

参苓白术散对 NAFLD 大鼠肝细胞 mTORC1/ STAT3 信号通路的影响

吕锦珍¹, 徐拥建^{1*}, 胡世平¹, 冯高飞¹, 黄裕华¹, 邓远军², 王欣¹

(1. 北京中医药大学深圳医院, 广东深圳 518172;

2. 暨南大学中医药学院, 广州 510632)

[摘要] **目的:**观察参苓白术散对高脂饮食饲养的非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)大鼠肝细胞哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合体 1(mTORC1)/细胞信号转导因子及转录激活因子 3(STAT3)信号通路的影响,从炎症角度揭示参苓白术散抗大鼠 NAFLD 的作用机制。**方法:**取 SD 大鼠 80 只,随机分为 4 组,分别为正常组、模型组、参苓白术散高、低剂量组(30, 10 g·kg⁻¹),每组 20 只。采用高脂饲料喂养大鼠 8 周,建立 NAFLD 大鼠模型,各药物干预组大鼠灌服相应剂量的参苓白术散,8 周后取血和肝组织样本,全自动生化分析仪检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST),总胆固醇(TC),甘油三酯(TG),高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C),低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)定量;对肝组织进行油红 O,苏木素-伊红(HE)染色;采用 IV 型胶原酶离体循环灌注法分离肝细胞,酶联免疫吸附测定(ELISA)检测肝细胞肿瘤坏死因子(TNF)- α , 白细胞介素(IL)-1 β , IL-5 及 IL-6 含量变化,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)及蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠肝细胞 mTORC1, STAT3 mRNA 及蛋白表达水平。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠病理组织学改变表明,肝组织炎症及脂肪蓄积显著,血清 ALT, AST, TC, TG 及 LDL-C 含量显著升高, HDL-C 显著下降,肝细胞 TNF- α , IL-1 β , IL-5 及 IL-6 水平显著升高, mTORC1, STAT3 mRNA 及蛋白相对表达量显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,参苓白术散高、低剂量组肝组织脂质蓄积明显改善,血清 ALT, AST, TC, TG 及 LDL-C 含量明显下降,肝细胞 TNF- α , IL-1 β , IL-5 及 IL-6 水平明显下降,肝细胞 mTORC1, STAT3 mRNA 及蛋白相对表达量明显降低;参苓白术散高剂量组在改善脂质蓄积,抑制肝组织炎症反应方面,效果优于参苓白术散低剂量组, mTORC1, STAT3 mRNA 及蛋白表达明显降低($P < 0.05, P < 0.01$)。**结论:**参苓白术散能够改善高脂饮食诱导的 NAFLD 大鼠脂肪代谢紊乱、减轻肝脏脂质蓄积及炎症反应,其作用机制可能与抑制肝细胞内 mTORC1/STAT3 通路相关 mRNA 及蛋白表达有关。

[关键词] 参苓白术散; 非酒精性脂肪性肝病; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合体 1(mTORC1)/细胞信号转导因子及转录激活因子 3(STAT3) 通路

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)02-0006-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20192302

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190821.1329.001.html>

[网络出版时间] 2019-08-21 14:30

Effect of Shenling Baizhusan on mTORC1/STAT3 Pathway in Hepatocytes of Nonalcoholic Fatty Liver Disease Rats

LYU Jin-zhen¹, XU Yong-jian^{1*}, HU Shi-ping¹, FENG Gao-fei¹, HUANG Yu-hua¹,
DENG Yuan-jun², WANG Xin¹

(1. Shenzhen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Shenzhen 518172, China;

2. School of Traditional Chinese Medicine, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Shenling Baizhusan (SBS) on the mammalian target of

[收稿日期] 20190522(001)

[基金项目] 北京中医药大学校级科研项目(2018BUCMXJKY013);深圳市龙岗区医疗卫生科技计划项目(20170405190544730)

[第一作者] 吕锦珍, 硕士, 主治医师, 从事中西医结合防治肝病基础及临床研究, Tel: 0755-28338833-6202, E-mail: 671111933@qq.com

