

泽泻提取物对大鼠非酒精性脂肪肝的治疗作用

龚 杰, 丁 岩, 干仲元, 王慧雯, 朱世敏, 李汉清

(上海中医药大学教学实验中心, 上海 201203)

【摘要】 目的 研究泽泻提取物(*Alisma orientale* extract, AOE)对非酒精性脂肪肝的治疗作用,并通过 HepG2 细胞模型系统性地研究其作用机制。**方法** 油酸和棕榈酸混合物诱导 HepG2 细胞脂肪变性,Western blot 检测内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ER stress)标记蛋白 GRP78、CHOP、XBP-1 等评价泽泻提取物对脂肪酸引起的 HepG2 细胞内质网应激的抑制作用;高脂饲料喂养 SD 大鼠制作非酒精性脂肪肝模型,不同浓度泽泻提取物灌胃后 ELISA 法检测大鼠血清中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、甘油三酯(triglyceride, TG)、高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)、低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)等血清生化指标判断 SD 大鼠模型的肝脂肪性病变程度。RT-PCR 法检测肝组织内细胞色素 P450 2E1(CYP2E1)、细胞色素 P450 2A5(CYP2A5)基因的表达情况,脂肪性肝炎大鼠肝脏内 CYP2E1/CYP2A5 呈诱导表达状态抗氧化能力,在加重脂质过氧化等过程参与了脂肪性肝炎的形成起作用。Western blot 检测 HepG2 细胞中 JNK1、p-JNK1、STAT3、GRP78、CHOP 和 XBP-1 等蛋白表达水平的变化,探寻肝细胞脂肪性病变过程的作用通路。**结果** 泽泻提取物处理后, JNK1、p-JNK1、GRP78、CHOP 和 XBP-1 表达水平明显下降, STAT3 表达增加,并且呈剂量依赖性;ELISA 结果显示,泽泻提取物处理后,大鼠血清中谷草转氨酶、谷丙转氨酶、甘油三酯、低密度脂蛋白的表达水平呈剂量依赖性下降,超氧化物歧化酶、高密度脂蛋白表达升高;同时 RT-PCR 结果显示泽泻提取物处理后,肝组织内 CYP2E1、CYP2A5 基因表达水平明显下降,尤其是高剂量组。**结论** 泽泻提取物可以通过抑制脂肪变性肝细胞的内质网应激反应,抑制 JNK 信号通路及代谢酶表达从而在机体上达到治疗非酒精性脂肪肝的目的。

【关键词】 泽泻提取物;非酒精性脂肪肝;内质网应激;SD 大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 07-0068-09

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.07.012

Therapeutic effects of *Alisma orientale* extract on nonalcoholic fatty liver disease in rats and its mechanism

GONG Jie, DING Yan, GAN Zhongyuan, WANG Huiwen, ZHU Shimin, LI Hanqing
(Experimental Center for Education, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine,
Shanghai 201203, China)

【Abstract】 Objective To study the therapeutic effects of *Alisma orientale* extract (AOE) on nonalcoholic fatty liver disease in rats and systematically determine the underlying mechanism. **Methods** Collected samples of an oleic acid-palmitic acid mixture were applied to adiposehepatic HepG2 cells after AOE treatment. ER stress marker proteins GRP78, CHOP, and XBP-1, as well as JNK1, p-JNK1, and STAT3 were detected by Western blotting. Serum SOD, AST, ALT,

TG, HDL, and LDL levels were measured after establishment of high fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease and AOE treatment in SD rats as confirmed by oil red staining. CYP2E1 and CYP2A5 gene expression levels were determined in liver tissue by RT-PCR. **Results** After AOE treatment, JNK1, p-JNK1, GRP78, CHOP, and XBP-1 expression showed obvious dose-dependent downregulation, while STAT3 expression was increased. Serum AST, ALT, TG, and LDL levels were reduced dose-dependently, but SOD and HDL levels were increased. CYP2E1 and CYP2A5 gene expression levels were decreased obviously in liver tissue, especially in the high dose group. **Conclusions** AOE inhibited ER stress in adipohepatic HepG2 cells, and JNK signaling pathway and metabolic enzymes *in vivo* to treat nonalcoholic fatty liver disease.

【Key words】 *Alisma orientale* extract, AOE; nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD; endoplasmic reticulum stress; SD rats

非酒精性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是一种无过量饮酒史、饮酒折合乙醇量小于 140 g/周 (女性 < 70 g/周), 以肝实质细胞脂肪变和脂肪贮积为特征的临床病理综合征, 包括单纯性脂肪肝以及由其演变的脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH) 和肝硬化, 胰岛素抵抗和遗传易感性与其发病关系密切^[1]。中医认为病位在肝, 病机特点以脾胃虚弱、肝郁气滞、肝郁脾虚、肾精亏虚等为主, 辨证以健脾化湿, 疏肝健脾, 化痰祛瘀等为治则, 经典方剂柴胡疏肝散、二陈汤、茵陈五苓散、香砂六君子汤等, 用药频次较高者为山楂、泽泻、柴胡、何首乌、郁金、半夏、陈皮、茯苓、虎杖、大黄等^[2]。

泽泻为泽泻科植物泽泻 *Alisma orientale* (Sam) Juzep 的干燥块茎, 冬季茎叶开始枯萎时采挖, 其性寒, 味甘、淡, 入肾、膀胱经, 具有利水渗湿、泄热、化浊降脂等功效, 用于小便不利、水肿胀满、泄泻尿少、痰饮眩晕、热淋涩痛、高脂血症等病症^[3]。现代研究表明泽泻主要化学成分为三萜类化合物 (泽泻醇 A、泽泻醇 B 及其衍生物)、倍半萜类化合物 (泽泻醇, 环氧泽泻烯, 泽泻萜醇 A, B, C, 磺酰泽泻醇 A, B, C, D 等)、二萜类化合物以及一些类脂和糖类化合物; 其主要药理作用包括利尿, 抗结石, 抗高血压、高血脂, 抗动脉粥样硬化, 抗脂肪肝, 免疫调节等^[4-8]。

