

• 实验研究 •

川陈皮素对非酒精性脂肪性肝病大鼠肝细胞凋亡的影响*

石安华^{1,2}, 范英昌¹, 姚政², 武俊紫², 何朋伦², 王维², 周青丽², 陈文慧^{2Δ}

(1. 天津中医药大学, 天津 300193; 2. 云南中医药大学, 云南 昆明 650500)

摘要: **目的** 从肝细胞凋亡途径研究川陈皮素对非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 大鼠的保护作用。**方法** 适应性喂养 2 周后, 72 只 SD 大鼠随机分成 6 组, 分别为正常对照组、模型组、阳性药物水飞蓟素片治疗组 (14 mg/kg), 以及川陈皮素低 (100 mg/kg)、中 (200 mg/kg)、高剂量 (400 mg/kg) 组, 高脂高糖饮食 8 周构建 NAFLD 模型, 治疗 6 周后, HE 染色观察肝脏病理变化, 计算肝指数, 取血清检测 ALT、AST、TC、TG、LDL-C、HDL-C、IL-1a、IL-1b 和 IL-6 的含量, Western blot 和 qRT-PCR 法测定肝组织 TNF- α 、TNFR-1、Fas、FasL、Caspase-8、Caspase-3、Bcl-2 和 Bax 的蛋白及 mRNA 表达水平。**结果** 正常组大鼠精神活跃, 模型组在造模成功后精神萎靡, 水飞蓟素片治疗组以及川陈皮素低、中、高剂量组相较于模型组有一定好转。与正常组相比, 模型组大鼠肝湿重、肝指数、ALT、AST、TG、TC、LDL-C、IL-1a、IL-1b、IL-6 明显升高 ($P < 0.05$), HDL-C 明显降低 ($P < 0.05$); 相较于模型组, 水飞蓟素片治疗组及川陈皮素低、中、高剂量组肝湿重、肝指数、ALT、AST、TG、TC、LDL-C、IL-1a、IL-1b、IL-6 明显降低 ($P < 0.05$), HDL-C 明显升高 ($P < 0.05$); 此外川陈皮素高剂量组肝指数、ALT、AST、IL-1a、IL-1b、IL-6 明显低于水飞蓟素片治疗组 ($P < 0.05$); 川陈皮素中剂量和高剂量组 TG、TC、LDL-C 明显低于水飞蓟素片治疗组 ($P < 0.05$), 中剂量和高剂量组 HDL-C 明显高于水飞蓟素片治疗组 ($P < 0.05$), 体重各组间没有明显差异。与正常组相比, 模型组 TNF- α 、TNFR-1、FasL、Fas、Bax、Caspase-8、Caspase-3 蛋白和 mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.05$), Bcl-2 蛋白和 mRNA 表达明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 水飞蓟素片治疗组、川陈皮素低、中、高剂量组 TNF- α 、TNFR-1、FasL、Fas、Caspase-8、Caspase-3 蛋白和 mRNA 表达明显降低 ($P < 0.05$), 水飞蓟素片治疗组、川陈皮素低、中、高剂量组 Bcl-2 表达明显升高 ($P < 0.05$)。**结论** 川陈皮素对高脂饮食诱导的非酒精性脂肪性肝病大鼠肝脏具有明显的保护作用, 其作用途径可能与川陈皮素调节凋亡相关蛋白表达, 降低炎症反应有关。

关键词: 川陈皮素; 非酒精性脂肪性肝病; 大鼠; 凋亡相关蛋白

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2019)03-0001-09

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2019.03.001

The Effect of Nobiletin on Hepatocyte Apoptosis in Rat Model of Non-alcoholic Fatty Liver Disease

SHI Anhua^{1,2}, FAN Yingchang¹, YAO Zheng², WU Junzi², HE Penglun²,
WANG Wei², ZHOU Qingli², CHEN Wenhui²

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin, 300193, China;

2. Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

ABSTRACT: **Objective** To study the protective effect of nobiletin on hepatocyte apoptosis in rat model of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Methods** 72 SD rats were randomly divided into 6 groups: the control group, model group, positive drug silymarin treatment group (14 mg/kg), and nobiletin low dose (100 mg/kg), medium dose (200 mg/kg) and high dose (400 mg/kg) treatment groups. NAFLD rat model was established by high-fat diet for 8 weeks followed by 6 weeks of

