

引用:彭佩纯,邓鑫. 肝宁方对 NASH 小鼠保护作用及大鼠肝星状细胞影响的实验研究[J]. 湖南中医杂志,2023,39(6): 197-204.

肝宁方对 NASH 小鼠保护作用及大鼠肝星状细胞影响的实验研究

彭佩纯¹, 邓鑫²

(1. 广西中医药大学附属国际壮医医院, 广西 南宁, 530001;

2. 广西中医药大学基础医学院, 广西 南宁, 530004)

[摘要] 目的:探讨肝宁方对非酒精性脂肪性肝炎(NASH)小鼠的保护作用及其对活化后大鼠肝星状细胞(HSCs)的影响。方法:将 24 只小鼠随机分为正常组、模型组、肝宁方组,每组各 8 只。对模型组、肝宁方组采用高脂饮食联合四氯化碳豆油溶液皮下注射建立 NASH 小鼠模型,造模成功后正常组和模型组予 0.9%氯化钠注射液灌胃,肝宁方组予肝宁方灌胃。干预 3 周。将大鼠 HSCs 分成正常组、模型组及肝宁方组,正常组予正常培养基培养,模型组及肝宁方组采用转化生长因子- β 1(TGF- β 1)活化,随后正常组和模型组用含正常大鼠血清培养基培养,肝宁方组加入含 30%肝宁方含药血清培养基培养。培养 24 h。观察肝组织病理学情况;血清天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、血清总胆固醇(CHOL)、三酰甘油(TG)水平;肝组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)表达,葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)及内质网核信号转导蛋白 1 α (IRE-1 α)蛋白表达;肝细胞凋亡情况;HSCs 的增殖情况。结果:肝宁方组和模型组小鼠相比,脂质空泡和出血减少,炎性细胞浸润减轻。小鼠血清 AST、ALT、CHOL、TG 水平,肝组织 TNF- α 、IL-6 水平,GRP78、IRE-1 α 蛋白表达,肝细胞凋亡情况模型组与正常组比较,肝宁方组与模型组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。与模型组相比,肝宁方含药血清干预后 HSCs 增殖趋势明显减弱($P < 0.01$)。结论:肝宁方能够改善 NASH 小鼠肝脏病理学变化,保护肝脏、调节脂质代谢、抑制炎症反应、减轻肝细胞凋亡、抑制 HSCs 增殖,其机制可能与调控内质网应激有关。

[关键词] 非酒精性脂肪性肝炎;肝宁方;肝星状细胞;内质网应激;实验研究

[中图分类号]R285.5 **[文献标识码]**A **DOI:**10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2023.06.039

Protective effect of Ganning prescription on mice with nonalcoholic steatohepatitis and its effect on rat hepatic stellate cells: An experimental study

PENG Peichun¹, DENG Xin²

(1. Guangxi International Zhuang Medicine Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, Guangxi, China;

2. School of Basic Medicine, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530004, Guangxi, China)

[Abstract] Objective: To investigate the protective effect of Ganning prescription on mice with nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and its effect on activated rat hepatic stellate cells (HSCs). Methods: A total of 24 mice

基金项目:广西壮族自治区自然科学基金项目(2021GXNSFBA220037);广西壮族自治区高校中青年教师科研基础能力提升项目(2019KY0334);广西中医药大学研究生教育创新计划项目(YCBXJ2021020);广西国际壮医医院课题(2019013);广西中医药大学桂派中医药传承创新团队项目(2022B004)

第一作者:彭佩纯,女,2020 级博士研究生,研究方向:中医、民族医防治慢性肝病

通信作者:邓鑫,男,医学博士,教授,研究方向:中西医结合防治传染病,E-mail:ricedx@126.com

were randomly divided into normal group, model group, and Ganning prescription group, with 8 mice in each group. The mice in the model group and the Ganning prescription group were given high-fat diet combined with subcutaneous injection of carbon tetrachloride-soybean oil solution to establish a mouse model of NASH. After successful modeling, the mice in the normal group and the model group were given 0.9% sodium chloride injection by gavage, and those in the Ganning prescription group were given Ganning prescription by gavage, for 3 weeks. Rat HSCs were divided into normal group, model group, and Ganning prescription group. HSCs in the normal group were cultured in a normal medium, and those in the model group and the Ganning prescription group were activated by transforming growth factor- β 1; then HSCs in the normal group and the model group were cultured in a medium containing normal rat serum, and those in the Ganning prescription group were cultured in a medium of serum containing 30% Ganning prescription. HSCs were cultured for 24 hours. Liver histopathology was observed; the serum levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), total cholesterol (CHOL), and triglyceride (TG) were measured, as well as the protein expression levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), glucose-regulated protein 78 (GRP78), and IRE-1 α in liver tissue; the apoptosis of hepatocytes and the proliferation of HSCs were observed. Results: Compared with the mice in the model group, the mice in the Ganning prescription group had reductions in lipid vacuoles and bleeding and alleviation of inflammatory cell infiltration. There were significant differences in the serum levels of AST, ALT, CHOL, and TG, the levels of TNF- α and IL-6 in liver tissue, the protein expression levels of GRP78 and IRE-1 α , and the apoptosis of hepatocytes between the model group and the normal group and between the Ganning prescription group and the model group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Compared with the HSCs in the model group, the HSCs treated with serum containing Ganning prescription showed a significant reduction in proliferation ($P < 0.01$). Conclusion: Ganning prescription can improve liver pathological changes, protect the liver, regulate lipid metabolism, inhibit inflammatory response, alleviate hepatocyte apoptosis, and inhibit the proliferation of HSCs in mice with NASH, possibly by regulating endoplasmic reticulum stress.