严伟伦^[9]报道了 60 例患者的临床试验, 发现泽泻调脂颗粒方能减轻脾虚痰瘀型非酒精性脂肪肝患者神疲乏力、食物不振、腹胀、四肢困倦、胸胁胀满等症状, 其作用机制包括有效改善非酒精性脂肪肝患者的各项血脂水平 (TC、TG、LDL-C、HDL-C) 以及有效降低非酒精性脂肪肝患者的转氨酶 (AST、ALT) 等。孙晓娜等^[10]报道了 100 例患者的临床试验, 结果发现泽泻泄浊颗粒配合穴位贴敷能减轻非

酒精性脂肪肝的严重程度, 改善脂质代谢, 保护肝功能。

虽然泽泻对于非酒精性脂肪肝的治疗效果已经明确, 但是其作用机制报道较少。有研究表明脂质过氧化是内质网应激的诱导因素, 内质网应激发生的过程主要是由于缺氧、氧化应激、错误合成蛋白质等多种因素诱发。内质网应激发生后, 启动了有关细胞信号转导途径抑制细胞蛋白合成, 或者错误合成蛋白, 对不能修复的细胞则通过内质网相关细胞凋亡机制诱导其凋亡以维持内环境稳态。过强和过长的内质网应激反应通过细胞能量耗竭、钙稳态失衡、激活内质网应激相关细胞凋亡等机制使器官和组织产生损伤, 其中内质网应激相关细胞凋亡是应激状态下细胞损伤的主要机制。NAFLD 发病机制的“二次打击”假说又表明氧化应激造成的还原性谷胱甘肽水平下降可以引起 JNK 信号通路过度活化而诱导脂肪变性细胞死亡^[11]。泽泻作为临床有效的抗脂肪肝药物, 不同的研究者做出了多方面探索, 但却没有该方面机制的系统性研究。本文通过泽泻提取物缓解内质网应激造成肝细胞损伤, 从而达到对非酒精性脂肪肝的治疗作用。

本研究通过体外 HepG2 细胞脂肪变性模型及大鼠非酒精性脂肪肝模型, 对泽泻提取物作用后重要生化指标、蛋白水平进行检测, 系统地总结泽泻对于非酒精性脂肪肝的药理作用机制, 为临床用药进一步提供指导。

1 材料和方法

1.1 实验材料

HepG2 人肝癌细胞购自中国科学院干细胞库。共 16 只雄性 SPF 级 SD 大鼠, 体重 (180 ± 10) g, 6 ~ 8 周龄, 由国家实验动物种子中心上海分中心暨

上海斯莱克实验动物有限责任公司提供[SCXK(沪)2017-0005]。实验于上海中医药大学实验动物楼 SPF 动物房进行[SYXK(沪)2014-0008],动物饲养于动物房通风鼠笼中,环境温度控制在 20℃~22℃,湿度为 50%,12 h:12 h 光亮和光暗循环。SD 大鼠共分为四组,每组 4 只,分别为对照组、400、200、100 mg/kg AOE 组。本实验动物伦理编号:SZY201706008。所有操作均按照 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

泽泻提取物由上海中医药大学中药研究中心提供。泽泻提取物的制备:将中药泽泻饮片成粗粉,分别用双蒸水、50% 甲醇和纯甲醇煎煮,提取液浓缩回收,制备为泽泻水浸膏、50% 甲醇浸膏和泽泻纯甲醇浸膏。用含 5% 乙醇和 7% 聚丙烯酰胺纤维素钠溶液作为泽泻提取物增溶剂溶解浸膏,制得浓度均相当于每毫升 1.0 g 泽泻生药的 3 种提取物混悬液。

油酸(货号:O1383)、棕榈酸购自 Sigma(货号:P5585);改良油红 O 染色试剂盒购自南京森贝伽生物科技有限公司;大鼠超氧化物歧化酶(SOD)ELISA 试剂盒(货号:SBJ-R0008)、大鼠天冬氨酸氨基转移酶(AST)ELISA 试剂盒(货号:SBJ-R0117)、大鼠丙氨酸氨基转移酶(ALT)ELISA 试剂盒(货号:SBJ-R0116)、大鼠甘油三酯(TG)ELISA 试剂盒(货号:SBJ-R0195)、大鼠高密度脂蛋白(HDL)ELISA 试剂盒(货号:SBJ-R0197)、大鼠低密度脂蛋白(LDL)ELISA 试剂盒(货号:SBJ-R0196)购自南京森贝伽生物科技有限公司;Anti-JNK1(phospho T183)抗体(货号:ab47337)、Anti-JNK1 抗体[EPR140(2)](货号:ab110724)、Anti- β -catenin 抗体(货号:ab16051)、Anti-GRP78 BiP 抗体(货号:ab140318)、Anti-DDIT3 抗体[9C8](货号:ab11419)、Anti-STAT3 抗体[9D8](货号:ab119352)和 Anti-XBP1 抗体(货号:ab37151)购自 Abcam。

可见紫外分光光度计,上海尤尼柯公司(型号:WFZ UV-2100);低温高速离心机,德国 Eppendorf 公司(型号:5430R);600 V 电泳仪,美国 GE Healthcare 公司(型号:EPS601);SDS-PAGE 电泳槽,北京六一公司(型号:DYCZ-24DN);qPCR 扩增仪,美国 ABI 公司(型号:ABI 7500);病理切片机,上海徕卡仪器有限公司(型号:RM2016);倒置荧光显微镜,日本 Nikon 公司(型号:Nikon Eclipse Ti-SR)。

1.3 实验方法

1.3.1 肝细胞脂肪变性模型建立

用油酸和棕榈酸诱导 HepG2 细胞积累甘油三酯^[12]。将油酸和棕榈酸(OA:PA=2:1,摩尔比)混合后置于 90℃ 以上水浴中加热并不断摇晃,5~10 min 左右可完全溶解,趁热移入 DMEM 完全培养基中,使油酸和棕榈酸的终浓度为 0.33 mol/L 和 0.17 mol/L。HepG2 接种于孔板中,孵育过夜后,用 DMEM 低糖培养基进行细胞饥饿 12 h,然后换成含 0.5 mol/L NEFA 的 DMEM 完全培养基培养 24 h 诱导 HepG2 细胞脂肪变性。

