

# 逍遥丸对代谢相关脂肪性肝炎大鼠 LXR- $\alpha$ /SREBP-1c 通路的调节机制研究

李梦琪, 张馨月, 张玉伟, 孟雅楠, 苗宇船\*

(山西中医药大学, 山西 晋中 030619)

**【摘要】目的** 探讨逍遥丸对代谢相关脂肪性肝炎(MASH)大鼠的部分治疗机制,阐明中医“肝与大肠相通”理论对治疗 MASH 的指导意义。**方法** 选取成年雄性 SD 大鼠 24 只,将其随机分为空白组(Control 组)8 只,模型 0 组(Model 0 组)16 只。其中 Control 组给予普通饲料喂养,Model 0 组给予高脂饮食喂养,40% 四氯化碳背部皮下注射,同时给予饥饿失常和夹尾刺激,4 周后,将 Model 0 组随机分为模型组(Model 组)和逍遥丸组(XYW 组),每组各 8 只。XYW 组大鼠给予逍遥丸灌胃,其他两组给予生理盐水灌胃。给药 4 周后,分别测定大鼠肝功能和肝脂肪指标含量;苏木精-伊红(HE)染色观察肝组织病理变化;阿利新蓝-过碘酸雪夫(AB-PAS)染色观察肠道屏障受损情况;ELISA 试剂盒测定大鼠肝匀浆中炎症因子水平;qRT-PCR 测定大鼠肝脏 LXR- $\alpha$ 、SREBP-1c、Nr2 及结肠 Claudin1、ZO-1、SREBP-1c、Nr2 mRNA 的表达;Western blot 检测大鼠肝脏 LXR- $\alpha$ 、SREBP-1c、Nr2 及结肠 Claudin1、ZO-1、SREBP-1c、Nr2 的蛋白表达情况。结果 与 Control 组比较,Model 组大鼠血清 ALT、AST 以及肝匀浆 T-CHO、TG、LDL-C、IL-8、IL-17、TNF- $\alpha$  水平升高( $P < 0.05$ ),HDL-C、IL-10、TGF- $\beta$ 1 水平降低( $P < 0.01$ );Model 组大鼠肝组织 LXR- $\alpha$ 、SREBP-1c mRNA 表达升高( $P < 0.001$ ),Nr2 mRNA 表达降低( $P < 0.01$ ),结肠组织 Claudin1、ZO-1、Nr2 mRNA 的表达降低( $P < 0.01$ ),SREBP-1c 的表达升高( $P < 0.01$ );Model 组大鼠肝组织 LXR- $\alpha$ 、SREBP-1c 蛋白水平升高( $P < 0.01$ ),Nr2 降低( $P < 0.05$ ),结肠组织中 Claudin1、ZO-1、Nr2 蛋白水平降低( $P < 0.001$ ),SREBP-1c 升高( $P < 0.001$ )。结论 逍遥丸对 MASH 大鼠具有一定的治疗作用,其治疗机制可能与减轻炎症、氧化应激反应,抑制脂肪酸堆积有关;保护肠黏膜屏障免受损害可以有效减轻肝脏的损伤,“肝与大肠相通”理论对于 MASH 治疗具有一定的指导意义。

**【关键词】** 代谢相关脂肪性肝炎; 逍遥丸; 肝与大肠相通; 肝 X 受体  $\alpha$ ; 固醇调节元件结合蛋白-1c; 核因子 E2 相关因子

DOI 标识:doi:10.3969/j.issn.1008-0805.2024.13.03

【中图分类号】R285.5 【文献标识码】A 【文章编号】1008-0805(2024)13-2919-07

代谢相关脂肪性肝炎(Metabolism-related steatohepatitis, MASH)是代谢相关脂肪性肝病发病过程中的重要环节,以肝内脂质过度蓄积,伴坏死性炎症和纤维化为主要病理变化,其发病机制尚未完全阐明<sup>[1]</sup>。逍遥丸是中华中医药学会推荐治疗 MASH 肝郁脾虚证的首选方<sup>[2]</sup>。明朝医家李挺在《医学入门》中首次提出了“肝与大肠相通”理论,揭示了肝脏与肠道的密切联系;现代医学研究也发现肝脏与肠道之间存在互相调节、互相影响复杂的双向交流<sup>[3-6]</sup>,1998 年马歇尔提出“肠-肝轴”的概念,不仅印证了中医“肝与大肠相通”理论,而且在一定程度上补充和丰富了其科学内涵,二者具有异曲同工之妙。

课题组前期研究发现逍遥丸能有效改善 MASH 大鼠脂质代谢紊乱、肠道菌群紊乱,减轻炎症反应<sup>[7-9]</sup>。但对于在逍遥丸干预下 MASH 肝郁脾虚证中肝与大肠

如何发挥相互作用的机制以及逍遥丸的治疗机制尚不完全清楚。本课题拟基于中医“肝与大肠相通”理论,通过观察逍遥丸干预后 MASH 模型大鼠肝组织变化及大鼠结肠黏膜屏障受损情况,探讨逍遥丸对 MASH 的部分治疗机制,阐明中医“肝与大肠相通”理论对治疗 MASH 的指导意义,为临床应用疏肝健脾法防治 MASH 提供一定的科学依据。

## 1 材料与仪器

### 1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 24 只,体质量( $220 \pm 20$ ) g,购自湖南斯莱克实验动物有限公司,许可证号: SXX(湘)2019-0004,饲养于江西中洪博元生物技术有限公司实验动物中心,温度( $22 \pm 2$ ) °C,湿度 50% ~ 60%,12 h 光照。