[Keywords] nonalcoholic steatohepatitis; Ganning prescription; hepatic stellate cell; endoplasmic reticulum stress; experimental study

随着生活水平的提高,人们生活方式和饮食习惯都发生了重大变化,长期高蛋白、高脂肪、高能量的饮食习惯促使非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)成为一个日益严重的健康问题,全球患病率达25%~30%^[1]。其分为单纯性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver, NAFL)、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)及其相关肝硬化和肝细胞癌,其中,NASH存在坏死性炎症和肝细胞损伤,伴有不同程度的纤维化,是单纯性脂肪肝向肝纤维化、肝硬化进展的重要环节。如果NASH持续存在,将有多达1/3的患者可能发展为晚期纤维化或肝硬化,最终发展为终末期肝病,导致肝脏相关病死率增加^[2-3]。NASH已成为全球面临的健康问题,是阻断NAFLD进展的关键点,因此,对NASH的治疗具有重大的研究价值。肝

宁方是全国名老中医蓝青强教授治疗慢性肝病的自拟方,具有补气健脾、祛瘀除湿的作用。课题组前期研究已证实了肝宁方对慢性肝病的临床疗效^[4-5],并在细胞水平上发现其通过调控肝细胞内质网应激(ERS)发挥保护肝细胞的作用^[6-7]。本文进一步通过体内研究探讨肝宁方对NASH的影响,并初步通过细胞实验探究其对活化后肝星状细胞的影响。

1 实验材料

1.1 动物及细胞 8周龄C57BL/6小鼠,24只,雄性,体质量18~22g;SD大鼠,60只,雄性,体质量180~200g,均购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物许可证号:SCXK(湘)2019-0004、SYXK桂2019-0001,实验动物质量合格证号:43072711101630476、430727211102917258,实验动

物使用许可证号: SYXK 桂 2019-0001, 伦理审批号 DW20220611-135。所有动物均饲养于广西中医药大学动物房, 室温 20~25℃, 光照 12h, 相对湿度 40%~60%, 噪音 < 60 dB。大鼠肝星状细胞 (HSC-T6, 广州赛库生物技术有限公司, 批号: CC9138), 用含 10% 胎牛血清的高糖培养基在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2 药物 肝宁方: 当归 10 g, 白芍 10 g, 鳖甲 10 g, 白术 10 g, 黄芪 20 g, 赤芍 10 g, 牡丹皮 10 g, 泽兰 10 g, 葫芦茶 15 g, 猛老虎 15 g, 绞股蓝 15 g, 黑蚂蚁 15 g, 由广西现代壮医药工程研究中心水煎后浓缩成中药混悬液 (含生药量 245.7 g) 备用。

1.3 主要试剂及仪器 总胆固醇 (CHOL)、三酰甘油 (TG)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 试剂盒 (山东博科生物产业有限公司, 批号: 70101、70102、70110、70111); TUNEL 检测试剂盒 (碧云天生物科技有限公司, 批号: C108); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体、葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) 及内质网核信号转导蛋白 1 α (IRE-1 α) 抗体 (碧云天生物科技有限公司, 批号: AF0006、AF0171、AI601); 二抗为辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG / 山羊抗小鼠 IgG (H+L) (碧云天生物科技有限公司, 批号: A0208、A0216); 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 抗体、白细胞介素-6 (IL-6) 抗体 (Affinity, 批号: AF7014、DF6087)。活细胞动态功能分析系统 (Sartorius Incucyte S3); 石蜡切片机 (慧达 HD-325C); 组织细胞匀浆仪 (罗氏 MagNA Lyser); 生物组织自动包埋机 (慧达 HD-310B); 半自动生化分析仪 [金浩峰 SCOUTV (II)]。

2 实验方法

2.1 动物实验 将 24 只小鼠适应性喂养 1 周后随机分为正常组、模型组及肝宁方组, 每组各 8 只。正常组予普通饲料喂养, 模型组及肝宁方组小鼠予高脂饲料 (由普通饲料、果糖、猪油、胆固醇、食盐、胆酸钠制成) 喂养, 于第 5 周开始接受每周 2 次 40% 四氯化碳豆油溶液皮下注射, 剂量为 0.1 ml/10 g^[8-10], 造模时间共 6 周, 以肝组织病理学提示肝细胞脂质空泡和炎症细胞浸润, 伴有轻度纤维化, 视为造模成功。本研究模型组及肝宁

方组动物均造模成功。造模成功后于第 7 周开始给药。正常组和模型组予 0.9% 氯化钠注射液灌胃, 灌胃体积为 0.2 ml/只, 肝宁方组根据人和动物体表面积折算的等效剂量比值, 按成人质量为 70 kg 计算, 给予 19.5 g/(kg·d) 的肝宁方药液灌胃, 1 次/d, 持续 3 周。

2.2 细胞实验 含药血清提取: 将 60 只 SD 大鼠适应性喂养 3 d 后随机分为正常组和肝宁方组, 每组各 30 只。正常组予 0.9% 氯化钠注射液灌胃, 肝宁方组予 13.5 g/(kg·d) 肝宁方药液灌胃, 1 次/d, 共 7 d。末次给药后 1.5~3 h 腹主动脉取血, 静置 1 h 后 4℃ 离心 10 min, 取上层血清用 0.22 μ m 滤膜过滤后 -20℃ 保存备用。