收稿日期: 2019-04-20

* 基金项目: 国家自然科学基金地区基金项目(81760818); 云南省中医药学分子生物学重点实验室资助

第一作者简介: 石安华(1977-), 男, 副教授, 在读博士研究生, 主要研究方向: 中西医结合防治肝病基础研究。

Δ通信作者: 陈文慧, E-mail: cwh6581908@126.com

treatment. After scarification the liver pathology was evaluated by HE staining, liver index was calculated, and serum levels of ALT, AST, TC, TG, LDL-C, HDL-C, IL-1a, IL-1b and IL-6 were measured. Protein expression and mRNA levels of TNF- α , TNFR-1, Fas, FasL, caspase-8, caspase-3, Bcl-2 and Bax in liver tissue were detected by Western Blot and qRT-PCR. **Results** Compared with the control group, rats in model group were apathetic, and rats in the silymarin group, low dose, medium dose and high dose nobiletin groups were obviously alleviated. In the model group, increase of the liver wet weight, liver index, ALT, AST, TG, TC, LDL-C, IL-1a, IL-1b and IL-6, also decrease of HDL-C ($P<0.05$) was observed. Compared with the model group, the liver wet weight, liver index, ALT, AST, TG, TC, LDL-C, IL-1a, IL-1b and IL-6 in the silymarin group and the low dose, medium dose and high dose nobiletin groups were significantly decreased ($P<0.05$) along with significant increase of HDL-C ($P<0.05$). In addition, the liver index, ALT, AST, IL-1a, IL-1b and IL-6 in the high dose nobiletin group were significantly lower than that of the silymarin group ($P<0.05$), and the TG, TC and LDL-C in the middle dose and high dose nobiletin groups were significantly lower than that of the silymarin group ($P<0.05$), while HDL-C in the middle dose and high dose nobiletin groups were significantly higher than that of the silymarin group ($P<0.05$). There were no significant difference in the body weight. In the model group, TNF- α , TNFR-1, FasL, Fas, Bax, caspase-8 and caspase-3 protein and mRNA levels were significantly increased ($P<0.05$), and Bcl-2 protein and mRNA levels were significantly declined ($P<0.05$). Compared with the model group, the TNF- α , TNFR-1, FasL, Fas, caspase-8 and caspase-3 protein and mRNA levels were significantly decreased in the silymarin and the low dose, medium dose and high dose nobiletin groups ($P<0.05$), and the expression of Bcl-2 in the silymarin treatment group and the low dose, medium dose and high dose nobiletin groups were significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion** The nobiletin has obvious protective effect on the NAFLD rats induced by high-fat diet, and the mechanism of action was attribute to the inhibition of nobiletin in apoptosis-related proteins expression and inflammatory response.

KEY WORDS: Nobiletin; nonalcoholic fatty liver disease; rat; apoptosis-related protein

当前随着我国社会经济的发展和人们运动量的相对减少,非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease,NAFLD)的发生率逐年升高^[1]。有研究显示,在我国NAFLD已经成为仅次于病毒性肝炎的第2大疾病^[2]。NAFLD临床中主要表现为肝脏脂肪颗粒的过量聚集,此时需积极控制,如若控制不佳,可造成肝纤维化、肝硬化甚至肝癌的发生,而在上述的发生和进展过程中,肝细胞凋亡伴随其中^[3]。目前西医疗本病并没有特效药,近年来国内外学者采用传统中医药治疗NAFLD发现独特的优势^[4],但是中医药汤剂在治疗本病时存在有效药理成分不明确的问题,因此采用中药单体治疗NAFLD是当前研究的热点。目前的研究显示,多种中医药单体在调节NAFLD血脂、改善肝功能方面具有独特的优势,特别是黄酮类化合物^[5-6]。川陈皮素(nobiletin)是从中药陈皮中提取的一类多甲氧基黄酮类化合物,其在抗氧化、改善记忆、抗癌等多种慢性疾病治疗方面已有众多的研究报道^[7-8]。但其对NAFLD的治疗作用还缺少相关研究证实,本实验通过复制NAFLD大鼠模型,探讨川陈皮素治疗后大鼠肝细胞凋亡相关基因表达特点,以进一步明确川陈皮素治疗NAFLD的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物、饲料和垫料

健康清洁级SD大鼠

72只,6周龄,体质量160~180g,由昆明医科大学动物实验中心提供(动物合格证号为:SYXK(滇)2011-004)。购买后饲养于云南中医药大学动物实验部,日常由其自由饮食,室温为20~24℃,光照/黑暗=12h/12h,普通饲料、饲养用垫料均由昆明医科大学提供;高脂饲料由本课题组提供配方(普通饲料加10%猪油,2%胆固醇),交由昆明医科大学动物实验中心配置。

1.2 实验材料和仪器 川陈皮素购于酷尔化学科技(北京)有限公司;水飞蓟素胶囊购于天津天士力圣特制药有限公司;谷丙转氨酶(Alanine transaminase,ALT)、谷草转氨酶(Aspartate transaminase,AST)、总胆固醇(total cholesterol,TC)、甘油三酯(triglyceride,TG)、低密度脂蛋白胆固醇(Low density lipoprotein cholesterol,LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(High density lipoprotein cholesterol,HDL-C)试剂盒购于武汉默沙克生物科技有限公司、白介素-1a(Interleukin-1a,IL-1a)、白介素-1b(Interleukin-1b,IL-1b)和白介素-6(Interleukin-6,IL-6)试剂盒购于武汉博士德生物有限公司;肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α ,TNF- α)、肿瘤坏死因子受体1(Tumor necrosis factor receptor 1,TNFR-1)、跨膜糖蛋白(Fas)、跨膜糖蛋白配体(FasL)、半胱氨酸天冬氨酸蛋

白酶 8 (Caspase-8)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (Caspase-3)、B- 细胞淋巴瘤 / 白血病 -2 原癌基因 (Bcl-2)、Bcl-2 相关基因 (Bax) 蛋白以及 β -actin 抗体购于美国 Santa 公司;

酶标仪 (HBS-1096A 型, 南京德铁实验设备有限公司); 全自动生化分析仪 (CHEMIX-180 型, 日本 SYSMEX 公司); 精密电子天平 (AB135-S 型, 上海精密仪器仪表有限公司); 蛋白电泳仪 (Mini Gel 型, 赛默飞世尔中国有限公司); PCR 仪 (ProFlex 型, 赛默飞世尔中国有限公司)。

1.3 动物分组、造模和给药剂量 所有大鼠在购买后均给予适应性喂养 2 周, 2 周后采用随机数字法将大鼠分为 6 组, 分别为正常组、模型组、阳性药物水飞蓟素治疗组、川陈皮素低、中、高剂量组, 每组 12 只。除正常组外, 其余 5 组给予高脂饮食 8 周, 构建 NAFLD 模型 (模型构建成功的标准为每组各处死 2 只大鼠, 血清肝功能指标检测和肝脏切片病理学观察, 有明显脂肪肝表征时证明造模成功)。

造模成功后, 给予相应治疗, 其中正常组和模型组给予每日 10 mL/kg 生理盐水灌胃, 水飞蓟素组以水飞蓟素 14 mg/kg 灌胃治疗, 川陈皮素低、中、高剂量组给予川陈皮素 100、200、400 mg/kg 灌胃治疗, 水飞蓟素给药剂量根据大鼠和人体换算公式计算得到, 川陈皮素给药剂量根据文献报道^[9]确定, 每天给药 1 次, 连续给药 6 周。