收稿日期:2024-03-12; 修订日期:2024-09-30

基金项目:国家自然科学基金(81470190);山西省卫生健康委项目(2019089);

山西中医药大学科技创新能力培育计划“基础研究专项”项目(2021FY-JC-04);

风湿免疫性疾病中西医结合基础研究(2024XKJS-03)

作者简介:李梦琪(1999-),女(汉族),陕西商洛人,山西中医药大学在读硕士研究生,学士学位,主要从事肝病的病因病机及中医药防治研究工作。

\*通讯作者简介:苗宇船(1965-),女(汉族),山西太原人,山西中医药大学教授,硕士研究生导师,博士学位,从事肝病的病因病机及中医药防治研究工作。

## 1.2 试剂与仪器

### 1.2.1 主要试剂

大鼠丙氨酸转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST)、总胆固醇 (total cholesterol, T-CHO)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 货号: C010-2-1、C009-2-1、A111-11、A1101-1、A113-1-1、A112-1-1); 大鼠白介素 (interleukin, IL)-8、转化生长因子- $\beta$ 1 (Transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)、IL-17 试剂盒, IL-10 试剂盒, 肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 试剂盒 (武汉贝茵莱生物科技有限公司, 货号: RA20553、RA20599、RA20117、RA20090、RA20035); 苏木精-伊红 (hematoxylin and eosin, HE) 染色液 (北京雷根生物技术有限公司, 货号: DH0006); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司, 货号: AR0146); LXR- $\alpha$  抗体、SREBP-1c 抗体、Nrf2 抗体、密封蛋白 1 (Claudin1) 抗体、紧密连接蛋白 1 (ZO-1) 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司, 货号: 14351-1-AP、66875-1-IG、805931-1-RR、28674-1-AP、21773-1-AP); M5 Sprint qPCR RT Kit with gDNA remover (北京聚合美生物科技有限公司, 货号: MF949)。

### 1.2.2 主要仪器

SpectraMay 型全波长酶标仪 (美国 Molecular Device 公司); EG115 型石蜡包埋机、RM223 型切片机、DM40008 型正置荧光显微镜 (德国 Leica 公司); 164-5050 型电泳仪、165-6001 型电泳槽、170-3930 型转印槽 (美国 Bio-Rad 公司); ChampChemi professional 型全自动多色荧光及化学发光凝胶成像系统 (北京赛智创业科技有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 MASH 模型构建、分组及干预

将 24 只雄性 SD 大鼠基础饲料适应性饲养 1 周后, 运用 SPSS 随机分组将其分为空白组 (Control 组,  $n=8$ )、模型 0 组 (Model 0 组,  $n=16$ )。Control 组饲喂基础饲料, Model 0 组饲喂高糖高脂饲料, 并于第 3 周开始每周两次 40% 四氯化碳豆油溶液皮下注射, 每隔两日喂予 1 次, 每日给予 3 h 夹尾处理, 造模成功后将其随机分为两组, 模型组 (Model 组,  $n=8$ ) 和逍遥丸组 (XYW 组,  $n=8$ )。第 5 周开始 Control 组和 Model 组给予 0.9% 氯化钠溶液 2 mL 灌胃, XYW 组给予相同剂量的逍遥丸水溶液灌胃, 连续给药 4 周。实验总周期为 8 周。

### 2.2 取材

末次给药后所有大鼠均禁食禁饮 12 h, 戊巴比妥钠

(30 mg/kg) 腹腔注射麻醉, 腹主动脉取血, 收集上清于-80℃ 备用; 称量各组大鼠肝脏质量并记录; 取材肝脏、结肠部分, 各组大鼠部分肝脏、结肠用 4% 多聚甲醛固定, 4℃ 备用; 部分肝脏组织与结肠组织于-80℃ 保存备用。

### 2.3 指标检测

#### 2.3.1 一般情况

观察并记录各组大鼠的精神状态、活动度、毛发、摄食量、粪便等。

#### 2.3.2 肝指数和体质量指数

取材时, 将肝脏从大鼠体内分离, 用 0.9% NaCl 洗涤, 滤纸吸尽表面水分, 称量并记录肝重, 依据公式算出肝指数和体质量指数: 肝指数 = 肝重/体质量、体质量指数 = 体质量 (kg)/身高的平方 ( $m^2$ )。

#### 2.3.3 肝脏组织病理学观察

取 4% 多聚甲醛中固定的肝组织制成石蜡切片, 通过 HE 染色观察肝细胞形态。

#### 2.3.4 血清、肝匀浆实验室指标检测

取各组大鼠肝组织, 经研磨后制成肝匀浆, 检测各组大鼠血清中 ALT、AST 含量, 肝匀浆中 T-CHO、TG、LDL-C、HDL-C、IL-8、IL-10、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1、IL-17 含量。

#### 2.3.5 qRT-PCR 检测肝组织中 LXR- $\alpha$ 、SREBP-1c、Nrf2 mRNA 和结肠组织中 Claudin1、ZO-1、SREBP-1c、Nrf2 mRNA 的表达

采用试剂盒对肝脏总 RNA 进行提取, 利用反转录获得 cDNA, 构建 qPCR 反应体系。扩增条件 stage1 (cycle1): 95℃ 30 s; stage2 (cycle40): 95℃ 15 s, 60℃ 15 s, 72℃ 45 s; stage3 (cycle1): 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 15 s。用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  计算出 Nrf2、LXR- $\alpha$ 、SREBP-1c、Nrf2、Claudin1、ZO-1 mRNA 相对含量。见表 1。