将大鼠 HSCs 用含 10% 胎牛血清的高糖培养基在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 取生长良好的大鼠 HSCs, 用胰酶消化, 1000 r/min 速度离心 5 min, 重悬后按每孔 3000 个细胞铺于 96 孔板中, 分为正常组、模型组及肝宁方组, 每组 3 个复孔。正常组予正常培养基培养, 模型组及肝宁方组采用含转化生长因子- β 1 (TGF- β 1, 10 ng/ml) 干预 24 h^[11]。细胞计数试剂盒 CCK8 检测结果提示细胞活力增加, 蛋白质印迹 (WB) 结果提示 TGF- β 1 蛋白表达增加, 说明造模成功。造模成功后弃去含 TGF- β 1 的培养基。正常组和模型组用含正常大鼠血清培养基培养, 肝宁方组加入含 30% 肝宁方含药血清培养基培养。继续干预 24 h。

2.3 观察指标

2.3.1 小鼠肝组织病理学情况 给药 21 d 后, 各组小鼠麻醉后取肝脏, 用 4% 多聚甲醛固定, -80℃ 保存备用。将固定好的肝组织进行石蜡包埋和切片, 苏木精红染色 (HE) 染色后在显微镜下观察各组肝组织病理变化并拍照。

2.3.2 小鼠血液 AST、ALT、CHOL、TG 含量 给药 21 d 后, 各组小鼠麻醉后心脏取血, 分别按照检测试剂盒进行操作, 检测 AST、ALT、CHOL、TG 含量。

2.3.3 小鼠肝组织 TNF- α 、IL-6 含量 采用免疫组化法检测。将固定好的肝组织进行石蜡包埋和切片, 用抗原修复液进行修复。消除内源性过氧化物酶, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤后滴加 5% 牛血清白蛋白 (BSA) 封闭液, 37℃ 封闭 30 min。分别加入

TNF- α (1:100)、IL-6(1:200)一抗,4℃孵育过夜后辣根酶标记山羊抗兔 IgG(H+L),37℃孵育 30 min。二氨基联苯胺(DAB)显色后在显微镜下掌握染色程度,PBS 洗涤,苏木精复染,盐酸酒精分化,返蓝,蒸馏水冲洗。脱水透明,以中性树脂胶封片、镜检。苏木素染色后细胞核为蓝色,DAB 显出的阳性表达为棕黄色,使用 Image J 对阳性信号面积比进行统计。

2.3.4 小鼠肝组织 GRP78、IRE-1 α 蛋白表达 取出肝组织后根据 RIPA 裂解液说明书加入裂解液,置于全自动组织匀浆仪中充分研磨,随后在高速离心机中离心,取上清并进行蛋白定量。随后按照电泳、转膜、封闭、孵育一抗和二抗的顺序操作,最后进行显影成像。

2.3.5 小鼠肝细胞凋亡情况 将固定好的肝组织进行石蜡包埋和切片,用蛋白酶 K(Proteinase K)工作液进行修复。PBS 浸洗后,滴加适量 TUNEL 检测液,37℃避光孵育 2 h。用 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)复染细胞核,用含抗荧光淬灭剂的封片液封片,在荧光显微镜下观察。DAPI 染色后细胞核在紫外的激发下为蓝色,TUNEL 阳性表达为相应荧光素标记的红光,并利用 Image J 软件对平均荧光强度进行统计。

2.3.6 大鼠 HSCs 细胞增殖情况 细胞正常培养 24h 后,正常组予正常培养基,模型组及肝宁方组培养基中加入 TGF- β 1 后开始使用活细胞动态功能分析系统实时拍照 48 h,观察细胞的增殖情况。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 24.0 和 GraphPad Prism 8 软件进行数据分析。计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,2 组比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组小鼠肝组织病理学结果 在光学显微镜下可见正常组肝细胞围绕中央静脉呈放射状排列,细胞形态清晰;模型组肝细胞肿胀,排序紊乱,局部可见脂质空泡,脂肪变性细胞相较于正常组明显增多,可见炎性细胞浸润。与模型组相比,肝宁方组脂质空泡和出血减少,炎性细胞浸润减轻。(见图 1)

3.2 各组小鼠血清 AST、ALT、CHOL、TG 水平比较

与正常组相比,模型组 AST、ALT、CHOL、TG 水平显著升高($P<0.01$);干预后,肝宁方组 AST、ALT、CHOL、TG 水平较模型组显著降低($P<0.01$)。(见图 2)

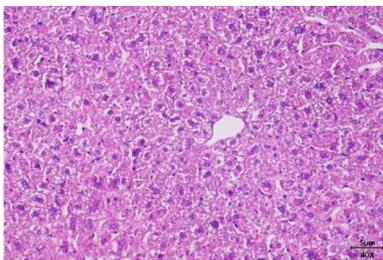


图 1-1 正常组

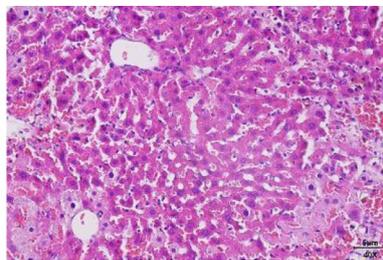


图 1-2 模型组

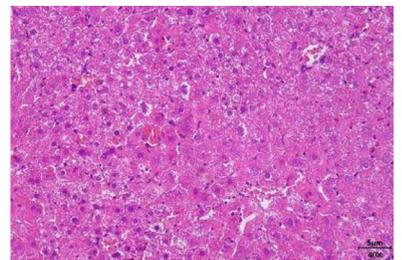


图 1-3 肝宁方组

图 1 各组小鼠肝组织 HE 染色结果(5 μ m,40 \times)

