

竹节参醇提物对小鼠酒精性脂肪肝的影响

李丽¹ 廖广辉² 楼招欢² 韩丽萍² 张广顺² 何志刚¹

1. 杭州市富阳区第一人民医院 杭州 311400 2. 浙江中医药大学药学院

摘要: [目的] 观察竹节参醇提物对急性酒精性脂肪肝的保护作用并初步探讨其作用机制。 [方法] 将 48 只 ICR 小鼠随机分为正常对照组、模型组、阳性对照组(多烯磷脂酰胆碱胶囊 0.27 g·kg⁻¹)、竹节参低剂量组(0.1 g·kg⁻¹)、竹节参中剂量组(0.2 g·kg⁻¹)、竹节参高剂量组(0.4 g·kg⁻¹)。小鼠高脂饲料喂养,以红星二锅头酒梯度稀释液为造模试剂,连续灌胃 8 周,复制酒精性脂肪肝模型,同时各给药组以相应药物进行干预。以全自动生化仪检测血清总胆固醇(total cholesterol,TC)、甘油三酯(triglyceride,TG)、谷丙转氨酶(alanine transaminase,ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase,AST)水平;苏木精-伊红(hematoxylin-eosin,HE)染色观察肝组织损伤程度;油红 O 染色法观察肝脏脂肪沉积情况;以试剂盒测定肝组织匀浆超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)活性及丙二醛(malondialdehyde,MDA)水平;免疫印迹法测定小鼠肝脏胰岛素诱导基因 1 编码蛋白(insulin induced gene 1,Insig1)、低密度脂蛋白受体(low-density lipoprotein receptor,LDLR)、过氧化物酶体增殖物激活受体 α(peroxisome proliferator-activated receptor α,PPARα)、胆固醇调节元件结合蛋白 1(sterol-regulatory element binding proteins 1,SREBP1)、甾醇调节因子结合蛋白裂解激活蛋白(sterol cleavage-activating protein,SCAP)、磷酸化氨基末端蛋白激酶(p-JNK)蛋白表达;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction,Real-time qPCR)检测肝脏 Insig1、LDLR、PPARα、SREBP1、SCAP 基因表达。 [结果] 竹节参醇提物能下调小鼠体重及肝脏指数,明显改善小鼠血清 ALT、AST 水平(P<0.05, P<0.01),各剂量组间 TC、TG 水平差异无统计学意义(P>0.05)。HE 染色显示,竹节参中、高剂量组肝细胞饱满,无炎症浸润细胞;油红 O 染色显示,竹节参中、高剂量组能明显改善小鼠肝脏脂肪累积。竹节参中剂量组明显提升肝脏 SOD 活性(P<0.05),低、高剂量组能明显降低肝脏 MDA 水平(P<0.05)。竹节参中、高剂量组能够显著降低 Insig1、SCAP 蛋白表达(P<0.01),各剂量组均能显著降低 SREBP1、P-JNK/JNK 蛋白相对表达水平(P<0.01),显著提升 LDLR、PPARα 蛋白相对表达水平(P<0.05, P<0.01)。此外,竹节参中、高剂量组还能显著降低 Insig1、SCAP、SREBP1 的 mRNA 基因相对表达水平(P<0.05, P<0.01),显著提升 LDLR、PPARα mRNA 基因相对表达水平(P<0.05, P<0.01)。 [结论] 竹节参醇提物对酒精性脂肪肝具有保护作用,该作用可能与改善肝脏胆固醇转运及合成,抑制脂质过氧化有关。

关键词: 浙派本草;本草纲目拾遗;酒精性脂肪肝;竹节参;胆固醇;氧化应激

中图分类号: R331 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005-5509(2022)12-1310-10

DOI: 10.16466/j.issn1005-5509.2022.12.002

Effect of Ethanol Extract of *Rhizoma Panax Japonicus* on Alcoholic Fatty Liver in Mice LI Li¹, LIAO Guanghui², LOU Zhaohuan², et al 1. The First People's Hospital of Fuyang Hangzhou, Hangzhou(311400), China; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University

Abstract: [Objective] To study the protective effect and the mechanism of action of ethanol extract of *Rhizoma Panax japonicus* on acute alcoholic fatty liver(AFL). [Methods] Forty-eight mice were randomly divided into normal control group, model group, positive control group(Polyene phosphatidylcholine capsule 0.27 g·kg⁻¹), ethanol extract of *Rhizoma Panax japonicus* low dose group(0.1 g·kg⁻¹), ethanol extract of *Rhizoma Panax japonicus* middle dose group(0.2 g·kg⁻¹) and ethanol extract of *Rhizoma Panax japonicus* high dose group(0.4 g·kg⁻¹). AFL mice model of was established by intragastric administration of Hongxing Chinese Vodka for 8 weeks. After final experiment, serum total cholesterol(TC), triglyceride(TG), alanine transaminase(ALT), aspartate aminotransferase(AST) levels were detected by fully automatic biochemical instrument; hematoxylin-eosin(HE) staining was used to observe pathological changes; oil red O staining was used to examine hepatic lipidosis; the activity of superoxide dismutase(SOD) and level of malondialdehyde(MDA) in liver tissue homogenate were determined with kit; the expressions of insulin induced gene 1(Insig1), low-density lipoprotein receptor(LDLR), peroxisome proliferator-

基金项目:浙江省中医药科技计划(2019ZA041);杭州市科技计划引导项目(20191231Y201)

Fund projects: Zhejiang Science and Technology Project of Traditional Chinese Medicine(2019ZA041); Pilot Project of Hangzhou Science and Technology Plan(20191231Y201)

通信作者:何志刚,E-mail:fly11505@163.com

activated receptor α (PPAR α), sterol-regulatory element binding proteins 1(SREBP1), sterol cleavage-activating protein(SCAP) and phosphorylated amino terminal protein kinase(p-JNK) proteins were determined by Western blot; the expression levels of Insig1, LDLR, SCAP, SREBP1 and PPAR α were detected by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction(Real-time qPCR). [Results] Ethanol extract of *Rhizoma Panax japonicus* high dose group could reduce the body weight and liver index of AFL mice, obviously improve the mice serum ALT, AST levels($P<0.05$, $P<0.01$), but there was no statistical difference of serum TC, TG levels among the ethanol extract of *Rhizoma Panax japonicus* groups($P>0.05$). HE staining showed that the liver cells in ethanol extract of *Rhizoma Panax japonicus* middle and high dose groups were full, without inflammatory infiltrating cells; oil red O staining showed that ethanol extract of *Rhizoma Panax japonicus* middle and high dose groups significantly reduced the fat accumulation in the liver cell. The SOD activity was significantly elevated in ethanol extract of *Rhizoma Panax japonicus* middle dose group($P<0.05$), and the MDA level was dropped significantly in ethanol extract of *Rhizoma Panax japonicus* low and high dose groups($P<0.05$). Meanwhile, middle and high dose ethanol extract of *Rhizoma Panax japonicus* obviously decreased the protein expression levels of Insig1 and SCAP($P<0.01$), the ethanol extract of *Rhizoma Panax japonicus* groups could significantly decrease SREBP1 and p-JNK/JNK protein expression($P<0.01$), and obviously increased the protein expression of LDLR and PPAR α ($P<0.05$, $P<0.01$). In addition, ethanol extract of *Rhizoma Panax japonicus* middle and high dose groups could effectively reduce the relative mRNA expression of Insig1, SCAP and SREBP1($P<0.05$, $P<0.01$), and increase clearly the relative mRNA expression of LDLR and PPAR α ($P<0.05$, $P<0.01$). [Conclusion] Ethanol extract of *Rhizoma Panax japonicus* can significantly improve the transport and synthesis of cholesterol, and the effect is associated with inhibition of lipid peroxidation.

