

基础研究

护肝清脂片对非酒精性脂肪肝大鼠肝脏中 AMPK 通路激活及 NF- κ B-p65 蛋白的影响

姚笑睿, 夏凡, 唐外姣, 周本杰

南方医科大学珠江医院药学部, 广东 广州 510282

摘要:目的 探讨护肝清脂片对高脂饮食诱导的非酒精性脂肪肝(NAFLD)大鼠脂质代谢和炎症反应的影响及可能的作用机制。方法 将大鼠随机分为6组:模型组、正常组、非诺贝特组(0.1 g/kg)、护肝清脂片低(0.54 g/kg)、中(1.08 g/kg)、高(2.16 g/kg)剂量组。在高脂饲料造模的同时给予相应的药物持续给药12周。HE染色观察各组肝脏形态学及病理学变化,采用全自动生化分析仪检测血清甘油三酯(TG)、胆固醇(CHOL)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)水平及肝组织TG、CHOL水平,酶联免疫吸附法(ELISA)测定肝组织TNF- α 、IL-6、CRP水平。qRT-PCR技术检测肝组织SREBP-1c、FASN的mRNA水平,Western blotting检测肝组织p-AMPK、SREBP-1c、FASN及NF- κ B-p65的蛋白水平。结果 护肝清脂片中、高剂量组能减轻NAFLD大鼠肝脏脂质沉积,显著降低其血清TG、CHOL、AST、ALT水平,同时降低肝组织TNF- α 、IL-6、CRP水平。护肝清脂片中、高剂量组能显著升高NAFLD大鼠肝脏p-AMPK的蛋白表达水平,降低SREBP-1c、FASN及NF- κ B-p65的表达水平。结论 护肝清脂片可能通过激活AMPK通路改善肝脏脂质代谢及抑制NF- κ B活性减轻肝细胞炎症反应,缓解NAFLD进程。

关键词:非酒精性脂肪肝;护肝清脂片;脂质代谢;炎症;AMPK;NF- κ B

Effect of Hupan Qingzhi tablets on AMPK pathway activation and NF- κ B-p65 protein expression in the liver of rats with nonalcoholic fatty liver disease

YAO Xiaorui, XIA Fan, TANG Waijiao, ZHOU Benjie

Department of Pharmacy, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of Hupan Qingzhi tablets on lipid metabolism and inflammation in rats fed on high-fat diet and explore the underlying mechanisms. **Methods** Sixty male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 6 groups, namely HFD group (with high-fat diet and distilled water), control group (with normal diet and distilled water), fenofibrate group (with high-fat diet and treatment with 0.1 g/kg fenofibrate suspension), and low-, moderate- and high-dose Hupan Qingzhi tablet groups (with high-fat diet and treatment with 0.54, 1.08, and 2.16 g/kg Hupan Qingzhi suspension). After daily corresponding treatments for 12 weeks, the histological changes in the liver were observed with HE staining. The serum levels of triglyceride (TG), cholesterol (CHOL), alanine transaminase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST), and the levels of TG and CHOL in the hepatic tissue were assayed. The proinflammatory cytokines TNF- α , IL-6 and CRP were detected with enzyme-linked immunoassay, and p-AMPK, SREBP-1c, FASN and NF- κ B-p65 expression levels in the liver were determined with qRT-PCR or Western blotting. **Results** At high and moderate doses, Hupan Qingzhi effectively decreased the levels of ALT, AST, TG and CHOL levels in the serum, lowered the hepatic levels of TNF- α , IL-6 and CRP, enhanced p-AMPK, and reduced the expression of SREBP-1c, FASN and NF- κ B-p65 in the liver of rats fed on high-fat diet. **Conclusion** Hupan Qingzhi tablets alleviates hyperlipidemia and inflammation in rats fed with high-fat diet possibly by activating AMPK pathway and suppress NF- κ B activity to arrest the progression of nonalcoholic fatty liver disease.

Keywords: nonalcoholic fatty liver disease; Hupan Qingzhi tablet; lipid metabolism; inflammation; AMP-activated protein kinase; nuclear factor- κ B

非酒精性脂肪肝病(Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一种无过量饮酒史,以肝实质细胞脂质贮积和脂肪变性为特征的临床病理综合征,包括单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎(NASH)、肝硬化及肝癌^[1-2]。

目前NAFLD的发病机制尚不明确,有研究表明肝脂质代谢紊乱和炎症反应可能在NAFLD的发生发展中发挥重要作用^[3-5]。腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)在肝脏脂质稳态调节中发挥重要作用,活化的AMPK可通过调节脂肪代谢相关靶蛋白活性从而影响肝脏脂质代谢^[6-8]。此外,有研究发现AMPK可通过调节核因子- κ B(nuclear factor NF- κ B, NF- κ B)活性间接抑制肝脏炎症反应^[9],减轻肝损伤^[10]。已有研究指出,高脂饮食诱导的NAFLD大鼠肝脏中p-AMPK蛋白表达减少、NF- κ B蛋白表达增强^[3, 11-12],表明AMPK及NF- κ B参与了NAFLD的病理过程。因此,

收稿日期:2016-08-11

基金项目:国家自然科学基金(81274160);广东省自然科学基金(S2012010009380)

Supported by National Natural Science Foundation of China (81274160).

