

• 实验研究 •

健肝消脂方对非酒精性脂肪性肝病胰岛素抵抗、脂质沉积的影响 及相关 mRNA 差异表达初步分析*

房 昉^{1,2}, 温伟波^{1Δ}, 万春平¹, 谢雪华¹, 祁 燕¹, 宋 云³, 陶丽玲³, 杨云姣³

(1. 云南中医药大学第一附属医院, 云南 昆明 650021; 2. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023;

3. 云南中医药大学临床医学院, 云南 昆明 650500)

摘要: **目的** 通过观察动物模型空腹胰岛素、空腹血糖、肝脏脂质沉积情况, 计算胰岛素抵抗(IR)相关指标, 并使用基因芯片技术观察相关 mRNA 表达谱差异, 以深入阐释健肝消脂方治疗非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)的分子机制。**方法** 使用高糖高脂饲料复制 NAFLD 大鼠模型, 造模成功后使用随机数字表法分为治疗组(Z 组)及模型组(M 组)。Z 组根据 10.86g/kg 的生药量予健肝消脂方灌胃给药, M 组给予等体积的蒸馏水灌胃, 均每日给药 1 次, 连续 60 天。给药结束后检测两组空腹胰岛素水平、空腹血糖水平, 计算胰岛素敏感性及胰岛素抵抗指数(HOMA-IR), 肝脏病理切片染色后观察肝脏脂质沉积情况, 采用基因芯片技术分析实验动物肝脏相关 mRNA 表达谱差异。**结果** 与 M 组比较, Z 组大鼠空腹胰岛素水平明显下降 ($P<0.05$), 胰岛素敏感性明显升高 ($P<0.05$), HOMA-IR 明显降低 ($P<0.05$), 肝脏脂质沉积明显改善; 两组肝脏 mRNA 表达存在明显差异($P<0.05$), 其中上调的基因有 52 个, 下调的基因有 13 个; 对基因功能进行分析可知, 生物途径(pathway)富集可得出排序前十的 pathway 富集结果, GO 富集可得到 8 个 GO 分子功能(molecular function)富集结果, 排序前十的 GO 生物过程(biological process)富集结果及 2 个 GO 细胞成分(cellular component)富集结果。**结论** 健肝消脂方可以改善 IR 及肝脏脂质沉积, 其作用机制可能与该方影响肝脏基因表达有关。其分子机制可能是该方能够调节干扰素调节因子(IRF)7、GO 分子功能 GO:0016597、GO 生物过程 GO:0006952, 并且影响了血管内皮生长因子(VEGF)信号通路、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路、Toll 样体信号通路。同时健肝消脂方可能在分子层面上对肝纤维化、丙型肝炎病毒在肝脏内的复制等产生一定影响。

关键词: 健肝消脂方; 非酒精性脂肪性肝病; 胰岛素抵抗; 脂质沉积; 基因芯片

中图分类号: R285.5

文献标志码: A **文章编号:** 1000-2723(2019)02-0001-10

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2019.02.001

Preliminary Analysis of the Effect of Jiangnan Xiaozhi Recipe on Insulin Resistance and Lipid Deposition and Different Expressions of Related mRNA in Non-alcoholic Fatty Liver Disease

FANG Fang^{1,2}, WEN Weibo¹, WAN Chunping¹, XIE Xuehua¹, QI Yan¹, SONG Yun³, TAO Liling³, YANG Yunjiao³

(1. The First Affiliated Hospital of Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650021, China;

2. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;

3. Clinical Medical College of Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming, 650500, China)

ABSTRACT: **Objective** To further explain the molecular mechanism of Jiangnan Xiaozhi Recipe in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), by investigating the fasting insulin, fasting blood glucose and liver lipid deposition in animal models and calculating insulin resistance (IR) related indicators, and observing the differences of related mRNA expression profiles by using gene chip technology. **Methods** NAFLD rat models were reproduced with high-sugar and high-fat diet. After successful establishment, the models were divided into treatment group (Z group) and model group (M group),

收稿日期: 2019-03-12

* 基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金(81560772)

第一作者简介: 房昉(1982-), 男, 在读博士研究生, 主治医师, 研究方向: 中医药治疗内分泌代谢病。

Δ通信作者: 温伟波, E-mail: dcwenweibo@sina.com

according to random number table. Group Z was given Jiangnan Xiaozhi Recipe orally once a day for 60 consecutive days according to the dosage of 10.86 g/kg. Group M was given distilled water of equal volume once a day for 60 consecutive days. Fasting insulin and fasting blood glucose levels were measured after intervention. Insulin sensitivity and insulin resistance index (HOMA-IR) were calculated. Liver pathological sections were stained to observe liver lipid deposition. Gene chip technology was used to analyze the different expressions of related mRNA in experimental animals' livers. **Results** Compared with group M, fasting insulin level of rats in group Z decreased significantly ($P<0.05$), insulin sensitivity increased significantly ($P<0.05$), HOMA-IR decreased significantly ($P<0.05$), and liver lipid deposition improved significantly ($P<0.05$). There were significant differences in liver gene expression between the two groups ($P<0.05$), including 52 up-regulated genes and 13 down-regulated genes. The results of pathway enrichment in the first ten rankings can be obtained. The results of molecular function enrichment can be obtained by GO enrichment. The biological process enrichment of GO in the first ten rankings and cell component enrichment of two GO cells can be obtained by GO enrichment. **Conclusion** Its molecular mechanism may be that Jiangnan Xiaozhi Recipe can effect vascular endothelial growth factor(VEGF) signaling pathway, mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway, and Toll-like receptor signaling pathway ,meanwhile adjusted interferon regulatory factor 7 (IRF7), GO:0016597 of GO molecular function and GO:0006952 of GO biological process. At the same time, Jiangnan Xiaozhi Recipe may have an effect on liver fibrosis and hepatitis C virus at the molecular level.