Key words: Zhejiang school materia medica; *Collection of Compendium of Materia Medica*; alcoholic fatty liver; *Rhizoma Panax japonicus*; cholesterol; oxidative stress

酒精性脂肪肝(alcoholic fatty liver,AFL)是由于长期大量饮酒导致的肝脏疾病,为酒精性肝病的一种类型,可进一步发展为脂肪性肝炎、肝纤维化和肝硬化^[1]。严重的酒精中毒会导致广泛的肝细胞死亡、肝功能衰竭,甚至肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)^[2]。随着全球经济的发展,人们日均饮酒量增加,导致AFL的发病率逐渐增加,根据世界卫生组织统计,15岁及以上人群的平均酒精摄入量约为6.2升/年和13.5 g/d^[3]。竹节参为五加科植物竹节参(*Panax japonicus* C.A. Mey.)的干燥根茎,味甘、微苦,性温,归肝、脾、肺经,有散瘀止血、消肿止痛、祛痰止咳、补虚强壮之功,首载于浙派本草代表赵学敏所著的《本草纲目拾遗》^[4],其中昭参条记载“竹节三七即昭参,解醒第一,有中酒者,嚼少许,立时即解”^[5]。近年研究发现,竹节参有效成分及其提取物能够抑制肝脏脂肪变性^[6],缓解肝损伤^[7]。本研究拟在上述基础上,进一步明确不同剂量竹节参醇提物对AFL的治疗作用,探讨其可能的作用机制,以期促进竹节参的开发利用。

1 材料和方法

1.1 药物与试剂 竹节参购于恩施医药有限公司(产地:恩施,批号:20200801),取适量切片,置于圆底烧瓶,加入30%乙醇(料液比1:12)浸出2 h,85 °C回流2 h,滤取后按料液比再次加入30%乙醇回流2 h,合并两次滤液,旋蒸至适量体积,取出后将药液继续浓缩成浸膏状,即得竹节参30%醇提物;乙醇体积分数为52%的五星二锅头酒购于北京五星股份有限公司;多

烯磷脂酰胆碱胶囊(商品名:易善复)购于赛诺菲(北京)制药有限公司(批号:BBJD106);谷丙转氨酶(alanine transaminase,ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase,AST)、总胆固醇(total cholesterol,TC)、甘油三酯(triglyceride,TG)检测试剂盒均购于宁波美康生物科技股份有限公司(批号:16052001、16091901、15100801、16030301);超氧化物歧化酶(superoxide dismutase)、丙二醛(malondialdehyde,MDA)检测试剂盒均购于南京建成生物工程研究所(批号:A001-1、A003-1);二喹啉甲酸(bicinchoninic acid,BCA)蛋白浓度测定试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司(批号:P0010);牛血清白蛋白(bovine serum albumin,BSA)购于生工生物工程(上海)股份有限公司(批号:A600903);胆固醇调节元件结合蛋白1(sterol-regulatory element binding proteins 1,SREBP1)、低密度脂蛋白受体(low-density lipoprotein receptor,LDLR)均购于美国Proteintech公司(批号:14088-1-AP、10787-1-AP);甾醇调节因子结合蛋白裂解激活蛋白(sterol cleavage-activating protein,SCAP)、胰岛素诱导基因1编码蛋白(insulin induced gene 1,Insig1)、过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator-activated receptor α ,PPAR α)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)均购于美国Abcam公司(批号:ab190103、70787、ab126285、ab181602);氨基末端蛋白激酶(amino terminal protein kinase,JNK)、磷酸

化JNK(phosphorylated-JNK,p-JNK)均购于美国CST公司(批号:9254、4668);山羊抗鼠IgG、山羊抗兔IgG二抗均购于美国Thermo Pierce公司(批号:31160、31210);RNase-Free DNase Set购于德国Qiagen公司(批号:97254)。

1.2 实验动物 健康ICR雄性小鼠48只,体质量22~24 g,购于上海灵畅生物科技有限公司[实验动物生产许可证号:SCXK(沪)2018-0003],饲养于浙江中医药大学富春动物房[实验动物使用许可证号:SYXK(浙)2019-0024],室温(23±2)℃,相对湿度45%~55%,自由饮食饮水,人工光照,明、暗各12 h。

1.3 实验仪器 TBA-40FR Accute全自动生化分析仪购于日本东芝公司;BIO-TEK 4C106酶标仪购于美国伯腾仪器有限公司;MF43-N正置荧光显微镜为广州市明美光电技术有限公司产品;Bio-Rad 1658033蛋白电泳及转印系统及Bio-Rad CFX384多重实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction,Real-time qPCR)仪均为美国伯乐公司产品。

1.4 实验方法

1.4.1 动物分组及给药方法 造模方法在陈潮等^[8]研究的基础上适当改进,将48只ICR小鼠随机分为正常对照组、模型组、阳性对照组(多烯磷脂酰胆碱胶囊0.27 g·kg⁻¹)、竹节参低剂量组(0.1 g·kg⁻¹)、竹节参中剂量组(0.2 g·kg⁻¹)、竹节参高剂量组(0.4 g·kg⁻¹),每组8只。除正常对照组使用普通饲料喂养外,其余5组均给予高脂饲料。除正常对照组以蒸馏水灌胃外,其余各组小鼠按0.1 mL/10 g剂量予二锅头稀释液灌胃,1次/d,连续8周。实验第1~2周给予浓度为30%的二锅头稀释液,第3~4周浓度增加至35%,第5~6周浓度增加至40%,第7~8周增加至45%。造模同时,正常对照组、模型组灌胃给予纯水,各给药组按0.1 mL/10 g体积给予多烯磷脂酰胆碱或不同剂量竹节参醇提物灌胃,每日1次,连续8周。

1.4.2 小鼠体质量测定 实验初称量小鼠体质量,随后每隔4 d称取1次并记录,实验期末再次称取小鼠体质量,绘制小鼠体质量趋势图,并进行小鼠体质量分析。

1.4.3 肝脏解剖学观察、脏器指数测定 末次给药后禁食12 h,称取小鼠体质量并记录,毛细管眼球取血,脱颈椎处死小鼠,分离肝脏后置于白色背景下观察肝

脏形态、色泽等。称取肝脏质量,并计算肝脏指数,肝脏指数(%)=肝质量(g)/体质量(g)×100%。取相同部位的肝组织,一部分-80℃冰箱保存,供后续指标检测;另取一部分10%甲醛溶液固定。