1.3.2 Western blot 实验

用混合脂肪酸诱导 HepG2 细胞脂肪变性后,加入生理盐水和不同浓度的泽泻提取物处理 24 h 后,收集细胞,含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液冰上裂解 30 min 得到蛋白样品。BCA 法测定总蛋白含量。100℃ 金属浴变性 10 min 后,加入 loading buffer 上样,跑电泳,转膜后,5% 牛奶封闭,按说明书比例加入一抗及二抗,加入底物,化学发光仪器上观察条带并计算灰度值。

1.3.3 非酒精性脂肪肝动物模型建立

SD 大鼠喂以高脂饲料(10% 猪油 + 2% 胆固醇 + 88% 标准饲料)及饮水^[13],连续喂食 8 周。4 只一组,分成四组,包括生理盐水对照组及泽泻提取物处理组(设置 400、200、100 mg/kg 泽泻提取物分别为高、中、低剂量给药组)。以灌胃方式给予药物治疗,每日 2 次,持续 4 周。对照组灌以生理盐水。油红染色阳性即为建模成功。

1.3.4 大鼠血清及肝组织采集

给药 4 周后,全体大鼠连续禁食 12 h。称量体重,然后以 1% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠,腹主动脉取新鲜血液 10 mL,4℃、3000 r/min 离心 5 min,取上清用于 ELISA 法生化指标测定;取血后,迅速解剖取得肝脏,PBS 冲洗干净血液后,置于含 20 倍体积 TRIzol 溶液的 EP 管中,液氮速冻后置于 -80℃ 冰箱保存,用于总 RNA 提取、基因表达分析。

1.3.5 血清生化指标检测

采集血清按照试剂盒说明书进行含量测定。

1.3.6 RT-PCR 实验

解剖所得肝组织加入 20 倍体积的 TRIzol 溶液并研磨。提取 RNA 后,按照反转录试剂盒步骤反转录为 cDNA,并进行 RT-PCR 实验。

1.3.7 油红染色

解剖所得肝组织在 OCT(聚乙二醇和聚乙烯醇的水溶性混合物)包埋后冰冻切片机切成 15 μm 的切片后,油红染色判断脂肪染色面积。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析。定量结果采用多个样本油红染色面积为准,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 油红 O 染色判断脂肪肝模型

高脂饮食诱发非酒精性脂肪肝模型组织中脂肪含量增高,肝细胞排列不规则,细胞内脂滴多为大泡,多囊泡型,油红 O 染色后,脂肪滴多呈片分布,水溶性封片剂封片后,脂滴常汇集在切片表面(见图 1)。

2.2 Western blot 检测内质网应激标记蛋白水平

作为内质网应激的经典标记分子,当细胞发生内质网应激时会上调 GRP78 表达并且通过活化 CHOP、JNK、caspase-12 等通路诱导凋亡发生^[14-15]。IRE-1/XBP-1 信号通路是高度保守的内质网应激通路,内质网应激通过酶剪切作用活化 XBP-1,后者的活化导致内质网伴侣分子表达增加^[16-17]。内质网应激可以通过抑制 FAK-STAT3 通路引发线粒体功能紊乱^[17]。如图 2 ~ 3 所示,泽泻提取物处理后, JNK1、p-JNK1、GRP78、CHOP 和 XBP-1 表达水平明显下降($P < 0.01$),STAT3 表达增加($P < 0.01$),并且呈剂量依赖性。实验结果说明泽泻提取物可

以抑制混合脂肪酸诱导 HepG2 细胞脂肪变性导致的内质网应激。

2.3 透射电镜结果

混合脂肪酸作用于 HepG2 细胞后会导致细胞发生脂滴蓄积、空泡化等脂肪变性^[19]。如图 4 所示,经过泽泻提取物处理,脂肪变性 HepG2 细胞中脂滴减少。

2.4 泽泻提取物对 SD 大鼠肝脂肪性病变的影响

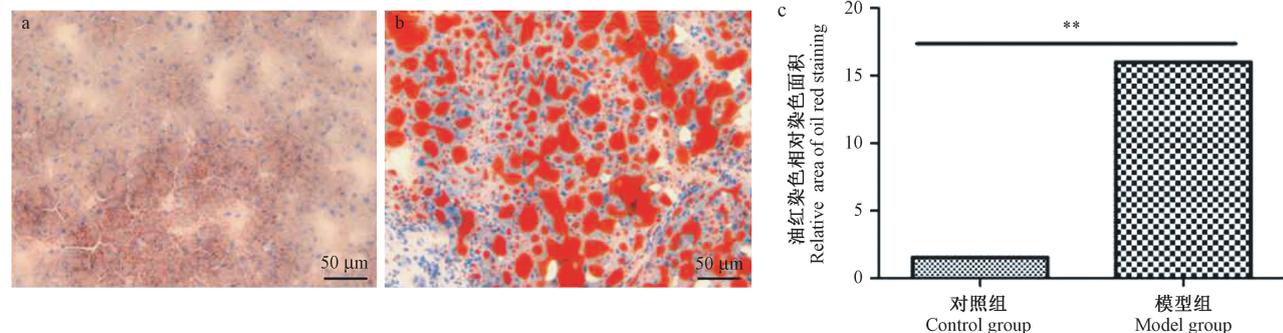
重度脂肪肝组织中脂肪含量高,肝脏组织细胞肿胀变形,通过高、中、低剂量的泽泻治疗后,从图 5 中显示,随着药物剂量浓度的增加,肝脏脂肪性病变随之好转。

2.5 ELISA 结果

脂肪蓄积发生在非酒精性脂肪肝早期病程中。脂肪蓄积导致肝细胞内质网应激、线粒体应激反应及自噬受损等脂毒性,以及 TG、VLDL 水平降低^[20]。AST、ALT 作为肝功能评价指标,其升高预示着肝损伤。非酒精性脂肪肝患者由于肝脂肪代谢紊乱会出现血清 HDL 降低和 LDL 升高^[21-23]。如图 6 结果所示,泽泻提取物处理后,大鼠血清中 AST、ALT、TG、LDL 的表达水平呈剂量依赖性下降($P < 0.01$),SOD、HDL 表达升高($P < 0.01$)。结果表明,泽泻提取物对非酒精性脂肪肝肝损伤具有治疗作用。