KEY WORDS: Jiangnan Xiaozhi Recipe; non-alcoholic fatty liver disease;insulin resistance; lipid deposition; gene chip

非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 已成为我国和发达国家肝脏疾病中的常见病种,严重危害人民健康。NAFLD 是指一种与代谢综合征 (metabolic syndrome, MetS) 等密切相关的临床病理综合征,该病的主要特征是与酒精等其他明确肝损害因素无关的肝脏脂肪变性,胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 是其重要发病机制^[1]。而胰岛素敏感性及胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR) 两个指标则通常被用来评价胰岛素抵抗的程度^[2]。高胰岛素血症 (hyperinsulinism, HIS) 一般多指除外胰岛素瘤、使用胰岛素等其他病因后,空腹胰岛素或糖负荷后 2 h 胰岛素水平升高, HIS 经常早于或伴随 IR 出现,通常被认为是 IR 的替代性参数 (surrogate variable), 而鉴于已有研究证实 HIS 与 NAFLD 的脂肪浸润程度密切相关^[3], 所以空腹胰岛素水平也是评价 NAFLD 患者 IR 的重要指标。同时预防和治疗 MetS 是 NAFLD 治疗的首要目标之一^[4], 而减轻 IR 又是防治 MetS 的一个重要手段^[5]。因此,降低空腹胰岛素水平、改善 IR 在 NAFLD 的治疗中具有重要意义。本实验观察健肝消脂方对 NAFLD 动物模型空腹胰岛素、空腹血糖、肝脏脂质沉积等的影响,计算 IR 相关指标,并通过基因芯片技术观察相关 mRNA 表达谱差异,以期深入了解其分子机制。

1 实验材料

1.1 实验动物 健康雄性 SD 大鼠, SPF 级, 8 周龄, 体质量 (200±20)g, 共 30 只, 购自重庆腾鑫生物技术

有限公司。使用 SPF 级动物房饲养动物, 温度 (22±1)℃, 湿度 (55±5)%, 并予光暗循环 12 h, 适应性饲养 1 周后使用。实验期间, 动物自由进食。参照《实验动物管理条例》进行实验。

1.2 药物及制备 健肝消脂方由丹参、三七、莪术、山楂、黄芪、青皮、赤芍、姜黄、菊花、荷叶、甘草等组成, 均购自云南省中医医院中药房, 并由云南省中医医院制剂室将除三七外其他药物采用传统中药煎煮方法制成水提液, 再浓缩至相对密度为 1.30~1.35 (60~80℃) 的中药浸膏; 三七经粉碎、筛分制成三七超细粉, 按处方比例加入浸膏, 混匀, 于 0~4℃ 保存备用。

1.3 主要试剂及仪器 胰岛素酶联免疫吸附实验 (ELISA) 测定试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司), 葡萄糖测定试剂盒 (中生北控生物科技股份有限公司), 油红 O (上海化学试剂公司), 苏木精 (美国 sigma-aldrich 公司), 氨基烯丙基扩增试剂盒 (Amino Allyl MessageAmp II aRNA Amplification Kit, AM1753) (美国 Ambion 公司), RNA 6000 nano assay 试剂盒 (美国 Agilent 公司), 离心机 (德国 Thermo Scientific Heraeus 公司), 全自动生化仪 (德国罗氏公司), Spectra Maxi3x 酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司), NanoDrop 1000 超微量分光光度计 (美国 Nanodrop 公司) 等。

2 实验方法

2.1 NAFLD 大鼠造模方法 参照杨坤等人方法^[6]改

良高糖高脂饲料(配方为:基础饲料 67.5%、猪油 10%、蔗糖 10%、蛋黄粉 10%、食盐 1%、胆固醇 1%、胆酸钠 0.5%)复制 NAFLD 大鼠^[7]。

2.2 分组及给药^[7] 根据随机数字表法进行随机分组。首先,随机选取 10 只大鼠为空白对照组,予正常饲料喂饲;剩余 20 只大鼠使用高糖高脂饲料造模(造模组)。造模组喂养第 31 天时,空白对照组与造模组各随机取 2 只大鼠处死,行肝脏病理学检测,以确认造模成功。确认造模成功后,造模组所剩 18 只大鼠,再次随机分为模型组(M 组)及治疗组(Z 组),每组各 9 只,均继续予以高糖高脂饲料,连续 60 d。同时 Z 组根据 10.86 g/kg 的生药量灌胃给药(按照大鼠与人的体表面积比例进行剂量换算),每日给药 1 次,连续 60 d;M 组给予相应体积的蒸馏水灌胃,每日 1 次,连续 60 d。

2.3 观察指标

2.3.1 空腹血糖、胰岛素及胰岛素敏感性、HOMA-IR 第 60 天时,M 组及 Z 组大鼠均禁食 12 h,鼠尾静脉取血,使用全自动生化仪及葡萄糖测定试剂盒检测空腹血浆葡萄糖水平;眼底静脉丛取血,再使用离心机分离血清,使用胰岛素 ELISA 测定试剂盒检测空腹胰岛素含量;胰岛素敏感性=1/[空腹血糖(mmol/L)×空腹胰岛素(mIU/L)],HOMA-IR=[空腹血糖(mmol/L)×空腹胰岛素(mIU/L)]/22.5^[2]。

2.3.2 肝脏脂质沉积 M 组及 Z 组大鼠剖腹取肝右叶及左叶部分新鲜肝组织进行冷冻切片,厚度 7 μm,风干,10%中性甲醛溶液固定,水洗,密封容器内稀释,油红 O 染色,60%乙醇分色;二次水洗后苏木精淡染细胞核,1%磷酸氢二钠冲洗,甘油明胶封固。

2.3.3 大鼠肝脏组织 mRNA 表达情况^[8] 根据随机数字表法随机选取 M 组中 3 只大鼠及 Z 组中 3 只大鼠进行进行肝组织 mRNA 表达谱芯片检测。实验标本取材均为实验动物肝右叶部分肝组织。