表 1 引物序列

| 基因            | 引物序列                     | 扩增长度/bp |
|---------------|--------------------------|---------|
| GAPDH         | F:CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG | 138     |
|               | R:GGTGAAGAATGGGAGTTGCT   |         |
| LXR- $\alpha$ | F:CGAGCTATGCAGTGTATGTGGG | 217     |
|               | R:ACACTGCTCCCTCATGCCTG   |         |
| SREBP-1c      | F:CGCTACCGTTCCTCTATCAATG | 134     |
|               | R:TGGTTGCTGTGCTGTAAGAAG  |         |
| Nrf2          | F:CAGGTTGCCACATTCCTCAA   | 149     |
|               | R:CTCTCAACGTGGCTGGGAATAT |         |
| Claudin1      | F:GACTGTGGATGTCTGCGGT    | 229     |
|               | R:ATTATGCCGCCGATGACAGC   |         |
| ZO-1          | F:AGTCTCGGAAAAGTGCCAGG   | 120     |
|               | R:GGGCACCATACCAACCATCA   |         |

#### 2.3.6 Western blot 检测肝组织 LXR- $\alpha$ 、SREBP-1c、Nrf2 和结肠组织 Claudin1、ZO-1、SREBP-1c、Nrf2 蛋白的表达

提取肝组织总蛋白, BCA 测定后蛋白样本变性,

SDS-PAGE 电泳,分离,转膜,5%牛奶封闭 2 h,TBST 洗后分别放入经 WB 抗体稀释液稀释后的抗体中孵育,其中 LXR- $\alpha$ (1: 5000),SREBP-1c(1: 2000),NFR2(1: 2500),Claudin1(1: 800),ZO-1(1: 800),4℃过夜,TBST 洗后,分别放入相应二抗(1: 4000),2 h 后 TBST 洗,采用 ECL 技术成像,通过 ImageJ 软件计算其灰度值。

## 2.4 统计学方法

运用 SPSS26.0 软件对所得资料进行统计学处理,并对其以  $\bar{x} \pm s$  表示。应用单因素方差分析(one-way-ANOVA)进行多组间比较;应用 SNK(即  $q$  检验)或 Bonferroni 检验进行两组间成对比较。 $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 一般情况比较

用药过程中,空白组大鼠精神佳,皮毛光滑,动作灵活,食欲和二便均无异常;模型组大鼠皮毛晦暗无光,早期易怒,易激动,后期情绪低落,食欲减退,行动乏力,大便稀溏;逍遥丸组与模型组相比,其临床症状

显著改善。

### 3.2 各组大鼠肝指数、体质量指数

见表 2。

表 2 各组大鼠肝指数、体质量指数含量( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别        | 肝指数/ $g \cdot g^{-1}$   | 体质量指数/ $kg \cdot m_2^{-1}$ |
|-----------|-------------------------|----------------------------|
| Control 组 | $0.032 \pm 0.002$       | $6.03 \pm 0.252$           |
| Model 组   | $0.045 \pm 0.006^{***}$ | $5.27 \pm 0.197^{***}$     |
| XYW 组     | $0.038 \pm 0.005^{**}$  | $5.90 \pm 0.271^{**}$      |

与 Control 组比较,\*\*\* $P < 0.001$ ;与 Model 组比较,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ ;n=8

### 3.3 各组大鼠肝组织病理比较

HE 染色显示,Control 组大鼠肝脏组织结构清晰,细胞质丰富,细胞核排列整齐,肝索排列整齐,肝脏中心静脉呈放射状排列,未见明显的炎症细胞浸润,未见肝小叶破坏;与 Control 组比较,Model 组肝细胞形态不规则,结构紊乱,肝索紊乱,脂肪空泡增多,细胞核向一侧挤压,炎性细胞浸润,脂肪变性显著;与 Model 组相比,XYW 组大鼠肝组织形态更趋完整,胞浆中脂肪空泡明显减少,炎细胞浸润明显降低,脂肪变明显减轻。见图 1。

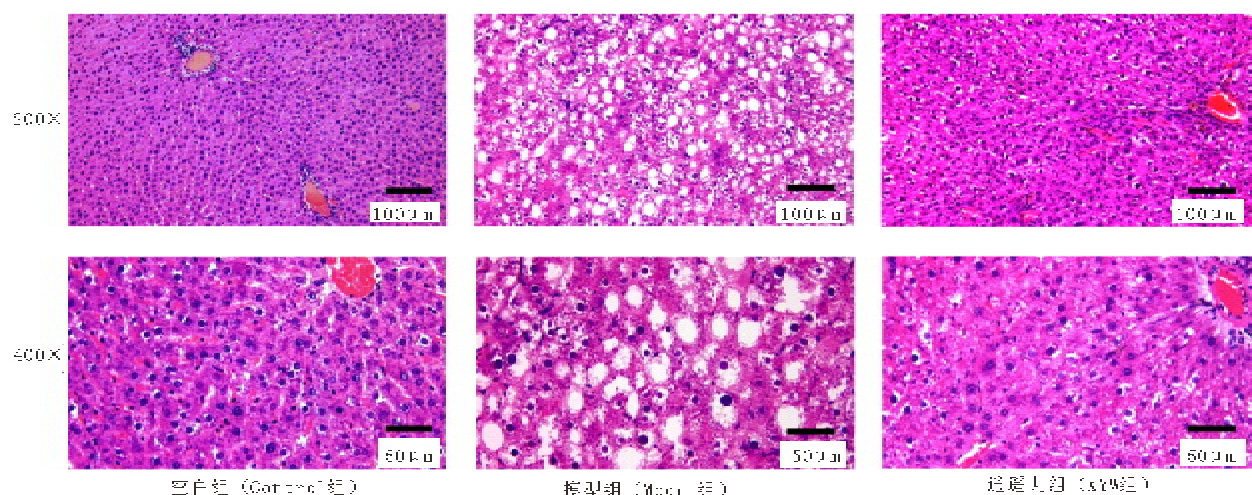


图 1 各组大鼠肝组织病理学观察(HE,200×,400×)