作者简介:姚笑睿,硕士,E-mail: 312578497@qq.com

通信作者:周本杰,博士,主任药师,博士生导师,E-mail: zhoubj163@163.com

AMPK及NF-κB有望成为防治非酒精性脂肪肝的治疗靶点。护肝清脂片为我院用于NAFLD治疗的医院制剂,由泽泻、山楂、蒲黄、荷叶、三七等中药组成,经多年临床实践证明其疗效确切。本课题组前期研究结果表明,护肝清脂片对NAFLD脂质代谢异常及炎症反应有较好的调节作用^[13],但其在体内的作用机制尚不明确。本研究利用高脂饮食建立NAFLD大鼠模型,通过观察护肝清脂片干预后大鼠肝组织p-AMPK、NF-κB及相关蛋白的表达水平,探讨其防治NAFLD的可能作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF级雄性SD大鼠60只,体质量180~220 g,购自南方医科大学动物实验中心,合格证号:SCXK(粤)2011-0015。实验动物饲养于南方医院药学部动物室,室内保持12 h昼夜节律,温度25±2℃,自由饮食饮水。

1.1.2 实验药物 护肝清脂片由南方医科大学珠江医院制剂室提供(批号:20150412),每片0.6 g。非诺贝特片(规格0.1g*20片/盒),杭州民生药业有限公司生产(批号:H33022462)。

1.1.3 试剂 高脂饲料,由广东省医学实验动物中心提供(蔗糖20%、猪油15%、胆固醇1.2%、胆酸钠0.2%、酪蛋白10%、磷酸氢钙0.6%、石粉0.4%、预混料0.4%、基础饲料52.2%);Trizol试剂盒,美国Invitrogen公司;SYBR®Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)荧光定量试剂盒、PrimeScript®RT Master Mix Perfect Real Time逆转录试剂盒,日本TAKARA Bio.株式会社;抗体p-AMPKα,美国Cell Signaling公司;抗体NF-κB p65,美国Abcam公司;抗体SREBP-1c、FAS、GAPDH、Histone H3,美国Santa Cruz公司。

1.1.4 仪器 SL-502N电子天平(百分之一),上海民桥公司;BSA224S电子天平(万分之一),德国赛多利斯公司;AU2700全自动生化分析仪,日本Olympus公司;ABI-7500荧光定量PCR仪,美国ABI公司;ABI-9700普通PCR仪,美国ABI公司;BX51正置荧光显微镜,日本Olympus公司;FJ-200高速分散均质机,上海标本模型厂;Legend Mach 1.6R低温高速离心机,美国Thermo公司;BG-verMINI迷你垂直电泳仪,北京百晶公司。

1.2 方法

1.2.1 动物造模及给药 将60只雄性SD大鼠适应性喂养1周后,按体质量随机分为6组:正常组(Con),模型组(HFD),非诺贝特组(FF),护肝清脂片低、中、高剂量组(HL/HM/HH)。正常组给予正常饲料,其余各组给予高脂饲料造模,在造模的同时持续给予相应的药物

干预12周,其中正常组及模型组按10 mL/kg给予蒸馏水灌胃;护肝清脂片低、中、高剂量组分别以0.54、1.08、2.16 g/kg的护肝清脂片混悬液灌胃给药;非诺贝特组以0.1 g/kg的非诺贝特混悬液灌胃给药。1次/d,直至12周结束。

1.2.2 血脂及肝功能检测 12周结束后,各组大鼠以水合氯醛麻醉,腹主动脉采血5 mL,3000 r/min,4℃离心15 min分离血清,采用全自动生化分析仪检测血清甘油三酯(TG)、胆固醇(CHOL)、谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)水平。

1.2.3 肝脏脂质含量检测 取各组大鼠肝组织200 mg,制成组织匀浆,3000 r/min,4℃离心15 min后取上清,采用全自动生化分析仪检测肝组织甘油三酯(TG)、胆固醇(CHOL)水平。采用酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒测定游离脂肪酸(FFA)含量。

1.2.4 炎症因子检测 制备肝组织匀浆,按ELISA试剂盒说明书操作测定肝组织匀浆中肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-6(IL-6)及C反应蛋白(CRP)含量。

1.2.5 肝组织HE染色及病理学评价 取各组大鼠适量肝组织以4%多聚甲醛液固定,经石蜡包埋后HE染色,于正置显微镜下观察肝组织形态学变化,并依据《非酒精性脂肪性肝病诊疗指南》(2010年修订版)中《美国国立卫生研究院NASH临床研究网病例工作组指南》的内容,对肝组织切片进行形态学与病理学分析,并对NAFLD活动度积分进行统计学评价,NAFLD活动度积分评价体系如表1。