1.4 肝脏和血液收集 于前夜禁食不禁水 12 h 后, 次日称重后处死大鼠, 处死时采用 3 mL 的 1% 水合氯醛腹腔注射麻醉, 麻醉后固定于解剖板, 心脏取血法收集大鼠血液, 血液收集后分装于 1.5 mL 的离心管中, 离心后提取上清液, -20 °C 冰箱保存备用。之后剖开腹腔, 取出肝脏, 采血后即刻脱颈处死大鼠, 作腹部正中切口打开腹腔, 取出完整肝脏, 称重后, 切取肝左叶置于 4% 的中性福尔马林溶液中保存备用用于 HE 染色, 其它组织切成 4 小块分装于冻存管中置于超低温冰箱中备用用于蛋白和 mRNA 的检测。

1.5 一般情况、肝指数及相关生化指标检测 大鼠一般情况要求每天记录, 主要观察大鼠毛色、体重生长情况、饮食、大小便以及死亡情况。大鼠肝指数为肝脏重量 / 大鼠体重 $\times 100\%$ 。ALT、AST、HDL-C、LDL-C、TC 和 TG 根据试剂盒说明书采用全自动生化

仪检测。IL-1a、IL-1b 和 IL-6 严格按照试剂盒说明书操作, 采用酶标仪检测。

1.6 组织病理学检测 从中性福尔马林溶液中取出肝组织, 进行常规石蜡包埋和切片, 切片后, 采用二甲苯脱蜡、梯度酒精清洗、超纯水清洗、苏木紫染色、清洗后伊红染色、二甲苯透明封片。制片成功后光镜下观察收集图像。

1.7 凋亡相关蛋白检测 称取 1g 肝脏组织, 用组织蛋白裂解液裂解后提取上清, BCA 法定量后调平, 每组各取 50 μ g 行 SDS-PAGE 电泳, 电泳完成后将目的条带转移至 PVDF 膜, 之后依次按照 5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后 PBST 洗涤 3 次、加入一抗过夜后洗涤 3 次 [TNF- α (1 : 5 000)、TNFR-1 (1 : 5 000)、Fas (1 : 3 000)、FasL (1 : 1 000)、Caspase-8 (1 : 2 000)、Caspase-3 (1 : 2 000)、Bcl-2 (1 : 5 000) 和 Bax (1 : 5 000)]、加入二抗 (1 : 5 000) 2 h 后洗涤 3 次, 暗室曝光、显影定影后扫描仪收集图片, Image J 计算每个条带的灰度值, 每组实验重复 3 次。

1.8 凋亡相关蛋白 mRNA 检测 称取 100 mg 肝脏组织, 采用总 RNA 试剂盒提取总 RNA, 琼脂糖凝胶电泳确认成功提取后, 定量并调平, 每组各取 2 μ g 将其逆转录合成 cDNA, 之后即进行 qRT-PCR 电泳, 电泳条件为扩增 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 变性 10 s, 退

表 1 引物序列设计表

名称	序列表	产物长度
Bax	F: AGACAGGGGCCCTTTTGTCTAC R: AATTCGCCGAGACACTCG	137
Bcl-2	F: GCTACCGTCTGCTGACTTCGC R: CCCACCGAACTCAAAGAAGG	147
Caspase-3	F: CTCGCTCTGCTACGGATGTG R: TCCCATAAATGACCCCTTCATCA	201
Caspase-8	F: TGCTTGGA CTACATCCACAC R: GTTGCACTCTAGGAAGTTGACC	171
TNF- α	F: CTGAACTTCGGGGTGATCGG R: GGCTTGCTACTCGAATTTTGAGA	122
TNFR-1	F: GGGGATACATCCATCAGGGGT R: GCTCGGACAGTCACTCACC	163
Fas-L	F: TCCGTGAGTTCACCAACCAAA R: GGGGGTTCCCTGTAAATGGG	120
Fas	F: GCGGGTTCGTGAAACTGATAA R: GCAAAATGGGCCTCCTTGATA	61
β -actin	F: GGCTGTATTCCCCTCCATCG R: CCAGTTGGTAACAATGCCATGT	154

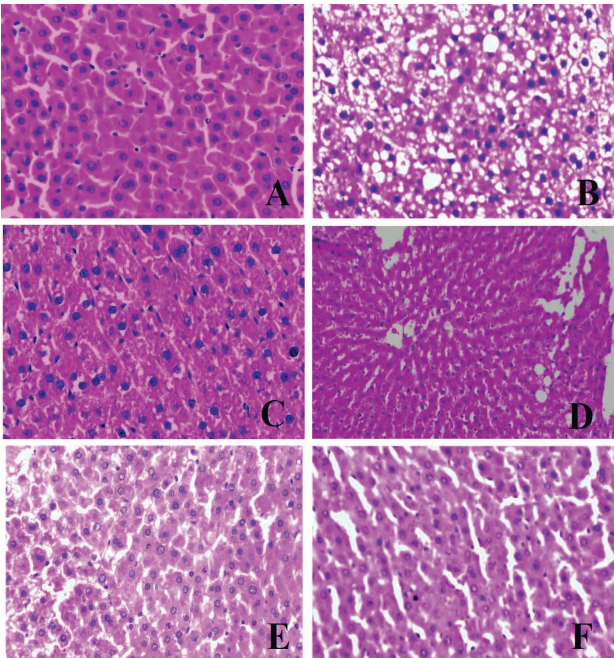
火 60℃、30 s,72℃延伸 35 s,循环次数 35 次。采用 2- $\Delta\Delta C_t$ 法计算目的基因相对表达量。引物序列设计为表 1 所示。

