

实验研究

BZL 方对非酒精性脂肪性肝炎模型小鼠肠黏膜损伤的保护作用

冷 静^{1,2} 田华捷^{1,2} 黄 甫^{1,2} 冯 琴^{1,2} 赵 瑜^{1,2} 胡义扬^{1,3,4} 彭景华^{1,2,3}

(1 上海中医药大学附属曙光医院,上海,201203; 2 上海中医药大学肝病研究所,上海,201203; 3 上海市中医临床重点实验室,上海,201203; 4 上海中医药大学附属医院临床药理研究所,上海,201203)

摘要 目的:观察中药组分复方 BZL 方(白术多糖、栀子苷、绿原酸)对高脂饮食诱导的小鼠脂肪性肝炎(NASH)及其肠黏膜损伤的作用。方法:C57BL/6J 雄性小鼠 27 只,随机分为正常、模型和 BZL 方组,每组 9 只。除正常组外,其余各组均采用高脂饮食诱导 NASH,第 14 周开始,BZL 方组灌胃 BZL 方,其余各组灌胃等量饮用水,至 17 周末处死取材。观察各组小鼠体质量、进食量、肝体比,肝组织病理(HE 和天狼猩红染色,SAF 评分),检测血浆 ALT、GGT 活性、LPS 水平,肝组织 TG 含量;肝组织胶原 I 型和 IV 型、内毒素受体 CD14、TLR1、TLR2、TLR4、TLR9 及炎症反应因子 IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达(real-time PCR 法);肠组织病理(HE 染色);大肠组织紧密连接 zo-1、occludin、claudin mRNA 表达(real-time PCR 法)及蛋白表达(免疫荧光染色)。结果:高脂饮食诱导 NASH 模型中,模型组血浆 ALT、GGT、LPS 及肝组织 TG 含量较正常组显著升高($P < 0.01$);肝组织可见脂肪沉积、炎症反应、气球样变及纤维化,SAF 评分显著高于正常组,肝组织胶原 ColI、ColIV mRNA 显著升高,CD14、TLR1、TLR2、TLR4、TLR9 及 IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);肠组织病理变化光镜下不明显,大肠组织紧密连接 zo-1、occludin、claudin mRNA 表达降低($P < 0.01$),zo-1、occludin 免疫荧光阳性染色减少。BZL 方可降低血浆 ALT、GGT、LPS、肝组织 TG 含量($P < 0.05$, $P < 0.01$),改善 SAF 评分,降低肝组织胶原 ColI、ColIV mRNA 表达($P < 0.01$),降低 CD14、TLR2、TLR4、TLR9 及 IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达($P < 0.05$, $P < 0.01$),恢复大肠组织紧密连接 zo-1、occludin mRNA 表达($P < 0.01$),恢复 zo-1、occludin 免疫荧光阳性染色。结论:BZL 方有效减轻高脂饮食诱导的小鼠 NASH,该作用与其保护肠黏膜、抑制 LPS 肠渗漏及肝组织中 TLRs 及炎症反应因子密切相关。

关键词 非酒精性脂肪性肝炎;中药组分复方;天然产物;白术多糖;栀子苷;绿原酸;肠黏膜屏障;紧密连接

Protective Effects of BZL Recipe on Intestinal Mucosal Injury in Non-alcoholic Steatohepatitis in Mice

Leng Jing¹, Tian Huajie¹, Huang Fu¹, Feng Qin¹, Zhao Yu¹, Hu Yiyang^{2,3}, Peng Jinghua^{1,2,3}

(1 Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2 Institute of Liver Diseases, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 3 Shanghai Key Laboratory of Traditional Chinese Clinical Medicine, Shanghai 201203, China; 4 Institute of Clinical Pharmacology, Shanghai 201203, China)

Abstract Objective: To observe the effects of Chinese Medicine BZL recipe(composed of Atractylodes macrocephala polysaccharide, chlorogenic acid, and geniposide) on non-alcoholic steatohepatitis(NASH) and intestinal mucosal injury induced by high-fat diet in mice. **Methods:** Twenty seven male C57BL/6J mice were randomly divided into the normal group, the model group, and BZL group, with 9 rats in each group. Except the normal group, the other groups were induced by NASH. From the 14th week, mice in BZL group were administrated with BZL recipe by gavage daily, and the other mice were administrated with same dose distilled water. Till the end of 17th week, the mice were killed for collection materials. The body weight, food intake, liver-to-body ratio, liver histopathology(HE and Sirius red staining, SAF score) were observed in each group. Plasma ALT, GGT activity, LPS level, liver tissue TG content, liver tissue collagen type I and type IV, endotoxin receptor CD14, TLR1, TLR2, TLR4, TLR9 and inflammatory factors IL-1 β , TNF- α mRNA expression(real-time PCR), intestinal histopathology(HE staining), large intestine tissue tight junction zo-1, occludin, claudin mRNA expression(real-time PCR) and protein expression(immunofluorescence staining) were detected. **Results:** In the high-fat diet induced NASH model, plasma ALT, GGT, LPS and liver tissue TG levels in the model group were significantly higher than those in the normal group($P < 0.01$); liver tissue showed fat deposition, inflammation, balloon-like

基金项目:国家自然科学基金项目(81370094,81673750);上海市科委“浦江人才”计划项目(17PJ1408900),上海市“杏林新星”计划项目(ZY3-RCPY-2-2010)