### 3.4 各组大鼠结肠黏膜情况

AB-PAS 染色结果所示,Control 组大鼠结肠黏膜表层的上皮细胞与杯状细胞呈规则排列,未见萎缩;Model 组大鼠结肠黏膜表层的上皮细胞与杯状细胞均呈现不同程度的萎缩,数量有所减少,黏液的覆盖面积也有所减少。经逍遥丸治疗后,黏膜层上皮细胞和杯状细胞数量有所增加,形态饱满圆润。见图 2。

### 3.5 逍遥丸对 MASH 大鼠血清肝功能和血浆脂质水平的影响

与 Control 组比较,Model 组大鼠血清中 ALT、AST 水平升高( $P < 0.01$ ),肝匀浆中 T-CHO、TG、LDL-C 水平升高( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ ),HDL-C 水平降低( $P$

$< 0.01$ );与 Model 组比较,XYW 组大鼠血清中 ALT、AST 水平降低( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ ),肝匀浆中 T-CHO、TG、LDL-C 水平降低( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ ),HDL-C 水平升高( $P < 0.01$ )。见表 3,表 4。

### 3.6 逍遥丸对 MASH 大鼠肝组织中炎症因子的影响

与 Control 组比较,Model 组大鼠肝匀浆中 IL-8、TNF- $\alpha$ 、IL-17 含量显著升高( $P < 0.001$ ),IL-10、TGF- $\beta 1$  含量显著下降( $P < 0.001$ );逍遥丸治疗后,大鼠肝匀浆中 IL-8、TNF- $\alpha$ 、IL-17 含量降低( $P < 0.001$ ),IL-10、TGF- $\beta 1$  含量显著升高( $P < 0.001$ )。见表 5。

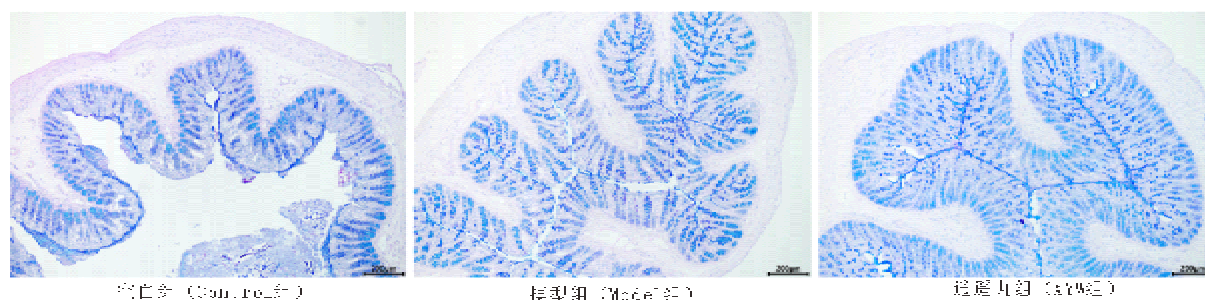


图2 各组大鼠结肠黏膜病理学观察(AB-PAS染色,200×)

表3 逍遥丸对 MASH 大鼠血清肝功能的影响( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别        | ALT                        | AST                        |
|-----------|----------------------------|----------------------------|
| Contro. 组 | 20.74 ± 6.31               | 27.88 ± 7.81               |
| Model 组   | 33.18 ± 5.47 <sup>**</sup> | 41.81 ± 5.85 <sup>**</sup> |
| XYW 组     | 21.39 ± 2.70 <sup>##</sup> | 29.84 ± 7.71 <sup>#</sup>  |

与 Control 组比较<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ;与 Model 组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;  $n = 6$

表4 逍遥丸对 MASH 大鼠血浆脂质水平的影响( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别        | T-CHO                    | TG                        | LDL-C                     | HDL-C                     |
|-----------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Contro. 组 | 0.70 ± 0.13              | 0.97 ± 0.31               | 0.38 ± 0.06               | 3.38 ± 0.31               |
| Model 组   | 1.18 ± 0.13 <sup>*</sup> | 3.40 ± 0.97 <sup>**</sup> | 0.78 ± 0.14 <sup>**</sup> | 1.41 ± 0.47 <sup>**</sup> |
| XYW 组     | 0.73 ± 0.25 <sup>#</sup> | 1.06 ± 0.14 <sup>##</sup> | 0.52 ± 0.11 <sup>#</sup>  | 2.64 ± 0.28 <sup>##</sup> |

与 Control 组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ;与 Model 组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;  $n = 3$