1.9 统计学处理 计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用统计软件 SPSS 19.0 对实验数据进行统计学分析,2 组间比较采用 LSD- t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般情况 正常组大鼠精神活跃,毛色发亮,饮食和生长均正常;相较于正常组,模型组在造模成功后体重明显增加,小便量增加,大便油腻发臭,毛色发黄,饮食量相较于正常组有一定的降低,药物治疗后,模型组体重增加幅度降低;水飞蓟素片治疗组以及川陈皮素低、中、高剂量组相较于模型组上述表现改善,特别是活动量有明显增加。

2.2 大鼠肝脏病理学 光镜下,正常组大鼠肝细胞大小均一,肝小叶结构正常,看不到任何脂肪变性以及炎细胞浸润,模型组则出现明显的肝细胞损伤,主要表现为肝细胞可见大量脂肪空泡,严重者空泡融合,将胞核挤向一侧,同时也可见肝细胞胞浆疏松化、气球样变,炎细胞浸润。相较于模型组,



注:图中 A、B、C、D、E、F 分别为正常组、模型组、阳性药物水飞蓟素片治疗组以及川陈皮素低、中、高剂量组

图 1 大鼠肝脏 HE 染色镜下观(20 $\times$ 20)

水飞蓟素片以及川陈皮素低、中、高剂量组肝脏上述病变明显减轻。

2.3 大鼠肝指数 与正常组相比,模型组大鼠肝湿重和肝指数明显升高($P<0.05$);相较于模型组,水飞蓟素片治疗组以及川陈皮素低、中、高剂量组肝湿重和肝指数明显降低($P<0.05$);此外川陈皮素高剂量组肝指数明显低于水飞蓟素片治疗组($P<0.05$);而体重各组间则没有明显差异,详见表 2。

表 2 治疗前后各组大鼠肝重、体重和肝指数的变化($\bar{x}\pm s,n=12$)

组别	肝湿重/g	体重/g	肝重/体重/%
正常组	13.01 $\pm$ 1.08	462.87 $\pm$ 32.34	2.81 $\pm$ 0.28
模型组	19.54 $\pm$ 2.45 [*]	474.71 $\pm$ 40.48	4.12 $\pm$ 0.60 [*]
水飞蓟素片组	15.77 $\pm$ 1.89 ^{*#}	464.52 $\pm$ 37.69	3.39 $\pm$ 0.57 ^{*#}
川陈皮素低剂量组	17.04 $\pm$ 1.43 ^{*#}	473.62 $\pm$ 32.65	3.60 $\pm$ 0.41 ^{*#}
川陈皮素中剂量组	16.38 $\pm$ 1.36 ^{*#}	468.37 $\pm$ 31.61	3.50 $\pm$ 0.25 ^{*#}
川陈皮素高剂量组	14.65 $\pm$ 1.17 ^{*#}	476.54 $\pm$ 29.85	3.07 $\pm$ 0.32 ^{*#Δ}

注:与正常组相比,^{*} $P<0.05$;与模型组相比,[#] $P<0.05$;与水飞蓟素片组相比, ^{Δ} $P<0.05$

2.4 大鼠肝功能 与正常组相比,模型组大鼠血清肝功能指标 ALT 和 AST 明显增高($P<0.05$);与模型组相比,水飞蓟素片治疗组以及川陈皮素低、中、高剂量组则明显降低($P<0.05$),此外,川陈皮素高剂量组 ALT 和 AST 均低于水飞蓟素片治疗组($P<0.05$),详见表 3。

表 3 治疗前后大鼠血清肝功能指标 ALT 和 AST 的变化($\bar{x}\pm s,n=12,U/L$)

组别	AST	ALT
正常组	36.54 $\pm$ 3.15	39.76 $\pm$ 2.28
模型组	72.33 $\pm$ 6.21 [*]	77.79 $\pm$ 8.04 [*]
水飞蓟素片组	49.25 $\pm$ 5.72 ^{*#}	50.54 $\pm$ 4.71 ^{*#}
川陈皮素低剂量组	52.19 $\pm$ 4.68 ^{*#}	53.65 $\pm$ 5.02 ^{*#}
川陈皮素中剂量组	48.72 $\pm$ 4.83 ^{*#}	52.36 $\pm$ 4.82 ^{*#}
川陈皮素高剂量组	43.71 $\pm$ 3.27 ^{*#Δ}	45.12 $\pm$ 3.24 ^{*#Δ}

注:与正常组相比,^{*} $P<0.05$;与模型组相比,[#] $P<0.05$;与水飞蓟素片组相比, ^{Δ} $P<0.05$

2.5 大鼠血脂 与正常组相比,模型组大鼠血清血脂指标 TG、TC 和 LDL-C 含量明显升高($P<0.05$),HDL-C 明显降低($P<0.05$);与模型组相比,水飞蓟素

片治疗组以及川陈皮素低、中、高剂量组 TG、TC 和 LDL-C 含量均明显降低 ($P<0.05$),HDL-C 明显升高 ($P<0.05$);此外,川陈皮素中剂量和高剂量组 TG、TC

和 LDL-C 明显低于水飞蓟素片治疗组 ($P<0.05$),HDL-C 明显高于水飞蓟素片治疗组 ($P<0.05$),详见表 4。

表 4 治疗前后各组大鼠血脂指标的变化($\bar{x}\pm s,n=12,\text{mmol/L}$)

组别	TC	TG	HDL-C	LDL-C
正常组	1.54±0.12	0.09±0.02	0.72±0.09	0.14±0.02
模型组	2.76±0.28*	0.81±0.13*	0.34±0.10*	0.52±0.11*
水飞蓟素片组	2.04±0.25**	0.52±0.09**	0.51±0.11**	0.27±0.08**
川陈皮素低剂量组	2.13±0.19**	0.56±0.07**	0.51±0.06**	0.32±0.05**
川陈皮素中剂量组	1.70±0.21**△	0.32±0.05**△	0.58±0.12**△	0.21±0.06**△
川陈皮素高剂量组	1.62±0.18**△	0.25±0.05**△	0.60±0.03**△	0.20±0.02**△