作者简介:冷静(1989.03—),女,博士,住院医师,研究方向:中医药防治慢性肝病,E-mail:1627009183@qq.com

通信作者:彭景华(1979.11—),女,博士,副研究员,研究方向:中医药防治慢性肝病,E-mail:pengjinghua2004@163.com

changes and fibrosis. SAF score was significantly higher than the normal group. Liver tissue collagen ColI, ColIV mRNA increased significantly, and CD14, TLR1, TLR2, TLR4, TLR9 and IL-1 β , TNF- α mRNA expression increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$); The pathological changes of intestinal tissue were not obvious under light microscope. The expression of zo-1, occludin and claudin mRNA in the large intestine was decreased ($P < 0.01$), and the immunofluorescence staining of zo-1 and occludin was decreased. BZL recipe can reduce plasma ALT, GGT, LPS, liver tissue TG content ($P < 0.05$, $P < 0.01$), improve SAF score, reduce liver tissue collagen ColI, ColIV mRNA expression ($P < 0.01$), reduce CD14, TLR2, TLR4, TLR9, IL-1 β and TNF- α mRNA expression ($P < 0.05$, $P < 0.01$), restored the expression of zo-1 and occludin mRNA in the large intestine, and restored the immunofluorescence staining of zo-1 and occludin. **Conclusion:** BZL recipe can effectively alleviate NASH induced by high-fat diet, which is closely related to the protection of intestinal mucosa, inhibition of LPS intestinal leakage and TLRs and inflammatory factors in liver tissue.

Key Words Non-alcoholic steatohepatitis; Chinese medicine components combination; Natural products; Atractylodes macrocephala polysaccharide; Geniposide; Chlorogenic acid; Intestinal mucosa barrier; Tight junction

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2019.03.014

非酒精性脂肪性肝病(Non-alcoholic Fatty Liver Disease, 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脂肪肝变(Non-alcoholic Fatty Liver, NAFL)、非酒精性脂肪性肝炎(Non-alcoholic Steatohepatitis, NASH)、肝硬化和肝细胞癌^[1]。NAFLD是全球最常见的慢性肝病之一,普通成人NAFLD患病率在6.3%~45%,其中10%~30%为NASH^[2]。与NAFL比较,NASH患者不良结局风险高,若不积极防治,易进展为肝硬化、肝功能衰竭和肝细胞癌,心血管疾病和恶性肿瘤的发生率也随之增加^[3-5]。新近的研究发现“肠道因素”在NAFLD发病过程中起到了重要作用,如肠黏膜屏障损伤可使肝脏直接暴露于肠道内的抗原物质(如肠道细菌、肠源性内毒素),导致肝脏一系列的免疫反应^[6],引发或加重NASH。

BZL方来源于本课题组总结的临床治疗NAFLD经验方——祛湿化痰方。前期研究发现,高脂饮食诱导的NASH小鼠肠黏膜损伤,祛湿化痰方改善NASH同时对肠黏膜屏障具有保护作用^[7]。进而对祛湿化痰方各味中药的代表性有效成分(绿原酸、虎杖苷、白术多糖、栀子苷和姜黄素)以不同剂量、肝组织三酰甘油(Triglyceride, TG)为参数,进行均匀设计筛选,得到的回归方程提示,白术多糖266.67 mg/kg、绿原酸3.33 mg/kg、栀子苷45 mg/kg所构成的组分复方降低肝组织TG的作用最明显,并命名为“BZL”方^[8-9]。已证实BZL方能够有效减轻高脂饮食诱导的小鼠NAFLD^[10],本研究拟通过观察BZL方对高脂饮食诱导的小鼠NASH肠黏膜损伤的作用,进一步揭示其防治NASH的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SPF级C57BL/6J健康雄性小鼠27

只,8周龄,体质量23~28 g,购自北京联合利华实验动物有限公司,合格证号:SCXK(京)2016-0006。饲养于上海中医药大学实验动物中心,温度20~25℃,湿度60%~70%,灯照周期12 h(7:00-19:00灯照,19:00-7:00黑暗)。获得上海中医药大学动物实验伦理委员会的批准,批准号:SZY201610010。

1.1.2 药物 BZL方由白术多糖(纯度85%,批号ZL20170129,南京泽朗医药有限公司),栀子苷(纯度98%,批号170106,上海融禾医药科技发展有限公司)与绿原酸(纯度98%,批号161227,上海融禾医药科技发展有限公司)组成。

1.1.3 主要仪器 M5多功能酶标仪(美国Molecular Devices);Aperio AT Turbo数字化病理扫片机(德国Lecia);T100 PCR仪(美国Bio-Rad);Applied Biosystems ViiA7 PCR仪(美国Thermo Fisher);FV10I激光共聚焦显微镜(日本OLYMPUS)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 C57BL/6J小鼠随机分为正常($n=9$)、模型($n=9$)和BZL方组($n=9$)。正常组予10%脂肪热能对照饲料(货号D12450B,美国Research Diet公司),模型组与BZL方组予60%脂肪热能高脂饲料(货号D12492,美国Research Diet公司),自由进食17周。

1.2.2 给药方法 造模第14周开始进行药物干预。BZL方组小鼠予配制好的BZL方(白术多糖266.67 mg/(kg·d)、绿原酸3.33 mg/(kg·d)、栀子苷45 mg/(kg·d))灌胃,正常组和模型组予等体积灭菌饮用水灌胃,至17周末。取腹腔静脉血液于EDTA抗凝管中,4℃,500 g/min,离心15 min,分离血浆;各取两份约1 cm×1 cm肝组织、约1 cm长度大小肠组织分别放入中性福尔马林及OCT包埋胶中固定,余下组织放入2 mL离心管液氮保存后,转