表1 NAFLD活动度积分评价体系
Tab.1 Evaluation system of NAFLD activity score

Index	Score/definition
Hepatic steatosis	0 (<5%)
	1 (5%-33%)
	2 (34%-66%)
	3 (>66%)
Lobular inflammation (magnification ×20)	0 (none)
	1 (<2)
	2 (2~4)
	3 (>4)
Hepatocellular ballooning	0 (none)
	1 (rare)
	2 (more)
Total points	0~8

1.2.6 qRT-PCR检测SREBP-1c、FASN mRNA水平 取各组大鼠肝组织60 mg,于液氮中迅速研磨后加入

Trizol 试剂提取总 RNA,测定浓度后进行逆转录反应合成 cDNA,反应条件:37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s。按 SYBR®Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)荧光定量试剂盒说明分配各反应液,以 cDNA 为模版进行扩增,RT-qPCR 上机条件:预变性(95 ℃、30 s,1cycle);扩增(95 ℃、5 s,60 ℃、34 s,40cycles);溶解曲线(95 ℃、5 s,60 ℃、1 min、1cycle),引物序列见表 2。

表2 引物序列
Tab.2 Primer sequence of qRT-PCR

Primer	Sequence (5'-3')
SREBP-1c F	GGCCCTGTGTGTACTGGTCT
SREBP-1c R	AGCATCAGAGGGAGTGAGGA
FASN F	CAGGTGTGTGATGGGAAG
FASN R	TGTGGATGATGTTGATGATAG
GADPH F	GCCAGCCTCGTCTCATAGACA
GADPH R	AGAGAAGGCAGCCCTGGTAAC

1.2.7 Western blotting 检测 取适量肝组织加入冷裂解液后匀浆、离心提取总蛋白,胞核蛋白采用核蛋白提取

试剂盒分离提取。BCA(bicinchoninic acid)法测定蛋白浓度,SDS-PAGE 电泳分离蛋白,电泳结束后取出分离胶,转移至 PVDF 膜上,后加 5%脱脂奶粉封闭液,室温下平摇 1 h;洗膜,加一抗稀释液(p-AMPKα,1:1000;SREBP-1c,1:1000;FAS,1:1000;NF-κB-p65,1:500;GAPDH,1:1000;Histone H3,1:3000)4 ℃过夜孵育;洗膜,加二抗稀释液室温孵育 1 h后,TBBS洗膜 10 min×3 次,均匀滴加 ECL 化学发光液后进行曝光显影。

1.2.8 统计学处理 实验数据采用软件 SPSS 19.0 处理,数据以均数±标准差表示,多组间均数比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),并用 LSD 检验或 Dunnett T₃ 检验作两两比较。认为 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 ALT、AST、TG 及 CHOL 水平

与正常组相比,模型组血清 ALT、AST、TG、CHOL 水平显著升高(P<0.01);与模型组相比,护肝清脂片低、中、高剂量组及非诺贝特组血清 ALT、AST、TG、CHOL 水平显著下降(P<0.01),且护肝清脂片中、高剂量组下降水平尤为突出(表 3)。

表3 各组大鼠血清 ALT、AST、TG、CHOL 水平比较
Tab.3 Serum ALT, AST, TG and CHOL levels indifferent groups (Mean± SD)

Group	ALT (U/L)	AST (U/L)	TG (mmol/L)	CHOL (mmol/L)
Con	32.75±4.03	108.75±11.09	0.34±0.04	1.46±0.79
HFD	106.88±11.18*	183.75±8.65*	0.96±0.10*	4.60±0.60*
HL	66.44±15.60 [#]	162.44±6.58 [#]	0.66±0.04 [#]	2.92±0.38 [#]
HM	45.00±3.50 [#]	138.00±10.17 [#]	0.47±0.05 [#]	2.52±0.20 [#]
HH	39.75±8.27 [#]	133.00±10.52 [#]	0.40±0.05 [#]	2.09±0.27 [#]
FF	45.00±4.38 [#]	137.62±8.23 [#]	0.39±0.06 [#]	2.32±0.13 [#]

*P<0.01 versus Con group. [#]P<0.01 versus HFD group. Con: Control group; HFD: High-fat diet group; HL: HFD + Hugan Qingzhi low dosage group; HM: HFD+Hugan Qingzhi moderate dosage group; HH: HFD+Hugan Qingzhi high dosage group; FF: HFD+ fenofibrate group.