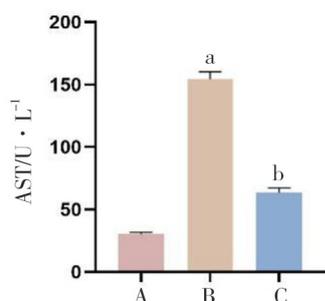


图 2-1 血清 AST 水平

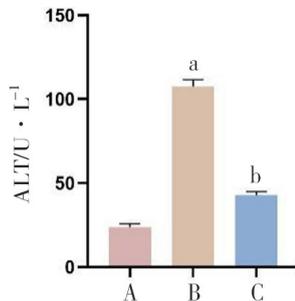


图 2-2 血清 ALT 水平

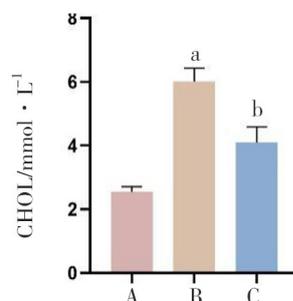


图 2-3 血清 CHOL 水平

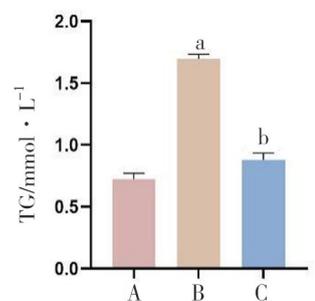


图 2-4 血清 TG 水平

注:与正常组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.01$ 。A—正常组;B—模型组;C—肝宁方组。

图 2 各组小鼠血清 AST、ALT、CHOL、TG 水平比较

3.3 各组小鼠肝组织 TNF- α 、IL-6 水平比较 模型组 TNF- α 和 IL-6 蛋白表达明显高于正常组 ($P < 0.01$); 干预后, 与模型组相比, 肝宁方组 TNF- α 和 IL-6 蛋白表达明显降低 ($P < 0.01, P < 0.05$)。(见图 3、4)

3.4 各组小鼠肝组织 GRP78、IRE-1 α 蛋白表达比较 模型组 GRP78 及 IRE-1 α 蛋白表达均明显高于正常组 ($P < 0.01$), 肝宁方组 GRP78 和 IRE-1 α 蛋白表达均较模型组降低 ($P < 0.01$)。(见图 5、6)

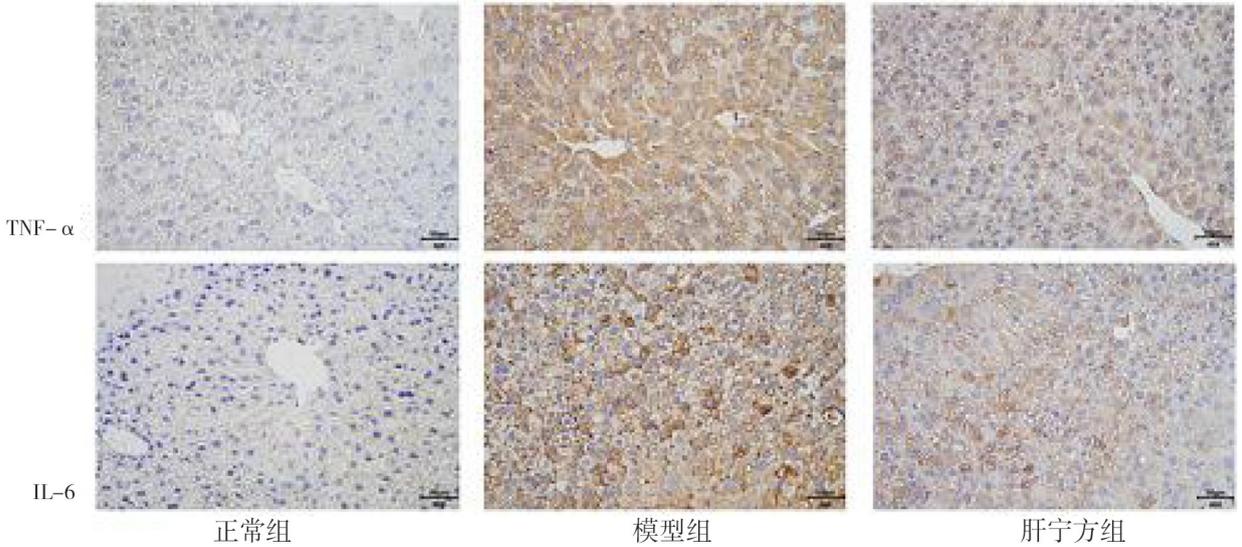


图 3 各组小鼠肝组织 TNF- α 、IL-6 蛋白水平表达结果 (50 μ m, 40 \times)