(1)RNA 质检方法

使用 NanoDrop ND-1000 测定吸光度以检验 RNA 样品的纯度,质检标准为:A260/A230≥1.5 同时 A260/A280≥1.8,以排除样品中存在蛋白、酚类物质、芳香基团、硫氰酸盐及其他有机物质的污染。RNA 完整值(RNA integrity number,RIN)以 RNA

6000 nano assay 试剂盒检测,质检标准为 RIN>6。基因组 DNA(genomic DNA,gDNA)的污染情况则通过凝胶电泳判断。

(2)样本制备质控方法

使用 AM1753 试剂盒获得氨基-烯丙基反义 RNA(aa-aRNA),RNA(aa-aRNA)与 NHS-CyDye(Cy5)完成荧光标记与纯化后进行芯片杂交。质控方法:aa-aRNA 符合定量分析相关要求;同时每 1000 个核苷酸中,Cy5 的标记效率应大于 15 个染料分子以上。

(3)芯片杂交质控方法

①平均背景强度: Cy5 以 B635 Median 表示,以 Cy5<400 为合格。

②内部杂交控制探针(IHCs):以 IHC>37 500 为合格。

③外部质控探针(ETQC probes & Spike-ins):利用 ETQC 外部质控探针合成 spike-ins 序列。设计低、中、高三个浓度,依 spike-ins 浓度,ETQC 探针分别呈现理想的高、中、低讯号监控杂交特异性。

④背景噪音:使用 48 个阴性控制探针监测非特异性杂交,并使用 Rosetta Resolver 软件进行计算,信号强度>400 的阴性探针个数应当小于 10 个。

⑤样本制备完整性:使用 ITQC 4,5,6 探针监测样本制备的完整性,应至少 2 组 ITQC 探针满足基因完整性的相关要求。

(4)基因芯片数据分析方法

将 GPR 文档加载到 Limma(Bioconductor)软件中进行分析。

①合并重复探针:将每张芯片上相同序列的探针为重复探针,取平均值。

②讯号均一化:去除 flagged probes 及控制探针后,对检出的探针讯号进行中位数平移。

③差异基因标准: $\log_2 |\text{Fold change}| \geq 1$ 同时 $P < 0.05$ 。

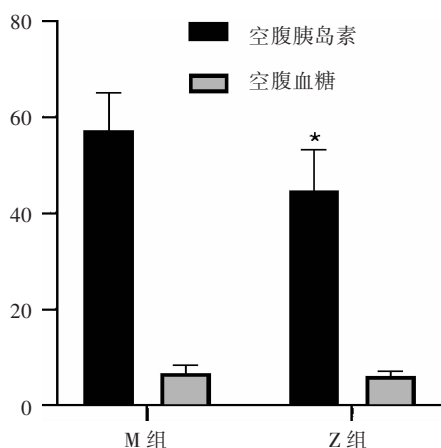
④功能富集分析:生物途径(Pathway)富集分析及基因本体(Gene Ontology,GO)分析程序使用 Bioconductor 网站的 clusterProfiler 软件进行,并与《京都基因与基因组百科全书》(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)数据库进行对比。

2.4 统计学处理 定量资料统计方法: 采用 SPSS 20.0 软件进行分析, 定量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 进行独立样本 t 检验; 基因差异表达 P 值计算方法为: 基因芯片讯号进行线性模型校正(Fit linear model), 再使用经验贝叶斯统计(Empirical Bayes Statistics)计算。以上均以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

基因差异聚类分析方法为: 芯片讯号值经数据 log 转换及平均数中心化后, 采用无监督层次聚类(unsupervised hierarchical clustering analysis)分析实验样本间整体基因表达的相似性。

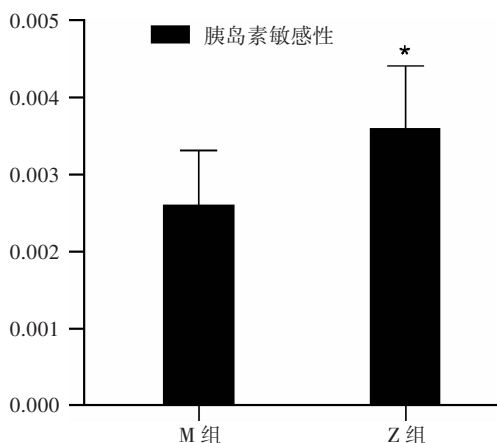
3 结果

3.1 空腹胰岛素与空腹血糖水平 Z 组与 M 组比较, 2 组空腹血糖水平无明显变化, 但 Z 组空腹胰岛素水平降低($P < 0.05$)。见图 1。



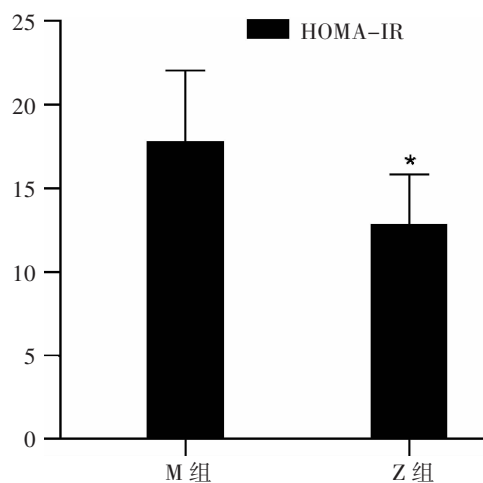
注: 与模型组比较, $*P < 0.01$; 胰岛素单位为 mIU/L, 血糖单位为 mmol/L