2.2 肝组织 TG、CHOL 及 FFA 水平

与正常组相比,模型组肝组织 TG、CHOL、FFA 水平显著升高(P<0.01);与模型组相比,护肝清脂片中、高剂量组及非诺贝特组肝组织 TG、CHOL、FFA 水平显著降低(P<0.01,表 4)。

2.3 肝组织炎症因子水平

与正常组相比,模型组肝组织 TNF-α、IL-6、CRP 水平显著升高(P<0.01);与模型相比,护肝清脂片各组及非诺贝特组肝组织 TNF-α、IL-6 水平显著降低(P<0.01),同时,护肝清脂片中、高剂量组及非诺贝特组肝组织 CRP 水平较模型组显著降低(P<0.01,表 5)。

2.4 肝组织形态学观察及病理学评价

正常组肝细胞排列整齐,肝小叶结构清晰,细胞无脂变,汇管区无炎细胞浸润;模型组肝细胞肿胀,细胞内有大小不一的脂滴空泡,细胞核边缘化,汇管区有炎细胞浸润;护肝清脂片低剂量组较模型组有改善但不明显,护肝清脂片中、高剂量组及非诺贝特组较模型组脂肪变显著减轻,炎症细胞减少或消失(图 1a)。此外,依据各组 NAS 评分结果发现(图 1b),与正常组相比,模型组的 NAS 积分显著升高(P<0.01);与模型组相比,护肝清脂片中、高剂量组及非诺贝特组的 NAS 积分显著降低(P<0.01)。

表4 各组大鼠肝组织TG、CHOL、FFA水平比较
Tab.4 TG, CHOL and FFA levels in liver homogenates indifferent groups (Mean±SD)

Group	TG (mmol/L)	CHOL (mmol/L)	FFA (mmol/L)
Con	0.70±0.03	0.34±0.05	356.89±50.04
HFD	1.16±0.05 ^{##}	0.68±0.04 ^{##}	588.37±86.44 ^{##}
HL	0.95±0.07	0.46±0.04 [*]	558±68.91
HM	0.78±0.04 ^{**}	0.37±0.03 ^{**}	376.02±53.60 ^{**}
HH	0.77±0.04 ^{**}	0.38±0.04 ^{**}	397.50±58.27 ^{**}
FF	0.78±0.04 ^{**}	0.38±0.04 ^{**}	380.40±51.39 ^{**}

^{##}*P*<0.01 versus Con group. ^{*}*P*<0.05, ^{**}*P*<0.01 versus HFD group. Con: Control group; HFD: High-fat diet group; HL: HFD + Hugan Qingzhi low dosage group; HM: HFD + Hugan Qingzhi moderate dosage group; HH: HFD+Hugan Qingzhi high dosage group; FF: HFD+ fenofibrate group.

表5 各组大鼠肝组织TNF-α、IL-6、CRP水平比较
Tab.5 TNF-α, IL-6 and CRP levels in liver homogenates in different groups (Mean±SD)

Group	TNF-α (pg/mg prot)	IL-6 (pg/mg prot)	CRP (ng/mg prot)
Con	12.78±1.06	6.94±0.77	125.82±12.32
HFD	30.16±2.81 ^{##}	17.89±1.34 ^{##}	321.49±36.86 ^{##}
HL	21.18±1.19 ^{**}	11.77±1.08 ^{**}	278.99±39.9
HM	13.87±1.48 ^{**}	7.94±1.22 ^{**}	160.20±13.86 ^{**}
HH	14.67±1.37 ^{**}	8.28±1.20 ^{**}	162.26±11.62 ^{**}
FF	16.74±2.61 ^{**}	8.45±1.21 ^{**}	167.85±39.62 ^{**}

^{##}*P*<0.01 versus Con group. ^{**}*P*<0.01 versus HFD group. Con: Control group; HFD: High-fat diet group; HL: HFD + Hugan Qingzhi low dosage group; HM: HFD + Hugan Qingzhi moderate dosage group; HH: HFD+Hugan Qingzhi high dosage group; FF: HFD+ fenofibrate group.