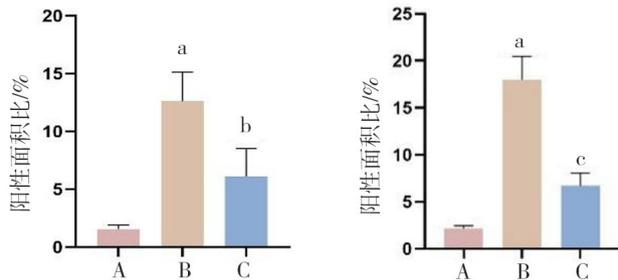


图 4-1 TNF- α 蛋白表达 图 4-2 IL-6 蛋白表达

注: 与正常组比较, ^a $P < 0.01$; 与模型组比较, ^b $P < 0.01, ^cP < 0.05$ 。A—正常组; B—模型组; C—肝宁方组。

图 4 各组小鼠肝组织 TNF- α 、IL-6 蛋白表达水平比较

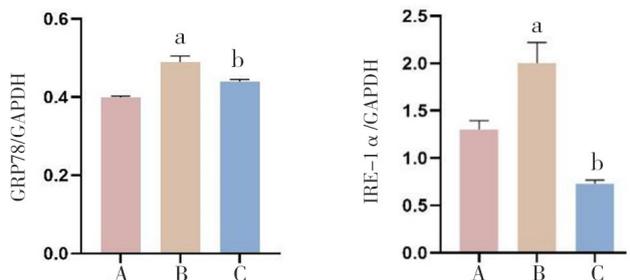


图 6-1 GRP78 蛋白表达 图 6-2 IRE-1 α 蛋白表达

注: 与正常组比较, ^a $P < 0.01$; 与模型组比较, ^b $P < 0.01$ 。A—正常组; B—模型组; C—肝宁方组。

图 6 各组小鼠肝组织 GRP78、IRE-1 α 蛋白表达比较

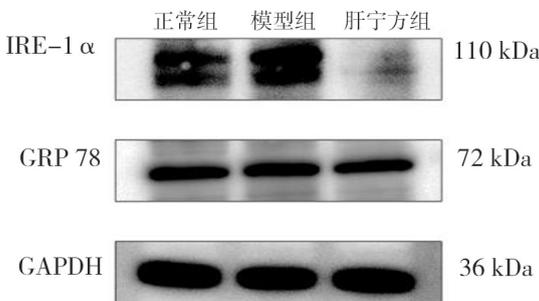


图 5 各组小鼠肝组织 GRP78、IRE-1 α 蛋白表达结果

3.5 各组小鼠肝细胞凋亡结果 与正常组相比, 模型组肝细胞凋亡数量明显上升 ($P < 0.01$); 与模型相比, 肝宁方组肝细胞凋亡数量明显下降 ($P < 0.01$)。(见图 7、8)

3.6 各组大鼠 HSCs 细胞增殖结果 TGF- β 1 干预期间, 3 组细胞增殖情况无明显差异, 但在加入肝宁方含药血清后, 3 组细胞增殖的趋势逐渐呈现出差异, 正常组和肝宁方组增殖趋势明显弱于模型组, 模型组与正常组及肝宁方组之间存在明显差异 ($P < 0.01$)。(见图 9、10)

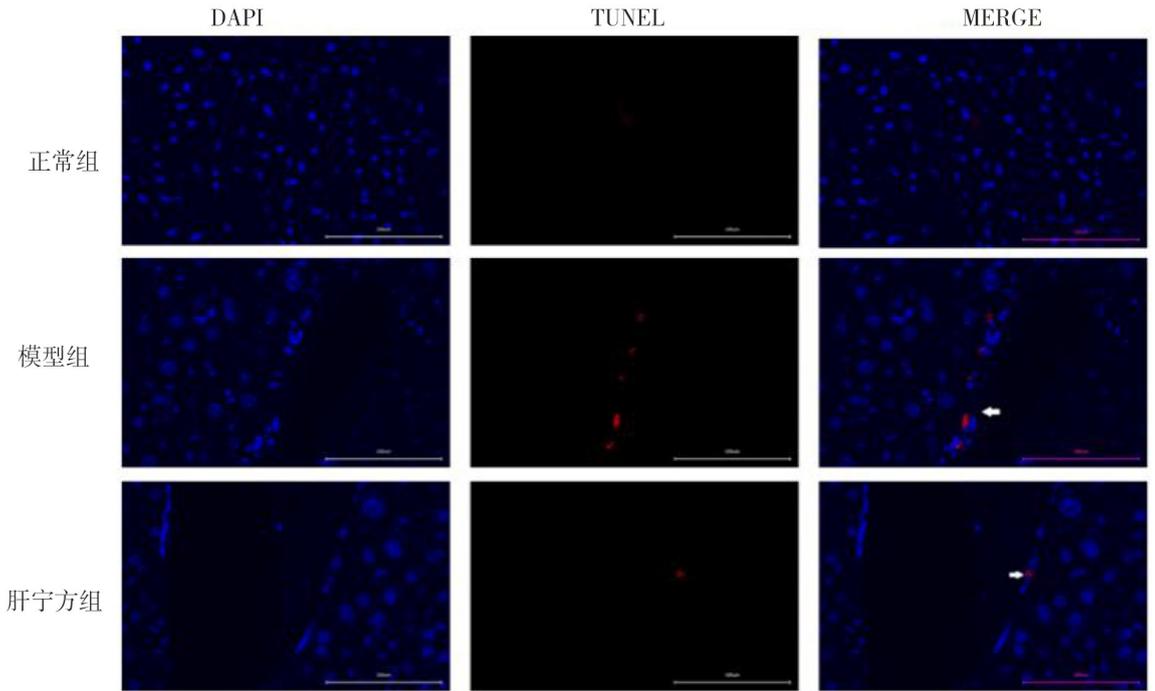
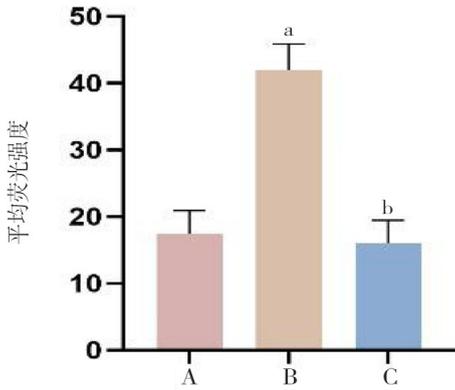