[通信作者] * 徐拥建, 博士, 副主任医师, 从事中西医结合防治肝病及恶性肿瘤研究, Tel: 0755-28338833-6202, E-mail: himi@163.com

rapamycin complex 1 (mTORC1) /signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) pathway in liver hepatocyte of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) rats induced by high fat diet, in order to reveal the mechanism of SBS against rat NAFLD from the perspective of inflammation. **Method:** Totally 80 SD rats were randomly divided into 4 groups, normal control group, model group, high-dose SBP group ($30 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), and low-dose SBS group ($10 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), with 20 rats in each group. The rats of NAFLD model were established by being fed with high-fat diets for 8 weeks, and the treatment groups were fed with high or low dose of SBS respectively. After treatment for 8 weeks, blood and liver samples of rats were collected. Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels in blood serum were detected with automatic biochemical analyzer. The liver tissues were observed by oil red O and hematoxylin-eosin (HE) staining. Hepatocytes were isolated by type IV collagenase perfusion *in vitro*. Tumor necrosis factor (TNF) $-\alpha$, interleukin (IL) -1β , IL-5 and IL-6 in hepatocytes were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the relevant gene and proteins expressions of mTORC1 and STAT3 in hepatocytes were detected by Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot detection respectively. **Result:** Compared with the normal control group, the serum levels of TG, TC, AST, ALT and LDL-C were increased significantly, the levels of TNF- α , IL- 1β , IL-5 and IL-6 in hepatocytes were increased significantly, and the expression levels of mTORC1, STAT3 mRNA and proteins in hepatocytes were increased significantly ($P < 0.01$). Compared with the model group, the hepatic lipid accumulation of the medicine intervention group was relieved significantly, the serum levels of AST, ALT, TG and LDL-C were decreased significantly, the expression levels of TNF- α , IL- 1β , IL-5 and IL-6 of hepatocytes were decreased significantly, and the expressions of mTORC1, STAT3 mRNA and proteins in hepatocytes were decreased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$). In the high-dose SBS group, the effects in improving the lipid accumulation and inhibiting the inflammatory reaction were better than those of the low-dose SBS group, and the expressions of mTORC1 and STAT3 genes and proteins in hepatocytes were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** SBS can improve the fat metabolism disorder and reduce liver lipid accumulation and inflammatory reaction in NAFLD rats induced by high-fat diet. The mechanism may be correlated with the inhibition of mTORC1/STAT3 pathway relating to genes and protein expression in hepatocytes.

[**Key words**] Shenling Baizhusan; nonalcoholic fatty liver disease; mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) /signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) pathway

非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 是指明确排除了酒精和其他可能导致肝细胞损伤因素, 主要以弥漫性的肝细胞大泡样脂肪变性为主要病理特征的一组遗传-环境-代谢相关性临床综合征。主要包括单纯性脂肪性肝病、非酒精性脂肪性肝炎和非酒精性脂肪肝性肝硬化。随着成人和儿童肥胖流行的上升, NAFLD 已经成为肝病的主要病种 (患病率约 20% ~ 34%)^[1-2], 目前 NAFLD 发病机制尚未明确, 一直以来缺乏有效的药物治疗。现代循证医学证实, 通过传统中医药治疗能有效地延缓 NAFLD 进展^[3]。中药可能通过多靶点、多途径的整合作用发挥终末防治效应^[4]。参苓白术散出自北宋《太平惠民和剂局方》, 具有健脾益气, 渗湿止泄的功效, 是临床常用的古代经典健脾名方。中医认为脾虚失

运, 津液输布失常, 水湿内停, 肥甘厚腻、食积膏脂不化, 肝气郁滞, 湿浊痰积瘀血互结, 痹阻肝络而成本病^[5], 可见, 脾虚失运是 NAFLD 发病的关键病机之一。Meta 分析表明^[6], 参苓白术散治疗 NAFLD 存在其独有的优势。前期研究发现参苓白术散具有显著的降低血脂, 缓解肝脏炎症, 防治脂肪肝疗效确切^[7-8]。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 可以调节细胞内的蛋白质合成并影响细胞凋亡细胞的生长和增殖^[9-10]。细胞信号转导因子及转录激活因子 3 (STAT3) 是双功能蛋白, 主要存在于细胞质中, 其再偶联酪氨酸磷酸化信号通道方面起重要作用, 与调节多种蛋白质的表达、细胞增殖和凋亡有关^[11]。本实验旨在前期研究的基础上, 运用方药参苓白术散干预 mTORC1/STAT3 信号通路介导的炎症通路,

