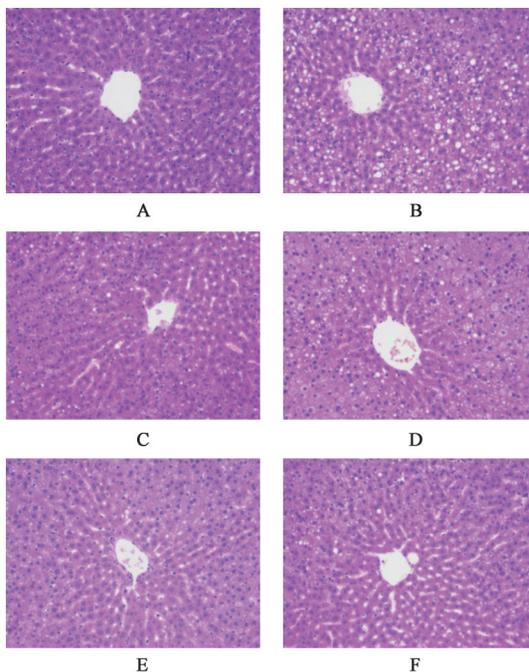


图2 当归芍药散对NAFLD大鼠肝脏病理形态的影响(HE, x200)

Fig. 2 Effect of Danggui Shaoyaosan on morphological change of liver in NAFLD rats (HE, x200)

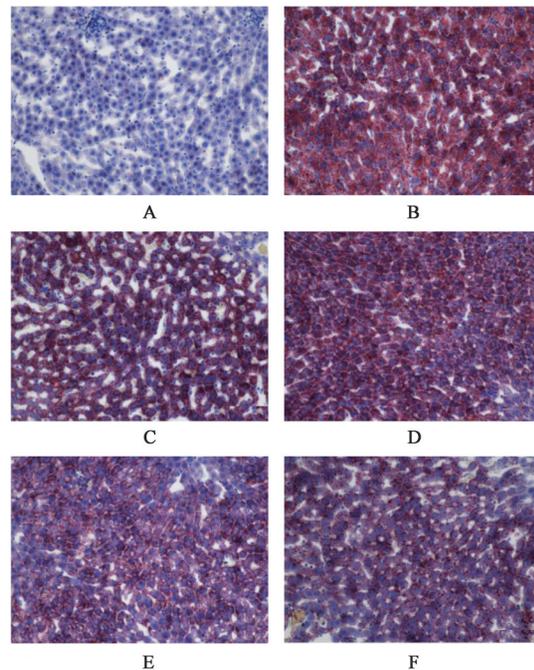


图3 当归芍药散对NAFLD大鼠肝脏脂质蓄积的影响(油红O, x200)

Fig. 3 Effect of Danggui Shaoyaosan on liver lipid accumulation in NAFLD rats (oil red O, x200)

4 讨论

中医学中没有NAFLD的病名,根据其致病特点及临床表现,将其可归属为“胁痛”“痰浊”等范畴。该病发病比较隐匿,有些患者可表现有不同程度的身体困重乏力、右上腹胀闷不适或隐痛或脘腹痞满胀痛等症,也有的患者往往无明显不适,仅于体检时发现。笔者认为NAFLD多是由于过食肥甘厚腻、作息无序、久坐少动、所欲不遂等原因致使脾失健运,肝失条达。脾为生痰之源,脾运失职,则湿聚痰生;肝失疏泄,一方面横逆侵犯脾胃,水谷精微不能升清使痰浊内生,另一方面,肝郁气滞,血行不畅,瘀阻脉络,终致痰瘀互结于肝而发病。故脾失调、痰瘀互结肝乃其主要病机,疏肝健脾、消痰祛瘀为有效治法。