移到 -80 ℃ 冰箱冻存,待测。

1.2.3 检测指标与方法 1) 血浆丙氨酸氨基转移酶(ALT)、γ-谷氨酰转移酶(GGT)检测 生化试剂盒检测(赖氏法),试剂盒购自南京建成生物研究所,按说明书操作。

2) 肝组织三酰甘油 TG 检测 称取肝组织 100 mg,放入无水乙醇和丙酮各 750 μL 液体中,65 Hz 匀浆,90 s/次,3 次。4 ℃ 静置过夜。4 ℃,3 000 r/min 离心 15 min,取上清液用于 TG 测定。TG 试剂盒购于浙江东瓯诊断产品有限公司,按说明书操作。

表 1 肝组织 SAF 积分标准

分类	依据	标准	分值
脂肪变(Steatosis)	脂肪变面积	<5%	0
		5%~33%	1
		34%~66%	2
		>67%	3
活动度(Activity)	气球样变	正常肝细胞立方形,具有尖锐的角和粉红色的嗜酸性细胞质	0
		具有圆形和苍白细胞质的肝细胞群存在,大小与正常肝细胞相似	1
		至少有一个膨胀的肝细胞,大小与正常细胞相比是其两倍	2
		小叶炎症反应无	0
纤维化(Fibrosis)	纤维化	每个小叶<2 个病灶	1
		每个小叶>2 个病灶	2
		无纤维化	0
		腺泡 3 区窦周或门脉周围纤维化	1
		腺泡 3 区窦周和门脉周围纤维化但无桥接形成	2
		桥接纤维化	3
		肝硬化	4

3) 组织病理 肝脏与肠组织(小肠和大肠)采用 HE 染色观察,肝组织胶原纤维采用天狼猩红染色观察。根据中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组的推荐意见^[1],肝组织病理采用 SAF 积分^[11]评定,评判标准。见表 1。其中,NASH 的定义为 5% 以上的肝细胞脂肪变合并小叶内炎症反应和肝细胞气球样变性,不合并肝纤维化或仅有轻度纤维化(F0-1)为早期 NASH;合并显著肝纤维化或间隔纤维化(F2-3)为纤维化性 NASH;合并肝硬化(F4)为 NASH 肝硬化^[1]。

4) 血浆内毒素(Lipopolysaccharide,LPS)检测 LPS 试剂盒购于 Associates of CAPE COD Incorporated,鲎试剂法,按说明书操作。

5) 肝脏与大肠组织 mRNA 表达 real-time PCR 检测 总 RNA 提取、cDNA 合成及 real-time PCR 均采用试剂盒(总 RNA 提取试剂盒,货号 B511321,生工生物工程上海有限公司;cDNA 合成试剂盒,货号 1708891,Bio-Rad 公司;real-time PCR 试剂盒,货号 RR420A,TaKaRa 公司)按照说明书操作。所用引物由生工生物工程上海有限公司合成,引物序列。见表 2。

6) 大肠组织蛋白表达 采用免疫荧光染色观察 OCT 胶包埋组织切片,厚度 8 μm,浸入 4 ℃ 丙酮 15 min 后 PBS 清洗,浸入 0.2% TritonTMX-100 透膜后 4 ℃ 双蒸水清洗,10% 山羊血清室温封闭 40 min,4 ℃ 孵育一抗过夜,隔日取出后 4 ℃ PBS 清洗,37 ℃ 避光孵育二抗 30 min,4 ℃ PBS 清洗后 DAPI 染核,抗荧光淬灭剂封片镜检。所用抗体见表 3。

表 2 引物序列表

项目	引物上游	引物下游	产物长度
ColI	5-CCACGTCTCACCATTGGGG-3	5-GCTTCTGGTCGATGTCATGAGCAA-3	103 bp
ColIV	5-CTGGCCTATAAGCCCTGGT-3	5-GCTTCTGGTCGATGTCATGAGCAA-3	118 bp
CD14	5-CTCTGTCTTAAAGCGGCTTAC-3	5-GTTGCGGAGGTTCAAGATGTT-3	191 bp
TLR1	5-TGAGGGTCTCTGATAATGTCCTAC-3	5-AGAGGTCCAAATGCTTGAGGC-3	153 bp
TLR2	5-CACCACTGCCCCGTAG ATGAAG-3	5-AGGGTACAGTCGTCGAAGCTCT-3	148 bp
TLR4	5-ATGGCATGGCTTACACCACC-3	5-GAGGCCAATTTTGTCTCCACA-3	129 bp
TLR9	5-ATGGTTCTCCGTCGAAGGACT-3	5-GAGGCTTCAGCTCACAGGG-3	118 bp
IL-1β	5-GAAATGCCACCTTTTGACAGTG-3	5-TGGATGCTCTCATCAGGACAG-3	116 bp
TNF-α	5-GACGTGGAAGTGGCAGAAAG-3	5-TTGGTGGTTTGTGAGTGTGAG-3	228 bp
zo-1	5-AACAATCACCATCTCTTCACAAC-3	5-TAGCACCATCCGCCTTCC-3	175 bp
occludin	5-TTGAAAGTCCACCTCCTTACAGA-3)	5-CCGGATAAAAAGAGTACGCTGG-3	120 bp
claudin	5-GGGGACAACATCGTGACCG-3	5-AGGAGTCGAAGACTTTGCACT-3	230 bp
18S	5-GGCCTACTAAACCATCCAA-3	5-GCAATTATTCCCCATGAAG-3	104 bp
β-actin	5-CTCCAGAGCACCGAGAGCTA-3	5-ATGGGCACAGTGTGGGTGAC-3	331 bp