注:与正常组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,** $P<0.05$;与水飞蓟素片组相比,△ $P<0.05$

2.6 大鼠炎症因子 与正常组相比,模型组大鼠血清炎症因子指标 IL-1a、IL-1b 和 IL-6 明显增高 ($P<0.05$);与模型组相比,水飞蓟素片治疗组以及川陈皮素低、中、高剂量组 IL-1a、IL-1b 和 IL-6 均明显降低 ($P<0.05$)。此外,川陈皮素高剂量组上述 3 个指标均明显低于水飞蓟素片治疗组 ($P<0.05$),详见表 5。

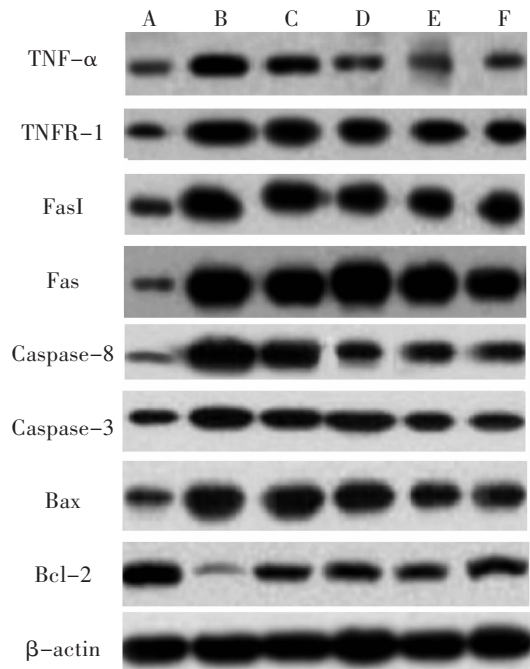
表 5 治疗前后大鼠炎症因子 IL-1 和 IL-6 的变化($\bar{x}\pm s,n=12$)

组别	IL-1a /(mmol·L ⁻¹)	IL-1b /(mmol·L ⁻¹)	IL-6 /(μg·L ⁻¹)
正常组	6.04±0.21	6.87±0.28	16.77±1.92
模型组	14.33±1.25*	17.50±1.36*	28.54±2.74*
水飞蓟素片组	8.76±0.78**	10.65±0.67**	19.35±1.69**
川陈皮素低剂量组	8.97±0.49**	10.14±0.80**	21.44±1.73**
川陈皮素中剂量组	8.24±0.59**	9.92±0.59**	20.82±1.52**
川陈皮素高剂量组	7.12±0.52**△	8.65±0.47**△	17.26±1.45**△

注:与正常组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,** $P<0.05$;与水飞蓟素片组相比,△ $P<0.05$

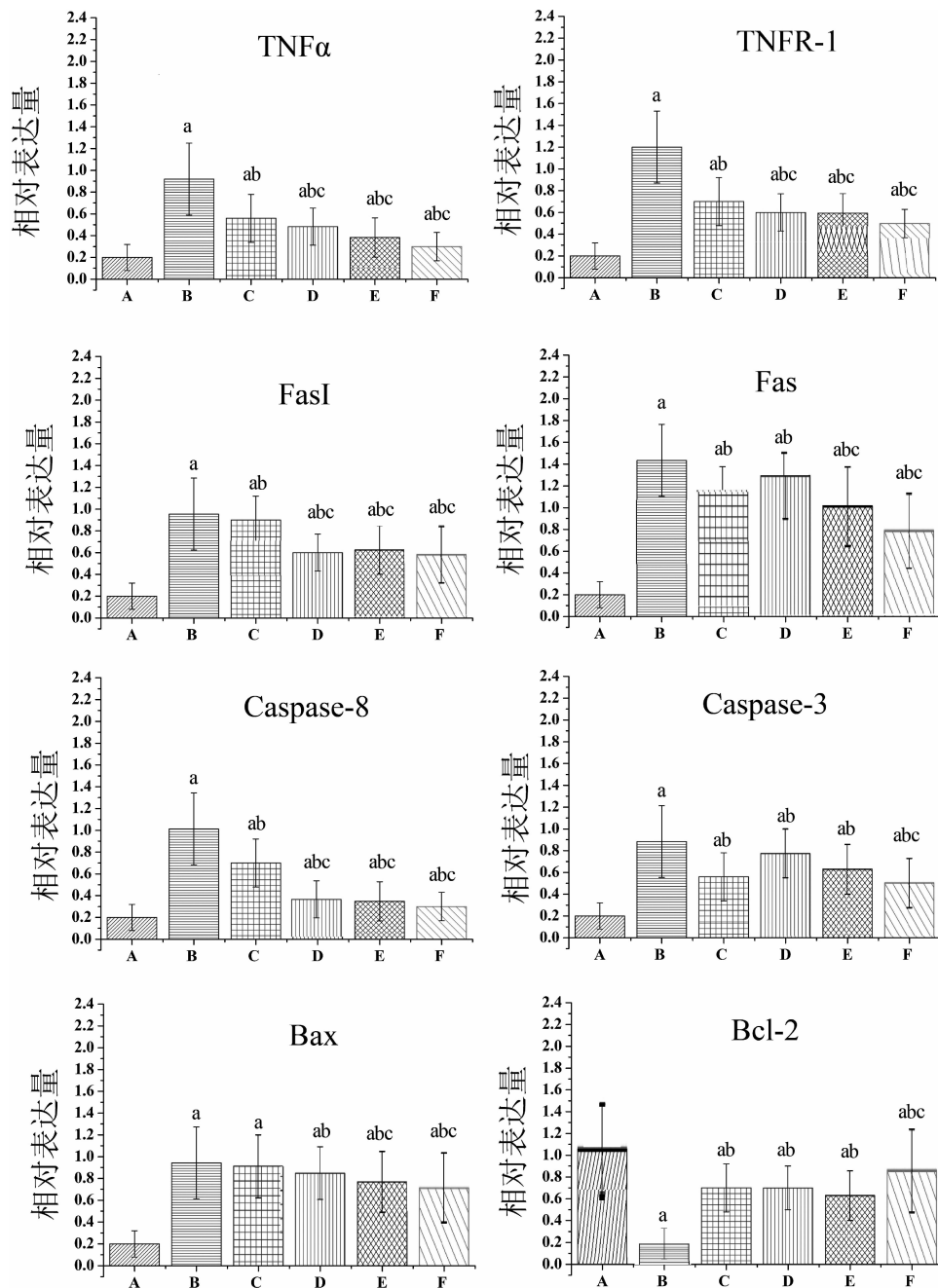
2.7 大鼠凋亡相关蛋白的表达特点 大鼠凋亡相关蛋白 TNF-α、TNFR-1、FasL、Fas、Caspase-8、Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 表达特点如图 2 和图 3 所示。从图中可以明显看出,与正常组相比,模型组 TNF-α、TNFR-1、FasL、Fas、Caspase-8 和 Caspase-3 明显升高 ($P<0.05$),Bcl-2 表达明显降低 ($P<0.05$);与模型组相比,水飞蓟素片治疗组、川陈皮素低、中、高剂量组 TNF-α、TNFR-1、FasL、Fas、Caspase-8 和 Caspase-3 明显降低 ($P<0.05$),Bcl-2 表达明显升高 ($P<0.05$);与

