

· 经典名方 ·

逍遥散改善卵巢切除大鼠脂代谢异常和脂肪性肝炎的作用机制

杨皓然^{1,2}, 刘丽娜^{1,2*}, 严晶¹, 葛飞³, 陆玮婷², 史会连², 乔飞²

(1. 南京中医药大学第一临床医学院, 南京 210046;

2. 南京中医药大学附属医院, 南京 210029; 3. 海安中医院, 江苏海安 226600)

[摘要] 目的: 研究逍遥散(Xiaoyaosan, XYS)对卵巢切除(OVX)SD雌性大鼠肝脏脂代谢和脂肪性肝炎的影响及作用机制。方法: 将40只雌性SD大鼠随机分为假手术组, OVX模型组, XYS低、高剂量组(3, 9 g·kg⁻¹)。切除大鼠双侧卵巢制作去势大鼠肥胖模型, 连续灌胃给药6周后, 比较各组大鼠的体质量变化率、血脂及肝功能水平; 苏木素-伊红(HE)染色观察肝细胞组织形态; 油红染色比较肝内脂肪沉积情况; 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)测定肝内促炎症因子和雌激素受体 β (ER β) mRNA表达的水平。结果: 与假手术组比较, OVX模型组大鼠随给药周期变化体质量变化率显著增加(2~6周, $P < 0.05$, $P < 0.01$); OVX模型组血清总胆固醇(TC), 丙氨酸氨基转移酶(ALT), 天冬氨酸氨基转移酶(AST), 低密度脂蛋白(LDL)水平明显增加($P < 0.05$, $P < 0.01$); 肝组织学中的肝索结构紊乱, 肝细胞浆内出现脂滴堆积; OVX模型组肝脏白细胞介素-1 β (IL-1 β), 白细胞介素-6(IL-6) mRNA转录水平亦明显增高($P < 0.05$)。与OVX模型组比较, XYS低、高剂量组体质量变化率随给药周期增加均显现出不同程度的下降(3~6周); XYS可明显降低OVX模型大鼠的血清TC, ALT, AST, LDL水平($P < 0.05$), 呈剂量依赖性; 而血清甘油三酯(TG), 碱性磷酸酶(AKP), 高密度脂蛋白(HDL)水平各组之间无统计学意义; XYS可改善OVX模型大鼠肝细胞排列结构和脂质变性; XYS可剂量依赖地降低OVX模型大鼠肝脏IL-6, IL-1 β mRNA转录水平($P < 0.05$, $P < 0.01$), 但肿瘤坏死因子- α (TNF- α) mRNA转录水平各组之间无显著差异; XYS低、高浓度均可提高OVX模型组肝脏ER β 的转录水平($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论: XYS可以改善OVX模型大鼠的体质量增长率, 肝脏脂质代谢异常和脂肪性肝炎, 其机制可能与XYS促进肝脏ER β 表达, 进而抑制肝内促炎症因子表达有关。

[关键词] 逍遥散; 卵巢切除; 肥胖; 脂质代谢; 脂肪性肝炎; 雌激素受体 β

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)03-0001-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20200203

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191011.1035.003.html>

[网络出版时间] 2019-10-11 11:38

Mechanism of Xiaoyaosan in Improving Abnormal Lipid Metabolism and Steatohepatitis of Ovariectomized Rats

YANG Hao-ran^{1,2}, LIU Li-na^{1,2*}, YAN Jing¹, GE Fei³, LU Wei-ting², SHI Hui-lian², QIAO Fei²

(1. The First College of Clinical Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;

2. Department of Hepatology, Affiliated Hospital to Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China;

3. Haian Hospital of Traditional Chinese Medicine, Haian 226600, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Xiaoyaosan (XYS) on hepatic lipid metabolism and

[收稿日期] 20190612(015)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81603578); 江苏省自然科学基金面上项目(BK20181235); 江苏省中医药管理局科技项目(YB2017066); 江苏高校优势学科建设工程项目