表 3 免疫荧光所用抗体

名称	种属	稀释比例	产品编号
ZO-1 Polyclonal Antibody	rabbit	1: 100	invitrogen40-2200
Occludin Polyclonal Antibody	rabbit	1: 250	invitrogen40-4700
Claudin1 Polyclonal Antibody	rabbit	1: 100	invitrogen71-7800
山羊 Anti-Rabbit IgG H&L(Cy3 ®)	Goat anti rabbit	1: 1 000	abcam ab6939
山羊 Anti-Rabbit IgG H&L(Alexa Fluor ® 488)	Goat anti rabbit	1: 1 000	abcam ab150077

1.3 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析,方差齐性用最小显著差法(Least Significant Difference, LSD)作两两比较,方差齐,符合正态分布的用单因素方差分析,数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。方差不齐或者不符合正态分布的用非参数检验,非参数检验用中位数(四分位间距)表示,即 median(Q3- Q1),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验小鼠一般情况 实验过程中小鼠状态良好。造模小鼠体质量较对照小鼠增长迅速,17 周末实验结束时,模型组小鼠体质量显著高于正常组($P < 0.01$),BZL 方干预后小鼠体质量较模型组降低($P < 0.05$)。每只小鼠平均每周进食量无统计学意义。模型组小鼠肝体比较正常组升高($P < 0.05$),BZL 方组较模型组显著降低($P < 0.01$)。见表 4。

2.2 BZL 方对 NASH 小鼠肝损伤的作用

2.2.1 肝组织病理 肝组织 HE 染色可见正常组小鼠肝小叶结构清晰,肝索排列整齐。模型组小鼠肝细胞出现明显的细胞肿胀,胞质内出现脂肪空泡,伴有肝细胞气球样变,部分汇管区、小叶内可见炎细胞浸润。BZL 方组小鼠肝细胞脂肪变性及气球样变

改变明显减轻,偶见炎细胞。天狼猩红染色可见正常组小鼠肝组织内仅在血管壁、汇管区有少量胶原纤维存在;模型组小鼠肝小叶汇管区可见胶原纤维增粗扩张,窦周可见少量胶原纤维增生;BZL 方组肝小叶胶原增生较模型组不明显。SAF 积分提示模型组小鼠肝组织脂肪变、活动度积分均较正常组明显升高($P < 0.01$),证实存在肝细胞脂肪变,合并气球样变和小叶内炎性反应,符合 NASH 的诊断。同时纤维化积分较正常组显著增高($P < 0.01$),根据指南关于 NASH 的定义提示为纤维化性 NASH(F2)。BZL 方组小鼠肝组织脂肪变与活动度积分均较模型组明显减轻($P < 0.01$),纤维化程度较模型组减轻($P < 0.05$),符合早期 NASH(F1)的诊断。见图 1、表 5。

表 4 各组小鼠 17 周末一般情况($\bar{x} \pm s$)

组别	体质量 (g)	进食量 [g/(只·周)]	肝体比 (%)
正常组($n=9$)	32.55 ± 1.96	19.1 ± 1.62	3.54 ± 0.24
模型组($n=9$)	50.80 ± 3.19**	21.3 ± 1.61	4.33 ± 0.98*
BZL 方组($n=9$)	47.18 ± 3.53 [△]	20.2 ± 3.36	2.75 ± 0.18 ^{△△}

注:与正常组比较,** $P < 0.01$,* $P < 0.05$;与模型组比较,^{△△} $P < 0.01$,[△] $P < 0.05$

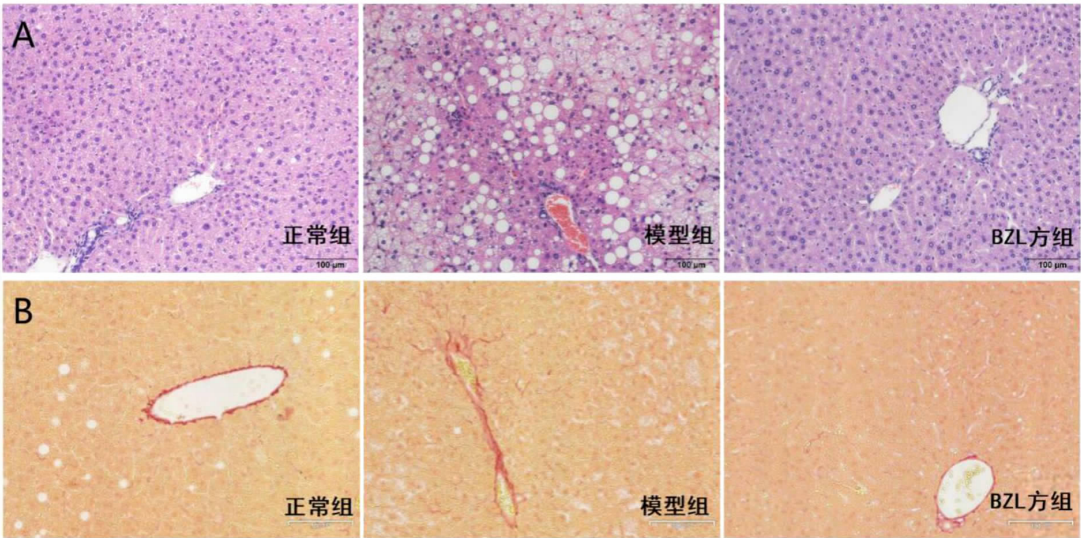


图 1 各组小鼠肝组织病理变化(×200)