正常组相比,模型组 Bax 表达明显升高 ($P<0.05$),与模型组相比,水飞蓟素片治疗组没有变化,但川陈皮素三个治疗组降低 ($P<0.05$);此外,川陈皮素低、中、高剂量组 TNF-α、TNFR-1、FasL 和 Caspase-8 明显低于水飞蓟素片治疗组 ($P<0.05$),川陈皮素中、高剂量组 Fas 和 Bax 明显低于水飞蓟素片治疗组 ($P<0.05$),川陈皮素高剂量组 Caspase-3 明显低于水飞蓟素片治疗组 ($P<0.05$),Bcl-2 明显高于水飞蓟素片治疗组。



注:A、B、C、D、E、F 分别为正常组、模型组、阳性药物水飞蓟素片治疗组、川陈皮素低、中、高剂量组

图 2 大鼠凋亡相关蛋白的表达图

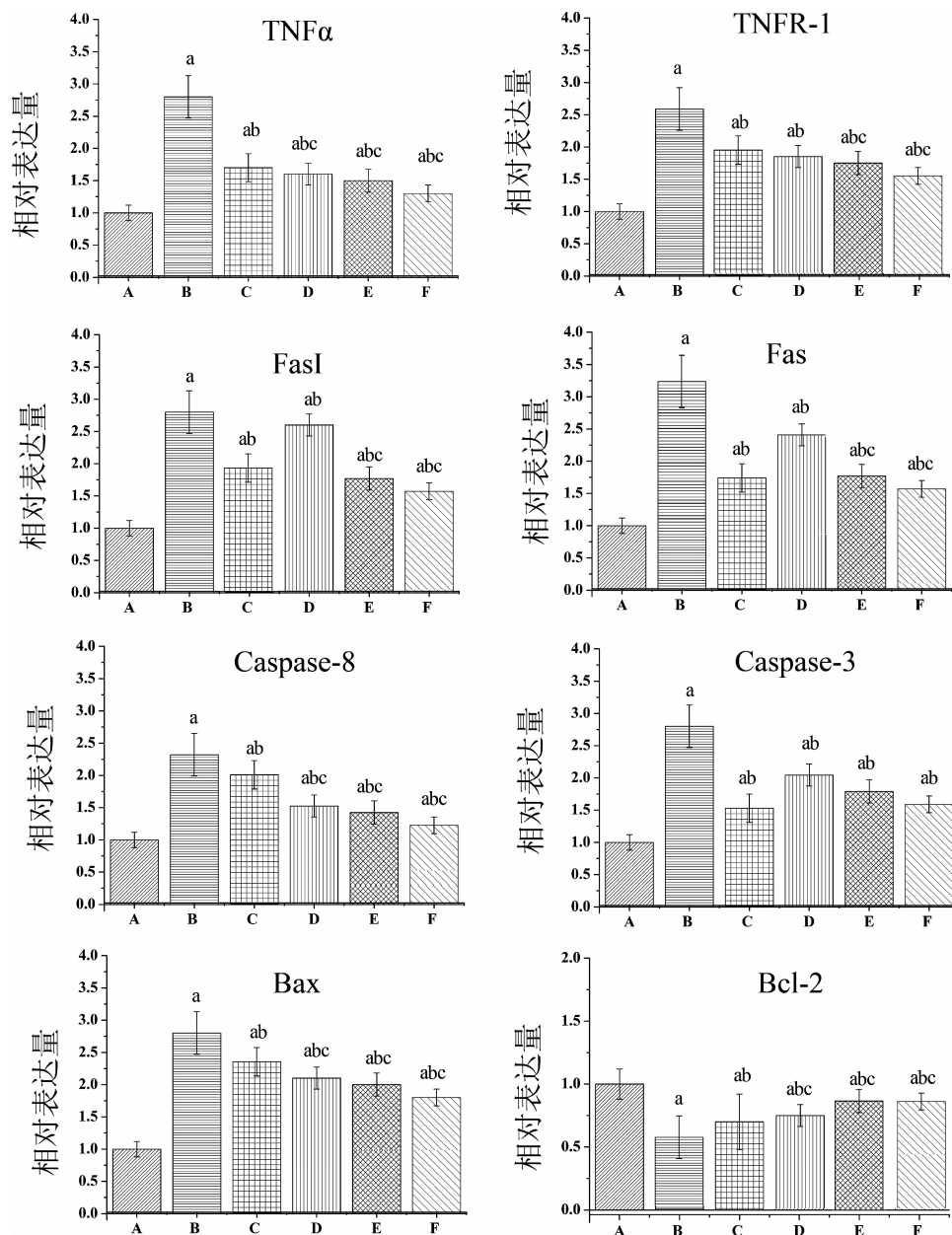


注：A、B、C、D、E、F 分别为正常组、模型组、阳性药物水飞蓟素片治疗组、川陈皮素低、中、高剂量组。与正常组相比，^a $P < 0.05$ ；与模型组相比，^b $P < 0.05$ ；与水飞蓟素片组相比，^c $P < 0.05$

图 3 大鼠凋亡相关蛋白相对表达量

2.8 大鼠凋亡相关蛋白 mRNA 的表达特点 大鼠凋亡相关蛋白 TNF- α 、TNFR-1、FasL、Fas、Caspase-8、Caspase-3、Bax、Bcl-2 mRNA 表达特点如图 4 所示。从图中可以明显看出，与正常组相比，模型组 TNF- α 、TNFR-1、FasL、Fas、Caspase-8、Caspase-3 和 Bax 明显升高 ($P < 0.05$)，Bcl-2 表达明显降低 ($P < 0.05$)；与模型组相比，水飞蓟素片治疗组、川陈皮素低、中、高剂量组 TNF- α 、TNFR-1、FasL、Fas、Cas-

pase-8、Caspase-3 和 Bax 明显降低 ($P < 0.05$)，Bcl-2 表达明显升高 ($P < 0.05$)。此外，川陈皮素低、中、高剂量组 TNF- α 、Caspase-8 和 Bax 明显低于水飞蓟素片治疗组 ($P < 0.05$)，川陈皮素中和高剂量组 TNFR-1、FasL、Fas 明显低于水飞蓟素片治疗组 ($P < 0.05$)，川陈皮素低、中、高剂量组 Bcl-2 明显高于水飞蓟素片治疗组 ($P < 0.05$)。