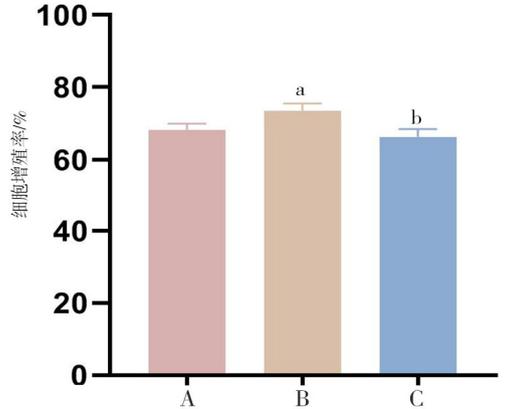
图7 各组小鼠肝细胞凋亡结果(TUNEL,100 μm,400×)



注:与正常组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.01$ 。

A—正常组;B—模型组;C—肝宁方组。

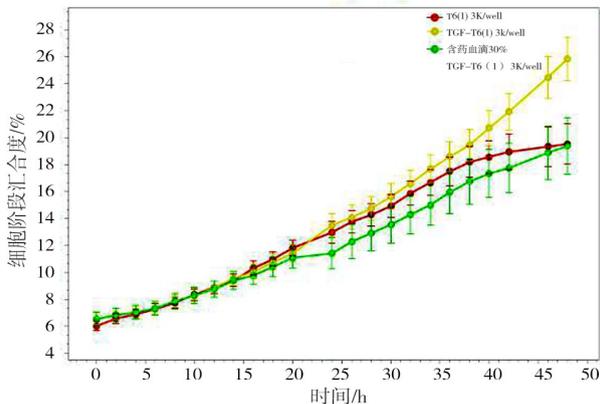
图8 各组小鼠肝细胞凋亡情况比较



注:与正常组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.01$ 。

A—正常组;B—模型组;C—肝宁方组。

图10 各组大鼠HSCs细胞增殖率



注:红色为正常组,黄色为模型组,绿色为肝宁方组。

图9 各组大鼠HSCs细胞生长趋势图

4 讨论

NASH属于中医学“胁痛”“痞满”“积聚”“肝癖”等范畴^[12],其形成与饮食的关系非常密切。饮食不节,多食肥甘厚腻之品,日久致肝脾受损,脾气失司,气血津液输布失常,痰、湿、瘀积聚,痰浊膏脂堆积于肝脏发为NAFLD^[13]。因此,笔者认为治疗应以补气健脾为主,兼顾清热化浊、祛瘀除湿。肝宁方由黄芪、当归、白芍、鳖甲、白术、赤芍、牡丹皮、泽兰、葫芦茶、猛老虎、绞股蓝、黑蚂蚁组成,具有补气健脾、祛瘀除湿的功效。方中黄芪、绞股蓝补脾益气,当归补血活血,二药配伍有健脾行气活血之功效;

白芍、白术柔肝缓急、益气健脾; 赤芍、牡丹皮、鳖甲、泽兰活血化瘀、软坚散结; 葫芦茶和猛老虎为广西特色民族药, 有清热解毒、利湿退黄的作用; 黑蚂蚁亦是广西特色药材, 具有祛风湿、补肝肾的作用。全方肝脾同治、攻补兼施。现代药理研究表明, 黄芪、白芍、葫芦茶、猛老虎等药物及其有效成分具有调节免疫、抗炎、抗凋亡及抗纤维化等作用, 同时也能通过调控 ERS 发挥防治慢性肝病的作用^[14-19]。

西医学认为 NASH 发病机制较为复杂, 其中, 异常脂质堆积、炎症反应及细胞凋亡是其关键病理表现, 异常脂质增加将导致细胞损伤和凋亡并激活炎症相关通路^[20-21]。脂质积累可激活多种细胞应激途径, 包括 ERS^[22-23]。肝细胞中有大量的内质网, 发挥着重要的肝脏代谢功能, 如蛋白质和脂质合成、跨膜蛋白折叠和钙稳态^[24-25]。在 NASH 中, 为应对肝损伤后的再生过程, 机体对蛋白质合成的需求增加, 导致内质网稳态失衡和 ERS, 原本与 GRP78 结合而处于静止状态的肌醇需求酶 1 (IRE1)、蛋白激酶 R 样内质网激酶 (PERK) 和转录激活因子 6 (ATF6) 3 种介导未折叠蛋白反应 (UPR) 的跨膜蛋白被激活, 导致炎症、脂代谢紊乱及细胞凋亡^[26]。