注:A. HE 染色;B. 天狼猩红染色

表 5 各组小鼠肝组织病理 SAF 积分

组别	S(脂肪变)	A(活动度)	F(纤维化)
正常组(n=9)	0(0)	1(1)	0(0)
模型组(n=9)	3(0)**	4(1)**	2(0.5)**
BZL 方组(n=9)	1(1) ^{△△}	1(2) ^{△△}	1(0.5) [△]

注:表格以中位数(四分位间距)表示,与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$

2.2.2 血浆 ALT、GGT 活性及肝组织 TG 含量 与正常组比较,模型组小鼠血浆 ALT、GGT 活性均明显升高($P < 0.01$);BZL 方组小鼠的血浆 ALT、GGT 活性较模型组降低($P < 0.05$)。模型组肝组织 TG 含量显著高于正常组($P < 0.01$),BZL 方组肝组织 TG 含量较模型组显著降低($P < 0.01$)。见表 6。

表 6 各组小鼠血浆 ALT、GGT 活性,肝组织 TG 含量($\bar{x} \pm s$)

组别	ALT(U/L)	GGT(U/L)	TG(mg/dl)
正常组(n=9)	4.86 ± 2.51	15.67 ± 2.65	12.94 ± 4.15
模型组(n=9)	36.79 ± 27.22**	37.91 ± 7.93**	30.67 ± 8.62**
BZL 方组(n=9)	8.71 ± 5.48 [△]	24.73 ± 7.81 [△]	19.99 ± 5.94 ^{△△}

注:与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$

2.2.3 肝组织 I 型和 IV 型胶原 mRNA 表达 与正常组比较,模型组小鼠肝组织 ColI 及 ColIV mRNA 表达明显升高($P < 0.01$),BZL 方组较模型组显著下降($P < 0.01$)。见表 7。

2.3 BZL 方对 NASH 小鼠肝组织内毒素受体及炎症反应因子 mRNA 表达的作用 与正常组比较,模型组小鼠肝组织内毒素受体 CD14、TLR9 mRNA 表达明显升高($P < 0.01$),TLR1、TLR2、TLR4 mRNA 升高($P < 0.05$)。BZL 方组肝组织 CD14、TLR4、TLR9 mRNA 表达较模型组显著降低($P < 0.01$),同

时 TLR2 mRNA 表达较模型组也降低($P < 0.05$)。与正常组比较,模型组肝组织炎症反应因子 IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达较正常组升高($P < 0.05$),BZL 方组较模型组降低($P < 0.01$, $P < 0.05$)。见表 8。

2.4 BZL 方对血浆内毒素 LPS 的影响 模型组小鼠血浆 LPS 含量高于正常组($P < 0.05$)。BZL 方组小鼠血浆 LPS 含量较模型组降低($P < 0.05$)。见表 9。

2.5 BZL 方对 NASH 小鼠肠黏膜损伤的作用

2.5.1 肠组织 HE 染色 各组小鼠小肠和大肠组织 HE 染色未见明显病理改变。见图 2。

2.5.2 大肠组织紧密连接 mRNA 表达 与正常组比较,模型组小鼠大肠组织 zo-1、occludin、claudin mRNA 表达明显降低($P < 0.01$),BZL 方组小鼠大肠组织 zo-1、occludin mRNA 表达较模型组显著升高($P < 0.01$),claudin mRNA 表达无明显统计学意义。见表 10。

2.5.3 大肠组织紧密连接蛋白表达 免疫荧光染色观察发现,模型组小鼠大肠组织紧密连接蛋白 zo-1、occludin 阳性染色较正常组弱、不连续,BZL 方组小鼠大肠组织紧密连接蛋白 zo-1、occludin 阳性染色较模型组更强。紧密连接蛋白 claudin 阳性染色各组间未见明显统计学意义。见图 3。

表 7 各组小鼠肝组织 I 型和 IV 型胶原 mRNA 表达($\bar{x} \pm s$)

组别	ColI mRNA 相对荧光值	ColIV mRNA 相对荧光值
正常组(n=9)	1.00 ± 0.82	1.00 ± 0.48
模型组(n=9)	7.46 ± 2.82**	3.26 ± 1.04**
BZL 方组(n=9)	0.81 ± 0.66 ^{△△}	0.55 ± 0.35 ^{△△}

注:与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,^{△△} $P < 0.01$

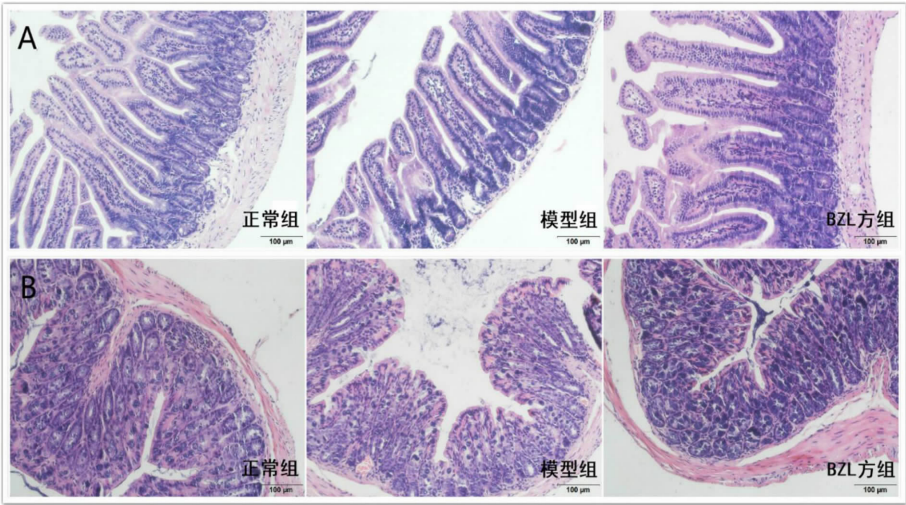


图 2 各组小鼠肠组织病理变化(HE 染色,×200)