注:A、B、C、D、E、F分别为正常组、模型组、阳性药物水飞蓟素片治疗组、川陈皮素低、中、高剂量组。与正常组相比,^a $P<0.05$;与模型组相比,^b $P<0.05$;与水飞蓟素片组相比,^c $P<0.05$

图4 大鼠凋亡相关 mRNA 相对表达量

3 讨论

NAFLD 发病机制较为复杂,其涉及到脂代谢、二次打击、氧化损伤等多种复杂的代谢过程^[10],因此构建一个好的 NAFLD 动物模型,使其更贴切于人类 NAFLD 发病机制是实验成功的保障。目前医学界用来构建 NAFLD 的动物模型主要有 2 种方式,第 1 种为基因改良模型^[11-12],此模型目前应用较多的为 CD36 基因敲除模型和乙酰辅酶 A 氧化酶基因缺乏模型,二者根据药物的作用机理不同,而各有侧重。

CD36 基因敲除鼠模型可以表现有明显的脂肪肝特征,也会造成总胆固醇的升高和胰岛素抵抗的发生,但其侧重点为氧化应激和肝细胞凋亡方面。乙酰辅酶 A 氧化酶基因缺乏小鼠则主要表现为脂代谢异常引发的 NAFLD,其适用于肝脏降脂药物的基础实验研究。但不管是 CD36 基因敲除模型还是乙酰辅酶 A 氧化酶基因缺乏模型,二者造价均较为昂贵,因此不被广泛推广。第 2 种模型即为高脂高糖诱导模型^[13],本类方法简单易行,同时造价相对低廉,构建的模型较

为稳定,因此推广性较高。本次研究即采用高脂诱导脂肪肝模型,从 HE 染色可以明显看出,模型组大鼠镜下可见肝细胞脂肪变性、胞浆疏松化、气球样变、炎细胞浸润等 NAFLD 的病理特征,这证明所构建的模型是成功的,可以用于后续的研究开展。

NAFLD 发生后,大鼠最典型的特点为肝脏病理学的损伤,同时出现明显的肝功能和血脂异常^[14]。陈皮素被发现有多种生物活性,其在抗癌、消炎、抗氧化以及调节血管平滑肌等多个方面均表现有较好的药理活性。目前也有研究采用川陈皮素治疗 NAFLD,但是上述的研究仅限于细胞学的研究,动物学的研究还缺少文献证实,相关的作用机理也没有明确^[15-16]。本次研究采用川陈皮素治疗 NAFLD 大鼠,研究结果发现,与模型组相比,川陈皮素低、中、高剂量组均可以明显的降低 NAFLD 大鼠肝功能指标 AST 和 ALT,同时也可以明显的调节血脂,降低肝脏指数。肝脏病理学结果也显示,在治疗后,川陈皮素 3 个剂量组脂肪空泡数量均明显降低,炎细胞浸润有明显改善,这种治疗效果与临床中常用的保肝护肝药物水飞蓟素片相一致,这提示川陈皮素可治疗 NAFLD,那么其作用机理是什么?