表5 各组大鼠肝匀浆炎症因子表达水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别        | IL-8                          | IL-10                         | TNF- $\alpha$                 | TGF- $\beta 1$                | IL-17                         |
|-----------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Contro. 组 | 91.69 ± 16.18                 | 215.224 ± 28.45               | 66.99 ± 16.56                 | 408.23 ± 63.09                | 49.23 ± 8.51                  |
| Model 组   | 417.48 ± 43.89 <sup>***</sup> | 51.14 ± 13.26 <sup>***</sup>  | 271.73 ± 39.75 <sup>***</sup> | 106.72 ± 22.73 <sup>***</sup> | 205.38 ± 23.56 <sup>***</sup> |
| XYW 组     | 227.41 ± 35.22 <sup>***</sup> | 128.14 ± 17.75 <sup>***</sup> | 157.93 ± 8.35 <sup>***</sup>  | 267.74 ± 30.71 <sup>***</sup> | 97.95 ± 11.63 <sup>***</sup>  |

与 Control 组比较,<sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ ;与 Model 组比较,<sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ ;  $n = 6$

表6 各组大鼠肝组织 LXR- $\alpha$ 、SREBP-1c、Nr2 mRNA 表达水平

| 组别        | LXR- $\alpha$              | SREBP-1c                   | Nr2                       |
|-----------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Control 组 | 0.95 ± 0.02                | 0.64 ± 0.03                | 1.18 ± 0.12               |
| Model 组   | 1.08 ± 0.02 <sup>***</sup> | 1.01 ± 0.01 <sup>***</sup> | 0.73 ± 0.13 <sup>**</sup> |
| XYW 组     | 0.97 ± 0.01 <sup>##</sup>  | 0.77 ± 0.06 <sup>##</sup>  | 1.12 ± 0.11 <sup>#</sup>  |

与 Control 组比较,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ,<sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ ;与 Model 组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ,<sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ ;  $n = 3$

表7 各组大鼠结肠组织 Claudin1、ZO-1、SREBP-1c、Nr2mRNA 表达水平

| 组别        | Claudin1                   | ZO-1                      | SREBP-1c                  | Nr2                        |
|-----------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Contro. 组 | 1.48 ± 0.16                | 1.15 ± 0.20               | 1 ± 0.59                  | 0.89 ± 0.16                |
| Model 组   | 0.40 ± 0.21 <sup>***</sup> | 0.27 ± 0.11 <sup>**</sup> | 3.97 ± 0.59 <sup>**</sup> | 0.15 ± 0.05 <sup>***</sup> |
| XYW 组     | 0.95 ± 0.15 <sup>##</sup>  | 0.85 ± 0.14 <sup>##</sup> | 1.74 ± 1.16 <sup>#</sup>  | 0.37 ± 0.13 <sup>#</sup>   |

与 Control 组比较,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ,<sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ ;与 Model 组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;  $n = 3$

### 3.9 逍遥丸对 MASH 大鼠肝组织 LXR- $\alpha$ 、SREBP-1c、Nr2 蛋白表达的影响

与 Control 组比较,Model 组大鼠肝组织 LXR- $\alpha$ 、

### 3.7 逍遥丸对 MASH 大鼠肝组织 LXR- $\alpha$ 、SREBP-1c、Nr2 mRNA 表达的影响

Model 组大鼠肝组织 LXR- $\alpha$ 、SREBP-1c mRNA 表达升高( $P < 0.001$ ),Nr2 mRNA 表达降低( $P < 0.01$ );逍遥丸治疗后,大鼠肝组织 LXR- $\alpha$ 、SREBP-1c mRNA 表达降低( $P < 0.01$ , $P < 0.001$ ),Nr2 mRNA 表达升高( $P < 0.05$ )。见表 6。

### 3.8 逍遥丸对 MASH 大鼠结肠组织 Claudin1、ZO-1、SREBP-1c、Nr2 mRNA 表达的影响

与 Control 组比较,Model 组大鼠结肠组织 Claudin1、ZO-1、Nr2 mRNA 的表达降低( $P < 0.01$ , $P < 0.001$ ),SREBP-1c 的表达升高( $P < 0.01$ );逍遥丸治疗后,大鼠结肠组织 Claudin1、ZO-1、Nr2 mRNA 的表达均明显增高( $P < 0.05$ ),而 SREBP-1c 的表达则明显下降( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ )。见表 7。

SREBP-1c 蛋白水平升高( $P < 0.01$ , $P < 0.001$ ),Nr2 降低( $P < 0.05$ );经逍遥丸治疗后,大鼠肝组织 LXR- $\alpha$ 、SREBP-1c 蛋白的表达则明显下降( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ ),

Nrf2 的表达则明显升高( $P < 0.05$ )。见表 8, 图 3。

表 8 各组大鼠肝组织 LXR- $\alpha$ 、SREBP-1c、Nrf2 蛋白表达水平( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别        | LXR- $\alpha$         | SREBP-1c             | Nrf2              |
|-----------|-----------------------|----------------------|-------------------|
| Control 组 | 1                     | 1                    | 1                 |
| Model 组   | $1.83 \pm 0.18^{***}$ | $1.70 \pm 0.17^{**}$ | $0.62 \pm 0.20^*$ |
| XYW 组     | $1.24 \pm 0.15^{**}$  | $1.39 \pm 0.14^*$    | $0.88 \pm 0.08^*$ |

与 Control 组比较,  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$ ; 与 Model 组比较,  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ ;  $n = 3$

### 3.10 逍遥丸对 MASH 大鼠结肠组织 Claudin1、ZO-1、SREBP-1c、Nrf2 蛋白表达的影响

与 Control 组比较, Model 组大鼠结肠组织中 Claudin1、ZO-1、Nrf2 蛋白水平降低( $P$  均  $< 0.001$ ), SREBP-1c 升高( $P < 0.001$ ); 经逍遥丸治疗后, 大鼠结肠组织中 Claudin1、ZO-1、Nrf2 蛋白水平升高( $P < 0.001$ ), SREBP-1c 降低( $P < 0.01$ )。见表 9, 图 4。