注:A. 小肠组织;B. 大肠组织

表 8 各组小鼠肝组织内毒素受体及炎症反应因子 mRNA 表达($\bar{x} \pm s$)

组别	CD14 mRNA 相对荧光值	TLR4 mRNA 相对荧光值	TLR1 mRNA 相对荧光值	TLR2 mRNA 相对荧光值	TLR9 mRNA 相对荧光值	IL-1βmRNA 相对荧光值	TNF-αmRNA 相对荧光值
正常组($n=9$)	1.00 ± 0.67	1.00 ± 0.62	1.00 ± 0.39	1.00 ± 0.56	1.00 ± 0.22	1.00 ± 0.54	1.00 ± 0.87
模型组($n=9$)	3.72 ± 1.62 ^{**}	2.88 ± 1.41 [*]	1.88 ± 0.71 [*]	2.57 ± 1.90 [*]	5.46 ± 3.14 ^{**}	2.49 ± 1.95 [*]	1.94 ± 1.13 [*]
BZL 方组($n=9$)	0.63 ± 0.40 ^{△△}	1.01 ± 0.35 ^{△△}	1.53 ± 0.27	1.06 ± 0.32 [△]	2.28 ± 1.58 ^{△△}	0.62 ± 0.49 ^{△△}	1.51 ± 0.49 [△]

注:与正常组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$;与模型组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$

表 9 各组小鼠血浆 LPS 含量($\bar{x} \pm s$)

组别	血浆 LPS 含量(EU/mL)
正常组($n=9$)	23.97 ± 6.08
模型组($n=9$)	94.40 ± 31.25 [*]
BZL 方组($n=9$)	41.58 ± 10.83 [△]

注:与正常组比较,^{*} $P<0.05$;与模型组比较,[△] $P<0.05$

表 10 各组小鼠大肠组织紧密连接 mRNA 表达($\bar{x} \pm s$)

组别	zo-1 mRNA 相对荧光值	occludin mRNA 相对荧光值	claudin mRNA 相对荧光值
正常组($n=9$)	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.32
模型组($n=9$)	0.42 ± 0.14 ^{**}	0.39 ± 0.14 ^{**}	0.38 ± 0.07 ^{**}
BZL 方组($n=9$)	0.96 ± 0.26 ^{△△}	1.29 ± 0.42 ^{△△}	0.51 ± 0.21

注:与正常组比较,^{**} $P<0.01$;与模型组比较,^{△△} $P<0.01$

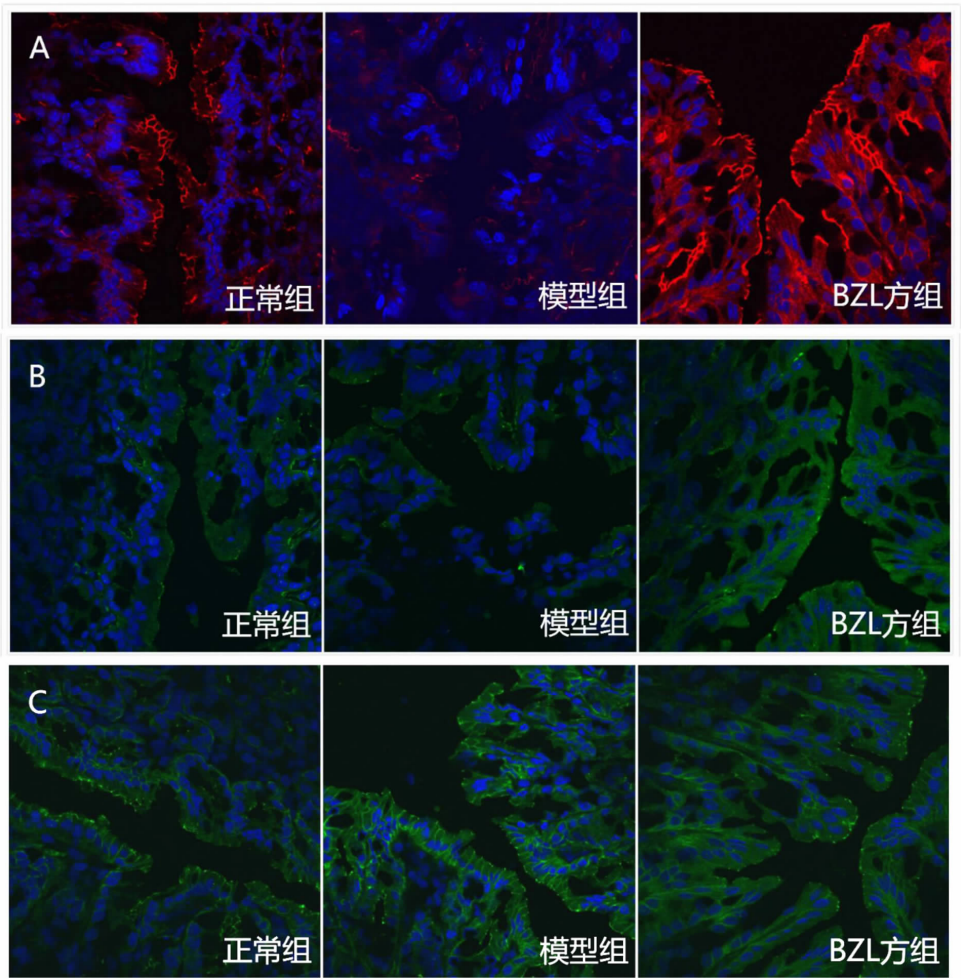


图 3 各组小鼠大肠组织紧密连接(免疫荧光染色,×600)