1.4.4 血清生化指标检测 于给药2、4、6、8周采集各组小鼠血液,于37℃静置30 min,3 500 r/min离心10 min,分离血清,检测ALT、AST、TC及TG水平。

1.4.5 肝脏氧化应激指标检测 称取冻存的肝组织0.1 g,按组织质量(g):0.9%氯化钠水溶液体积(mL)=1:9,制备10%肝组织匀浆,3 500 r/min离心10 min,取上清液,以BCA法测定蛋白浓度,参照试剂盒说明书操作,酶标仪检测光密度(optical density,OD)值,计算SOD活性及MDA水平。

1.4.6 小鼠肝脏HE染色 取10%甲醛溶液固定的小鼠肝脏,全自动脱水机脱水后包埋,切片后苏木精-伊红(hematoxylin-eosin,HE)染色,中性树脂封片,镜检。

1.4.7 小鼠肝脏油红O染色 取-80℃保存的小鼠肝脏,组织切片冲洗后置于70%乙醇中20 s,再以油红O染色1 min,70%乙醇分色清洗后苏木精复染1 min,甘油明胶封片,镜检观察小鼠肝脏脂肪累积情况。

1.4.8 免疫印迹法检测小鼠肝脏相关蛋白表达 采用总蛋白提取试剂盒提取总蛋白,BCA试剂盒定量后电泳2 h,转膜,5%奶粉封闭2 h后,4℃下一抗孵育过夜,二抗杂交,漂洗后显影和定影。采用Image J软件分析条带的OD值,目的蛋白相对表达量=OD_{目的蛋白}/OD_{内参蛋白}×10³表示。

1.4.9 Real-time qPCR检测肝脏相关基因表达 以Trizol法提取总RNA,检测其含量、纯度及质量,反转录为cDNA后进行扩增,95℃预变性1 min,95℃ 15 s,63℃ 25 s,共40个循环,以GAPDH为内参,用2^{-ΔΔCt}表示基因平均相对表达量。引物由杭州纽贝生物公司设计,生工生物工程(上海)股份有限公司合成。序列见表1。

1.5 统计学分析 应用GraphPad Prism 5.0软件进行统计学分析及作图,组间多重比较采用单因素分析,两组间比较采用t-test。以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠体质量比较 与正常对照组比较,实验期间模型组及各给药组小鼠体质量增长相对缓慢,各组体质量均低于正常对照组,但差异无统计学意义(P>0.05)。见图1。

表1 引物序列

Tab.1 Primer sequences

基因名称	引物序列(5'→3')	片段大小(bp)
<i>Mouse GAPDH</i>	GAAGGTCGGTGTGAACGGATTG	127
	CATGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	
<i>Mouse Insig1</i>	GATTACCATCGCCTTCCTAGCT	103
	GAGCCAAGAACGGATATAGAGGAA	
<i>Mouse LDLR</i>	GTCTGTCACCTGTCACTCCAAT	120
	CAGCCTTGTTCCTCTGACTCATT	
<i>Mouse SCAP</i>	CAGCGCTACCATGCCAAGTTT	132
	CTCAGCAATGCCAATCTCCTCTT	
<i>Mouse SREBP-1</i>	CATCGACTACATCCGCTTCTTG	71
	CACTTCGTAGGCTCAGGTTCT	
<i>Mouse PPARα</i>	GCTTCCAGCCCTTCTCAGTC	153
	GAAGCCCTTACAGCCTTCACATG	

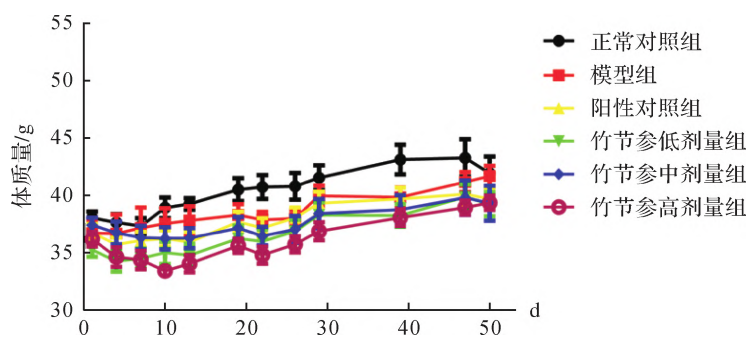


图1 各组小鼠体质量比较

Fig.1 Comparison of body mass of mouse in each group

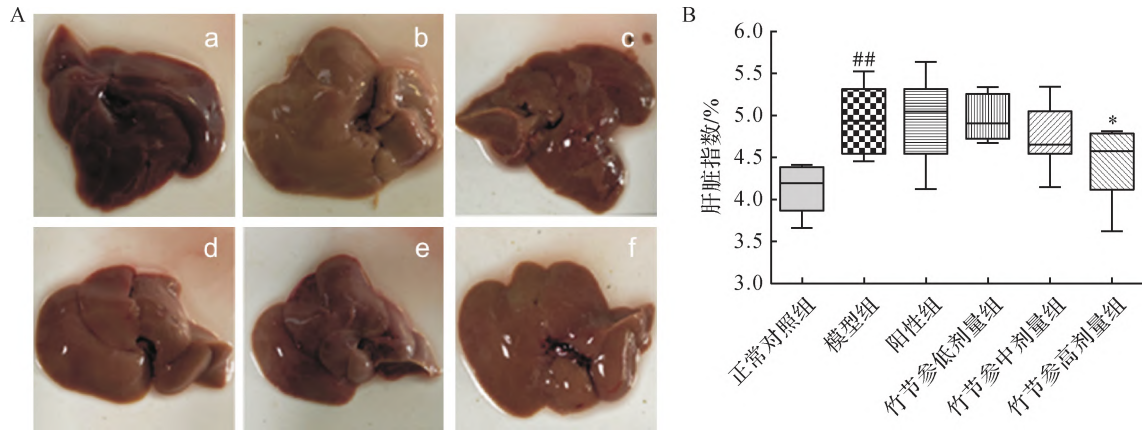
2.2 各组小鼠肝脏形态学及肝脏指数比较 在实验过程中,正常对照组小鼠行为正常,体质量逐渐增加。模型组小鼠呈明显的醉酒状态,体质量增长率逐渐下降。正常对照组小鼠肝脏颜色深红鲜亮,模型组小鼠肝脏颜色呈黄棕色,给药组小鼠肝脏浮肿程度减小,色泽较模型组红润。见图2A。与正常对照组小鼠比较,模型组小鼠肝脏指数明显增加($P<0.01$);与模型组比较,竹节参高剂量组小鼠肝脏指数显著下降($P<0.05$)。见图2B。