表 9 各组大鼠结肠组织 Claudin1、ZO-1、SREBP-1c、Nrf2 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别        | Claudin1              | ZO-1                  | SREBP-1c              | Nrf2                  |
|-----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Control 组 | 1                     | 1                     | 1                     | 1                     |
| Model 组   | $0.22 \pm 0.04^{***}$ | $0.32 \pm 0.04^{***}$ | $2.48 \pm 0.12^{***}$ | $0.13 \pm 0.04^{***}$ |
| XYW 组     | $0.84 \pm 0.06^{***}$ | $0.69 \pm 0.03^{***}$ | $1.67 \pm 0.25^{**}$  | $0.65 \pm 0.14^{***}$ |

与 Control 组比较,  $^{***}P < 0.001$ ; 与 Model 组比较,  $^{***}P < 0.001$ ,  $^{**}P < 0.01$ ;  $n = 3$

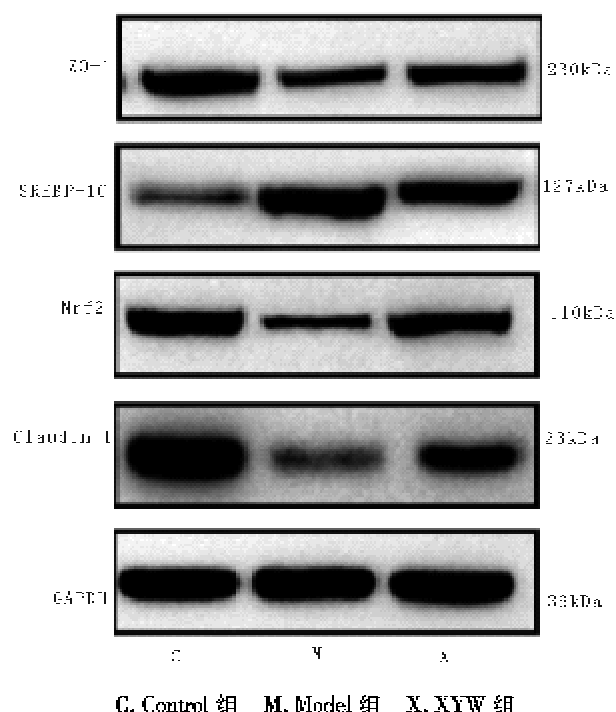


图 4 各组大鼠结肠组织 Claudin1、ZO-1、SREBP-1c、Nrf2 蛋白表达水平

## 4 讨论

在 MASH 的发生发展过程中, 脂肪酸在肝细胞中堆积, 这一过程与固醇调节元件结合蛋白-1C(SREBP

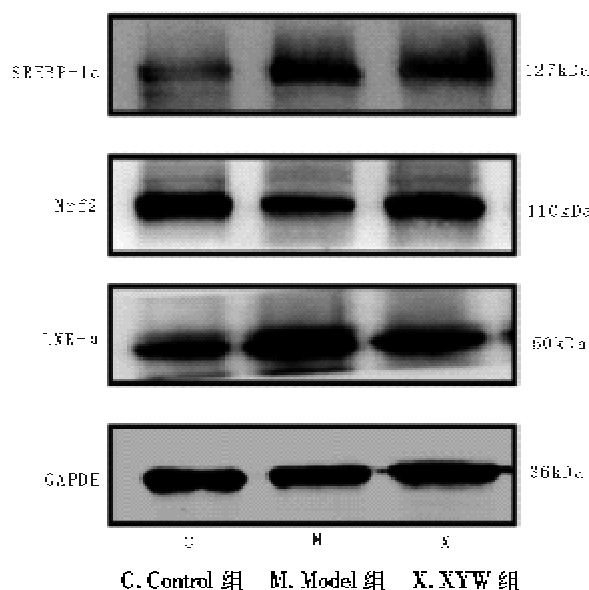


图 3 各组大鼠肝组织 Nrf2、LXR- $\alpha$ 、SREBP-1c 蛋白表达水平

-1c) 的表达增加有关。SREBP-1c 是 LXR- $\alpha$  的重要下游靶基因, 当 LXR- $\alpha$  过表达可激活调控脂肪代谢的 SREBP-1c 及控制脂肪酸合成的重要调节因子 FAS, 促使 TG、脂肪酸在肝细胞蓄积, 诱发脂肪肝; SREBP-1c 也是具有调节肝脏脂肪酸从头合成的关键转录因子, 可影响脂肪酸合成酶 FAS 和 SCD1 的表达水平, 增加 TG 聚集与合成, 进而调控肝脏脂质异位沉积, 最终影响 MASH 的发展<sup>[10~12]</sup>。Nrf2 活性的损害是单纯性脂肪肝向 MASH 发展的关键因素, 肝细胞 Nrf2 激活可抑制炎症和氧化应激, 抑制脂肪肝, 减轻 MASH 的肝纤维化, 而 Nrf2 失活则可导致 MASH 的肝损伤加重<sup>[13]</sup>, 从而调控和维持脂肪酸代谢平衡。本实验观察到 Model 组大鼠肝细胞脂肪变性炎症细胞浸润明显, 血清 ALT、AST 及肝匀浆中 T-CHO、TG、LDL-C 活性升高, HDL-C 活性降低; XYW 组肝细胞脂肪变性炎症细胞浸润程度减轻, 血清 ALT、AST 及肝匀浆中 T-CHO、TG、LDL-C 活性降低, HDL-C 活性升高, 提示逍遥丸能够改善 MASH 大鼠脂质代谢状态。Model 组大鼠肝组织 LXR- $\alpha$ 、SREBP-1c 的蛋白和基因表达升高, Nrf2 表达降低; XYW 组大鼠 LXR- $\alpha$ 、SREBP-1c 的蛋白和基因表达降低, Nrf2 表达升高。提示逍遥丸可通过抑制脂肪酸堆积, 抑制炎症和氧化应激反应来防治 MASH。