图 1 健肝消脂方对空腹胰岛素空腹血糖的影响



注: 与模型组比较, $*P < 0.05$

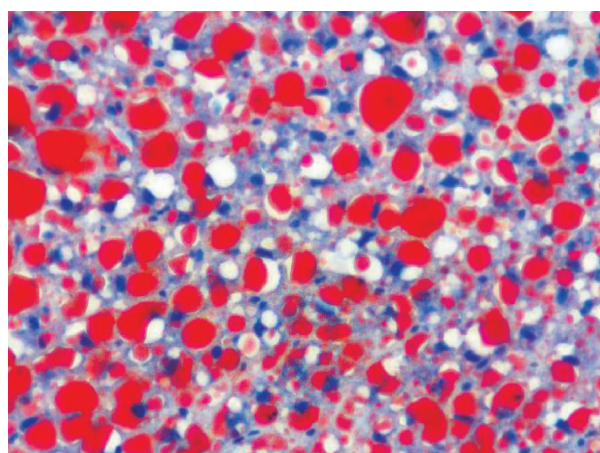
图 2 健肝消脂方对胰岛素敏感性的影响



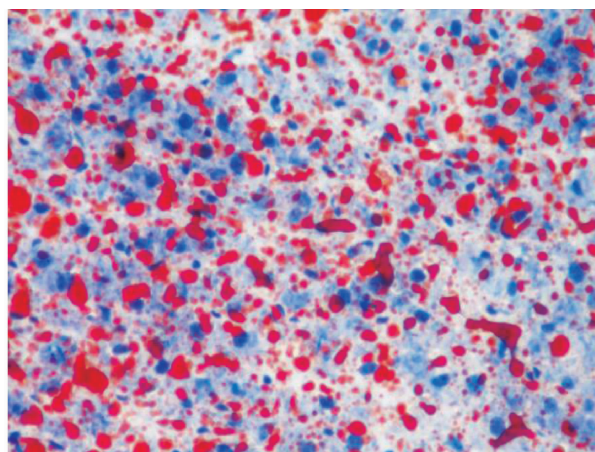
注: 与模型组比较, $*P < 0.05$

图 3 健肝消脂方对 HOMA-IR 的影响

3.2 肝脏脂质沉积情况 经油红 O 及苏木精染色后, 可见治疗组肝脏内大脂滴明显减少, 肝脏脂质沉积明显改善。见图 4。



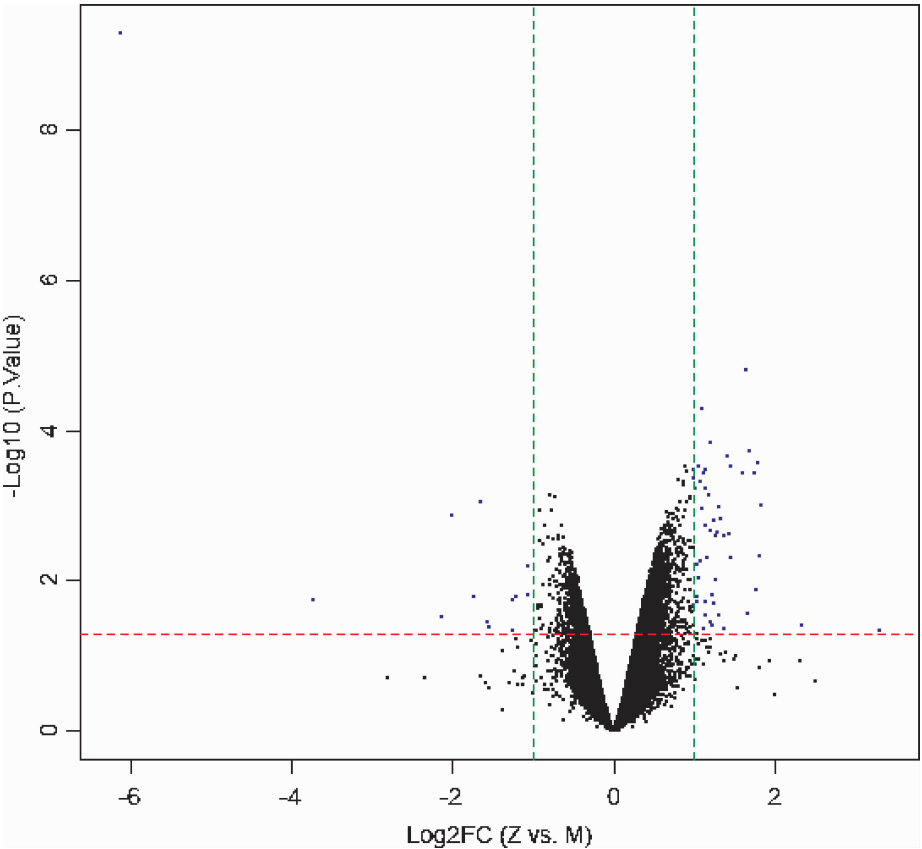
M 组



Z 组

图 4 健肝消脂方对肝脏组织脂质沉积的影响
(油红 O 及苏木精染色 $\times 40$)

3.3 基因差异表达分析结果 Z 组与 M 组比较肝脏 mRNA 表达存在明显差异,其中上调的基因有 52 个,下调的基因有 13 个,差异表达基因共 65 个。见图 5 及表 1。



注:差异表达基因的筛选阈值为 |Fold change| ≥ 1 且 P < 0.05,差异探针标示为蓝色点

图 5 mRNA 差异表达的火山图

表 1 Z 组和 M 组差异表达的 mRNA(各前 10 位)

Entrez 基因		基因符号	Z 组与 M 组比较		Entrez 基因		基因符号	Z 组与 M 组比较	
(Entrez gene ID)	(Gene symbol)		logFC	P 值	(Entrez gene ID)	(Gene symbol)		logFC	P 值
上调的前十个基因					下调的前十个基因				
1	309526	Ifit3	1.4629	0.0003	1	367746	LOC367746	-1.245	0.018
2	293624	Irf7	1.7541	0.0004	2	79220	Grid2	-1.572	0.036
3	690845	Ftps4y2	1.3783	0.0025	3	360967	Rnf185	-6.13	5E-10
4	298590	Klhdc7a	1.2132	0.0363	4	362039	Pla2g12a	-1.655	0.0009
5	362376	Herc6	1.4176	0.0002	5	308016	Cica5	-3.728	0.0183
6	65030	Ephx2	1.1217	0.0004	6	360718	Popdc2	-1.065	0.0155
7	316290	Ogfrll	1.0404	0.019	7	24314	Nqol	-1.731	0.0167
8	288053	Ropn1	1.0003	0.0003	8	24326	Ednra	-1.551	0.042
9	25748	Alas2	1.0615	0.0095	9	24443	Hdc	-2.004	0.0013
10	287699	Krt13	1.1449	0.0291	10	24684	Prlr	-2.136	0.0305