2.3 各组小鼠血清生化指标比较 与正常对照组比较,第2周模型组小鼠血清ALT差异无统计学意义($P>0.05$),血清AST水平显著上升($P<0.01$)。与模型组比较,阳性对照组、竹节参各剂量组小鼠血清AST水平显著下降($P<0.01, P<0.05$)。与正常对照组比较,第6周模型组小鼠血清ALT、AST水平显著增加($P<0.05$)。

与模型组比较,竹节参各剂量组小鼠血清ALT及AST水平有下降趋势,但差异无统计学意义($P>0.05$)。见图3。

与正常对照组比较,实验第2周模型组小鼠血清TC水平显著升高($P<0.01$),TG水平差异无统计学意义($P>0.05$);实验第6周模型组小鼠血清TC水平显著升高($P<0.01$),TG水平降低($P<0.05$);第8周模型组小鼠血清TC水平显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,实验第2、4、6周竹节参中剂量组TC水平有不同程度升高($P<0.05, P<0.01$);第4周中剂量组TG水平明显升高($P<0.05$),第6周高剂量组TG水平显著降低($P<0.05$);给药各组间TC、TG指标差异无统计学意义($P>0.05$)。见图3。

2.4 各组小鼠肝脏氧化应激功能比较 与正常对照组比较,模型组小鼠肝组织SOD活性显著下降($P<$

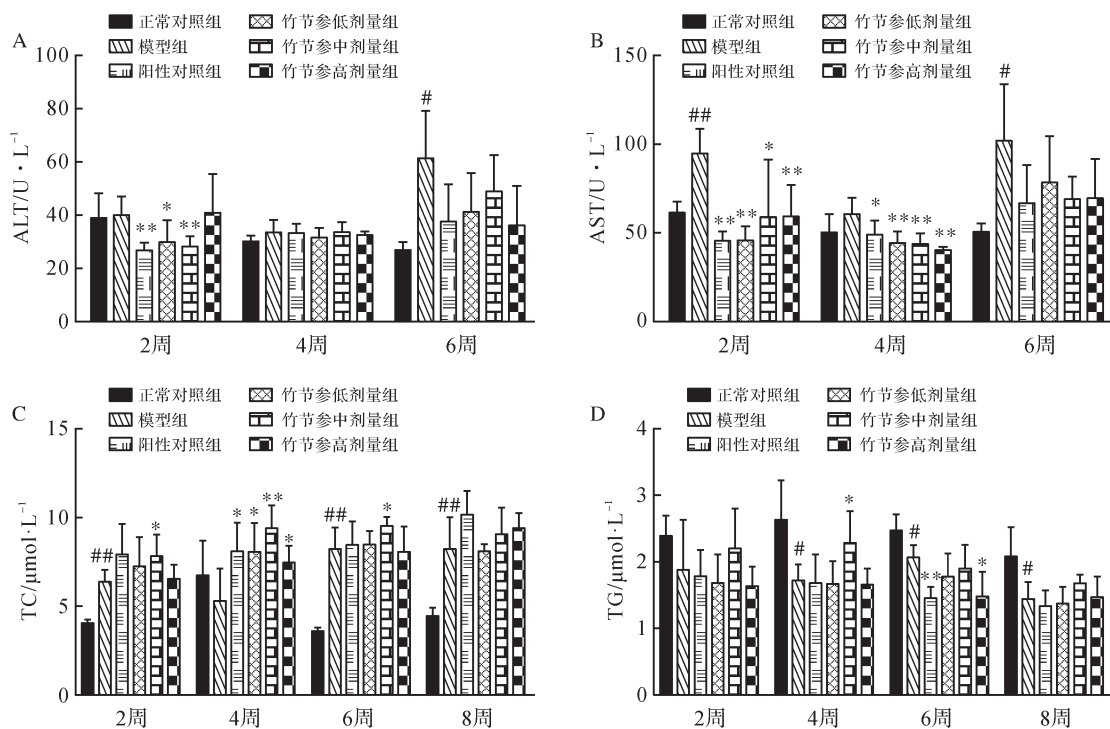


注:A.小鼠肝脏解剖外观;B.肝脏指数比较。a.正常对照组;b.模型组;c.阳性对照组;d.竹节参低剂量组;e.竹节参中剂量组;f.竹节参高剂量组。与正常对照组比较, [#]*P*<0.01;与模型组比较, ^{*}*P*<0.05。

Note: A. Anatomical appearance of mouse liver; B. Liver index. a. Normal control group; b. Model group; c. Positive control group; d. *Rhizoma Panax Japonicus* low dose group; e. *Rhizoma Panax Japonicus* middle dose group; f. *Rhizoma Panax Japonicus* high dose group. Compared with normal control group, [#]*P*<0.01; compared with model group, ^{*}*P*<0.05.

图2 各组小鼠肝脏外观照片及肝脏指数

Fig.2 Pictures of liver appearance and liver index of mouse in each group



注:A.血清ALT水平;B.血清AST水平;C.血清TC水平;D.血清TG水平。与正常对照组比较, [#]*P*<0.05, ^{##}*P*<0.01;与模型组比较, ^{*}*P*<0.05, ^{**}*P*<0.01。

Note: A. Serum ALT levels; B. Serum AST levels; C. Serum TC levels; D. Serum TG levels. Compared with normal control group, [#]*P*<0.05, ^{##}*P*<0.01; compared with model group, ^{*}*P*<0.05, ^{**}*P*<0.01.

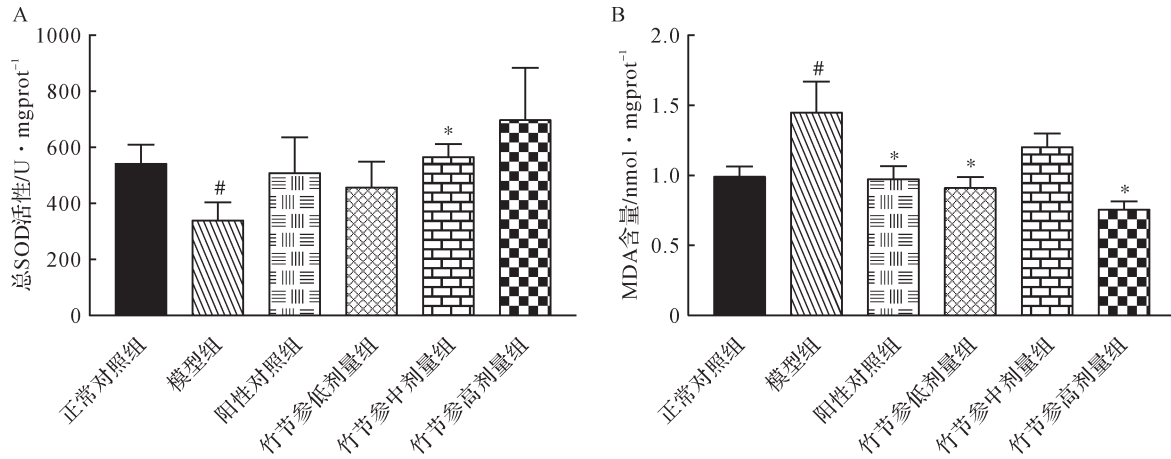
图3 各组小鼠血脂水平比较

Fig.3 Comparison of serum lipid levels of mouse in each group

0.05), MDA水平显著上升(*P*<0.05)。与模型组比较, 竹节参中剂量组小鼠肝组织SOD活性显著增加(*P*<0.05), 竹节参低、高剂量组小鼠肝组织MDA水平显著