肝脏炎症和纤维化的发生与胃肠道通透性增加、脂多糖移位、免疫激活和胆汁酸信号改变等因素也息

息相关<sup>[14]</sup>。紊乱的肠道菌群可致肠道黏膜机械屏障破坏、通透性增加,肠内细菌及微生物移位,脂多糖等外源性毒素进入门静脉,引发炎症反应,导致肝细胞脂肪变性,是 MASH 发病机制中的重要环节<sup>[15]</sup>。肠黏膜屏障是一个由闭合蛋白(Claudin-1)、咬合蛋白(occludin)和带状闭合蛋白-1(ZO-1)等跨膜蛋白构成的紧密连接结构,是维持肠黏膜屏障功能的关键。Claudin-1 是 Claudin 家族中的一员,其表达增加会导致肠道上皮细胞紧密连接的通透性下降<sup>[15]</sup>;ZO-1 作为肠道机械屏障上最关键的结构蛋白,在抵御病原菌、代谢产物及毒素等入侵方面具有直接的作用<sup>[16]</sup>。本实验结果显示,Model 组大鼠结肠黏膜表层的上皮细胞与杯状细胞均有不同程度的萎缩,数量也出现不同程度的减少,上皮细胞被粘液所覆盖的面积较小,经逍遥丸治疗后,黏膜层上皮细胞和杯状细胞均恢复圆润饱满的状态;Model 组大鼠结肠组织中 Claudin1、ZO-1 的蛋白和基因表达降低,XYW 组大鼠结肠组织中 Claudin1、ZO-1 表达升高,提示逍遥丸能够改善 MASH 模型大鼠肠黏膜的通透性,加强肠道黏膜屏障。

在肝脏的正常生理结构被破坏、炎症细胞被激活的情况下,肠源性因素可加重肝脏疾病,引起组织损害及炎症扩散<sup>[17]</sup>。肠-肝轴稳态的维持离不开肠道菌群的调控,而这一双向沟通又反过来影响着肠道菌群<sup>[18]</sup>。肝与大肠之间形成一个完整的相互制约的循环,这与西医发现的肠-肝轴理论不谋而合<sup>[19]</sup>。实验结果显示,Model 组大鼠结肠组织中 SREBP-1c 表达升高、Nrf2 的表达降低,XYW 组大鼠结肠组织中 SREBP-1c 表达降低、Nrf2 的表达升高,大鼠结肠组织中 SREBP-1c、Nrf2 的表达随大鼠肝组织中 SREBP-1c、Nrf2 表达的变化而变化,这些均是“肝与大肠相通”理论的体现,这一结果也印证了肝与大肠之间相互作用的关系。

综上所述,逍遥丸能够有效改善 MASH 大鼠血清肝功能、脂质水平、肝细胞脂肪变性及肠道黏膜屏障损伤,其治疗机制可能与保护肠道黏膜屏障,减轻炎症、氧化应激反应,抑制脂肪酸堆积,从而减轻对肝脏的损伤有关。“肝与胆相表里”和“肺与大肠相表里”为众多医家所周知,但“肝与大肠相通”理论却鲜有提及,更遑论将其应用于临床。本实验基于“肝与大肠相通”理论为临床应用疏肝健脾法防治 MASH 肝郁脾虚证提供了新思路,今后仍需更多体内外实验加以验证。