注:FC 为基因表达改变(fold change)的简写,logFC 为 FC 的对数值

3.4 聚类分析结果 以差异表达基因探针筛选出的前 65 基因探针进行聚类分析,可见 M 组与 Z 组基因表达有明显差别。见图 6。

3.5 功能富集分析结果

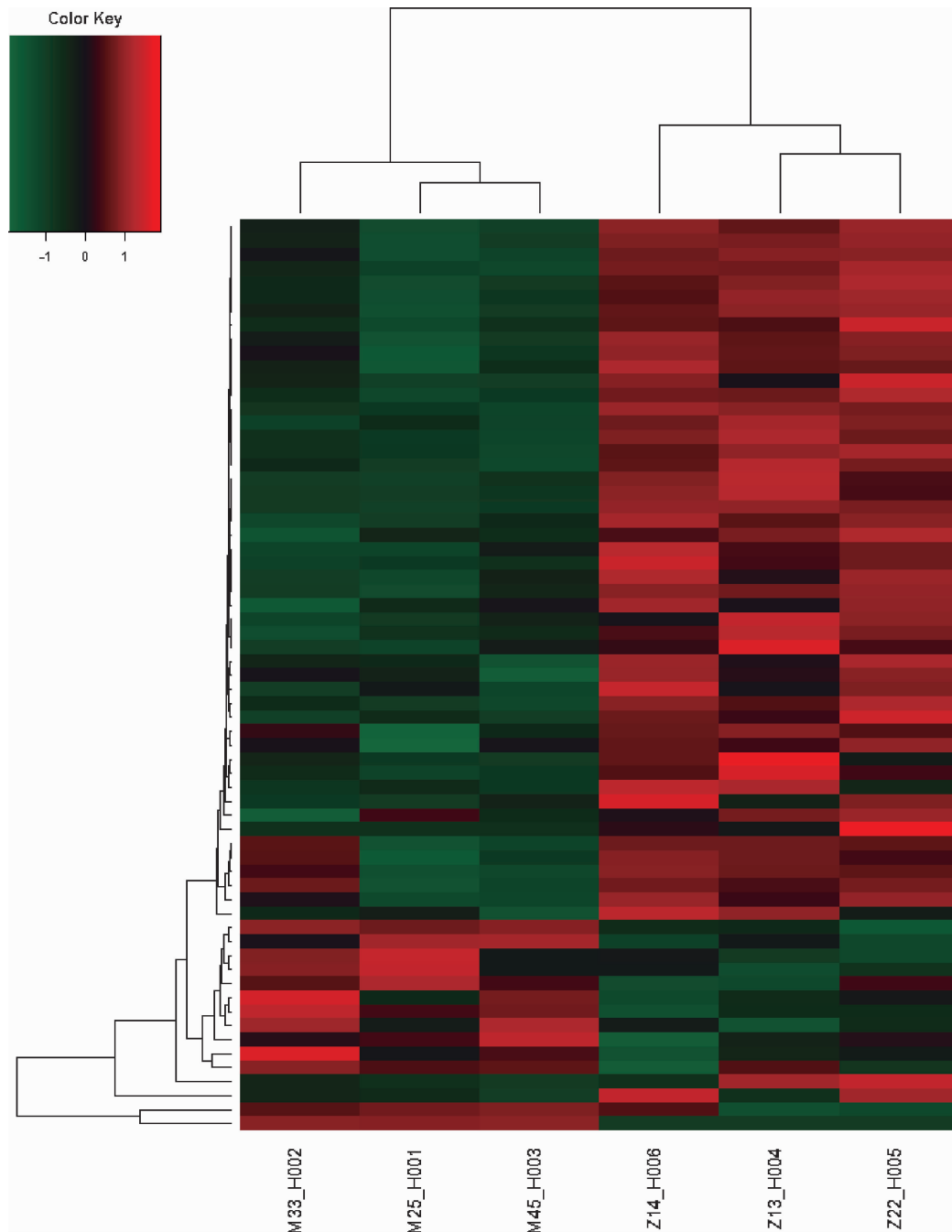
3.5.1 生物途径(pathway)富集分析结果 见表 2。

3.5.2 基因本体(GO)富集分析结果

(1)GO 分子功能(molecular function)富集结果见表 3。

(2)GO 生物过程(biological process)富集结果见表 4。

(3)GO 细胞成分(cellular component)富集结果见表 5。



注:图中每一行为一张芯片,每一列为一个基因探针。红绿色阶标示了探针讯号上/下调的变化幅度。线的长度则代表距离指标,同簇样本或基因的相似性高(模式相近)

图 6 基因差异表达的 mRNA 聚类分析图

表 2 排序前十的生物途径(pathway)富集结果

ID	说明(Description)	数量(Count)	P 值
rno04620	Toll-like receptor signaling pathway	4	0.00031455
rno05160	Hepatitis C	4	0.001055577
rno04622	RIG-I-like receptor signaling pathway	3	0.001515535
rno04010	MAPK signaling pathway	4	0.014980719
rno04080	Neuroactive ligand-receptor interaction	4	0.017966521
rno04730	Long-term depression	2	0.026960561
rno04370	VEGF signaling pathway	2	0.029843704
rno04664	Fc epsilon RI signaling pathway	2	0.030583123
rno00590	Arachidonic acid metabolism	2	0.031329879
rno04912	GnRH signaling pathway	2	0.049499872