《金匱要略·妇人妊娠病脉证并治第二十》记载“妇人怀妊,腹中疝痛,当归芍药散主之”。方中当归、白芍配用养血柔肝,赤芍、川芎相伍活血化瘀,四味血药同用,既可养血以柔肝体,又可行气活血以达肝用,使瘀滞之血得化,肝之疏泄条达复常,共奏养血活血、调肝化瘀之功。白术、茯苓相合培土健脾、燥湿利水,泽泻淡渗利水,祛湿消痰,三味水药伍用,既可益气健脾固其本,以杜水湿痰浊生成之源,又可使已成之痰湿得以消散。全方三血三水之品,相济并用,肝脾同调,痰瘀同治,共成活血通

脉,祛湿消痰,调和肝脾之效。该方原本针对妇人妊娠腹痛而创立,但其组方用药与NAFLD的病机恰合,根据异病同治的原则,可作为防治NAFLD的有效方剂。现代药理也表明,当归中有有效成分阿魏酸可竞争性地抑制肝脏中羟戊酸-5-焦磷酸脱氢酶的活性,减慢肝脏合成TC的速率^[15];白术多糖可降低非酒精性脂肪肝炎大鼠血清中TC和FFA的含量^[16];白芍总苷能够下调NAFLD大鼠肝组织中TLR4和JNK的蛋白,减轻炎症反应^[17];茯苓多糖通过调控TLR4信号通路,具有抗炎作用^[18]。实验研究提示当归芍药散能够降低高脂饮食大鼠和家兔血清中异常升高的TC和TG含量^[19-20]。临床应用也证明当归芍药散为治疗NAFLD的有效方剂^[21]。由上可知,当归芍药散防治NAFLD不仅符合中医理论,临床应用确有疗效,而且现代研究也提供了较为翔实的依据。

肝脏是体内的重要代谢器官,参与内源性脂肪的合成和转运^[22]。肝脏无储存脂肪的功能,若脂质代谢动态失衡,摄取FFA和FFA内源性合成增加、促进TG合成且运转障碍,TG在肝细胞堆积遂致肝脏脂肪变性。另外,FFA增加还可通过升高胰岛素的信号转导抑制因子3的表达而促进胰岛素抵抗,引发“一次打击”,加重肝脏脂变程度,同时经过体内一系列活性因子的作用下以及肝细胞线粒体 β 氧化代偿性加快,产生大量的活性氧簇,打破氧自由基的产生和清除之间的平衡,发生氧化应激,加重肝细胞损伤,进一步发展为“二次打击”,引发肝脏炎症反应,释放炎症因子^[23-24]。氧化应激、炎症因子以及FFA等均可激活TLR4,TLR4活化后,发生构象变化后的Toll/IL-1受体(TIR)结构域与MyD88的TIR结构域结合^[25-26],MyD88可募集下游丝苏氨酸激酶IL-1受体相关激酶1(IRAK1)和IL-1受体相关激酶2(IRAK2),使IRAK自身磷酸化,磷酸化的IRAK脱离MyD88,并与肿瘤坏死因子受体相关因子6(TRAF6)结合。活化的TRAF6可激活ECSIT,进一步活化促分裂原激活的蛋白激酶激酶1(MEKK1),调节下游丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号转导通路^[27]。JNK通路是MAPK信号通路中的一条重要通路,参与细胞增殖、分化和凋亡^[28]。丝裂原活化蛋白3激酶(MAP3K)是MAPK级联反应的中心,MKK是MAP3K的家族分子,有MKK4和MKK7两种亚型,二者分别磷酸化JNK上的Tyr185位点和Tyr183位点,激活JNK^[29-30]。JNK活化磷酸化后,使得核内的转录因子c-Jun氨基末端的

丝氨酸残基磷酸化,进而激活c-Jun而增强其转录活性,同时,c-Jun氨基末端的磷酸化还可以促进c-Jun/c-fos异二聚体及c-Jun同二聚体的形成,最终促进炎症因子分泌,诱导肝细胞死亡^[31]。