#### 参考文献:

[1] 中华医学会肝病学会,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.
- [2] 郭继龙,李若瑜,关伟,等. 基于血清代谢组学探究逍遥丸干预肝郁脾虚非酒精性脂肪肝的作用机制[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(11): 5446.
- [3] 梁煜,赵远红. “肝与大肠相通”的理论内涵初析[J]. 中西医结合肝病杂志, 2023, 33(3): 261.
- [4] 王朝军,纪云西. “肝与大肠相通”之理论研究及运用初探[J]. 浙江中医药大学学报, 2021, 45(4): 339.
- [5] Marshall JC. The gut as a potential trigger of exercise-induced inflammatory responses[J]. Can J Physiol Pharmacol, 1998, 76(5): 479.
- [6] 姜惠中,杨兵,李高,等. 基于“肝与大肠相通”理论的结直肠癌肝转移的中医发病机制探讨[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(4): 925.
- [7] 徐慧超,高艳,陈浩,等. 逍遥散对非酒精性脂肪性肝炎大鼠 Toll 样受体 4 基因甲基化水平的调节作用[J]. 北京中医药大学学报, 2020, 43(5): 402.
- [8] 孟雅楠,张玉伟,张馨月,等. 逍遥散调节非酒精性脂肪性肝炎模型大鼠肠道菌群的研究[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2023, 52(4): 517.
- [9] 张玉伟,孟雅楠,张馨月,等. 逍遥丸对非酒精性脂肪性肝炎大鼠粪便代谢组学和 PPAR $\alpha$ 、PGC1 $\alpha$  的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2023, 29(11): 1829.
- [10] Aron-Wisniewski J, Warmuth MV, Nieuwdorp M, et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Modulating Gut Microbiota to Improve Severity[J]. Gastroenterology, 2020, 158(7): 1881.
- [11] 张曼. 逍遥散调节 Nrf2/ARE 通路抗氧化应激干预肝郁脾虚小鼠肝损伤的机制[D]. 北京中医药大学硕士学位论文, 2021.
- [12] Sharma RS, Harrison DJ, Kisilewski D, et al. Experimental Nonalcoholic Steatohepatitis and Liver Fibrosis Are Ameliorated by Pharmacologic Activation of Nrf2 (Nrf-E2 p45-Related Factor 2)[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2018, 5(3): 367.
- [13] Ji Y, Yin Y, Sun L, et al. The Molecular and Mechanistic Insights Based on Gut-Liver Axis: Nutritional Target for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Improvement[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(9): 3066.
- [14] Anstee QM, Reeves HL, Katsilimi E, et al. From NASH to HCC: current concepts and future challenges[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2019, 16(7): 411.
- [15] 陈璐佳,刘宏飞,邓艳华,等. 消脂舒肝汤结合西药治疗非酒精性脂肪肝的疗效及对血清脂多糖、Claudin-1、Claudin-4 的影响[J]. 中药药, 2023, 46(8): 2067.
- [16] 王曼非,肖朕平,赵好好,等. 茵陈四苓汤对酒精性肝损伤大鼠肠黏膜屏障 ZO-1 及 occludin 的影响[J]. 中医药导报, 2023, 29(5): 31.
- [17] Son G, Kremer M, Hines IN. Contribution of gut bacteria to liver pathobiology[J]. Gastroenterol Res Pract, 2010, 2010: 453563.
- [18] Albillos A, De Gottardi A, Rescigno M. The gut-liver axis in liver disease: Pathophysiological basis for therapy[J]. J Hepatol, 2020, 72(3): 558.
- [19] 贾越博,郑娟娟,白光,等. 基于肝与大肠相通理论的脂肪肝与炎症性肠病相关性探讨[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(11): 2719.

## Exploration on the regulation mechanism of LXR - $\alpha$ / SREBP - 1c pathway in MASH rats based on the theory of "liver and large intestine communication"

LI Meng-qi, ZHANG Xin-yue, ZHANG Yu-wei, MENG Ya-nan, MIAO Yu-chuan\*

(*Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong, Shanxi 030619, China*)

**Abstract; Objective** To explore the therapeutic mechanism of Xiaoyao pills on MASH rats, and to clarify the guiding significance of the theory of "connecting liver and large intestine" in TCM. **Methods** A total of 24 adult male SD rats were selected and randomly divided into Control group (8 rats) and Model group (16 rats). The Control group was fed with ordinary diet, and the Model 0 group was fed with high-fat diet, with subcutaneous injection of 40% carbon tetrachloride into the back, as well as with hunger and satiation disorder and tail-clip stimulation. 4 weeks later, the Model 0 group was randomly divided into Model group and Xiaoyao pill group (XYW group), with 8 animals in each group. The rats in XYW group were given Xiaoyao pill and the other two groups were given normal saline. After 4 weeks of administration, the liver function and liver fat content of rats were measured respectively. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of liver tissue. The damage of intestinal barrier was observed by Alcian blue-periodate Shew (AB-PAS) staining. The levels of inflammatory factors in rat liver homogenate were determined by ELISA kit. The mRNA expressions of LXR- $\alpha$ , SREBP-1c and Nr2 in liver and Claudin1, ZO-1, SREBP-1c and Nr2 in colon were determined by qRT-PCR. The protein expression of LXR- $\alpha$ , SREBP-1c and Nr2 in liver and Claudin1, ZO-1, SREBP-1c and Nr2 in colon were detected by Western blot. **Results** Compared with Control group, the levels of serum ALT, AST and liver homogenate T-CHO, TG, LDL-C, IL-8, IL-17 and TNF- $\alpha$  in Model group were increased ( $P < 0.05$ ), while the levels of HDL-C, IL-10 and TGF- $\beta$ 1 were decreased ( $P < 0.01$ ). In Model group, the mRNA expressions of LXR- $\alpha$  and SREBP-1c in liver tissue were increased ( $P < 0.001$ ), the mRNA expressions of Nr2 were decreased ( $P < 0.01$ ), and the mRNA expressions of Claudin1, ZO-1 and Nr2 in colon tissue were decreased ( $P < 0.01$ ). The expression of SREBP-1c was increased ( $P < 0.01$ ). The protein levels of LXR- $\alpha$  and SREBP-1c in liver tissue of Model group were increased ( $P < 0.01$ ), while Nr2 was decreased ( $P < 0.05$ ), the protein levels of Claudin1, ZO-1 and Nr2 in colon tissue were decreased ( $P < 0.001$ ), and SREBP-1c was increased ( $P < 0.001$ ). **Conclusion** Xiaoyao Pill has a certain therapeutic effect on MASH rats, and its therapeutic mechanism may be related to reducing inflammation, oxidative stress and inhibiting fatty acid accumulation. Protecting the intestinal mucosal barrier from damage can effectively reduce the damage of the liver. The theory of "connecting the liver and the large intestine" has certain guiding significance for MASH treatment.

**Key words:** Metabolic related steatohepatitis; Xiaoyao pill; Liver in the large intestine; Sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c); Nuclear factor E2-related factor; Nr2; Liver X receptor  $\alpha$  (LXR- $\alpha$ )

(责任编辑:杜国安)