表 3 GO(molecular function)富集结果

ID	说明(Description)	数量(Count)	P 值
GO:0016597	amino acid binding	3	0.001668767
GO:0003725	double-stranded RNA binding	3	0.001879496
GO:0043177	organic acid binding	4	0.004522205
GO:0036094	small molecule binding	14	0.017360591
GO:0000979	RNA polymerase II core promoter sequence-specific DNA binding	2	0.021872032
GO:0042802	identical protein binding	11	0.028945788
GO:0042562	hormone binding	2	0.031496644
GO:0043168	anion binding	14	0.044046566

表 4 排序前十的 GO(biological process)富集结果

ID	说明(Description)	数量(Count)	P 值
GO:0009607	response to biotic stimulus	17	5.26262E-9
GO:0009615	response to virus	10	1.23738E-8
GO:0043207	response to external biotic stimulus	16	2.39631E-8
GO:0051704	multi-organism process	23	4.68477E-8
GO:0009605	response to external stimulus	24	4.95719E-8
GO:0045071	negative regulation of viral genome replication	5	1.99411E-7
GO:0006950	response to stress	28	4.90192E-7
GO:0006952	defense response	16	1.86276E-6
GO:0045069	regulation of viral genome replication	5	3.69561E-6
GO:0019079	viral genome replication	5	1.09489E-5

表 5 GO(cellular component)富集结果

ID	说明(Description)	数量(Count)	P 值
GO:0031975	envelope	9	0.004473651
GO:0019867	outer membrane	3	0.015782506

4 讨论

研究结果显示,虽然健肝消脂方对高糖高脂饲料诱导的 NAFLD 大鼠模型空腹血糖没有明显影响,但是该方可以明显降低空腹胰岛素,改善胰岛抵抗,并可改善肝脏脂质沉积,其作用机制可能与肝脏基因表

达有关。

根据肝脏 mRNA 差异表达的功能富集分析及基因本体(GO)富集可知,健肝消脂方可以通过影响生物途径(pathway)及 GO 分子功能(molecular function)、GO 生物过程(biological process)、GO 细胞成分(cellular component)改善 NAFLD 的病理生理过程。

在排序前十的生物途径富集结果中,Toll 样受体与 NAFLD 密切相关,通过调节 Toll 样受体信号通路(Toll-like receptor signaling pathway),可以减轻高胰岛素血症,但未能明显降低血糖水平,同时可减轻肝组织纤维化^[9],此外还可影响肝细胞脂质沉积^[10]。丙型肝炎病毒(Hepatitis C)感染会增加胰岛素抵抗的患病率^[11],而丙肝的抗病毒治疗则可以改善非糖尿病、瘦型慢性丙型肝炎患者的外周胰岛素敏感性^[12],同时丙型肝炎患者若出现肝细胞脂肪变性,则更容易发生肝纤维化^[13]。维甲酸诱导基因 I(retinoic acid-induced gene I,RIG-I)样受体信号通路(RIG-I-like receptor signaling pathway)的泛素化修饰可激活干扰素调节因子(interferon regulatory factor,IRF)/核因子 κ B(nuclear factor kappa B,NF- κ B)信号通路^[14]。再根据肥胖动物模型的肝脏中 IRF3 的表达下降,而敲除 IRF3 后肥胖动物模型易于出现胰岛素抵抗及脂肪变性,以及其他学者已证实经肝脏过量表达 IRF3 的实验动物可保持葡萄糖和脂质稳态,我们可以推测 RIG-I 样受体信号通路可能通过激活 IRF3 而改善 IR。IRF3 还可以抑制 NF- κ B 的活性^[15],而 NF- κ B 活性的抑制则是改善 IR 的潜在分子途径^[16]。此外,RIG-I 可以激活干扰素 β (interferon β ,IFN β)^[17],而已有实验研究证实干扰素 β -1a 对肝纤维化模型大鼠的肝纤维化程度有明显的抑制作用^[18]。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK)信号通路(MAPK signaling pathway)是 IR 的经典信号转导途径之一^[19],并参与了肝纤维化的进程^[20],还与肝细胞脂质沉积密切相关^[21]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)信号通路(VEGF signaling pathway)与脂质的代谢关系密切,在改善胰岛素抵抗方面具有重要作用^[22]。VEGF 活性的降低,又可能与抗肝纤维化血管新生有关^[23]。并已有研究证实 VEGF 基因 rs833061、rs3025039 位

点多态性与 NAFLD 的发病有关^[24]。花生四烯酸(arachidonic acid,AA)对胰岛 β 细胞合成及分泌胰岛素具有双向调节作用^[25],同时 AA 及其代谢产物对 NAFLD 的脂质沉积及肝纤维化均有影响^[26]。

在 GO 分子功能方面,上调的 IRF7 可能与 Toll 样受体信号通路有关^[27]。而 Toll 样受体富含亮氨酸^[28],因此 GO 分子功能富集中的 GO:0016597(amino acid binding)可能也与 Toll 样受体信号通路相关。在 GO 生物过程方面,富集排序前十中的 GO:0006952(defense response)可能与 MAPK 信号通路有关^[29];鉴于众所周知病毒复制与丙型肝炎病毒密切相关,因此 GO 生物过程排序前十中的 GO:0045069(regulation of viral genome replication)、GO:0019079(viral genome replication)可能均对丙型肝炎病毒有影响。在 GO 细胞成分方面,GO:0019867(outer membrane)也可能与丙型肝炎病毒有关^[30]。

健肝消脂方由丹参、三七、莪术、山楂、黄芪、青皮、赤芍、姜黄、菊花、荷叶、甘草等构成,具有行气消滞、活血化瘀之功^[7]。方中丹参可能对 VEGF 信号通路^[31]、MAPK 信号通路^[32]、Toll 样受体信号通路^[33]均有影响,三七可能对 VEGF 信号通路有影响^[34],莪术可能对 VEGF 信号通路、MAPK 信号通路^[35]均有影响,黄芪可能对 VEGF 信号通路^[36]有影响,赤芍可能对 Toll 样受体信号通路^[37]、MAPK 信号通路^[38]均有影响,姜黄可能对 VEGF 信号通路^[39]、MAPK 信号通路^[40]均有影响,荷叶可能对 VEGF 信号通路有影响^[41]。