从细胞水平探讨参苓白术散防治 NAFLD 的有效作用靶点,为中医药防治 NAFLD 提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 健康成年雄性 SPF 级 SD 大鼠 80 只,体质量(200 ± 20) g,周龄 8 周,由山东省济南市朋悦实验动物繁育有限公司提供,实验动物合格证号 SCXK(鲁)2014-0007,合格证编号 37009200012268。饲养于广东暨南大学动物实验管理中心,实验动物使用许可证号 SYXK(粤)2017-0174。

1.2 药物 参苓白术散方药(人参 15 g,白术 15 g,山药 15 g,白扁豆 12 g,薏苡仁 9 g,茯苓 15 g,桔梗 6 g,砂仁 6 g,莲子 9 g,炙甘草 9 g)。中药均为配方颗粒剂,由深圳华润三九医药股份有限公司生产,批号 20180125,购自广州暨南大学附属华侨医院,方药组成、剂量均参照第 6 版《方剂学》^[12]教材。按免煎中药包装说明(山药 1 袋相当于山药饮片 10 g),换算成 1 剂参苓白术散饮片的实际剂量,溶于水,调匀制成混悬液备用。

1.3 试剂 大鼠白细胞介素(IL)- 1β , IL-5, IL-6 和肿瘤坏死因子(TNF)- α 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海依科赛生物制品有限公司,批号分别为 ER008-96, ER005-96, ER003-96, ER006-96);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体,辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(美国 Abbkine 公司,批号分别为 A21020, A01020);苏木素-伊红(HE)染色剂,油红 O 染液(苏州泽科生物科技有限公司,批号 ZKP-E151004-1, ZKP-E150043);实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(日本 Takara 公司,批号 RR047A);兔抗大鼠 Lysozyme, IV 型胶原酶, mTORC1, STAT3 抗体(美国 Thermo Fisher 公司,批号分别为 MA5-32154, 17104-019, PA1-188, 44-384G);血脂、肝功试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号均为 SA9697)。

1.4 仪器 Chemray240 型全自动生化分析仪(深圳雷杜生命科技公司);Multiskan FC 型酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司);ELITE ESP 型流式细胞检测仪(美国 Beckman-Coulter 公司);IQ5 型 Real-time PCR 仪, Mini-PROTEAN 型电泳仪, Trans-Blot Turbo 型转膜仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 动物分组及处理 大鼠随机分成正常组,模型组,参苓白术散低、高剂量组($10, 30 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),每组各 20 只。大鼠 NAFLD 模型的建立参照张玉佩等^[5]

的方法。正常组大鼠喂饲基础饲料,模型组、参苓白术散低、高剂量组喂饲高脂饲料。高脂饲料由基础饲料-胆固醇-精制猪油-III 号胆盐按照 88:1.5:10:0.5 比例制成。各组动物自由饮水进食,给药剂量按人和动物体表面积折算^[13]。按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 标准,各组大鼠灌服相应剂量的中药制剂或实验动物饮用水,每日 1 次,分笼饲养于 $18 \sim 22 \text{ }^\circ\text{C}$ 明暗各 12 h 的 SPF 级动物实验室内,连续 8 周。前期研究中确立了疏肝方(柴胡疏肝散),健脾方(参苓白术散),疏肝健脾方(柴胡疏肝散合参苓白术散)的灌服剂量^[5,11]。低剂量药物组为人临床等效剂量,高剂量药物组为的 3 倍人临床等效剂量。实验的第 8 周结束后,各组随机选出大鼠 10 只取血及肝组织备用,余下每组 10 只用以提取原代肝细胞。

2.2 肝细胞的分离及鉴定 采用 IV 型胶原酶离体循环灌注法分离肝细胞。在前期已经掌握了肝细胞的分离提取、鉴定方法,提取的肝细胞纯度达到 90% 以上,完全满足相关实验要求^[7-8]。

2.3 检测方法

2.3.1 肝组织病理学观察 随机选取 10 只大鼠,肝组织经冰冻切片,厚约 $6 \sim 8 \text{ } \mu\text{m}$,行油红 O 染色,甘油封片,光镜下观察肝细胞内脂滴分布。另经甲醛固定、常规石蜡包埋,作 $4 \sim 6 \text{ } \mu\text{m}$ 切片,行 HE 染色,树脂封固,光镜下观察大鼠肝组织脂肪变性程度。

2.3.2 血脂、肝功及炎症因子检测 全自动生化分析仪检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST),总胆固醇(TC),甘油三酯(TG),高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C),低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)含量变化。ELISA 试剂盒检测肝细胞 TNF- α , IL- 1β , IL-5, IL-6 含量变化。