TNF- α 是第一次打击环节中产生的重要炎症因子,胰岛素抵抗可以促进脂肪组织中TNF- α 的分泌,而TNF- α 的分泌增多又可以促进肝脏中IL-2,IL-6等炎症因子的释放,从而加重肝脏的炎症损伤^[32]。当TNF- α 浓度过高时,外周组织脂肪分解速率降低,肝细胞中TG的合成及聚集加快,使肝内的FFA增多,进而增强TNF- α 的毒性,引起线粒体功能不全以致肝细胞损伤^[33]。IL-10由T,B淋巴细胞产生,是公认的抗炎因子,其主要作用是阻止胰岛素信号的恶化,抑制炎症因子的分泌,且IL-10含量与脂肪肝程度呈负相关^[34]。

本实验结果显示,模型组大鼠血脂、肝脏脂质以及血清中ALT,AST,TNF- α 的活性或含量明显升高,IL-10含量明显降低,肝细胞内有大量的脂滴空泡积聚和气球样病变,肝脏中TLR4,MyD88和JNK的基因和蛋白表达水平及p-JNK的蛋白表达水平均明显升高,提示TLR4/MyD88/JNK信号通路调节的炎症反应参与了NAFLD的病程进展。当归芍药散治疗后,各剂量组大鼠血脂、肝脏脂质以及血清中ALT,AST,TNF- α 的活性或含量明显降低,IL-10含量明显升高,肝细胞内脂质蓄积和气球样病变均减轻,肝脏中TLR4,MyD88和JNK的mRNA和蛋白表达水平以及p-JNK的蛋白表达水平均明显降低,表明当归芍药散能有效调节TLR4/MyD88/JNK信号通路,减轻炎症反应,调节脂质代谢,以改善肝脏脂变程度。综上所述,当归芍药散治疗NAFLD的机制可能与抑制TLR4/MyD88/JNK信号通路,减轻炎症反应有关。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 中华医学会肝病学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].实用肝脏病杂志,2018,21(2):177-186.
- [2] 涂宏飞,费素娟.肠道微生物与非酒精性脂肪性肝病[J].肝脏,2018,23(4):347-349.
- [3] YOUNOSSI Z M, KOENIG A B, ABDELATIF D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes [J]. Hepatology, 2016, 64(4): 73-84.