细胞凋亡是机体维持自身稳定的一种基本的生理活动现象,但是细胞凋亡过低和过高均可以导致疾病的发生^[17]。目前关于细胞凋亡在非酒精性脂肪性肝病中的作用和发生机制以及相关的药物治疗已有大量的文献报道。而鉴于川陈皮素在抗凋亡和抗炎方面的作用,因此推测川陈皮素实现保肝护肝作用可能是通过调节细胞凋亡实现的。目前介导 NAFLD 肝细胞凋亡常见的信号通路主要 3 条^[18-21],分别为死亡受体通路、线粒体通路和内质网通路。死亡受体通路包括 TNF 家族的 FasL/Fas 和 TNF- α /TNFR-1 等介导的凋亡信号通路,本类通路可以直接调控炎症的发生。线粒体通路主要是指 Bcl-2 蛋白家族相关的基因,其中典型的蛋白为 Bax 和 Bcl-2,二者可形成同源二聚体,以起到对细胞凋亡的抑制或促进作用。第 3 条通路为内质网通路,内质网通路与凋亡相关的代表性蛋白主要为 Caspase 家族蛋白,其可以参与胆固醇的合成和脂质的代谢。本次研究观察川陈皮素治疗前后肝脏组织中上述 3 条通路的代表性蛋白 TNF- α 、TNFR-1、FasL、Fas、Caspase-8、Caspase-3、Bax、Bcl-2 的

表达特点,研究结果发现,与模型组相比,川陈皮素低、中、高剂量组 TNF- α 、TNFR-1、FasL、Fas、Caspase-8、Caspase-3 和 Bax 明显降低,而 Bcl-2 表达明显升高。这提示,川陈皮素具有明显的调节 NAFLD 大鼠凋亡发生的作用。

综上所述,本次研究证实川陈皮素对高脂饮食诱导的 NAFLD 大鼠肝功能、血脂以及肝脏病理学有着明显的改善作用,其治疗 NAFLD 的作用可能是通过抑制细胞凋亡,降低炎症反应实现的。

参考文献:

- [1] CALZADILLA B L, ADAMS L A. The natural course of non-alcoholic fatty liver disease [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(5): E774.
- [2] 张海博,王宇. 非酒精性脂肪肝的现代研究进展[J]. 海南医学, 2017, 28(10): 1651-1653.
- [3] PAIS R, RATZIU V. Epidemiology and natural history of nonalcoholic fatty liver disease [J]. La Revue Du Praticien, 2012, 62(10): 1416-1418.
- [4] 李慧卿,苏少慧,宋娟. 非酒精性脂肪肝中西医结合治疗新进展[J]. 临床荟萃, 2016, 31(9): 1042-1044.
- [5] 周晓黎,舒磊,石拓,等. 银杏总黄酮对 NAFLD 大鼠生化指标及血清脂联素水平的影响 [J]. 临床消化病杂志, 2017, 29(4): 231-235.
- [6] 郑晓艳,陈育青. 风柜斗草黄酮治疗大鼠非酒精性脂肪肝的研究[J]. 江西中医药大学学报, 2016, 28(2): 84-87.
- [7] LI W, WANG X, NIU X, et al. Protective effects of nobiletin against endotoxic shock in mice through inhibiting TNF- α , IL-6, and HMGB1 and regulating NF- κ B pathway [J]. Inflammation, 2016, 39(2): 786-797.
- [8] DA C, LIU Y, ZHAN Y, et al. Nobiletin inhibits epithelial-mesenchymal transition of human non-small cell lung cancer cells by antagonizing the TGF- β 1/Smad3 signaling pathway[J]. Oncology Reports, 2016, 35(5): 2767-2774.
- [9] 张红蕊,王耕银,崔昌萌,等. 川陈皮素对糖尿病大鼠认知功能障碍的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(18): 4516-4519.
- [10] 王一强,姜德民,张玉香. 现代医学对非酒精性脂肪肝发病机制及治疗的研究进展 [J]. 卫生职业教育, 2016, 34(12): 144-145.
- [11] GARCIA M C, LO I O, CRESPO J, et al. Increased soluble CD36 is linked to advanced steatosis in nonalcoholic

- fatty liver disease[J]. *European Journal of Clinical Investigation*, 2014, 44(1): 65–73.
- [12] 喻琴, 王丽. 非酒精性脂肪性肝病动物模型研究进展[J]. *西南医科大学学报*, 2016, 39(3): 300–302.
- [13] 苏琳, 刘玉兰. 高糖饮食及高脂饮食建立非酒精性脂肪肝大鼠模型的比较[J]. *实验动物科学*, 2009, 26(3): 14–17.
- [14] 姜慧卿. 非酒精性脂肪性肝病的临床表现与病理学特点[J]. *中国全科医学*, 2007, 10(24): 2030–2033.
- [15] 叶喜德, 黄兆胜, 骆利平, 等. 川陈皮素研究概括[J]. *江西中医药大学学报*, 2013, 25(3): 42–45.
- [16] 汪娇, 蒋鹏, 周建伟. 川陈皮素对非酒精性脂肪肝细胞的保护作用 and lncLSTR 的调控机制 [J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(6): 1129–1133.
- [17] 王文亮. 细胞凋亡研究进展[J]. *心脏杂志*, 2005, 17(6): 603–606.
- [18] LUO K X, ZHU Y F, ZHANG L X, et al. In situ investigation of Fas/FasL expression in chronic hepatitis B infection and related liver diseases [J]. *Journal of Viral Hepatitis*, 1997, 4(5): 303–307.
- [19] 张新星. 抗凋亡对非酒精性脂肪性肝病进展的影响及机制探讨[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2005.
- [20] JIANG X, TANG X, ZHANG P, et al. Cyanidin-3-O- β -glucoside protects primary mouse hepatocytes against high glucose-induced apoptosis by modulating mitochondrial dysfunction and the PI3K/Akt pathway [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2014, 90(2): 135–144.
- [21] 何双艳, 李昌平, 李鹏, 等. Fas/FasL、Bcl-2/Bax、Caspase-8 在大鼠非酒精性脂肪性肝病中的作用机制[J]. *世界华人消化杂志*, 2012, 20(36): 3761–3766.