2.6 RT-PCR 结果

非酒精性脂肪肝会导致 CYP2E1、CYP2A5 上调表达^[24-25]。如图 7 结果显示,泽泻提取物处理后,肝组织内 CYP2E1、CYP2A5 基因表达水平明显下降($P < 0.01$),尤其是高剂量组。

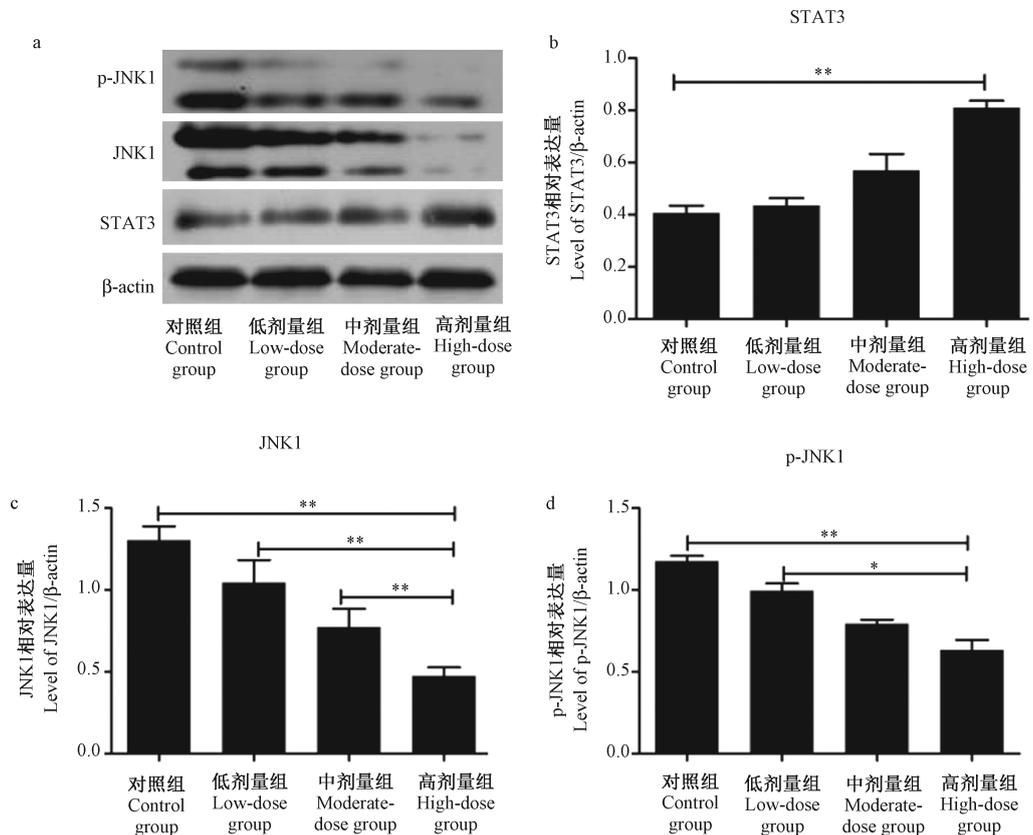


注:a:生理盐水对照组;b:高脂饮食模型组;c:油红染色相对染色面积定量结果。与对照组比较,** $P < 0.01$ 。

图 1 油红染色判断脂肪肝模型($\times 100$)

Note. a: Physiological saline control group; b: High-fat diet model group. c: Relative quantitative results of oil red staining. Compared with the control group, ** $P < 0.01$.

Figure 1 Evaluation of fatty liver model by oil red staining



注:a:各组 p-JNK1、JNK1、STAT3 表达水平;b:各组 STAT3 表达定量结果;c:各组 JNK1 表达定量结果;d:各组 p-JNK1 表达定量结果。对照组:0 mg/kg AOE;低剂量组:100 mg/kg AOE;中剂量组:200 mg/kg AOE;高剂量组:400 mg/kg AOE。与高剂量组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。图 3、6、7 同。

图 2 AOE 处理后 p-JNK1、JNK1、STAT3 表达水平

Note. a: Expression of p-JNK1, JNK1 and STAT3 in each group. b: Quantitative results of STAT3 expression in each group. c: Quantitative results of JNK1 expression in each group. d: Quantitative results of p-JNK1 expression in each group. Control group: 0 mg/kg AOE; low-dose group: 100 mg/kg AOE; moderate-dose group: 200 mg/kg AOE; high-dose group: 400 mg/kg AOE. Compared with the high-dose group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. The same in Figures 3, 6 and 7.