- [4] 董姝,刘平,孙明瑜. 非酒精性脂肪肝发病机制—“二次打击”学说研究进展[J]. 临床肝胆病杂志, 2012,28(7):551-555.
- [5] 戴冰清,张明香. 中西医结合治疗非酒精性脂肪肝研究概况[J]. 辽宁中医药大学学报,2017,19(11):139-142.
- [6] COMAR K M, STRING R K. Review article: drug therapy for non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 2006, 23(2):207-215.
- [7] SHAH P, MUDALIAR S. Pioglitazone: side effect and safety profile[J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2010, 9(2):347-354.
- [8] 宋晓宇,张天真,徐薇,等. 当归芍药散治疗血脂异常痰瘀互结证的临床观察[J]. 河北中医药学报,2009,24(1):12-13.
- [9] 王慧丽,贾淑亚. 当归芍药散合枳术丸治疗非酒精性脂肪性肝病(肝郁脾虚型)临床观察[J]. 现代中医临床,2019,26(2):48-51,55.
- [10] 刘明坤,吕文良,张婷婷. 姚乃礼运用当归芍药散治疗脂肪肝的经验[J]. 国际中医中药杂志,2015,37(4):376-377.
- [11] 陈静,叶平,阎艳丽,等. 当归芍药散防治高脂血症的实验研究[J]. 天津中医药,2005(6):493-494.
- [12] 董培良,殷鑫,张天宇,等. 当归芍药散对实验性高脂血症模型大鼠的影响[J]. 中医药学报,2013,41(6):81-83.
- [13] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社,2011:1261-1262.
- [14] 刘皎皎,戴玲,董璐. 虎杖苷对非酒精性脂肪肝的影响及相关分子机制探究[J]. 中国免疫学杂志,2019,35(10):1188-1191.
- [15] 张明发. 阿魏酸抗动脉粥样硬化研究进展[J]. 中草药,1990,21(1):41-43.
- [16] 车财妍,李红山,应豪,等. 白术多糖对非酒精性脂肪性肝炎的防治作用研究[J]. 中华中医药学刊,2017,35(7):1801-1803,1924.
- [17] 黄楨,魏毅,王卓,等. 白芍总苷对NAFLD大鼠炎症通路中TLR4和JNK蛋白表达的影响[J]. 湖南师范大学学报:医学版,2018,15(2):23-27.
- [18] 田卉. 茯苓多糖通过TLR4/TRAF6/NF- κ B信号传导通路发挥免疫调节作用机制的研究[D]. 重庆:重庆医科大学,2019.
- [19] 董培良,张天宇,殷鑫,等. 当归芍药散对实验性高脂血症模型大鼠的影响[J]. 中医药学报,2014,42(4):102-104.
- [20] 阎艳丽,王鑫国,宋晓宇,等. 当归芍药散对高脂血症家兔脂代谢及血液流变学的影响[J]. 辽宁中医杂志,2005(2):170-171.
- [21] 贾文燕,包桂篮. 当归芍药散加味合穴位埋线治疗非酒精性脂肪肝40例[J]. 光明中医,2020,35(16):2479-2481.
- [22] RECCIA I, KUMAR J, AKLADIOS C, et al. Non-alcoholic fatty liver disease: a sign of systemic disease [J]. *Metab*, 2017, 72:94-108.
- [23] LAGATHU F, CLARIE G, BASTARD D, et al. Chronic interleukin-6 treatment increased IL-6 secretion and induced insulin resistance in adipocyte: prevention by rosiglitazone [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 311(2):372-375.
- [24] 苏剑锋,江伟. “二次打击”对非酒精性脂肪肝的影响[J]. 华夏医学,2015,28(2):141-144.
- [25] 刁爱芹,韩梅,李菁,等. 雌激素调控TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路减缓心肌肥大作用的研究[J]. 中国病理生理杂志,2010,26(10):1994.
- [26] DASU M R, SRIDEBI D, LING Z, et al. High glucose induces Toll-like receptor expression in human monocytes [J]. *Diabetes*, 2008, 57(11):3090-3098.
- [27] LEE J K, KIM S Y, LEE W H, et al. Suppression of the TRIF dependent signaling pathway of Toll-like receptors by luteolin [J]. *Biochem Pharmacol*, 2009, 77(8):1391-1400.
- [28] COFFEY E T. Nuclear and cytosolic JNK signalling in neurons [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2014, 15(5):285-299.
- [29] 赵明哲,刘靖华,李玉花,等. ERK信号通路的信号转导调控机制[J]. 国际病理科学与临床杂志,2009,29(1):15-19.
- [30] PATERSON A, COHEN P, FLEMING Y, et al. Synergistic activation of stress-activated protein kinase 1/c-Jun N-terminal kinase (SAPK1/JNK) isoforms by mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4) and MKK7 [J]. *Biochem J*, 2000, 352(Pt1):145-154.
- [31] ZHANG Y D, BIAO Y N, CHU X Q, et al. Protective effect of Chushizi (*Fructus Broussonetiae*) on acetaminophen-induced rat hepatitis by inhibiting the Toll-like receptor 3/c-Jun N-terminal kinase/c-Jun/c-fos/janus protein tyrosine kinase/activators of transcription 3 pathway [J]. *J Tradit Chin Med*, 2020, 40(6):965-973.
- [32] 谢维宁,彭红兵,李焯,等. 柴胡疏肝散对肝郁脾虚型非酒精性脂肪肝患者的临床疗效及肠道菌群的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(3):129-137.
- [33] YANG R, GUAN M J, ZHAO N, et al. Roles of extrahepatic lipolysis and the disturbance of hepatic fatty acid metabolism in TNF- α -induced hepatic steatosis [J]. *Toxicology*, 2019, 411:172-180.
- [34] 李阳,杜志祥,王牧婷,等. 非酒精性脂肪性肝病患者病情进展与T细胞水平的相关性研究[J]. 实用临床医药杂志,2020,24(14):11-14,18.

[责任编辑 孙丛丛]