[第一作者] 杨皓然, 在读硕士, 从事中西医结合胃肠疾病及肝病的诊治及研究, E-mail: 1158177878@qq.com

[通信作者] * 刘丽娜, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 从事中西医结合胃肠疾病及肝病的诊治及研究工作, Tel: 025-86617141, E-mail: lina_liu@njucm.edu.cn

steatohepatitis in ovariectomized (OVX) female SD rats and its mechanism. **Method:** Forty female SD rats were randomly divided into sham surgery group, OVX group, low-dose YYS group ($3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), and high-dose YYS group ($9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$). Bilateral ovaries of rats were excised to replicate the obesity model of ovariectomized rat. After 6 weeks of intragastric administration, the change rate of body mass in each group, the levels of blood lipids and liver function of rats were detected. Hematoxylin-eosin (HE) staining and oil red staining were used to observe the hepatocyte histomorphology and the intrahepatic fatty deposits. The expressions of hepatic proinflammatory cytokines and estrogen receptor beta ($\text{ER}\beta$) were determined by quantitative real time polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** Compared with sham surgery group, the change rate of body mass of OVX group was significantly increased (2-6 weeks) with the changes in the course of drug administration and the levels of serum total cholesterol (TC), alanine aminotransferase (ALT) ($P < 0.05$), aspartate amino transferase (AST) ($P < 0.01$), low-density lipoprotein (LDL) ($P < 0.05$) were markedly increased too ($P < 0.05$, $P < 0.01$). By histological method, in OVX group, the structure of hepatic cord became disordered, and there were new lipid droplets in hepatocyte cytoplasm, transcription levels of hepatic interleukin- 1β (IL- 1β) and interleukin-6 (IL-6) in OVX group were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with OVX group, the growth rate of body weight in low-dose and high-dose YYS group showed significant decreases with the increase of the cycle of drug administration (3-6 weeks). YYS significantly reduced levels of serum TC, ALT, AST, and LDL levels of OVX rats ($P < 0.05$) in a dose-dependent manner, while serum triglyceride (TG), alkaline phosphatase (AKP) and high-density lipoprotein (HDL) levels in the four groups showed no statistical significance, YYS can improve hepatocyte structure and steatosis of OVX rats, YYS could reduce the transcription hepatic levels of IL-6 and IL- 1β of OVX rats in a dose-dependent manner ($P < 0.05$, $P < 0.01$), but there was no significant difference in the transcription level of tumor necrosis factor- α (TNF- α) among groups, both low and high-dose YYS can increase the transcription hepatic level of $\text{ER}\beta$ in OVX group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** YYS can improve the growth rate of body mass, the hepatic lipid metabolism abnormalities and steatohepatitis of OVX rats. The mechanism may be related to the elevated expression of hepatic $\text{ER}\beta$ by YYS, so as to inhibit the hepatic pro-inflammatory factors expressions.

[**Key words**] Xiaoyaosan; ovariectomy; obesity; lipid metabolism; steatohepatitis; estrogen receptor β

绝经后肥胖是影响更年期女性人体健康的重要因素,由于卵巢功能衰竭,雌激素分泌减少,下丘脑-垂体-卵巢轴平衡失调,导致体内物质代谢紊乱,体质量进行性增加。研究表明,女性肥胖的发病率随着年龄的增长而增加,并且绝经后女性的肥胖率高于有卵巢功能的绝经前女性^[1]。绝经后女性比绝经前女性腹腔内脂肪堆积更多,导致肥胖及相关并发症的风险更大^[2]。绝经后女性 2 型糖尿病、血脂异常、高血压病和心血管疾病的患病率比绝经前女性更高^[3-4]。目前临床上针对绝经后女性的肥胖缺乏有效的治疗措施,激素替代疗法虽然能缓解肥胖及其并发症,但也增加了其他妇科肿瘤的患病率^[5]。中医秉持整体观念和辨证论治的理念,认为绝经后女性除了易致肥胖,还常伴有胸胁胀满、烦躁易怒、情志抑郁、神疲食少等症^[6],应归属于肝郁脾虚证。逍遥散出自《太平惠民和剂局方》^[7],全方深合《黄帝内经·素问·藏气法时论》“肝苦急,急食酸以缓之”“脾欲缓,急食甘以缓之”“肝欲散,急食辛

以散之”之旨,可使肝郁得疏,血虚得养,脾弱得复,气血兼顾,肝脾同调。逍遥散为治疗肝郁血虚脾弱证之基础方、妇科调经之常用方,目前在治疗女性绝经前后情志病方面有较好的临床疗效^[8],但是逍遥散对此相关的肥胖及其并发症可能的治疗效果还未见报道。此外,临床研究与基础研究已证实逍遥散加减对肝郁脾虚型非酒精性脂肪性肝炎有改善作用^[9-11]。因此,本研究通过卵巢切除(OVX)雌大鼠模拟绝经后肥胖女性,观察逍遥散对雌激素缺乏引起肥胖及其相关并发症,包括脂代谢紊乱和肝脏脂肪变性及其炎症的影响,探讨其可能的机制,为临床运用提供一定参考。