2.3.3 Real-time PCR 检测肝细胞 mTORC1, STAT3 mRNA 相对表达量 取培养的贴壁肝细胞经 $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min。弃去上清后,加入 trizol 裂解液 1 mL 待其充分裂解,经分相、沉淀、洗涤、溶解,吸取 RNA 样品 $0.1 \text{ } \mu\text{L}$ 经微量核酸分光光度计测定 RNA 浓度值。然后经逆转录反应。引物序列由上海捷瑞生物工程有限公司设计及合成,选用 GAPDH 为内参基因。mTORC1 上游 5'-CAGAGG GCAGCAACAGTGAAAG-3', 下游 5'-GACAAGGAG ATAGAACGGAAGAAGC-3', 片段长度 134 bp; STAT3 上游 5'-ACCAGCAGTATAGCCGCT TC-3', 下游 5'-GCCACAATCCGGGCAATCT-3', 片段长度 97 bp; GAPDH 上游 5'-GATCCCGCTAACATC

AAATG-3', 下游 5'-GAGGGAGTTGTCATATTTCTC-3', 片段长度 96 bp。依照说明书在冰台上配置 20 μ L 反应液, 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 持续 30 s 预变性; 95 $^{\circ}$ C 持续 5 s 变性; mTORC1, STAT3, GAPDH 60 $^{\circ}$ C 退火 20 s; 60 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 扩增 40 个循环; 再于 72 ~ 95 $^{\circ}$ C, 持续 10 s, 分析溶解曲线。用 Opticon Monitor 3.1 软件整理和分析。设定正常组 mRNA 表达水平为 1。

2.3.4 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测肝细胞 mTORC1, STAT3 蛋白的表达 按细胞计数板计数 5×10^6 个细胞含 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PMSF 的 RIPA 裂解液, 待充分裂解后, 4 $^{\circ}$ C, 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 收集细胞上清液, BCA 测定样品蛋白浓度, 调整上样量终质量至 40 ~ 60 μ g。100 $^{\circ}$ C 沸水浴加热 5 min, 使蛋白充分变性, 冷却到室温, 进行电泳及转膜。将蛋白条带转移至 PVDF 膜上, 用含 5% 脱脂奶粉封闭 PVDF 膜, 室温下摇床封闭 60 min。洗涤 3 次, 每次 5 min, 加入配制好的一抗稀释液 (GAPDH 1:2 000; mTORC1 1:5 000, STAT3 1:1 000), 充分覆盖膜后孵育过夜, 洗膜后, 加二抗稀释液 (1:6 000) 室温孵育 60 min。再洗膜后加入适量的发光工作液, 暗箱中曝光、显色成像, 测定灰度值, 准备统计分析。

2.4 统计学处理 采用 SPSS 20.0 进行统计学处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数两两比较, 采用单因素方差分析, 检验水准 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

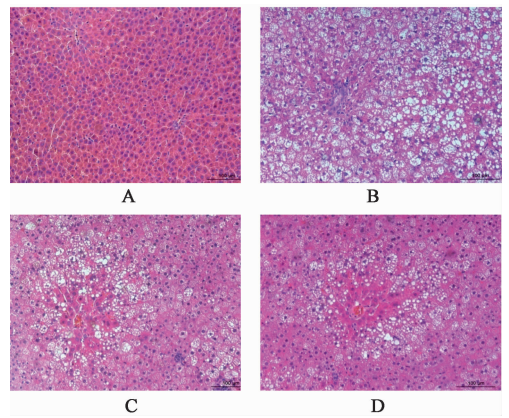
3 结果

3.1 对 NAFLD 大鼠基本情况的影响 正常组大鼠性格温顺, 皮毛润泽, 饮食、饮水、大小便正常, 笼内垫料较干燥, 对外界刺激反应迅捷。模型组大鼠易激惹咬噬, 皮毛枯黄发暗, 形体臃肿, 饮水量大, 大便油腻稀软, 垫料潮湿, 对外界刺激反应较迟钝。各药物干预组大鼠基本情况介于正常组和模型组大鼠之间。