降低(*P*<0.05)。见图4。

2.5 各组小鼠肝细胞损伤比较 正常对照组肝细胞排列紧密, 无炎性浸润; 模型组脂肪变性较明显, 细胞



注:A.小鼠肝组织SOD活性;B.小鼠肝组织MDA水平。与正常对照组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$ 。

Note: A.SOD activity in liver tissue of mouse; B.MDA level in liver tissue of mouse. Compared with normal control group, [#] $P<0.05$; compared with model group, ^{*} $P<0.05$.

图4 各组小鼠肝组织氧化应激指标水平比较

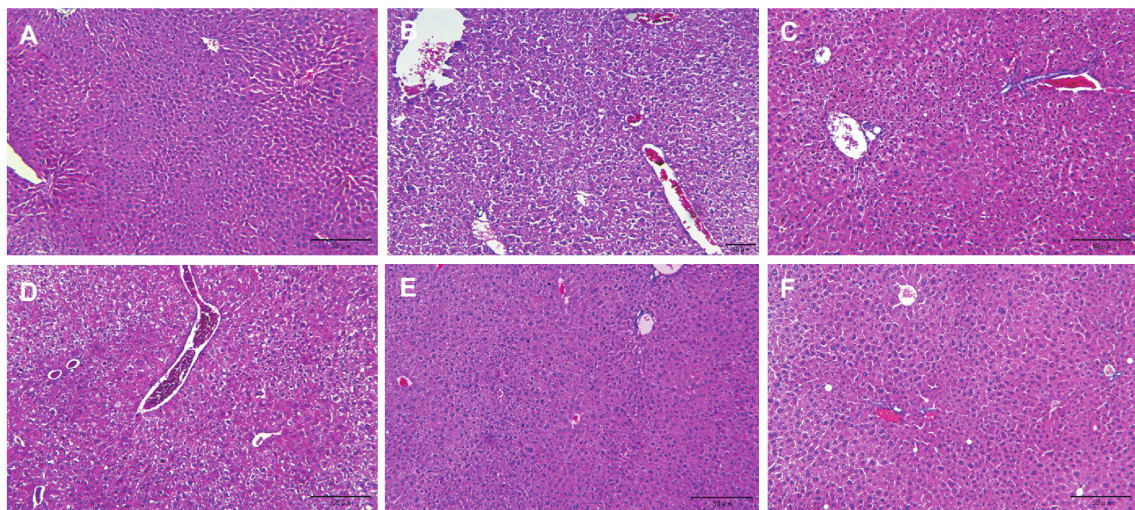
Fig.4 Comparison of levels of oxidative stress index in liver tissue of mouse in each group

间隙明显。与模型组比较,阳性对照组无肝细胞肿胀,中央静脉周围细胞呈轮辐状分布,肝细胞呈多边形,有少量脂肪空洞。与模型组比较,竹节参低剂量组脂肪变性有所缓解,但仍然存在少量炎性浸润现象;竹节参中剂量组无肝细胞肿胀,细胞排列紧密,未见脂肪空洞;竹节参高剂量组肝细胞排列成条索状较均匀,仅有少数脂肪空洞,与正常对照组和阳性对照组接近。见图5。说明对于乙醇诱导的肝脏损伤,竹节参高剂量组的治疗效果与阳性对照药物类似,对肝脏起

到了有效的保护作用。

2.6 各组小鼠肝脏脂肪累积情况比较 模型组小鼠肝脏内脂滴数量较多,阳性对照组肝细胞内的脂滴明显减少,竹节参中、高剂量组中橘红色脂滴较模型组显著减少,效果与阳性对照组较接近。见图6。提示竹节参醇提物对肝脏脂质沉积具有一定的改善作用。

2.7 各组小鼠肝脏脂代谢相关蛋白表达比较 与正常对照组比较,模型组小鼠Insig1、SCAP、SREBP1、p-JNK蛋白表达水平显著上调($P<0.01$);LDLR、PPAR α

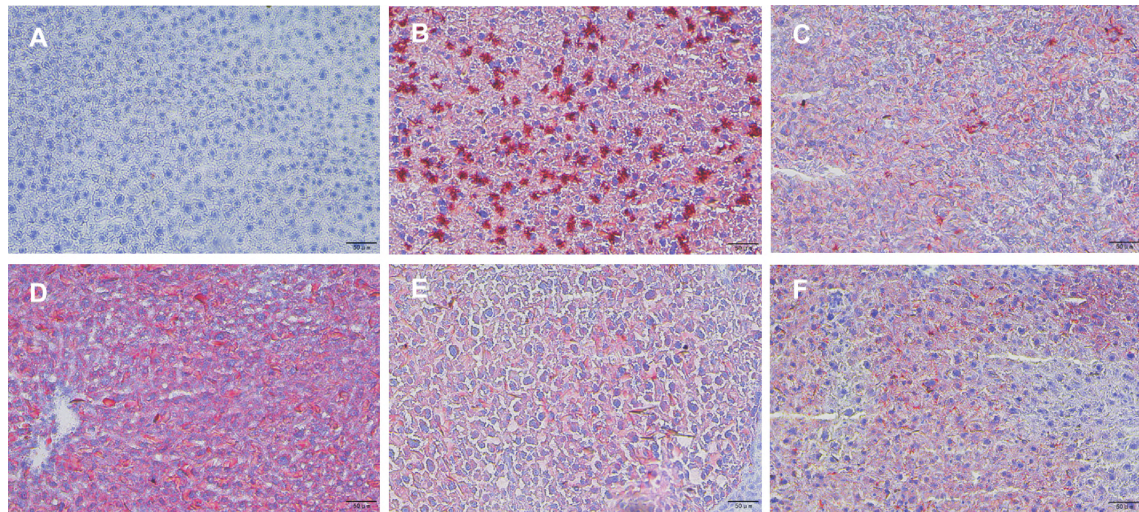


注:A.正常对照组;B.模型组;C.阳性对照组;D.竹节参低剂量组;E.竹节参中剂量组;F.竹节参高剂量组。标尺=50 μm 。

Note: A. Normal control group; B. Model group; C. Positive control group; D. *Rhizoma Panax Japonicus* low dose group; E. *Rhizoma Panax Japonicus* middle dose group; F. *Rhizoma Panax Japonicus* high dose group. Scale=50 μm .