注:A. zo-1;B. occludin;C. claudin

3 讨论

NASH引起的肝硬化已经越来越多的成为肝移植的一种常见适应证,这与NASH伴随的肝纤维化密切相关。肝纤维化可以独立于其他因素预测NAFLD的预后^[12],一项NAFLD患者的纵向研究中也证实,NASH中患者中,与长期总体死亡率及肝移植相关的是纤维化,而不是其他组织学特征^[13]。此外,如果一个NASH患者不伴有纤维化,未来10~20年内发生死亡或肝相关并发症(如腹水,静脉曲张,肝性脑病)的可能性较低^[4],故NASH防治中需重视组织学中纤维化的评估。SAF积分系统引入了“纤维化”这一组分,被新近更新的诸多指南推荐用于NASH肝组织病理学的评判,且更优于NAS评分系统^[1]。该积分一方面将肝纤维化程度单独评估可以更加精确评估预后;另一方面,将NAS评分中的小叶炎性反应与气球样合并,为疾病活动度评价提供了更大空间^[14]。

本研究再次验证了BZL方对于高脂饮食诱导的NASH的药效。同时发现,高脂饮食17周,小鼠肝小叶已能观察到汇管区胶原纤维的扩张及窦周纤维组织沉积较正常组小鼠增加,胶原组织mRNA检测结果也与之相符,SAF积分提示处于NASH合病纤维化(F2)。BZL方干预后,肝组织NASH病变明显减轻,胶原沉积也有所减轻。

肠道与肝脏在解剖上通过门静脉相连。完整的肠黏膜屏障可以阻止肠源性抗原物质(如细菌及其产物)进入血循环。紧密连接位于肠上皮的顶端,由相邻肠细胞的连接蛋白zo-1,occludin,claudin等组成,是肠黏膜屏障的最重要组成部分。完整的紧密连接既可以有选择性的允许营养物质的运输,又可以防止肠腔内有害物质进入循环^[15]。研究^[16-19]显示,NAFLD患者和动物模型中均存在肠黏膜损伤,在NAFLD小鼠中加重肠黏膜损伤,则其肝组织损伤(NASH、肝纤维化)可进一步加重。在前期研究中我们发现,高脂饮食16周即可诱导NASH小鼠合病肠黏膜损伤^[7],在本研究中虽然在NASH小鼠肠组织HE染色中未观察到明显的病理变化,但血浆LPS水平上升。LPS来源于肠道中的革兰氏阴性菌,肠源性LPS可透过损伤的肠黏膜屏障进入血循环。进一步观察到NASH小鼠肠组织紧密连接蛋白表达较正常组明显下调,上述改变均提示了肠黏膜损伤。BZL方作用后,血浆LPS水平下降,大肠组织紧密连接zo-1,occludin表达均较模型组有所恢复,提示BZL方对NASH小鼠肠黏膜屏障具有保护

作用。

Toll样受体家族是NASH中最主要的识别肠源性细菌产物的受体家族^[20-21],其中,TLR4/CD14受体特异性识别革兰氏阴性菌产物LPS,TLR1与TLR2则介导宿主对革兰氏阳性菌的应答,TLR9可识别双链细菌DNA^[22]。特异性TLRs激活后,细胞内级联反应发生^[23-24],分泌参与炎症反应和细胞死亡的生物活性细胞因子如IL-1 β 和TNF- α 等进一步加重肝损伤,并可能激活肝星状细胞,进而引发肝纤维化。本研究中,模型组小鼠肝组织TLRs受体及炎症反应因子mRNA表达升高,部分提示了肝组织中肠源性细菌产物的暴露,BZL方对肝组织TLR2、TLR4、CD14、TLR9及IL-1 β 、TNF- α mRNA表达均有下调作用,提示BZL方可抑制肠源性细菌产物诱导的TLRs激活而产生炎症反应因子,该作用与其抗NASH的药理效应密切相关。

目前针对NASH缺乏理想药物。胰岛素增敏剂吡格列酮虽对NASH患者生化学指标和肝组织病变均有改善作用,但考虑长期应用的安全性,目前仅推荐用于NASH合并2型糖尿病患者的治疗^[25-26]。有研究发现维生素E 800 U/d口服2年可以使无糖尿病的NASH成人血清氨基酸转移酶恢复正常,脂肪肝变和炎症反应损伤得到改善^[27]。然而长期大剂量使用维生素E的安全性尚不明确^[1]。奥贝胆酸显著减轻NASH患者肝纤维化程度,但是该药对脂代谢有不良影响,可导致皮肤瘙痒,且其有效性还需更多的临床试验验证^[1]。中医药治疗NAFLD有其特色,中药复方多途径、多靶点的药理作用特性也与多脏器、多通路参与其中的NAFLD复杂的发病机制相契合,中医药治疗NAFLD的药效和药理机制值得深入的研究和挖掘。

BZL方为临床治疗NAFLD有效经验方——祛湿化痰方基础上筛选得到的有效成分复方,组方相对简单,成分明确,药理效应得到验证。本研究证实BZL方对高脂饮食诱导的小鼠NASH模型具有良好的治疗作用,该药理效应与其保护肠黏膜、抑制LPS肠渗漏及肝组织中肠源性细菌产物相应受体和炎症反应因子密切相关。