3.2 对 NAFLD 大鼠肝组织病理学的影响

3.2.1 HE 染色 正常组大鼠肝小叶界限清晰, 肝窦形态正常, 肝索呈放射状排列 (以中央静脉为轴心), 肝细胞质均匀红染, 无空泡。模型组大鼠肝小叶边界欠清, 肝索结构紊乱, 汇管区炎症细胞浸润, 肝细胞胞内可见大小不等的空泡, 部分细胞呈气球样变。各药物干预组大鼠肝组织病理学改变较模型组有不同程度的改善, 其中参苓白术散高剂量组大鼠肝组织结构最接近于正常组。见图 1。

3.2.2 油红 O 染色 正常组大鼠肝细胞核均为淡



A. 正常组; B. 模型组; C. 参苓白术散低剂量组; D. 参苓白术散高剂量组 (图 2, 3 同)

图 1 参苓白术散对大鼠肝组织病理学的影响 (HE, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of Shenling Baizhusan (SBS) on histological changes of liver in rats (HE, $\times 200$)

蓝色, 仅少许胞浆内分布散在的较小的红染脂滴。模型组大鼠肝细胞形态肿胀肥大, 细胞核多居于胞内边缘, 胞浆内可见大团状的红色脂滴, 甚至有部分胞内脂滴融合成大脂滴。各药物干预组大鼠肝细胞脂滴红染面积及程度较模型组明显缩小和减轻, 其中参苓白术散高剂量组大鼠肝组织脂滴含量最接近于正常组。见图 2。

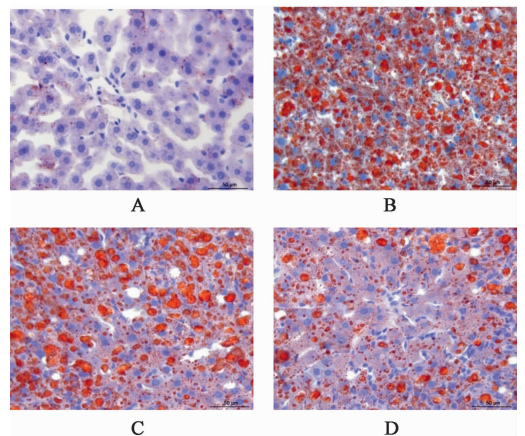


图 2 参苓白术散对大鼠肝组织病理学的影响 (油红 O, $\times 200$)

Fig. 2 Effect of SBS on histological changes of liver in rats (oil red O, $\times 200$)

3.2.3 对 NAFLD 大鼠血清 TC, TG, HDL-C, LDL-C, AST, ALT 水平的影响 与正常组比较, 模型组血脂 TC, TG, HDL-C, LDL-C 水平显著升高, 肝功能 AST, ALT 水平显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 各药物干预组血脂、肝功能均有不同程度降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), 其中高剂量组较为明显, 与低剂量组比较有统计学差异 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 1, 2。

表 1 参苓白术散对 NAFLD 大鼠血清 ALT, AST 水平影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Effect of SBS on levels of serum ALT, AST in NAFLD rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$) U·L⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ALT	AST
正常	-	27.55 ± 6.90	80.91 ± 13.05
模型	-	90.44 ± 15.93 ¹⁾	233.81 ± 29.80 ¹⁾
参苓白术散	10	68.33 ± 13.58 ²⁾	153.14 ± 23.81 ²⁾
	30	50.36 ± 11.18 ^{2,3)}	102.14 ± 13.86 ^{2,3)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$;与参苓白术散低剂量组比较³⁾ $P < 0.01$ (表 4 同)。

表 2 参苓白术散对 NAFLD 大鼠血清 TC, TG, HDL-C, LDL-C 影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Effect of SBS on levels of serum TC, TG, HDL-C, LDL-C in NAFLD rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

mmo·L⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TC	TG	HDL-C	LDL-C
正常	-	2.06 ± 0.30	0.73 ± 0.11	1.21 ± 0.21	1.14 ± 0.13
模型	-	4.50 ± 0.60 ¹⁾	1.21 ± 0.16 ¹⁾	0.68 ± 0.26 ¹⁾	1.80 ± 0.25 ¹⁾
参苓白术散	10	3.53 ± 0.94 ²⁾	1.07 ± 0.10 ²⁾	0.95 ± 0.19 ²⁾	1.41 ± 0.22 ²⁾
	30	2.48 ± 0.84 ^{2,4)}	0.96 ± 0.13 ^{2,4)}	1.13 ± 0.18 ⁴⁾	1.27 ± 0.18 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$;与参苓白术散低剂量组比较⁴⁾ $P < 0.05$ (表 3,5 同)。