图5 各组小鼠肝组织病理学(HE染色,100 \times)

Fig.5 Liver histopathological of mouse in each group(HE staining, 100 \times)



注:A.正常对照组;B.模型组;C.阳性对照组;D.竹节参低剂量组;E.竹节参中剂量组;F.竹节参高剂量组。标尺=50 μm。

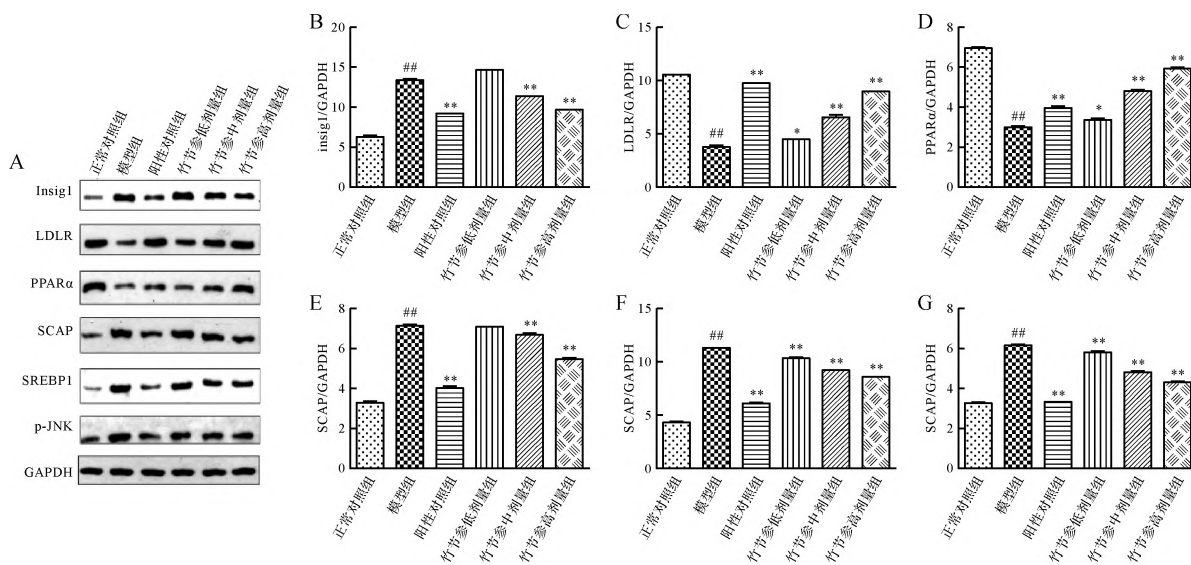
Note: A. Normal control group; B. Model group; C. Positive control group; D. *Rhizoma Panax Japonicus* low dose group; E. *Rhizoma Panax Japonicus* middle dose group; F. *Rhizoma Panax Japonicus* high dose group. Scale=50 μm.

图6 各组小鼠肝脏脂质沉积情况(油红O染色,200×)

Fig.6 Liver lipid deposition of mice in each group(O staining, 200×)

水平显著下调($P<0.01$)。与模型组比较,竹节参中、高剂量组小鼠肝组织Insig1、SCAP蛋白水平显著降低($P<0.01$),低、中、高剂量组SREBP1、p-JNK蛋白表达水平显著降低($P<0.01$),LDLR、PPARα蛋白表达水平显著升高($P<0.05, P<0.01$)。见图7。

2.8 各组小鼠肝脏脂代谢相关基因表达比较 与正常对照组比较,模型组PPARα、LDLR mRNA相对表达水平显著下降($P<0.01$);Insig1、SCAP、SREBP1基因mRNA相对表达水平显著上升($P<0.01$)。与模型组比较,阳性对照组,竹节参中、高剂量组小鼠肝组织



注:A.免疫印迹条带图;B. Insig1蛋白表达;C. LDLR蛋白表达;D. PPARα蛋白表达;E. SCAP蛋白表达;F. SREBP1蛋白表达;G. p-JNK蛋白表达。与正常对照组比较,## $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

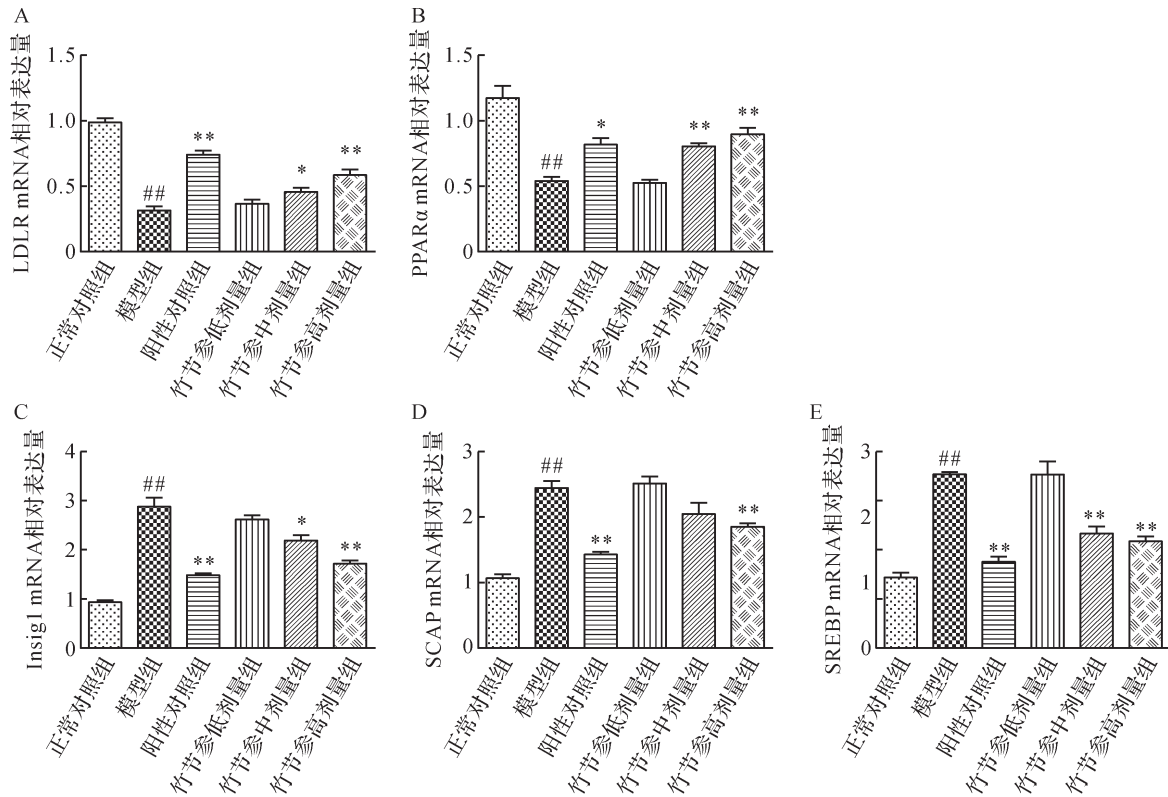
Note: A. Histogram of Western blot; B. Relative expression of insig1 protein; C. Relative expression of LDLR protein; D. Relative expression of PPARα protein; E. Relative expression of SCAP protein; F. Relative expression of SREBP1 protein; G. Relative expression of p-JNK protein. Compared with normal control group, ## $P<0.01$; compared with model group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图7 各组小鼠肝组织胆固醇转运及合成相关蛋白表达比较