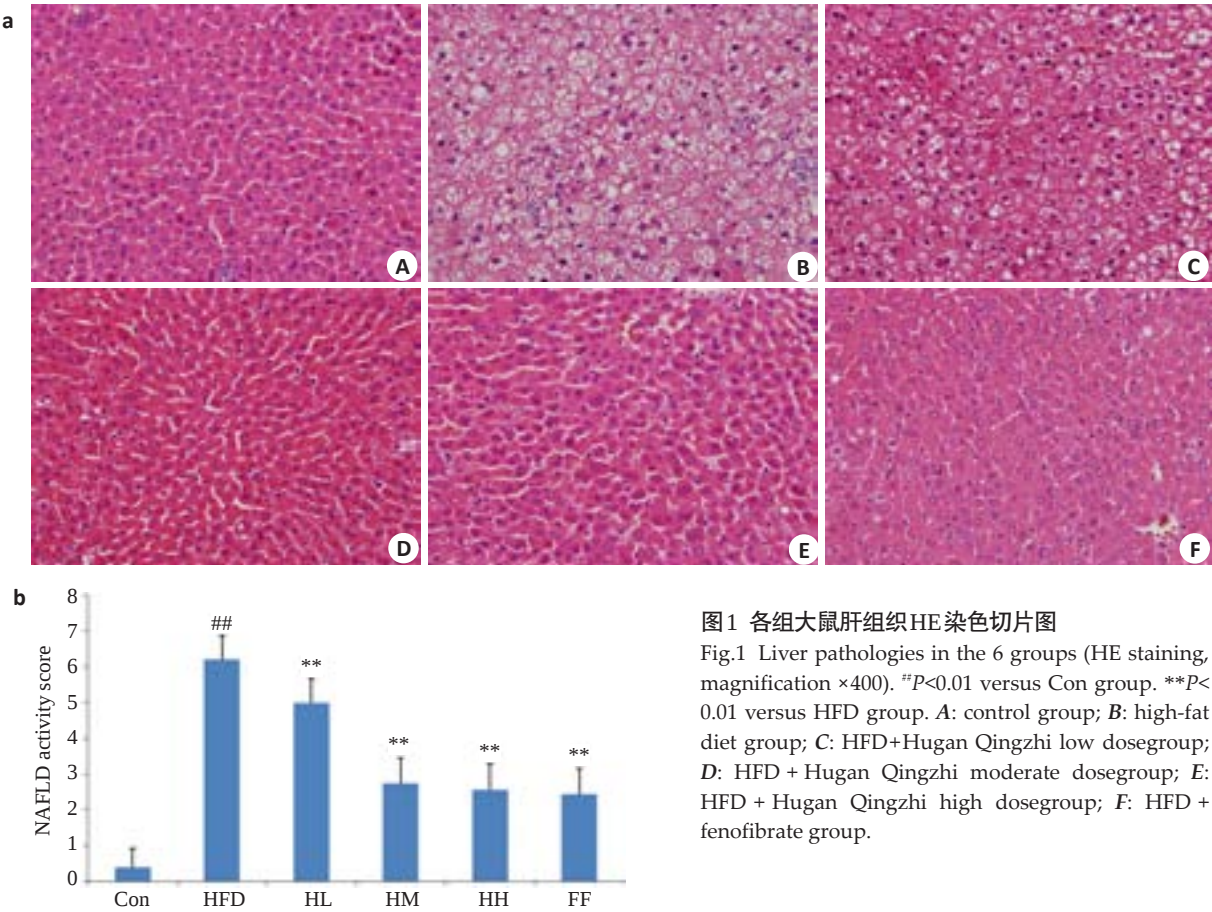


图1 各组大鼠肝组织HE染色切片图
Fig.1 Liver pathologies in the 6 groups (HE staining, magnification ×400). ^{##}*P*<0.01 versus Con group. ^{**}*P*<0.01 versus HFD group. A: control group; B: high-fat diet group; C: HFD+Hugan Qingzhi low dosegroup; D: HFD + Hugan Qingzhi moderate dosegroup; E: HFD + Hugan Qingzhi high dosegroup; F: HFD + fenofibrate group.

2.5 护肝清脂片对大鼠肝脂质代谢的影响

由于AMPK的活性与其 α 亚基Thr-172位点的磷酸化(pAMPK α)密切相关,所以通过检测p-AMPK α 的蛋白表达量评估AMPK的活性。如图2A、B所示,与正常组相比,模型组中p-AMPK α 的蛋白表达水平显著降低($P<0.01$);与模型相比,护肝清脂片中、高剂量组及非诺贝特组中p-AMPK α 的蛋白表达水平

显著升高($P<0.01$)。

如图2A、B所示,与正常组相比,模型组中SREBP-1c、FASN蛋白水平显著升高($P<0.01$);与模型相比,护肝清脂片中、高剂量组及非诺贝特组能显著降低大鼠肝脏中SREBP-1c、FASN蛋白的表达水平($P<0.01$)。同时,SREBP-1c和FASN的mRNA表达水平与其蛋白表达水平结果一致(图2C)。