NAFLD 是因摄入游离脂肪酸和肝脏新生脂肪的增加而致肝细胞内 CHOL 和 TC 过量积累而引起氧化应激和炎症反应, 其进一步发展会导致 NASH^[27-28]。因此, 本研究通过检测 CHOL、TC、AST、ALT, 以及肝组织病理学探讨肝宁方对 NASH 小鼠的影响, 结果表明肝宁方能明显改善 NASH 小鼠血脂异常及肝功能损伤的情况, 同时能够减轻肝内脂质空泡。肝脏炎症反应是疾病进展的重要驱动力, 可以使得肝纤维化发展为肝硬化。NASH 与炎症因子有关, 其中, TNF- α 和 IL-6 是主要的促炎细胞因子, 在 NASH 进展过程中, 其不仅可以引起肝内炎症反应, 还会影响细胞凋亡和胰岛素抵抗^[29-30], 故本研究将其作为评价肝宁方对 NASH 炎症反应的观察指标。此外, 肝细胞凋亡是 NASH 另一个关键的形态学和病理学特征, 与肝损伤程度相关^[26]。本研究结果发现, NASH 小鼠炎症因子 TNF- α , IL-6 水平升高, 肝细胞凋亡明显, 而肝宁方可改善小鼠炎症反应和肝细胞凋亡程度。研究表明, 过度的 ERS 可致异常脂质积累, 诱导炎症反应, 促进肝细胞凋亡。其中, GRP78 是 ERS 的标志性蛋

白。有研究发现在 NASH 患者肝脏中 GRP78 表达明显升高, 而在单纯性脂肪变性患者中则无此类情况, 说明 ERS 在脂肪变性到脂肪性肝炎或纤维化的阶段转变中起重要作用^[27,31]。ERS 与 NASH 之间的关系涉及多种信号机制, 其中 IRE-1 α 作为一个重要信号被认为参与了 ERS 诱导的脂质异常积累及细胞凋亡过程, 包括 IRE-1 α /NF- κ B、IRE-1 α /XBP1 等信号通路^[32]。笔者通过 WB 检测 GRP78 及 IRE-1 α 蛋白表达情况, 发现肝宁方能降低 NASH 小鼠肝脏中 GRP78 和 IRE-1 α 蛋白的表达, 说明肝宁方能够通过 ERS 的调控延缓 NASH 发展进程。ERS 的加重在炎症反应、脂质代谢及凋亡中起着重要作用^[25,33-35], 而肝宁方具体通过哪条途径发挥对 NASH 小鼠的保护作用仍需要进一步深入探索。

此外, 与大多数慢性肝病一样, NASH 的持续肝损伤与肝纤维化的发生相关, 最终导致肝硬化。基础研究揭示了 HSCs 作为纤维化反应的关键介质的主要作用^[36]。在 NASH 模型中, 游离胆固醇在 HSCs 中累积, 导致心肌 Toll 样受体 4 (TLR4) 信号增加, 并使细胞对 TGF- β 1 的促纤维化作用敏感, 因此 NASH 是伴有不同程度纤维化的病理状态^[37]。本研究初步探讨了肝宁方对肝星状细胞的影响, 结果发现其能抑制 TGF- β 1 介导的肝星状细胞增殖, 说明肝宁方对 NASH 的作用不仅是保护肝细胞, 也可以通过抑制肝星状细胞增殖避免 NASH 进一步向肝纤维化发展。

综上, 肝宁方能够改善 NASH 小鼠肝脏病理学变化, 在保护肝脏、调节脂质代谢、抑制炎症反应、减轻肝细胞凋亡、抑制 HSCs 异常增殖方面效果颇佳, 其机制可能与调控 ERS 有关。但因肝宁方药物之间的相互作用复杂, 其具体的作用机制仍需深入研究。

参考文献

- [1] YOUNOSSI ZM, HENRY L. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma[J]. JHEP Rep, 2021, 3(4): 100305.
- [2] ANSTEE QM, REEVES HL, KOTSILITI E, et al. From NASH to HCC: Current concepts and future challenges[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2019, 16(7): 411-428.
- [3] MARENGO A, JOUNESS RI, BUGIANESI E. Progression and natural history of nonalcoholic fatty liver disease in adults[J]. Clin Liver Dis, 2016, 20(2): 313-324.