Fig.7 Comparison of expression of cholesterol transport and synthesis related proteins in liver tissue of mouse in each group

PPAR α 、LDLR mRNA 表达水平显著上升 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 阳性对照组、竹节参中、高剂量组小鼠肝组织 Insig1、SREBP1 mRNA 相对表达水平显著降低 ($P <$

0.01, $P < 0.05$); 阳性对照组、竹节参高剂量组小鼠肝组织 SCAP mRNA 相对表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。见图 8。



注: A~E. LDLR、Insig1、PPAR α 、SCAP、SREBP1 mRNA 相对表达量。与正常对照组比较, ## $P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: A~E. Relative expression of insig1, LDLR, PPAR α , SCAP and SREBP1 mRNA. Compared with normal control group, ## $P < 0.01$; compared with model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图8 各组小鼠肝组织胆固醇转运及合成相关基因mRNA表达比较

Fig.8 Comparison of mRNA expression of cholesterol transport and synthesis related genes in liver tissue of mouse in each group

3 讨论

随着物质生活的不断丰富, AFL患病率呈上升趋势, 近年约为4.0%。一项对上万人的随访发现, 具有中度至高度纤维化评分的AFL与肝脏相关死亡风险增加密切相关, 这种现象在非肥胖个体中比肥胖个体中更为明显^[9], AFL发病具有一定的隐蔽性, 不易被多数患者发现^[9]。中医药对AFL具有良好的防治作用, 如三七、葛根、大枣等中药对AFL均有一定的防治作用^[11], 如《本草纲目拾遗》记载竹节参具有解酒作用^[9]。研究报道竹节参提取物对脂肪肝具有保护作用^[12], 但其对AFL的防治作用及潜在机制目前尚未见相关报道。

饮酒过量会干扰肝细胞内脂质代谢, 促进AFL的发生发展^[13]。本研究采用高脂饮食和乙醇灌胃, 复制AFL小鼠模型, 结果发现摄入高脂的同时以乙醇灌胃可导致模型小鼠血清ALT、AST水平明显上调, TC水

平及肝指数显著增加, 肝组织油红O染色结果显示模型组肝细胞脂质沉积明显, 提示AFL模型复制成功。以竹节参醇提取物干预, 能有效降低模型小鼠血清ALT、AST及TC水平, 提升肝脏总SOD活性, 降低MDA水平, 改善肝组织脂质沉积, 减轻病理损伤, 提示竹节参醇提取物对AFL具有良好的防治作用。

研究显示, 乙醇与PPAR及SREBP的表达紧密相关, 是促进AFL发生发展的主要因素之一^[14-15]。Insig与SCAP、SREBPs共同组成了Insig1-Scap-SERBP1转运体系, 通过影响LDLR的转录, 调节外源性TC的摄取^[16]。Insig蛋白具有两个亚型, 分别为Insig1和Insig2, 常与SREBP及SCAP结合形成三元复合体, 参与胆固醇的代谢, SCAP蛋白为SREBP裂解活化蛋白, SREBP蛋白参与体内胆固醇代谢及脂质合成^[7], 胆固醇与SCAP元件结合后, 促进了Insig1与SCAP的结合, 抑制SCAP-SREBP

从内质网转运至高尔基体,进而阻止了SREBP的成熟^[18]。LDLR基因编码LDLR蛋白,主要在肝脏表达,其表达升高会促进LDL受体与LDL的结合,从而增加肝脏对胆固醇的吸收及代谢^[19]。JNK为参与激活炎症通路重要因素。PPAR α 表达水平升高能够上调PPAR α 靶基因的表达,从而促进肝脏脂肪酸的代谢^[20]。

本研究表明,AFL小鼠肝组织PPAR α 、LDLR mRNA及蛋白相对表达水平明显下降,SREBP1、Insig1、SCAP mRNA及蛋白相对表达水平显著上升,肝组织总SOD活性下降,MDA水平明显增加。予以不同剂量竹节参醇提物干预,能有效上调AFL小鼠肝组织PPAR α 、LDLR mRNA及蛋白表达,下调Insig1、SCAP、SREBP1 mRNA及蛋白表达;此外,尚能增加AFL小鼠SOD活性,降低MDA水平。提示,竹节参醇提物对AFL的防治作用可能与阻断Insig1、SCAP、SREBP1复合体形成,抑制胆固醇的合成,上调LDLR及PPAR α 表达,促进脂肪酸氧化,进而改善肝组织脂质沉积及其介导的氧化应激损伤有关。

综上所述,竹节参能够防治高脂及乙醇诱导的AFL,该作用与抑制SREBP1-Insig1-SCAP活性,减少TC合成,上调LDLR、PPAR α 表达,促进脂质代谢,改善脂质过氧化损伤有关。

参考文献:

References:

- [1] 丁庆学,王德学,李振伟,等.酒精性脂肪肝148例的中医体质分型研究[J]. 基层医学论坛,2017,21(17):2254-2256.
DING Qingxue, WANG Dexue, LI Zhenwei, et al. Study on TCM constitution classification of 148 cases of alcoholic fatty liver[J]. The Medical Forum, 2017, 21(17):2254-2256.
- [2] YAN J B, NIE Y M, LUO M M, et al. Natural compounds: a potential treatment for alcoholic liver disease? [J]. Front Pharmacol, 2021, 12:694475.
- [3] ZHAO L, Mehmood A, YUAN D D, et al. Protective mechanism of edible food plants against alcoholic liver disease with special mention to polyphenolic compounds [J]. Nutrients, 2021, 13(5):1612.
- [4] 管家齐,宋捷民.浙派中医本草学派的源流与学术特色[J]. 浙江中医药大学学报, 2018, 42(1):64-67.
GUAN Jiaqi, SONG Jiemin. The origin and academic characteristics of Zhejiang school of traditional Chinese medicine[J]. J Zhejiang Chin Med Univ, 2018, 42(1): 64-67.
- [5] 赵学敏.本草纲目拾遗[M].刘从明,校注.北京:中国中医药出版社, 2017:65.
ZHAO Xuemin. A Collection of Compendium of Materia Medica[M]. LIU Congming, Proofread. Beijing: China Press

of Traditional Chinese Medicine, 2017:65.