1 材料

1.1 动物 40 只成年雌性 SD 大鼠,体质量(200 ± 20) g,年龄 6 ~ 7 周,SPF 级,购于北京维通利华实验动物技术有限公司有限公司,动物合格证号 SCXK(苏)2016-0002。本实验已获南京中医药大学实验动物伦理委员会批准,大鼠饲养于 12 h/12 h

昼夜循环环境(7:00~19:00),室温保持在25℃,相对湿度保持在50%~55%,动物自由摄食饮水。实验开始前动物适应性饲养7 d。

1.2 药物 实验所用中药复方选自《太平惠民和剂局方》中的逍遥散(北柴胡 30 g,当归 30 g,白芍 30 g,白术 30 g,茯苓 30 g,炙甘草 15 g,生姜 10 g,薄荷 10 g)。上述中药饮片购自南京中医药大学附属医院,经江苏省中医院药剂科朱育凤教授鉴定均为正品。药物先用清水浸泡 30 min,煎煮 2 次,每次沸腾后煎煮 40 min,合并 2 次药液,过滤,水浴浓缩制备成相当于含有 1 g·mL⁻¹生药的煎剂,保存于 4℃冰箱备用。

1.3 试剂 苏木素-伊红(HE)染液,油红 O 染液(武汉谷歌生物科技有限公司,货号分别为 G1005, G1016);trizol RNA 分离试剂,SYBR Green Mix(南京诺唯赞生物科技有限公司,货号分别为 R401-01, Q131-02);Prime Script™ Master Mix(日本 Takara 公司,货号 RR036A);总胆固醇(TC),甘油三酯(TG),碱性磷酸酶(AKP),高密度脂蛋白(HDL),低密度脂蛋白(LDL),天冬氨酸氨基转移酶(AST),丙氨酸氨基转移酶(ALT)试剂盒(南京建成生物工程研究所,货号分别为 20190105, 20190106, 20190111, 20190117, 20190117, 20190201, 20190202)。

1.4 仪器 Cryostar NX50 型冰冻切片机(赛默飞世尔科技中国公司),JB-P5 型包埋机(武汉俊杰电子有限公司),Nikon Eclipse E100 型正置光学显微镜(日本尼康公司),Step One Plus 型 ABI 实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)仪(美国应用生物系统公司),H7600-020 型生化分析仪(日本日立公司)。

2 方法

2.1 OVX 术 大鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 40 mg·kg⁻¹麻醉,在腹部正中作 2~3 cm 的切口,用手术钳和细丝结扎子宫,移除双侧卵巢,缝合切口。假手术组在麻醉打开腹腔后不做任何处理,缝合切口。OVX 术后 5 d,收集 5 d 的阴道涂片,参照文献[12]以出现动情期反应与否判断手术是否成功。

2.2 分组与给药 40 只雌大鼠随机分为 4 组,分别为假手术组,OVX 模型组,逍遥散低、高剂量组,每组各 10 只。药物组大鼠 OVX 后 1 周,每天早 8:00 灌胃给药,持续 6 周。假手术组和 OVX 模型组给予 0.9% 生理盐水 10 mL·kg⁻¹,逍遥散低、高剂量组分别给予 3,9 g·kg⁻¹剂量灌胃(给药剂量为预实验的有效剂量)。每周称量体质量,给药剂量按

体质量变化灌胃。

2.3 血清生化指标测定 大鼠给药 6 周后,禁食 8 h,将大鼠用戊巴比妥深度麻醉后,经左心耳取血,分离血清,生化分析仪测定血清 TC, TG, ALT, AST, AKP, HDL, LDL 的水平。

2.4 HE 染色观察肝组织病理学变化 上述取血后的部分大鼠,每组 3 只,以 4℃生理盐水经左心耳冲净血液,再经心脏灌注 4% 多聚甲醛固定 1 h。大鼠剖腹,取部分肝右叶,用 10% 磷酸盐缓冲甲醛固定 1 d,再用石蜡包埋,然后切成 5 μm 厚的切片;以 HE 染色切片,梯度浓度乙醇脱水,二甲苯透明后以中性树胶封片;显微镜下图像采集分析。

2.5 油红 O 脂肪染色观察肝脏组织病理变化 上述取血后的另一部分大鼠,每组 3 只,以 4℃生理盐水经左心耳冲净血液,迅速开腹去除新鲜肝组织行冰冻切片。实验时将冰冻切片复温干燥,固定液中固定 15 min,切片入油红 O 染液浸染 10 min(加盖避光),蒸馏水洗;75% 乙醇分化背景,蒸馏水洗。苏木素复染 8 min,甘油明胶封片。显微镜镜检,图像采集分析。