- [4] 赵晓芳,邓鑫,胡晓宁,等.天然牛磺酸联合肝宁方治疗肝炎后肝硬化腹水的临床观察[J].大众科技,2017,19(1):47-48.
- [5] 李椿莹.肝宁方对慢性乙型肝炎患者生存质量的临床研究[D].南宁:广西中医药大学,2017.
- [6] 彭佩纯.肝宁方对肝细胞内质网应激状态下UPR跨膜蛋白表达的影响[D].南宁:广西中医药大学,2015.
- [7] 文彬,李福英,陈然,等.肝宁方对衣霉素诱导肝细胞内质网应激生存信号分子的影响[J].医学研究杂志,2017,46(11):62-65.
- [8] TSUCHIDA T,LEE YA,FUJIWARA N,et al. A simple diet- and chemical-induced murine NASH model with rapid progression of steatohepatitis, fibrosis and liver cancer[J]. J Hepatol, 2018, 69(2):385-395.
- [9] 高艳,徐慧超,郝健亨,等.非酒精性脂肪性肝炎肝郁脾虚证大鼠模型的改进研究[J].山西中医,2020,36(3):54-57.
- [10] 康建华,李明杰,栾培培,等.西方饮食联合小剂量四氯化碳构建非酒精性脂肪性肝炎小鼠模型研究[J].上海交通大学学报:医学版,2020,40(5):590-597.
- [11] 王丽惠,程变巧,朱琪,等.TGF- β 1诱导大鼠肝星状细胞系HSC-T6活化及上皮间质转换[J].基础医学与临床,2017,37(9):1257-1262.
- [12] 郜玲,曾岳祥,范瑞园,等.祛脂护肝饮治疗非酒精性脂肪性肝炎湿浊内停证40例临床观察[J].湖南中医杂志,2022,38(3):9-12.
- [13] 方南元,孙晓琦,车军勇,等.试论消导法在非酒精性脂肪性肝病中的应用[J].湖南中医杂志,2020,36(8):116-117,127.
- [14] 高文,王增四,陈菁,等.黄芪通过阻断内质网应激改善糖尿病肾病大鼠蛋白尿的研究[J].中华中医药学刊,2021,39(12):133-136,289.
- [15] 车宇娥,高誉珊,王岩飞,等.黄芪葛根联用对KKAy小鼠心脏组织GRP78、CHOP和PUMA表达的影响[J].北京中医药大学学报,2021,44(2):128-133.
- [16] 郑烈,张亚利,戴彦成.黄芪多糖对毒胡萝卜素诱导人结肠癌细胞HT29细胞内质网应激的影响[J].中华中医药学刊,2020,38(2):122-125,271.
- [17] 代小兰,竺东杰,陈小丽.白芍总苷通过抑制内质网应激减轻大鼠脑缺血再灌注损伤的实验研究[J].浙江中西医结合杂志,2021,31(1):11-17.
- [18] 戴斌.中国现代瑶药[M].南宁:广西科学技术出版社,2009:19-21.
- [19] 韦璐莹,卢清华,甘昌鑫,等.葫芦茶苷通过调控Nrf2/HO-1信号通路抑制肝星状细胞增殖活化的作用[J].广西医学,2022,44(10):1125-1130.
- [20] BESSONE F,RAZORI MV,ROMA MG. Molecular pathways of non-alcoholic fatty liver disease development and progression[J]. Cell Mol Life Sci, 2019, 76(1):99-128.
- [21] GALLUZZI L,VITALE I,ABRAMS JM,et al. Molecular definitions of cell death subroutines: Recommendations of the nomenclature committee on cell ceath[J]. Cell Death Differ, 2012, 19(1):107-120.
- [22] BOZAYKUT P,SAHIN A,KARADEMIR B,et al. Endoplasmic reticulum stress related molecular mechanisms in nonalcoholic steatohepatitis[J]. Mech Ageing Dev, 2016, 157:17-29.
- [23] FUN XH,THIBAUT G. Lipid bilayer stress and proteotoxic stress-induced unfolded protein response deploy divergent transcriptional and non-transcriptional programmes[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2020, 1865(1):158449.
- [24] FU S,YANG L,LI P,et al. Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity[J]. Nature, 2011, 473(7348):528-531.
- [25] ASHRAF NU,SHEIKH TA. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease[J]. Free Radic Res, 2015, 49(12):1405-1418.
- [26] MARRA F,SVEGLIATI-BARONI G. Lipotoxicity and the gut-liver axis in NASH pathogenesis[J]. J Hepatol, 2018, 68(2):280-295.
- [27] LEBEAUPIN C,VALLÉE D,HAZARI Y,et al. Endoplasmic reticulum stress signalling and the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease[J]. J Hepatol, 2018, 69(4):927-947.
- [28] ZHANG XQ,XU CF,YU CH,et al. Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(7):1768-1776.
- [29] HAN MS,JUNG DY,MOREL C,et al. JNK expression by macrophages promotes obesity-induced insulin resistance and inflammation[J]. Science, 2013, 339(6116):218-222.
- [30] HOTAMISLIGIL GS,SHARGILL NS,SPIEGELMAN BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : Direct role in obesity-linked insulin resistance[J]. Science, 1993, 259(5091):87-91.
- [31] GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ A,MAYORAL R,AGRA N,et al. Impaired autophagic flux is associated with increased endoplasmic reticulum stress during the development of NAFLD[J]. Cell Death Dis, 2014, 5(4):e1179.
- [32] WANG L,CHEN J,NING C,et al. Endoplasmic reticulum stress related molecular mechanisms in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)[J]. Curr Drug Targets, 2018, 19(9):1087-1094.
- [33] HERREMA H,ZHOU Y,ZHANG D,et al. XBP1s is an anti-lipogenic protein[J]. J Biol Chem, 2016, 291(33):17394-17404.
- [34] CULLINAN SB,DIEHL JA. Coordination of ER and oxidative stress signaling: The PERK/Nrf2 signaling pathway[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2006, 38(3):317-332.
- [35] HARDY T,OAKLEY F,ANSTEE QM,et al. Nonalcoholic fatty liver disease: Pathogenesis and disease spectrum[J]. Annu Rev Pathol, 2016, 11:451-496.
- [36] HIGASHI T,FRIEDMAN SL,HOSHIDA Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2017, 121:27-42.
- [37] TERATANI T,TOMITA K,SUZUKI T,et al. A high-cholesterol diet exacerbates liver fibrosis in mice via accumulation of free cholesterol in hepatic stellate cells[J]. Gastroenterology, 2012, 142(1):152-164.

(收稿日期:2023-03-10)

[编辑:刘珍]