表 3 参苓白术散对 NAFLD 大鼠肝细胞 TNF- α , IL-1 β , IL-5, IL-6 含量影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 3 Effect of SBS on levels of TNF- α , IL-1 β , IL-5 and IL-6 in hepatocytes of NAFLD rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

ng·L⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TNF- α	IL-1 β	IL-5	IL-6
正常	-	106.11 ± 16.87	99.45 ± 20.66	79.04 ± 9.20	88.92 ± 10.93
模型	-	427.89 ± 30.14 ¹⁾	180.06 ± 15.13 ¹⁾	230.27 ± 16.63 ¹⁾	112.47 ± 24.76 ¹⁾
参苓白术散	10	350.35 ± 22.21 ³⁾	168.35 ± 20.02 ²⁾	142.59 ± 28.34 ³⁾	100.58 ± 8.29 ³⁾
	30	181.68 ± 14.09 ^{3,4)}	152.69 ± 23.11 ^{2,4)}	131.22 ± 14.61 ^{3,4)}	94.36 ± 8.41 ^{3,4)}

大鼠肝细胞 mTORC1, STAT3 mRNA 及蛋白表达水平显著上调 ($P < 0.01$);与模型组比较,参苓白术散低、高剂量组 mTORC1, STAT3 mRNA 及蛋白表达水平下调 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);与参苓白术散低剂量组比较,高剂量组 mTORC1, STAT3 mRNA 及蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 4,5,图 3。

表 4 参苓白术散对 NAFLD 大鼠肝细胞 mTORC1, STAT3 mRNA 表达影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 4 Effect of SBS on expression of mTORC1, STAT3 mRNA in hepatocytes of NAFLD rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	mTORC1	STAT3
正常	-	1.05 ± 0.90	0.98 ± 0.66
模型	-	7.44 ± 1.17 ¹⁾	5.44 ± 1.02 ¹⁾
参苓白术散	10	4.02 ± 1.21 ²⁾	4.28 ± 1.23 ²⁾
	30	2.94 ± 1.06 ^{2,3)}	2.04 ± 1.06 ^{2,3)}

4 讨论

在中医古代文献中并没有关于 NAFLD 的记载。在《难经》中最早记载了“肝之积,名曰肥气”;《黄帝

3.2.4 对 NAFLD 大鼠肝细胞 TNF- α , IL-1 β , IL-5, IL-6 含量影响 与正常组比较,模型组大鼠肝细胞 TNF- α , IL-1 β , IL-5 及 IL-6 含量显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,参苓白术散高、低剂量组大鼠肝细胞 TNF- α , IL-1 β , IL-5 及 IL-6 含量明显下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);与参苓白术散低剂量组比较,高剂量组大鼠肝细胞 TNF- α , IL-1 β , IL-5 及 IL-6 含量明显下降 ($P < 0.05$)。见表 3。

3.2.5 对 NAFLD 大鼠肝细胞 mTORC1, STAT3 mRNA 及蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组

表 5 参苓白术散对 NAFLD 大鼠肝细胞 mTORC1, STAT3 蛋白表达影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 5 Effect of SBS on proteins expression of mTORC1, STAT3 in hepatocytes of NAFLD rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	mTORC1/GAPDH	STAT3/GAPDH
正常	-	0.44 ± 0.10	0.39 ± 0.04
模型	-	1.32 ± 0.15 ¹⁾	1.16 ± 0.08 ¹⁾
参苓白术散	10	1.16 ± 0.16 ²⁾	1.07 ± 0.10 ²⁾
	30	1.01 ± 0.09 ^{3,4)}	0.99 ± 0.07 ^{3,4)}

内经·素问·痹论》曰:“饮食自倍,肠胃乃伤。”根据其临床症状,临床上多将 NAFLD 归属于“肥气”“肝积”“胁痛”“痞满”等。2017 年中华中医药学会脾胃病分会将 NAFLD 的中医病名规范为“肝癖”“积聚”“胁痛”,其病位在肝,与脾肾关系密切等,其病机以脾虚为主,以痰、湿、浊、瘀为主要病理因素^[14],故在各个阶段的中医治疗中,绕不开治脾。张仲景《金匮要略·脏腑经络先后病脉证第一》曰:“夫治未病者,见肝之病,知肝传脾,当先实脾。”故运用参苓