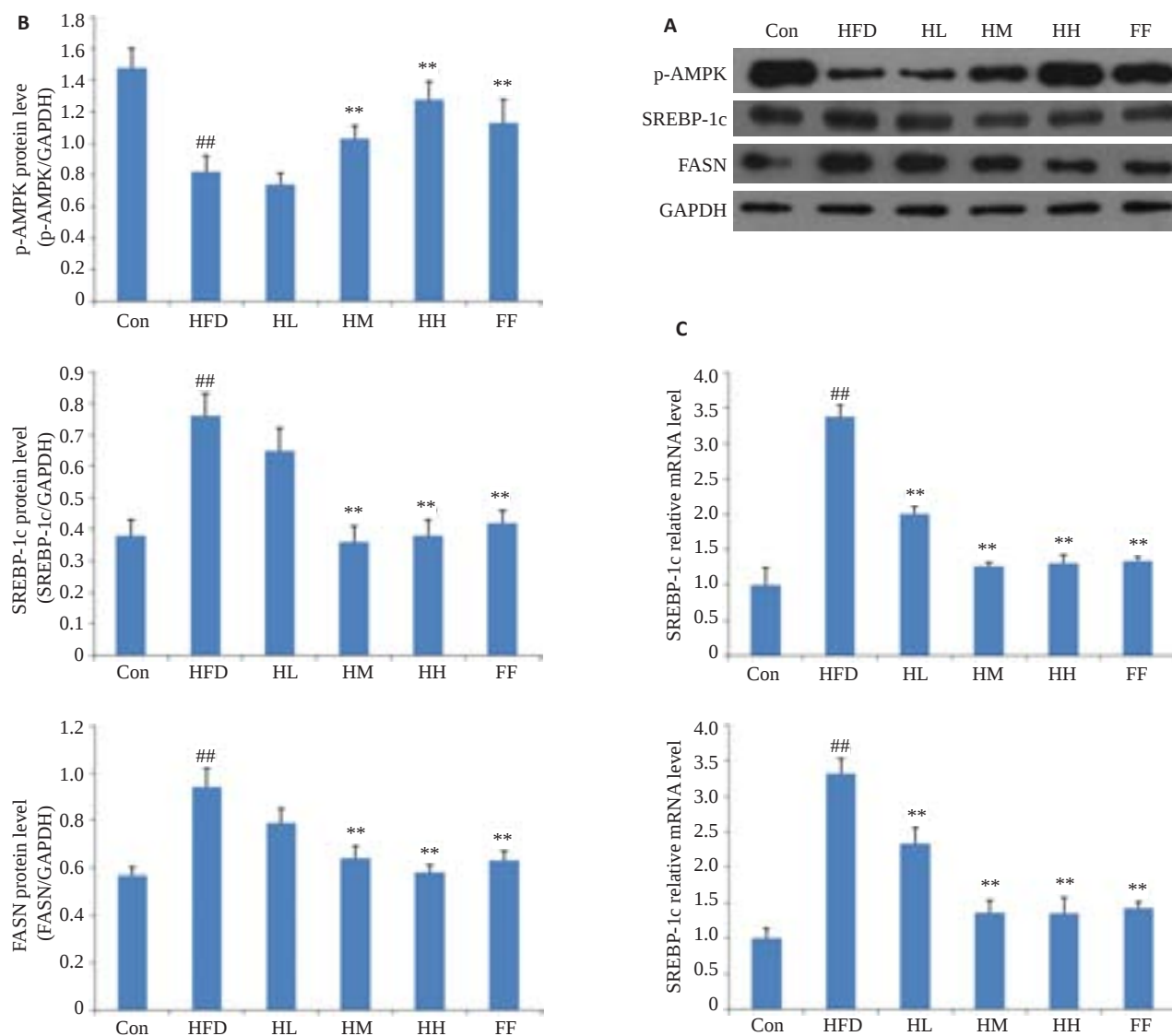


图2 各组大鼠肝组织中p-AMPK α 、SREBP-1c、FASN的表达水平

Fig.2 Expressions of p-AMPK α , SREBP-1c and FASN in liver homogenates. A: Western blotting; B: Gray-level scores; C: SREBP-1c and FASN mRNA expression determined by qRT-PCR. ^{##} $P<0.01$ versus Con group. ^{**} $P<0.01$ versus HFD group. Con: control group; HFD: high-fat diet group; HL: HFD+Hugan Qingzhi low dose group; HM: HFD+Hugan Qingzhi moderate dose group; HH: HFD+Hugan Qingzhi high dose group; FF: HFD+fenofibrate group.

2.6 护肝清脂片对大鼠肝脏炎症反应的改善作用

由表5可知,护肝清脂片中、高剂量组能显著降低NAFLD大鼠肝组织TNF- α 、IL-6、CRP水平($P<0.01$),同时,Western blot检测各组大鼠肝细胞核中NF- κ B-p65的蛋白表达水平,结果显示,与正常组相比,模

型组大鼠肝细胞核中NF- κ B-p65的蛋白表达水平显著升高($P<0.01$),而护肝清脂中、高剂量组及非诺贝特组大鼠肝细胞核中NF- κ B-p65的蛋白表达水平较模型组显著降低($P<0.01$,图3)。

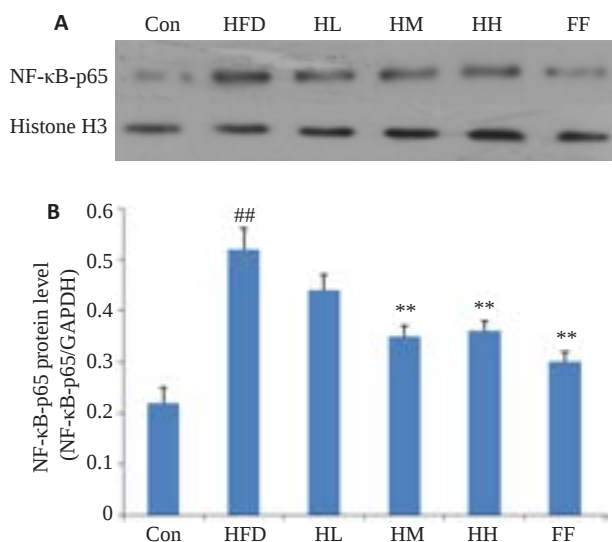


图3 各组大鼠肝细胞核中NF-κB-p65的蛋白表达

Fig.3 Protein level of NF-κB-p65 in the hepatocyte nuclei. A: Western blotting; B: Gray-level scores. ^{##} $P<0.01$ versus Con group. ^{**} $P<0.01$ versus HFD group. Con: control group; HFD: high-fat diet group; HL: HFD + Hugin Qingzhi low dose group; HM: HFD + Hugin Qingzhi moderate dose group; HH: HFD + Hugin Qingzhi high dose group; FF: HFD+fenofibrate group.