Figure 2 Expression levels of p-JNK1, JNK1 and STAT3 after AOE treatment

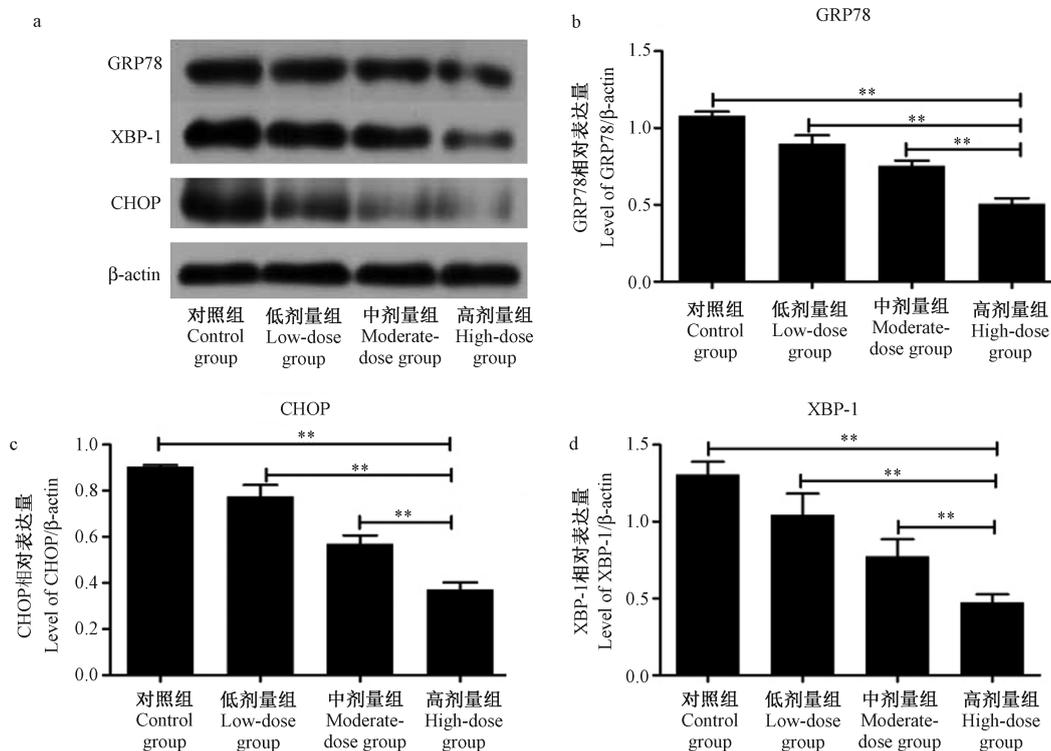
3 讨论

近年来,因生活方式改变、营养过剩等,非酒精性脂肪肝的发病率呈逐年上升的趋势^[26]。30% 的脂肪肝患者如果得不到有效治疗会逐渐进展成非酒精性脂肪性肝炎;如果病情继续进展,25% 的非酒精性脂肪性肝炎可能发展成肝硬化或终末期肝病^[27],对人类健康造成严重威胁。

临床研究资料表明,痰瘀互结为非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 的重要发病机制。丹参具有活血祛瘀之功,泽泻功能除水湿、消痰浊,两药为中医临床治疗 NAFLD 过程中使用频率较高的中药^[28]。三萜类成分是泽泻中的主要成分之一,在泽泻的功效中起着非常重要的作用^[29]。除了有效成分的确定,不同

研究者从不同角度对其作用机制进行了探索性研究。

李金海^[30]通过对应用异功泽泻汤治疗的 52 例非酒精性脂肪性肝炎患者及水飞蓟宾胶囊治疗的 48 例患者进行对照观察,发现异功泽泻汤在降低血脂、改善肝功能等方面均优于水飞蓟宾胶囊,泽泻可抑制外源性 TG、TC 的吸收,影响内源性 TC 代谢及抑制 TG 肝内合成,从而改善肝脏的脂肪代谢。王磊^[31]通过对 34 例使用泽泻饮合京三棱丸治疗的非酒精性脂肪肝进行研究发现泽泻饮合京三棱丸能有效改善 TC、TG 的水平,治疗脂肪肝临床疗效显著。姜国贤等^[32]报道了 32 例口服调肝降脂(青蒿、柴胡、山楂、茯苓、泽泻、法半夏、白芍、肉豆蔻、韭菜汁等)中药治疗非酒精性脂肪肝的临床研究结果,

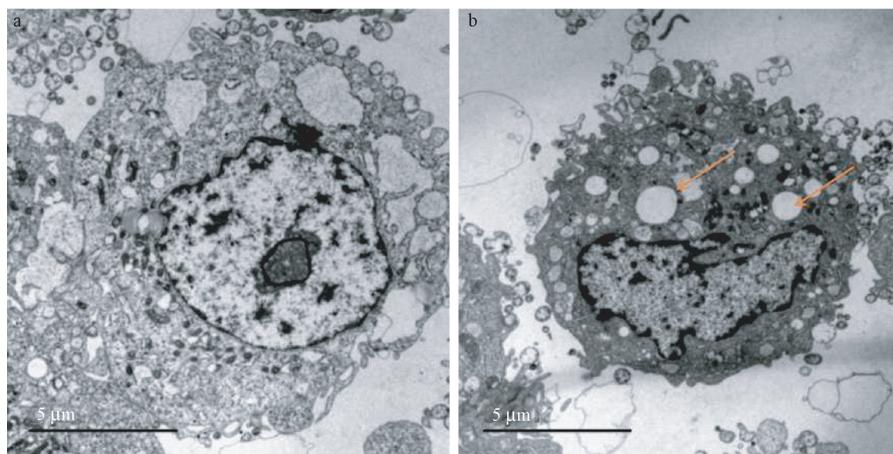


注:a:各组 GRP78、XBP-1、CHOP 表达水平;b:各组 GRP78 表达定量结果;c:各组 CHOP 表达定量结果;d:各组 XBP-1 表达定量结果。

图 3 AOE 处理后 GRP78、XBP-1、CHOP 表达水平

Note. a: Expression of GRP78, XBP-1 and CHOP in each group. b: Quantitative results of GRP78 expression in each group. c: Quantitative results of CHOP expression in each group. d: Quantitative results of XBP-1 expression in each group.

Figure 3 Expression levels of GRP78, XBP-1 and CHOP after AOE treatment



注:a; HepG2 泽泻高剂量组(400 mg/kg AOE); b; HepG2 脂肪性病变组。箭头指示肝细胞脂变。

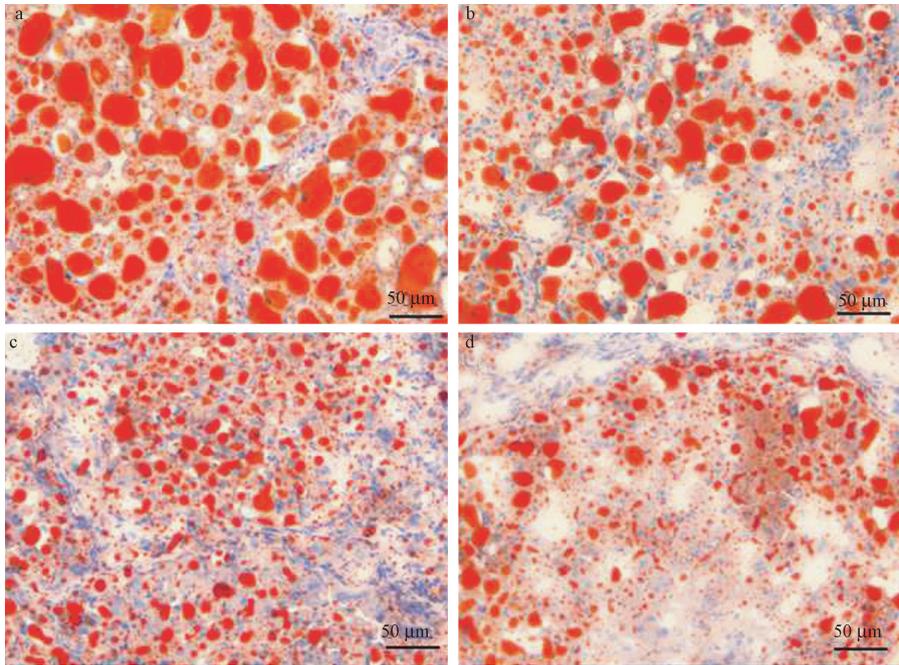
图 4 HepG2 透射电镜照片(× 3500)