Toll 样受体信号通路、丙型肝炎病毒、RIG-I 样受体信号通路、MAPK 信号通路、VEGF 信号通路、花生四烯酸代谢均与 IR、肝内脂质沉积有关,同时可能对肝纤维化有影响,其中 Toll 样受体信号通路与上调的 IRF7 基因、GO 分子功能富集的 GO:0016597 有关,而 MAPK 信号通路与 GO 生物过程富集的 GO:0006952 有关。而对现有单味药相关研究进行分析可知丹参、三七、莪术、黄芪、姜黄、荷叶均可能影响 VEGF 信号通路,丹参、莪术、赤芍、姜黄均可能影响 MAPK 信号通路,丹参、赤芍均可能影响 Toll 样受体信号通路。因此 VEGF 信号通路、MAPK 信号通路、Toll 样受体信号通路可能是健肝消脂方干预 NAFLD 的主要分子信号通路。而 c-Jun N-末端激酶(c-Jun N-terminal kinase,JNK)作为 MAPK 家族中的重要一

员,JNK 相关通路值得进行深入研究。

另一方面,肝脏受损时,可能导致胰岛素分泌增多、胰岛素降解减少,易于导致 HIS,而且 HIS 的持续存在可能还是肝脏损伤时 IR 的重要病因之一^[42],因此降低空腹胰岛素水平可能在改善 NAFLD 的 IR 中具有特殊意义;我们的研究则提示了健肝消脂方降低空腹胰岛素水平疗效良好,同时其影响的多个生物途径可能与肝纤维化有关,而目前已有研究证实空腹胰岛素水平是 NAFLD 肝纤维化的独立预测因子之一^[43],据此推测该方可能对肝纤维化治疗有益。最后,该方还在生物途径、GO 生物过程、GO 细胞成分方面影响了丙型肝炎病毒,据此推测该方可能对于丙型肝炎合并 NAFLD 的患者有益。但上述推测仍待进一步的相关研究证实。

5 结论

综上所述,健肝消脂方可以改善 IR 及肝脏脂质沉积,其作用机制与肝脏基因表达及相关基因功能有关。其分子机制可能是该方能够调节干扰素调节因子(IRF)7、GO 分子功能 GO:0016597、GO 生物过程 GO:0006952,并影响了 MAPK 信号通路、VEGF 信号通路、Toll 样受体信号通路。同时健肝消脂方可能在分子层面对肝纤维化、丙型肝炎病毒在肝脏内的复制等产生一定影响。另一方面,本研究虽然在寻找中医药治疗 NAFLD 的基因靶点方面进行了尝试,初步探讨了健肝消脂方可能影响的相关肝脏基因,但由于 NAFLD 是一个与遗传、环境、代谢等多方面有关的复杂疾病,今后仍有待围绕已知差异表达基因,扩大样本量,进一步分析健肝消脂方治疗 NAFLD 的基因靶点。

参考文献:

- [1] 葛均波,徐永健,王辰. 内科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2018:391-392,766-767.
- [2] 李秀钧. 代谢综合征(胰岛素抵抗)[M]. 北京:人民卫生出版社,2007:50,80-81.
- [3] 张军汉,傅国琴,翟惠虹,等. 血糖正常者非乙醇性脂肪肝与高胰岛素血症的相关性 [J]. 第四军医大学学报, 2006,27(6):524-526.
- [4] 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 更新版)[J]. 中华肝脏病杂志,2018,26(3):195-203.
- [5] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2017 年版)[J]. 中华糖尿病杂志,2018,10(1):4-67.
- [6] 杨坤,胡克章,黄正明,等. 高糖高脂肪饲料诱导大鼠非酒精性脂肪性肝病模型的动态研究 [J]. 解放军药科学学报, 2010,26(6):509-512.
- [7] 陈烁. 基于 ROS 探讨健肝消脂方调节 IR 改善 NAFLD 的机制[D]. 昆明:云南中医药大学,2019.
- [8] 刘蓓. 新型查耳酮衍生物 MW-9 抗实验性自身免疫性脑脊髓炎的作用及机理研究 [D]. 昆明:云南中医药大学, 2019.
- [9] 陈杰,张晶,何秋水. Toll 样受体在非酒精性脂肪性肝病发生发展中的作用 [J]. 临床肝胆病杂志,2015,31(7): 1153-1155.
- [10] KWON E Y, CHOI M S. Luteolin targets the toll-like receptor signaling pathway in prevention of hepatic and adipocyte fibrosis and insulin resistance in diet-induced obese mice[J]. *Nutrients*,2018,10(10):1415.
- [11] DESBOIS A C, CACOUB P. Diabetes mellitus, insulin resistance and hepatitis C virus infection:A contemporary review [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2017,23(9):1697-1711.
- [12] GASTALDI G, GOMES D, SCHNEITER P, et al. Treatment with direct-acting antivirals improves peripheral insulin sensitivity in non-diabetic, lean chronic hepatitis C patients [J]. *PLoS One*,2019,14 (6): e0217751.
- [13] BONDINI S, YOUNOSSI Z M. Non-alcoholic fatty liver disease and hepatitis C infection [J]. *Minerva Gastroenterol Dietol*,2006,52(2):135-143.
- [14] 丁汝璇. RIG-I 样受体信号通路及其调控研究综述[J]. 中外医学研究,2019,17(14):184-186.
- [15] 余美霞,刘迅,杜柳涛,等. 经典途径 IKK α 和 IKK β 在胰岛素抵抗和 2 型糖尿病中的作用机制及药物治疗[J]. 中国新药杂志,2017,26(5):535-541.
- [16] 陈丽,陈瑞,梁凤霞,等. NF- κ B 信号通路与胰岛素抵抗 [J]. 华中科技大学学报(医学版),2015,44(5):608-611.
- [17] LAFYATIS R, FARINA A. New insights into the mechanisms of innate immune receptor signalling in fibrosis[J]. *Open Rheumatology Journal*,2012,6(1):72-79.
- [18] 王妍,林孝发,张微微,等. 重组人干扰素 β -1a 注射液对大鼠肝纤维化模型的治疗作用 [J]. 长春中医药大学学报,2015,31(5):904-907.