3 讨论

随着生活水平的提高,NAFLD成为最常见的肝脏疾病且发病率逐年升高,尤其在肥胖人群中发病率高达75%^[14]。但目前尚没有理想的NAFLD治疗药物。护肝清脂片在降脂及抗炎方面临床疗效确切,但其在体内的作用机制尚不清楚。本文研究结果显示,模型组大鼠体质量及肝指数明显增加,血清TG、CHOL及肝组织TG、CHOL、FFA水平较正常组显著升高($P<0.01$),炎症因子指标也发生相应改变,肝细胞呈弥漫性脂肪病变,由此表明本文NAFLD大鼠造模成功。同时,护肝清脂片中、高剂量组能显著降低NAFLD大鼠血清ALT、AST水平及肝组织TG、CHOL、FFA水平($P<0.01$),抑制炎症因子水平,改善肝脏脂质堆积及炎症反应,说明护肝清脂片能有效缓解NAFLD的发展进程。

AMPK在调节体内能量平衡及脂质代谢过程中具有关键性作用,活化的AMPK可通过抑制脂质合成相关基因表达、诱导脂肪酸代谢基因表达改善肝脏脂质堆积^[4, 15-16]。研究表明,给予AMPK敲除的小鼠高脂饲料喂养,在第5周即出现肝脂肪变,血糖升高及胰岛素抵抗,而正常组小鼠第12周才出现肝脂肪变^[17];同时在食源性肥胖者恢复体质量的过程中,患者皮下脂肪组织中AMPK表达升高,血清甘油三酯含量降低^[18]。白藜芦醇、茶黄素等作为AMPK的激活剂,可用于治疗高脂饮食导致的NAFLD,包括改善脂质代谢、减轻炎症反应、提高细胞活性等^[19-20]。这些研究表明AMPK可看作为治疗NAFLD疾病一个重要的机制。本文研究结果显

示,护肝清脂片中、高剂量组能显著升高NAFLD大鼠肝脏p-AMPK的蛋白表达水平,降低下游靶分子SREBP-1c和FASN的mRNA及蛋白表达水平,减少肝细胞脂质合成。前期研究亦证实,护肝清脂片可通过pAMPK/ACC/CPT1通路改善肝脏脂肪酸氧化^[21],由此表明,护肝清脂片可能是通过激活AMPK进而调节下游相关脂质合成蛋白的表达以达到改善NAFLD肝脏脂质代谢,逆转肝细胞脂质沉积的作用。

NF-κB已经被证实是具有多种功能的转录因子,p65是涉及NF-κB激活的一个重要亚基^[22]。NF-κB在NAFLD的起始及发展过程中能调控多种基因的表达,譬如:食物中的脂质尤其是FFA能激活转录因子NF-κB,增加TNF-α、IL-6、CRP等炎症细胞因子的表达,引起肝损伤^[23-24]。长期的高脂饮食和由此导致的肥胖会通过上述途径诱发炎症反应,导致肝内的炎症因子水平升高,最终引起NAFLD^[25]。同时多项研究表明,AMPK可通过抑制NF-κB的活性进而减轻炎症反应^[4, 9]。本文结果显示,模型组大鼠肝细胞核中NF-κB-p65的蛋白表达水平较正常组显著升高,且TNF-α、IL-6、CRP水平也显著升高;而护肝清脂片中、高剂量组能显著降低NAFLD大鼠肝细胞核中NF-κB-p65表达水平及TNF-α、IL-6、CRP水平,减轻肝细胞炎症反应,缓解NASH的发展进程。由此推测,护肝清脂片可能通过阻断NF-κB信号通路,减少TNF-α、IL-6、CRP等炎症因子的表达进而发挥其对NAFLD的抗炎作用。

参考文献:

- [1] Tuyama AC, Chang CY. Non-alcoholic fatty liver disease [J]. J Diabetes, 2012, 4(3): 266-80.
- [2] Golabi P, Locklear CT, Austin P, et al. Effectiveness of exercise in hepatic fat mobilization in non-alcoholic fatty liver disease: Systematic review [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(27): 6318-27.
- [3] Lin Z, Cai F, Lin N, et al. Effects of glutamine on oxidative stress and nuclear factor-kappaB expression in the livers of rats with nonalcoholic fatty liver disease [J]. Exp Ther Med, 2014, 7(2): 365-70.
- [4] Zou B, Ge ZZ, Zhang Y, et al. Persimmon tannin accounts for hypolipidemic effects of persimmon through activating of AMPK and suppressing NF-kappaB activation and inflammatory responses in high-fat diet rats [J]. Food Funct, 2014, 5(7): 1536-46.
- [5] Li M, Ye T, Wang XX, et al. Effect of Octreotide on Hepatic Steatosis in Diet-Induced Obesity in Rats [J]. PLoS One, 2016, 11(3): e152085.
- [6] Ducommun S, Deak M, Sumpton D, et al. Motif affinity and mass spectrometry proteomic approach for the discovery of cellular AMPK targets: identification of mitochondrial fission factor as a new AMPK substrate [J]. Cell Signal, 2015, 27(5): 978-88.
- [7] Smith BK, Marcinko K, Desjardins EM, et al. Treatment of nonalcoholic fatty liver disease: role of AMPK [J]. Am J Physiol

- Endocrinol Metab, 2016, 311(4): E730-E740.
- [8] Lin KT, Hsu SW, Lai FY, et al. Rhodiola crenulata extract regulates hepatic glycogen and lipid metabolism via activation of the AMPK pathway[J]. BMC Complement Altern Med, 2016, 16: 127.
- [9] Salminen A, Hyttinen JM, Kaamiranta K. AMP-activated protein kinase inhibits NF-kappaB signaling and inflammation: impact on healthspan and lifespan[J]. J Mol Med (Berl), 2011, 89(7): 667-76.
- [10] Park HJ, Lee JY, Chung MY, et al. Green tea extract suppresses NFkappaB activation and inflammatory responses in diet-induced obese rats with nonalcoholic steatohepatitis[J]. J Nutr, 2012, 142(1): 57-63.
- [11] Li Y, Ma J, Zhu H, et al. Targeted inhibition of calpain reduces myocardial hypertrophy and fibrosis in mouse models of type 1 diabetes[J]. Diabetes, 2011, 60(11): 2985-94.
- [12] Li Z, Xu J, Zheng P, et al. Hawthorn leaf flavonoids alleviate nonalcoholic fatty liver disease by enhancing the adiponectin/AMPK pathway[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(10): 17295-307.
- [13] Tang W, Zeng L, Yin J, et al. Hugin Qingzhi Exerts Anti-Inflammatory Effects in a Rat Model of Nonalcoholic Fatty Liver Disease [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2015, 2015: 810369.
- [14] Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2011, 34(3): 274-85.
- [15] Um JH, Park SJ, Kang H, et al. AMP-activated protein kinase-deficient mice are resistant to the metabolic effects of resveratrol [J]. Diabetes, 2010, 59(3): 554-63.
- [16] Yang M, Li X, Zeng X, et al. Rheum palmatum L. Attenuates High Fat Diet-Induced Hepatosteatosis by Activating AMP-Activated Protein Kinase[J]. Am J Chin Med, 2016, 44(3): 551-64.
- [17] Mottillo EP, Desjardins EM, Crane JD, et al. Lack of Adipocyte AMPK Exacerbates Insulin Resistance and Hepatic Steatosis through Brown and Beige Adipose Tissue Function[J]. Cell Metab, 2016, 24(1): 118-29.
- [18] Fritzen AM, Lundsgaard AM, Jordy AB, et al. New Nordic Diet-Induced Weight Loss Is Accompanied by Changes in Metabolism and AMPK Signaling in Adipose Tissue [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2015, 100(9): 3509-19.
- [19] Kudo N, Arai Y, Suhara Y, et al. A Single Oral Administration of Theaflavins Increases Energy Expenditure and the Expression of Metabolic Genes[J]. PLoS One, 2015, 10(9): e137809.
- [20] Andre DM, Calixto MC, Sollon C, et al. Therapy with resveratrol attenuates obesity-associated allergic airway inflammation in mice [J]. Int Immunopharmacol, 2016, 38: 298-305.
- [21] Yin J, Luo Y, Deng H, et al. Hugin Qingzhi medication ameliorates hepatic steatosis by activating AMPK and PPARalpha pathways in L02 cells and HepG2 cells [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 154(1): 229-39.
- [22] Napetschnig J, Wu H. Molecular basis of NF-kappaB signaling[J]. Annu Rev Biophys, 2013, 42: 443-68.
- [23] Glauert HP. Role of NF-kappaB in hepatocarcinogenesis and its potential inhibition by dietary antioxidants [J]. Curr Cancer Drug Targets, 2012, 12(9): 1160-72.
- [24] Zhang B, Roh YS, Liang S, et al. Neurotrophin suppresses inflammatory cytokine expression and cell death through suppression of NF-kB and JNK in hepatocytes[J]. PLoS One. 2014, 9(12): e114071.
- [25] Zeng L, Tang WJ, Yin JJ, et al. Signal transductions and non-alcoholic fatty liver: a mini-review[J]. Int J Clin Exp Med, 2014, 7(7): 1624-31.

(编辑:经 媛)