- [6] 熊海容,李聪,何春喜,等.竹节参总皂苷通过调节miR-199-5p改善小鼠脂肪性肝病的实验研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(17):3525-3529.
XIONG Hairong, LI Cong, HE Chunxi, et al. Experimental study on the effect of total saponins of *Panax japonicus* on fatty liver disease in mice by regulating miR-199-5p[J]. Chin J Chin Mater Med, 2018, 43(17):3525-3529.
- [7] 何志刚,汪洋鹏,刘磊,等.竹节参提取物对慢性酒精性肝损伤模型小鼠血清生化指标及炎症因子水平的影响[J]. 浙江中西医结合杂志, 2018, 28(1):21-24.
HE Zhigang, WANG Yangpeng, LIU Lei, et al. Effects of *Panax japonicus* extract on serum biochemical indexes and inflammatory factors in mice with chronic alcoholic liver injury[J]. Zhejiang J Integr Tradit Chin West Med, 2018, 28(1):21-24.
- [8] 陈潮,汤小刚,王军伟,等.乌药不同提取物对酒精性肝损伤大鼠肝脏及小肠组织形态学的干预研究[J]. 浙江中西医结合杂志, 2017, 27(11):940-942.
CHEN Chao, TANG Xiaogang, WANG Junwei, et al. Intervention of different extracts of *Radix aconiti* on histomorphology of liver and small intestine in rats with alcoholic liver injury[J]. Zhejiang J Integr Tradit Chin West Med, 2017, 27(11):940-942.
- [9] CHANG Y, CHO Y K, CHO J, et al. Alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease and liver-related mortality: a cohort study [J]. Am J Gastroenterol, 2019, 114(4):620-629.
- [10] 彭朝荣.酒精性脂肪肝的临床诊治及预防措施[J]. 中国医药指南, 2016, 14(16):143-144.
PENG Chaorong. Clinical diagnosis, treatment and preventive measures of alcoholic fatty liver [J]. Guide Chin Med, 2016, 14(16):143-144.
- [11] 周文伟,王邦才.中医药治疗酒精性肝病研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2017, 19(2):118-121.
ZHOU Wenwei, WANG Bangcai. Research progress in the treatment of alcoholic liver disease with traditional Chinese medicine [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2017, 19(2):118-121.
- [12] 熊海容,吴利春,段丽,等.竹节参总皂苷通过调节miR-34a/PPAR α 干预小鼠脂肪肝的作用研究[J]. 现代食品科技, 2017, 33(8):1-6, 29.
XIONG Hairong, WU Lichun, Duan Li, et al. Total saponins of *Panax japonicus* can regulate mir-34a PPAR α effect of intervention on fatty liver in mice [J]. Modern Food Sci Technol, 2017, 33(8):1-6, 29.
- [13] OSNA N A, DONOHUE T M JR, KHARBANDA K K. Alcoholic liver disease: pathogenesis and current management [J]. Alcohol Res, 2017, 38(2):147-161.
- [14] 全巧云,葛存锦,郑世华.PPAR α 及Acox1在酒精性脂肪肝中的表达[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2016, 45(3):

- 288-291.
TONG Qiaoyun, GE Cunjin, ZHENG Shihua. PPAR α and the expression of acox1 in alcoholic fatty liver[J]. Acta Med Univ Sci Technol Huazhong, 2016, 45(3):288-291.
- [15] 潘友欣. 绞股蓝总甙对酒精性脂肪肝大鼠肝脏保护作用及分子机制研究[D]. 武汉: 武汉科技大学, 2013:21.
PAN Youxin. Study on protective effect and molecular mechanism of gypenosides on alcoholic fatty liver in rats [D]. Wuhan: Wuhan University of Science and Technology, 2013:21.
- [16] RADHAKRISHNAN A, IKEDA Y, KWON H J, et al. Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi; Oxysterols block transport by binding to Insig[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(16):6511-6518.
- [17] 王苗, 罗军, 许会芬, 等. 山羊INSIG1基因超表达对乳腺上皮细胞中脂质合成的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(9): 1806-1816.
WANG Miao, LUO Jun, XU Huifen, et al. Effect of goat INSIG1 gene overexpression on lipid synthesis in mammary epithelial cells[J]. Acta Veterin Zootechn Sin, 2016, 47(9):1806-1816.
- [18] YANG T, ESPENSHADE P J, WRIGHT M E, et al. Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPS in ER[J]. Cell, 2002, 110(4):489-500.
- [19] 宋欠红, 樊睿, 李易, 等. 芪蛭通脉颗粒对冠心病血脂异常大鼠PCSK9/LDLR通路的影响[J]. 中国中医急症, 2021, 30(11):1920-1923.
SONG Qianhong, FAN Rui, LI Yi, et al. Effect of Qizhi Tongmai Granule on PCSK9/LDLR pathway in rats with coronary heart disease and dyslipidemia[J]. Emerg Tradit Chin Med, 2021, 30(11):1920-1923.
- [20] HUANG W, WANG B, LI X, et al. Endogenously elevated n-3 polyunsaturated fatty acids alleviate acute ethanol-induced liver steatosis[J]. Biofactors, 2015, 41(6):453-462.
(收稿日期: 2022-04-06)
-
- (上接第1309页)
- [23] 李姿慧, 王键, 蔡荣林, 等. 参苓白术散通过ERK/p38 MAPK信号通路干预溃疡性结肠炎大鼠结肠组织AQP3、AQP4的表达[J]. 中成药, 2015, 37(9):1883-1888.
LI Zihui, WANG Jian, CAI Ronglin, et al. Shenling-baizhu Powder interferes with the expression of AQP3 and AQP4 in colon tissues of rats with ulcerative colitis through ERK/p38 MAPK signaling pathway[J]. Chin Tradit Pat Med, 2015, 37(9):1883-1888.
- [24] WU X, CONLIN V S, MORAMPUDI V, et al. Vasoactive intestinal polypeptide promotes intestinal barrier homeostasis and protection against colitis in mice[J]. PLoS One, 2015, 10(5):e0125225.
- [25] RAJU P, SHASHIKANTH N, TSAI P Y, et al. Inactivation of paracellular cation-selective claudin-2 channels attenuates immune-mediated experimental colitis in mice [J]. J Clin Invest, 2020, 130(10):5197-5208.
- [26] LIN J, SUN Z, ZHANG W, et al. Protective effects of intestinal trefoil factor(ITF) on gastric mucosal epithelium through activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2)[J]. Mol Cell Biochem, 2015, 404(1-2):263-270.
- [27] WU Q, XIE S, ZHU Y, et al. Wogonin strengthens the therapeutic effects of mesenchymal stem cells in dss-induced colitis via promoting IL-10 production[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021:5527935.
- [28] SAYOC-BECERRA A, KRISHNAN M, FAN S, et al. The JAK-inhibitor tofacitinib rescues human intestinal epithelial cells and colonoids from cytokine-induced barrier dysfunction[J]. Inflamm Bowel Dis, 2020, 26(3):407-422.
- [29] BIDDLESTONE J, BANDARRA D, ROCHA S. The role of hypoxia in inflammatory disease(review)[J]. Int J Mol Med, 2015, 35(4):859-869.
(收稿日期: 2022-03-06)