- [19] YEE H Y, 杨晶晶, 万毅刚, 等. 胰岛素抵抗的分子机制及中药的干预作用 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(7): 1289-1294.
- [20] 孙雪梅, 黄秀昆, 朱勋帅, 等. 基于 MAPK 信号通路研究 4-羟基苯并恶唑-2-酮抗肝纤维化的作用机制 [J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39(1): 25-28.
- [21] WANG T, TAKIKAWA Y, SATOH T, et al. Carnosic acid (CA) prevents lipid accumulation in hepatocytes through the EGFR/MAPK pathway [J]. Journal of Gastroenterology, 2012, 47(7): 805-813.
- [22] 孙洁, 王一民, 廖琳. VEGF-B 与 2 型糖尿病相关性研究进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(6): 58-60.
- [23] 陈兰羽, 马继征, 刘咏梅, 等. 基于 HIF-1 α 介导的 VEGF mRNA 表达探讨膈下逐瘀汤抗肝纤维化血管新生的机制 [J]. 中草药, 2019, 50(2): 449-456.
- [24] 王倩, 吴鹏波, 李明, 等. VEGF 基因多态性及吸烟在诱发非酒精性脂肪肝中的交互作用 [J]. 山东医药, 2016, 56(8): 7-9.
- [25] 叶小珍, 邵加庆, 王坚. 花生四烯酸及其代谢产物在胰岛 β 细胞功能及胰岛素抵抗中的作用 [J]. 中国全科医学, 2009, 12(2): 160-162.
- [26] 章烁, 阳学风. 花生四烯酸氧化应激与非酒精性脂肪性肝病的研究进展 [J]. 中国现代医生, 2013, 51(34): 19-22.
- [27] HONDA K, YANAI H, MIZUTANI T, et al. Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-Like receptor signaling [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(43): 15416-15421.
- [28] BELL J K, MULLEN G E, LEIFER C A, et al. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors [J]. Trends in Immunology, 2003, 24(10): 528-533.
- [29] INOUE H, HISAMOTO N, AN J H, et al. The C. elegans p38 MAPK pathway regulates nuclear localization of the transcription factor SKN-1 in oxidative stress response [J]. Genes Dev, 2005, 19(19): 2278-2283.
- [30] LIN R, LACOSTE J, NAKHAEI P, et al. Dissociation of a MAVS/IPS-1/VISA/Cardif-IK ϵ molecular complex from the mitochondrial outer membrane by hepatitis C virus NS3-4A proteolytic cleavage [J]. Journal of Virology, 2006, 80(12): 6072-6083.
- [31] 丁罡, 宋明志, 于尔辛. 丹参、赤芍对大鼠 Walker 256 癌肝转移影响机制的研究 [J]. 中国癌症杂志, 2001, 11(4): 364-366.
- [32] 李琦, 王炎, 范忠泽, 等. 丹参酮 II A 及其纳米粒诱导肝癌细胞凋亡及对 p38 MAPK、TGF β 1 信号蛋白表达的影响 [J]. 肿瘤, 2008, 28(1): 8-12.
- [33] 王喜福, 叶明, 颜东, 等. 丹参多酚酸盐对急性心肌梗死 PCI 术后 CD14+ 单核细胞活性氧和 Toll 样受体的影响 [C]// 2014 年中华中医药学会急诊分会年会暨急诊医学培训班论文集. 北京: 中华中医药学会急诊分会, 2014.
- [34] 张金生, 何庆勇. 三七总皂苷对不同时点心肌梗死大鼠心肌 VEGF、bFGF 蛋白表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(11): 1496-1499.
- [35] 李宝石, 夏宁俊, 朱超林. 中药莪术对肿瘤相关信号通路影响研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(2): 188-191.
- [36] 沈洪, 刘增巍, 张坤, 等. 黄芪对 SGC7901 胃癌细胞 COX-1、COX-2、VEGF 和 PGE₂ 表达的影响 [J]. 肿瘤, 2007, 27(3): 194-198.
- [37] 张海燕, 刘忠锦, 陈志伟. 赤芍总苷对 D-半乳糖诱导衰老大鼠脑组织 TOLL 受体和 IL-33 的实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(6): 830-833.
- [38] 詹丽英, 夏中元, 夏芳, 等. p38MAPK/iNOS/HO-1 信号通路在赤芍减轻大鼠内毒素性急性肺损伤中的作用 [J]. 中华麻醉学杂志, 2009, 29(3): 258-261.
- [39] 唐春兰, 杨和平, 李剑明, 等. 姜黄素 III 对 A549 裸鼠移植瘤 VEGF 蛋白表达的影响 [J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(9): 831-833.
- [40] 陈茜, 陈丽娟, 党媛媛, 等. 姜黄素通过阻滞 MAPK/ERK 通路抑制人子宫内膜癌 HEC-1-B 细胞的侵袭转移 [J]. 山西医科大学学报, 2015, 46(8): 762-768.
- [41] 张雪梅. 荷叶生物碱对人主动脉内皮细胞 VEGF-A 表达及功能的影响 [D]. 东莞: 广东医学院, 2016.
- [42] 廖二元. 内分泌代谢病学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 1004-1005.
- [43] CANSANÇÃO K, SILVA M L, CARVALHO L N, et al. Advanced liver fibrosis is independently associated with palmitic acid and insulin levels in patients with non-alcoholic fatty liver disease [J]. Nutrients, 2018, 10(11): 1586.