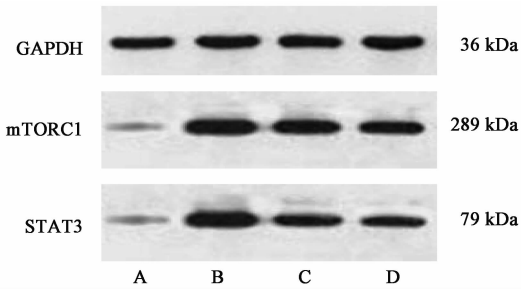


图 3 大鼠肝细胞 mTORC1, STAT3 蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of mTORC1, STAT3 proteins expression in hepatocytes

白术散防治 NAFLD 是“肝病治脾”理论的体现。现代研究表明,参苓白术散的健脾功效可能与修复肠道黏膜屏障,调节肠道菌群,减轻机体炎症反应,提高免疫功能有关^[15-16],发挥多通路、多靶点作用,其机制可能与糖脂、能量代谢等密切相关^[17]。

mTOR 是一种非典型丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,分为 mTORC1 和 mTORC2,目前研究多集中在研究 mTORC1, mTORC2 研究较少。mTORC1 可以调节细胞合成及代谢过程,如蛋白质,核苷酸和脂质合成,同时抑制脂质等分解代谢^[18-19]。当 mTORC1 通路阻断后,可减少由遗传和代谢紊乱,尤其是脂质代谢引起的机体紊乱^[9]。STAT3 主要存在于细胞质中,被 Janus 激酶家族成员磷酸化和激活后,促进脂质蓄积,并产生局灶性炎性微环境^[11]。

研究发现,在 NAFLD 患者中, mTOR/STAT3 及磷酸化产物等在肝脏脂肪变性组中比在对照组中表达更为频繁, mTOR 在 78% 肝细胞中有表达, STAT3 在 73% 的肝细胞和 45% 的肝星状细胞中存在表达,可见 mTOR/STAT3 的表达在肝脏脂肪变性患者中对疾病进展发挥了重要作用^[20]。mTORC1 可能通过信号转到蛋白 GPI30 使 STAT3 和 STAT1 被独立激活诱导炎症的发生^[21]。炎症程度加重时, mTOR 和 STAT3 的活性及表达也随之升高^[22]。mTORC1 通路的激活与 TNF- α 和 IL-6 的表达有关。其机制可能是激活了核转录因子(NF)- κ B 和 STAT3, 激活的 NF- κ B 上调 TNF- α 和 IL-6 表达, 增强细胞增殖, 促进 STAT3 蛋白表达^[23], 同时 IL-1 β , IL-5 表达也能促进 mTORC1 蛋白表达^[24-25]。以上表明, mTORC1/STAT3 与炎症因子 IL-1 β , IL-5, IL-6, TNF- α 关系密切。

由此可见, mTORC1/STAT3 信号通路是参与机体脂质代谢调节的关键环节, mTORC1/STAT3 可能成为中医药有效防治 NAFLD 的药物作用靶点。本

研究表明,采用高脂饲料喂养建立的 NAFLD 模型组大鼠血脂及炎症因子 IL-1 β , IL-5, IL-6, TNF- α 水平较正常组大鼠显著升高;肝细胞 mTORC1, STAT3 mRNA 及蛋白表达较正常组显著上调。表明模型组大鼠肝脏存在较严重的脂质代谢紊乱和炎症反应。通过参苓白术散干预后,大鼠血脂及 IL-1 β , IL-5, IL-6, TNF- α 水平降低明显,肝细胞 mTORC1, STAT3 mRNA 及蛋白表达亦有不同程度的下调,其中以参苓白术散高剂量组效果较为显著。以上提示 mTORC1/STAT3 信号通路是机体脂质代谢及炎症调控的关键靶点;参苓白术散可能通过抑制 mTORC1/STAT3 通路的激活,调节肝脏脂质代谢,减轻肝脏脂质蓄积和肝脏炎症反应,达到防治 NAFLD 的目的。此外,根据参苓白术散具有健脾益气的功效来推测 NAFLD 的中医辨证分型, NAFLD 大鼠模型可能存在中医脾虚证的病机和证候特点,其有关详细机制仍值得进一步的研究和探讨。

[参考文献]