然而BZL方是通过何种机理保护肠上皮细胞间紧密连接进而保护肠黏膜屏障仍需深入研究。此外,白术多糖、栀子苷和绿原酸分别在其中起到何种作用及其相互之间的影响是今后深入研究的关键问题,以期进一步解析BZL方作用机制和配伍特点。

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. 非酒精性脂肪性肝病防治指南(2018 更新版)[J]. 现代医药卫生, 2018, 34(5): 641-649.
- [2] 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(1): 73-84.
- [3] Rinella M E, Sanyal A J. Management of NAFLD: a stage-based approach[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2016, 13(4): 196-205.
- [4] Singh S, Allen A M, Zhen W, et al. Fibrosis Progression in Nonalcoholic Fatty Liver versus Nonalcoholic Steatohepatitis: A Systematic Review and Meta-analysis of Paired-Biopsy Studies[J]. Clinical Gastroenterology & Hepatology, 2015, 13(4): 643-654.
- [5] Lindenmeyer C C, McCullough A J. The Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease—An Evolving View[J]. Clinics in Liver Disease, 2018, 22(1): 11-21.
- [6] Wiest R, Albillos A, Trauner M, et al. Targeting the gut-liver axis in liver disease[J]. Journal of Hepatology, 2017, 67(5): 1084-1103.
- [7] 海亚美, 黄甫, 冷静, 等. 祛湿化痰方对非酒精性脂肪肝小鼠肠粘膜损伤的保护作用[J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 58(5): 361-365.
- [8] 孟胜喜, 胡义扬, 冯琴, 等. 中药组分复方“BZL”的筛选及其对实验性脂肪肝大鼠的作用[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2014, 16(1): 45-51.
- [9] Meng S X, Liu Q, Tang Y J, et al. A Recipe Composed of Chinese Herbal Active Components Regulates Hepatic Lipid Metabolism of NAFLD In Vivo and In Vitro[J]. BioMed Research International, 2016, (2016): 1-12.
- [10] 黄甫, 彭景华, 李晓飞, 等. 有效组分复方 BZL 对高脂饮食诱导小鼠非酒精性脂肪肝的干预作用[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(3): 713-717.
- [11] Pierre Bedossa, Poitou C, Veyrie N, et al. Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients[J]. Hepatology, 2012, 56(5): 1751-1759.
- [12] Ekstedt M, Hagström H, Nasr P, et al. Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up[J]. Hepatology, 2015, 61(5): 1547-1554.
- [13] Angulo P, Kleiner D E, Dam Larsen S, et al. Liver Fibrosis, but no Other Histologic Features, Associates with Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease[J]. Gastroenterology, 2015, 149(2): 389-397.
- [14] Kleiner D E, Makhlouf H R. Histology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis in Adults and Children[J]. Clinics in Liver Disease, 2016, 20(2): 293-312.
- [15] Odenwald M A, Turner J R. The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target? [J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2016, 14(1): 9.
- [16] Rahman K, Desai C, Iyer S S, et al. Loss of Junctional Adhesion Molecule A Promotes Severe Steatohepatitis in Mice on a Diet High in Saturated Fat, Fructose, and Cholesterol[J]. Gastroenterology, 2016, 151(4): 733-746. e12.
- [17] Yizhe Cui, Qiuju Wang, Renxu Chang, et al. Intestinal Barrier Function-NAFLD Interactions and Possible Role of Gut Microbiota[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, doi: 10. 1021/acs. jafc. 9b00080.
- [18] Safari Z, Philippe Gérard. The links between the gut microbiome and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 2019, doi: 10. 1007/s00018-019-03011-w.
- [19] Feng Q, Liu W, Baker S S, et al. Multi-targeting therapeutic mechanisms of the Chinese herbal medicine QHD in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease [J]. Oncotarget, 2017, 8(17): 27820-27838.
- [20] Cai J, Xu M, Zhang X, et al. Innate Immune Signaling in Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Cardiovascular Diseases[J]. Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease, 2019, 14(1): 153-184.
- [21] Woolbright B L, Hartmut J. Mechanisms of Inflammatory Liver Injury and Drug-Induced Hepatotoxicity [J]. Current Pharmacology Reports, 2018, 4(5): 346-357.
- [22] Narayanankutty Arunaksharan, Toll like receptors as a novel therapeutic target for natural products against chronic diseases [J]. Curr Drug Targets, 2019, doi: 10. 2174/1389450120666 190222181506.
- [23] Greuter T, Malhi H, Gores G J, et al. Therapeutic opportunities for alcoholic steatohepatitis and nonalcoholic steatohepatitis: exploiting similarities and differences in pathogenesis [J]. Jci Insight, 2017, 2(17): 1-18.
- [24] Zhou Huiting, Coveney Andrew P, Wu Ming et al. Activation of Both TLR and NOD Signaling Confers Host Innate Immunity-Mediated Protection Against Microbial Infection [J]. Front Immunol, 2018, 9: 3082.
- [25] Armstrong M J, Gaunt P, Aithal G P, et al. Liraglutide safety and efficacy in patients with non-alcoholic steatohepatitis (LEAN): a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 study [J]. Lancet, 2016, 387(10019): 679-690.
- [26] Cusi K, Orsak B, Bril F, et al. Long-Term Pioglitazone Treatment for Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis and Prediabetes or Type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized, Controlled Trial [J]. Annals of Internal Medicine, 2016, 165(5): 305.
- [27] Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, et al. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis [J]. N Engl J Med, 2010, 362(12): 1185-1186.

(2018-11-12 收稿 责任编辑: 徐颖)