Note. a: HepG2 in the high-dose group (400 mg/kg AOE); b: HepG2 in the fatty degeneration group. Arrows indicate fatty degeneration of the liver cells.

Figure 4 Transmission electron microscopy of HepG2

发现泽泻通过抑制外源性甘油三酯在肝内的合成,影响与胆固醇代谢有关的酶及抑制肝内甘油三酯合成等药理作用而发挥抗脂肪肝效果。

随后,又有不同的研究者从不同方面对泽泻护肝功能进行了研究。唐外姣^[33]报道了护肝清脂片(由泽泻、山楂、三七、蒲黄、荷叶及陈皮六味中药组

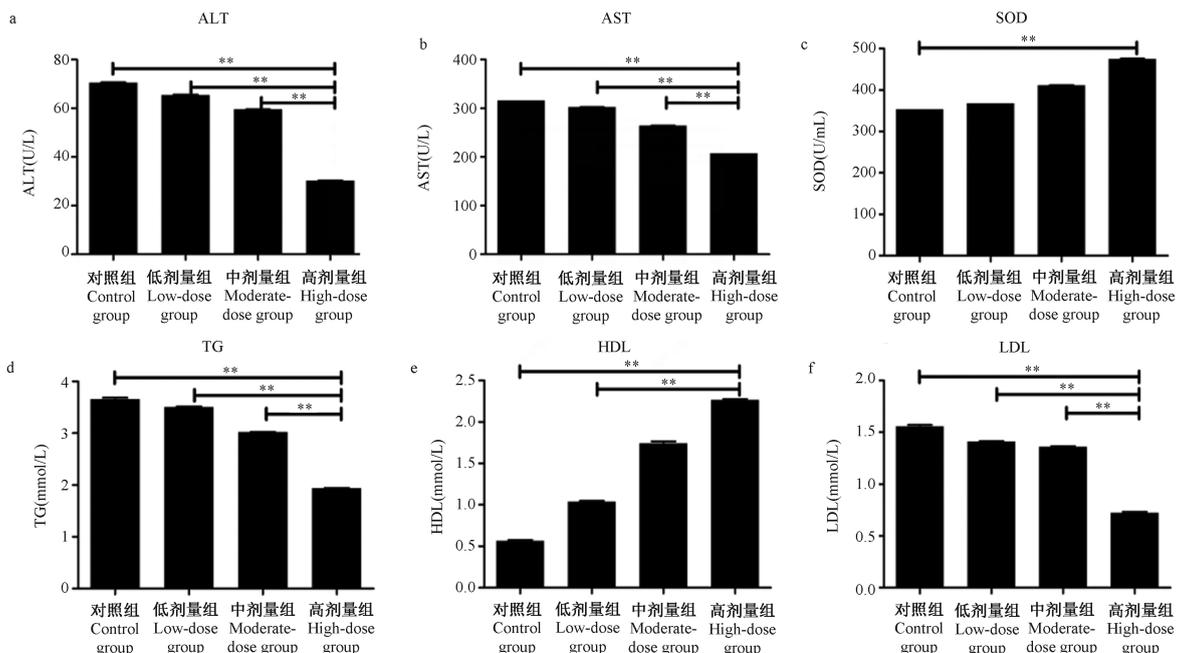


注:a:生理盐水对照组;b:泽泻提取物 100 mg/kg 处理组;c:泽泻提取物 200 mg/kg 处理组;d:泽泻提取物 400 mg/kg 处理组。

图 5 油红染色检测泽泻提取物对 SD 大鼠肝脂肪性病变的影响 (× 100)

Note. a: Physiological saline control group; b: 100 mg/kg of AOE treatment group; c: 200 mg/kg of AOE treatment group; d: 400 mg/kg of AOE treatment group.

Figure 5 Effect of AOE on hepatic steatosis of SD rats detected by oil red staining

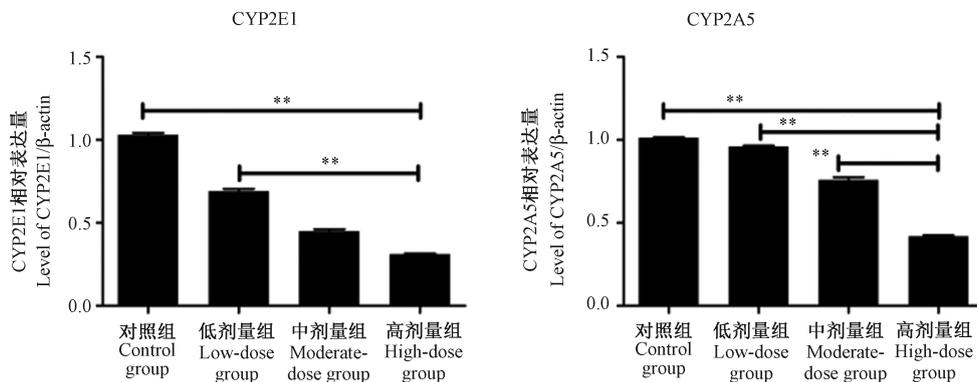


注:a:ALT 检测水平;b:AST 检测水平;c:SOD 检测水平;d:TG 检测水平;e:HDL 检测水平;f:LDL 检测水平。

图 6 ELISA 检测血清生化指标

Note. a: ALT detection level. b: AST detection level. c: SOD detection level. d: TG detection level. e: HDL detection level. f: LDL detection level.