2.6 Real-time PCR 检测白细胞介素(IL)-1β, IL-6, 肿瘤坏死因子(TNF)-α, 雌激素受体β(ERβ) mRNA 表达 用 trizol 试剂从肝脏组织中提取细胞总 RNA,细胞总 RNA 1 μL 再加上 Prime Script™ Master Mix 4 μL 和 RNAase-free 15 μL 双蒸水配置成反转录反应液,进行反转录反应生成反义 cDNA 模板,条件为 37℃ 15 min, 85℃ 5 s, 4℃ 10 min, 最后用 5 μL SYBR Green Mix, 2 μL cDNA 模板,上下游引物(10 μmol·L⁻¹)等配置混合液,PCR 仪扩增所需 cDNA。PCR 扩增条件为 95℃ 5 s, 1 次循环, 95℃ 5 s, 60℃ 31 s, 40 次循环。熔解条件为 95℃ 15 s, 60℃ 30 s, 95℃ 15 s。最后通过 2^{-ΔΔC_t} 计算各 mRNA 相对表达量。引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,见表 1。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 22.0 软件对结果进行分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间数据比较采用单因素方差分析,两两组间的比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 OVX 模型大鼠体质量增长率的影响 在 6 周的给药周期中,与假手术组比较,从第 2 周开始 OVX 模型组大鼠体质量增长率均明显增加($P < 0.05$, $P < 0.01$);与 OVX 模型组比较,逍遥散低剂量组在第 3, 5, 6 周体质量增长率明显降低($P <$

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR

引物	序列(5'-3')	长度/bp
IL-1 β	上游 GCACAGTTCCCAACTGGTA	82
	下游 TGTCCCGACCATTGCTGTTT	
IL-6	上游 CTGGTCTTCTGGAGTTCCGT	90
	下游 TGCTCTGAATGACTCTGGCT	
TNF- α	上游 GGCATGGATCTCAAAGACAACC	126
	下游 AAATCGGACGGTGTGG	
ER β	上游 GCTACTGCTGAGCACCTGA	141
	下游 TTGTCGCCAGCTTAGTGAG	
GAPDH	上游 GCGAGATCCCGCTAACATCA	178
	下游 CTCGTGGTTCACCCATCA	

0.05, $P < 0.01$), 其余给药周期体质量增长率虽有下降, 但差异无统计学意义; 逍遥散高剂量组较 OVX 模型组从第 3 周开始体质量增长率明显下降 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 1。

3.2 对 OVX 模型大鼠血清生化指标的影响 与假手术组比较, OVX 模型组 TC, ALT, AST, LDL 均明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。与 OVX 模型组

表 2 逍遥散对 OVX 模型大鼠血清生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of YYS on serum biochemical indexes in OVX rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	TC	TG	ALT	AST	AKP	HDL	LDL
假手术	-	1.30 \pm 0.15	0.48 \pm 0.14	35.00 \pm 7.13	133.95 \pm 16.52	97.60 \pm 26.01	0.58 \pm 0.09	0.28 \pm 0.06
OVX 模型	-	1.62 \pm 0.25 ²⁾	0.61 \pm 0.18	50.78 \pm 13.39 ¹⁾	164.29 \pm 20.14 ²⁾	137.17 \pm 55.60	0.49 \pm 0.10	0.36 \pm 0.06 ¹⁾
逍遥散	3	1.36 \pm 0.23 ³⁾	0.52 \pm 0.19	45.85 \pm 12.36	143.57 \pm 17.31	124.31 \pm 45.14	0.53 \pm 0.12	0.30 \pm 0.06
	9	1.33 \pm 0.21 ³⁾	0.52 \pm 0.16	37.44 \pm 10.56 ³⁾	139.67 \pm 18.69 ³⁾	121.86 \pm 47.08	0.56 \pm 0.10	0.28 \pm 0.07 ³⁾

3.3 对 OVX 模型大鼠肝细胞结构的影响 假手术组大鼠的肝细胞围绕小叶中心静脉呈放射状排列, 肝索排列整齐。OVX 模型组大鼠肝细胞和肝索排列紊乱无序。经过 6 周逍遥散干预后, 肝索排列成有序形态, 逍遥散高剂量组更明显。见图 2。