- [1] Browning J D, Szczepaniak L S, Dobbins R, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity [J]. *Hepatology*, 2004, 40(6): 1387-1395.
- [2] Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, et al. The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data [J]. *J Hepatol*, 2013, 58: 593-608.
- [3] SHI K Q, FAN Y C, LIU W Y, et al. Traditional Chinese medicines benefit to nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and Meta-analysis [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(10): 9715-9722.
- [4] 刘志华, 孙晓波. 网络药理学: 中医药现代化的新机遇 [J]. *药学学报*, 2012, 47(6): 696-703.
- [5] 张玉佩, 杨钦河, 孔怡琳, 等. 从痰瘀角度探讨脂肪肝“二次打击”学说 [J]. *新中医*, 2010, 10(7): 158-159.
- [6] 王珏云, 张异卓, 邹金桥, 等. 参苓白术散治疗非酒精性脂肪肝随机对照试验 Meta 分析 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2017, 19(9): 110-114.
- [7] YANG Q H, XU Y J, FENG G F, et al. p38 MAPK signal pathway involved in anti-inflammatory effect of chaihui-shugan-san and shen-ling-bai-zhu-san on hepatocyte in non-alcoholic steatohepatitis rats [J]. *Afr J Tradit Complem Med*, 2014, 11(1): 213-221.
- [8] 徐拥建, 杨钦河, 韩莉, 等. 疏肝健脾方药对 NAFLD 大鼠肝细胞 SREBP-1c, SCD-1 mRNA 及蛋白表达的影响 [J]. *中药材*, 2014, 37(1): 83-89.
- [9] Sciarretta S, Forte M, Frati G, et al. New insights into the

- role of mTOR signaling in the cardiovascular system[J]. *Circ Res*, 2018, 122(3): 489-505.
- [10] Moeini A, Cornellà H, Villanueva A. Emerging signaling pathways in hepatocellular carcinoma[J]. *Liver Canc*, 2012, 1(2): 83-93.
- [11] Belloni L, Di Cocco S, Guerrieri F, et al. Targeting a phospho-STAT3-miRNAs pathway improves vesicular hepatic steatosis in an *in vitro* and *in vivo* model[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 13638.
- [12] 段富津. 方剂学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1995: 114-179.
- [13] 施新猷. 现代医学实验动物学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000: 334.
- [14] 中华中医药学会脾胃病分会. 非酒精性脂肪性肝病中医诊疗专家共识意见(2017)[J]. *中医杂志*, 2017, 58(19): 1707-1708.
- [15] 丁凌辉, 贾育新, 成映霞, 等. 参苓白术散对脾虚湿困型溃疡性结肠炎大鼠结肠 IL-13, IL-23 及 COX-2, CREB 表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(11): 67-72.
- [16] 张广玉, 张勤生, 孙晓娜, 等. 参苓白术散加减治疗抗生素相关性腹泻脾胃虚寒证的临床观察[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20191835.
- [17] 张栎婧, 战丽彬. 基于整合药理学平台探究参苓白术散治疗 2 型糖尿病的物质基础和作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(21): 157-162.
- [18] Saxton R A, Sabatini D M. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease [J]. *Cell*, 2017, 169 (2): 361-371.
- [19] Wullschlegel S, Loewith R, Hall M N. TOR signaling in growth and metabolism [J]. *Cell*, 2006, 124 (3): 471-484.
- [20] Choil E, Kim W, Joo S K, et al. Expression patterns of STAT3 ERK and estrogen-receptor α are associated with development and histologic severity of hepatic steatosis: a retrospective study [J]. *Diagn Pathol*, 2018, 13 (1): 23.
- [21] Thiem S, Pierce T P, Palmieri M, et al. mTORC1 inhibition restricts inflammation-associated gastrointestinal tumorigenesis in mice[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(2): 767-781.
- [22] HE Z, HE X, CHEN Z, et al. Activation of the mTORC1 and STAT3 pathways promotes the malignant transformation of colitis in mice[J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(5): 1873-1880.
- [23] BAO W, WANG Y, FU Y, et al. mTORC1 regulates flagellin-induced inflammatory response in macrophages [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0125910.
- [24] ZHU C, XIA L, LI F, et al. mTOR complexes differentially orchestrates eosinophil development in allergy[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 6883.
- [25] Smith E D, Prieto G A, TONG L, et al. Rapamycin and interleukin-1 β impair brain-derived neurotrophic factor-dependent neuron survival by modulating autophagy[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(30): 20615-20629.

[责任编辑 周冰冰]