Figure 6 ELISA detection of serum biochemical indicators



注:a;CYP2E1 基因表达水平;b;CYP2A5 基因表达水平。

图7 RT-PCR 检测 CYP2E1、CYP2A5 基因表达水平

Note. a: CYP2E1 gene expression level. b: CYP2A5 gene expression level.

Figure 7 RT-PCR detection of CYP2E1 and CYP2A5 gene expression levels

成)通过上调大鼠肝脏中沉默信息因子 SIRT1 的 mRNA 及其蛋白的表达,可以显著改善胰岛素抵抗,同时减缓氧化应激/脂质过氧化损伤,抑制肝脏胶原沉积,有效调节血脂代谢紊乱以及抑制肝脏脂质沉积。Park 等^[34]报道了泽泻乙醇提取物可以通过下调 C/EBP β 表达,降低 PPAR γ 和 C/EBP β 表达水平来抑制 OP9 细胞脂肪分化。Jang 等^[35]报道了泽泻块茎甲醇提取物 (MEAO) 可以通过抑制肝脂肪生成基因、VLDLR 等基因表达,增加 ApoB 分泌来减弱肝细胞内质网应激,阻止肝细胞病理性脂肪变性。曾璐^[36]研究发现泽泻醇 A-24-醋酸酯能逆转肝脂肪变性 HepG2 细胞的 TNF- α 和 IL-6 水平的增加。郭雨雅^[37]报道了加味泽泻汤对可能通过抑制 TLR4/NF- κ B、MAPK 信号通路上 MyD88、NF- κ B、P65、p-P65、P38、p-P38、MAPK 蛋白的表达,抑制肝脏炎症的产生、缓解肝脏的损伤,对高脂饮食诱导的大鼠 NAFLD 模型有良好的治疗效果。杜金梁等^[38]报道了泽泻提取物对油酸诱导建鲤脂肪肝细胞损伤中生化指标及 CYP1A 蛋白表达的影响。孙晓琦^[39]报道了加味泽泻汤可能通过改变 NAFLD 小鼠肠道微生物组成、改善肠黏膜屏障、降低肝脏内炎症因子表达及减轻肝脏炎症来发挥作用。

其它关于非酒精性脂肪肝的治疗机制研究也有很多,对泽泻治疗 NAFLD 的药理作用机制研究有很大的参考意义。田卫东^[40]报道了阿托伐他汀能通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路改善大鼠非酒精性脂肪肝肝脏损伤。郑培永等^[41]报道了强肝胶囊和辛伐他汀可能通过改善瘦素抵抗,增加肝脏瘦素受体 mRNA 表达及 P-JAK2 和 P-STAT3 蛋白水平而对 NAFLD 大鼠肝脏脂质和炎症有较好的治疗作用。

孙立云^[42]报道了 2 mmol/L DL-乙硫氨酸作用奶牛原代肝细胞 24 h 可成功制备脂肪变性肝细胞模型,10 μ g/mL 泽泻作用 48 h,可以降低肝细胞 CYP450 的表达,对脂肪变性肝细胞具有较好的保护作用。杨文强等^[43]报道了脂肪乳灌胃可以通过上调 Wnt3 α 、 β -catenin、Collal mRNA 表达诱导非酒精性脂肪肝大鼠肝纤维化。关丽嫦等^[44]报道了高脂饮食可以通过诱导肝组织 JNK1、p-JNK1 蛋白表达水平升高,激活肝细胞内 JNK 信号通路同时抑制了脂联素的生成,进而产生和加重 NAFLD。

这些研究都为泽泻治疗 NAFLD 作用机制探索提供了重要依据,但是仍然没有泽泻作用机制的系统性研究。本文系统性地研究阐明了泽泻对非酒精性脂肪肝的治疗机制。但是本研究仍然存在不足,需要进一步实验来验证泽泻对肝细胞脂肪蓄积的缓解作用及其机制,因为脂肪蓄积是肝损伤的根本原因。总之,本文通过研究不同浓度泽泻对非酒精性脂肪肝血清生化指标、JNK 信号通路及脂肪变性肝细胞内质网应激的影响系统地研究了泽泻治疗 NAFLD 的作用机制,为泽泻临床治疗 NAFLD 提供了重要理论依据。

参考文献:

- [1] 张声生,陈剑明. 非酒精性脂肪肝中医药研究现状及思考 [A]. 北京中医药学会 2012 年度学术年会论文汇编 [C]. 2012.
- [2] 许佳年,张毅明,张琴,等. 辨证治疗脂肪肝临床研究进展 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2016, 14(21): 137-140.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 229.
- [4] 陈利娟,李卿. 泽泻的研究进展 [J]. 中国药业, 2016, 25(21): 1-3.

- [5] 禹建春, 叶红梅, 林西西. 泽泻的药理研究概况 [J]. 海峡药学, 2011, 23(2): 92-93.
- [6] 徐硕, 夏路风, 金鹏飞, 等. 泽泻的化学成分及生物活性研究进展 [J]. 中国医药导报, 2015, 12(27): 47-51.
- [7] 陈曦. 泽泻的研究现状与进展 [J]. 中国民族民间医药, 2011, 20(9): 50-51, 53.
- [8] 田婷, 陈华, 冯亚龙, 等. 泽泻药理与毒理作用的研究进展 [J]. 中药材, 2014, 37(11): 2103-2107.
- [9] 严伟伦. 泽泻调脂颗粒方改善脾虚痰瘀型非酒精性脂肪肝的临床观察 [D]. 福建中医药大学, 2015.
- [10] 孙晓娜, 于悦, 许向前, 等. 泽泻泄浊颗粒配合穴位贴敷治疗非酒精性脂肪肝的临床观察 [J]. 中医临床研究, 2016, 8(35): 1-4.
- [11] Engin A. Non-alcoholic fatty liver disease [M]. Obesity and Lipotoxicity, 2017: 443-467.
- [12] Jeong HS, Cho YH, Kim KH, et al. Anti-lipoapoptotic effects of *Alisma orientalis* extract on non-esterified fatty acid-induced HepG2 cells [J]. BMC Complement Altern Med, 2016, 16: 239.
- [13] 黄晓欢. 泽泻提取物对非酒精性脂肪肝的作用机制研究 [J]. 按摩与康复医学, 2017, 8(6): 76-78.
- [14] Yan M, Shen J, Person MD, et al. Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in Atm-deficient thymocytes and thymic lymphoma cells are attributable to oxidative stress [J]. Neoplasia, 2008, 10(2): 160-167.
- [15] Zheng YZ, Cao ZG, Hu X, et al. The endoplasmic reticulum stress markers GRP78 and CHOP predict disease-free survival and responsiveness to chemotherapy in breast cancer [J]. Breast Cancer Res Treat, 2014, 145(2): 349-358.
- [16] Christopher LC, Tao JG, Javier A, et al. Inhibition of ER stress-associated IRE-1/XBP-1 pathway reduces leukemic cell survival [J]. J Clin Invest, 2014, 124(6): 2585-2598.
- [17] Sivan HK, Zhang PC, Malene H, et al. Insulin/IGF-1 signaling mutants reprogram ER stress response regulators to promote longevity [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(21): 9730-9735.
- [18] Banerjee K, Keasey MP, Razskazovskiy V, et al. Reduced FAK-STAT3 signaling contributes to ER stress-induced mitochondrial dysfunction and death in endothelial cells [J]. Cell Signal, 2017, 36: 154-162.
- [19] 张优敬, 郑乃纳, 刘彬, 等. 亚硝酸钠增强自噬减轻肝脂肪变性的细胞脂肪蓄积 [J]. 药理学报, 2015, 50(8): 1000-1007.
- [20] Koo SH. Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis [J]. Clin Mol Hepatol, 2013, 19(3): 210-215.
- [21] Fon Tacer K, Rozman D. Nonalcoholic fatty liver disease: focus on lipoprotein and lipid deregulation [J]. J Lipids, 2011, 2011: 783976.
- [22] Nobili V, Alkhoury N, Feldstein AE, et al. Severity of liver injury and atherogenic lipid profile in children with nonalcoholic fatty liver disease [J]. Pediatr Res, 2010, 67(6): 665-670.
- [23] Musunuru K. Atherogenic dyslipidemia: cardiovascular risk and dietary intervention [J]. Lipids, 2010, 45(10): 907-914.
- [24] Dey A. Cytochrome P450 2E1: its role in disease and drug metabolism [M]. Netherlands: Springer, 2013.
- [25] Cui Y, Wang Q, Li X, et al. Experimental nonalcoholic fatty liver disease in mice leads to cytochrome p450 2a5 upregulation through nuclear factor erythroid 2-like 2 translocation [J]. Redox Biol, 2013, 1: 433-440.
- [26] 卢向琴. 丹参治疗非酒精性脂肪肝的荟萃分析 [J]. 海峡药学, 2013, 25(51): 83-84.
- [27] Starley BQ, Calcagno CJ, Harrison SA. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection [J]. Hepatology, 2010, 51(5): 1820-1832.
- [28] 韩雪. 丹参、泽泻对非酒精性脂肪肝大鼠的防治作用及其机制研究 [D]. 河北医科大学, 2012.
- [29] 汪春飞, 成旭东, 顾俊菲, 等. 泽泻化学物质基础及其毒性研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(22): 3420-3426.
- [30] 李金海. 异功泽泻汤治疗非酒精性脂肪性肝炎 52 例 [J]. 河北中医, 2012, 34(6): 833-834.
- [31] 王磊. 泽泻饮合京三棱丸治疗非酒精性脂肪肝 34 例 [J]. 西部中医药, 2013, 26(9): 64-65.
- [32] 姜国贤, 喻国华, 余传友. 调肝降脂法治疗非酒精性脂肪肝 32 例 [J]. 陕西中医, 2010, 31(5): 528-530.
- [33] 唐外姣. 护肝清脂片治疗非酒精性脂肪性肝病药理学研究及机制探讨 [D]. 南方医科大学, 2010.
- [34] Park YJ, Kim MS, Kim HR, et al. Ethanol extract of *Alismatis rhizome* inhibits adipocyte differentiation of OP9 cells [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014, 2014: 415097.
- [35] Jang MK, Han YR, Nam JS, et al. Protective effects of *Alisma orientale* extract against hepatic steatosis via inhibition of endoplasmic reticulum stress [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(11): 26151-26165.
- [36] 曾璐. 基于肝脂肪变性 HepG2 细胞模型探讨护肝清脂片主要成分对脂质代谢的影响及可能机制 [D]. 南方医科大学, 2012.
- [37] 郭雨雅. 基于 TLR4/NF- κ B 信号通路对加味泽泻汤治疗非酒精性脂肪肝机制的研究 [D]. 南京中医药大学, 2017.
- [38] 杜金梁, 曹丽萍, 贾睿, 等. 泽泻提取物对油酸诱导建鲤脂肪肝细胞损伤中生化指标及 CYP1A 蛋白表达的影响 [J]. 西南农业学报, 2017, 30(1): 226-232.
- [39] 孙晓琦. 加味泽泻汤对 NAFLD 小鼠肠道微生物干预作用的研究 [D]. 南京中医药大学, 2015.
- [40] 田卫东. Wnt/ β -Catenin 信号通路在非酒精性脂肪肝发病中的作用及阿托伐他汀的干预效果 [J]. 中国药业, 2016, 25(4): 51-54.
- [41] 郑培永, 王磊, 张莉, 等. 强肝胶囊对非酒精性脂肪肝大鼠肝脏瘦素受体及 P-JAK2 和 P-STAT3 蛋白的影响 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2009, 17(3): 141-145.
- [42] 孙立云. 泽泻对奶牛脂肪变性肝细胞 CYP450 的影响 [D]. 河北农业大学, 2013.
- [43] 杨文强, 钟新生, 黄炎, 等. 脂肪乳灌胃诱导非酒精性脂肪肝大鼠肝纤维化及 β -catenin mRNA 表达的影响 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2017, 27(3): 164-167.
- [44] 关丽端, 高慧亭, 徐丽妹. 脂联素和 JNK1 在非酒精性脂肪肝大鼠中的作用及机制 [J]. 实用医学杂志, 2015, 31(12): 1915-1917.