3.4 对 OVX 模型大鼠肝细胞脂肪变性的作用 由

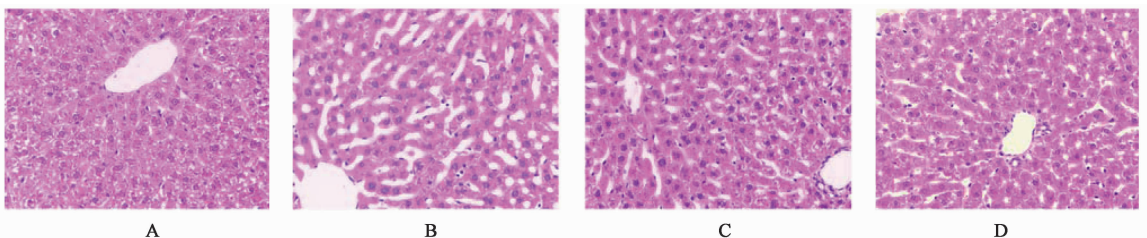
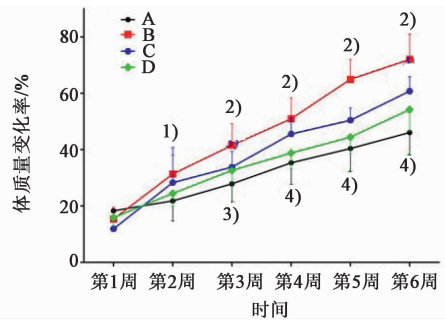


图 2 逍遥散对 OVX 模型大鼠肝细胞结构的影响 (HE, $\times 400$)

Fig. 2 Effect of YYS on hepatocyte structure in OVX rats (HE, $\times 400$)



A. 假手术组; B. OVX 模型组; C. 逍遥散低剂量组; D. 逍遥散高剂量组 (图 2~3 同); 与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 OVX 模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)

图 1 逍遥散对 OVX 模型大鼠体质量增长率的影响

Fig. 1 Effect of Xiyao San (XYS) on growth rate of mass in OVX rats

比较, 逍遥散低剂量组 TC 水平明显下降 ($P < 0.05$), 且逍遥散高剂量组 TC, ALT, AST, LDL 均明显下降 ($P < 0.05$), TG, AKP, HDL 在各组间差异无统计学意义。逍遥散对 OVX 模型的肝功能、血脂有改善作用, 并呈现一定的量效关系。见表 2。

于肝细胞的脂肪变性表现为胞浆脂滴的堆积, 细胞浆染色为红色。模型组出现肝细胞胞浆内散在分布的红染, 有脂滴堆积, 且脂滴数目较假手术组增多。而经过逍遥散干预后, 药物组肝细胞的胞浆内红色亮度减弱, 肝内脂滴数目减少, 且逍遥散高剂量组脂肪染色进一步减少。见图 3。

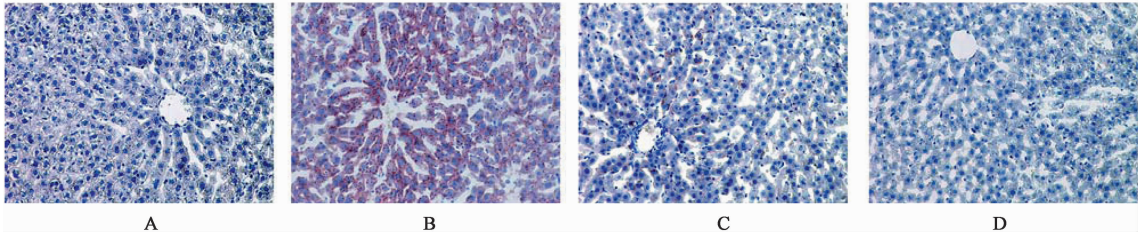


图 3 逍遥散对 OVX 模型大鼠肝细胞脂肪变性的作用 (油红 O, ×200)

Fig. 3 Effect of XYX on hepatocyte steatosis in OVX rats (oil red O, ×200)

3.5 对 OVX 模型大鼠肝脏内促炎因子和 ERβ mRNA 表达 与假手术组比较,OVX 模型组 IL-1β, IL-6 mRNA 水平明显增高 ($P < 0.05$);与模型组比较,低剂量逍遥散可明显降低 IL-6 mRNA 水平 ($P < 0.05$),高剂量逍遥散均可显著降低 OVX 模型组的 IL-1β, IL-6 mRNA 水平 ($P < 0.05, P <$

0.01),TNF-α 的表达在各组之间的差异没有统计学意义。与假手术组比较,OVX 模型组的 ERβ 相对表达量有降低的趋势,但差异无显著性明显升高;与模型组比较,逍遥散低、高剂量可明显升高 OVX 模型组 ERβ mRNA 水平 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3。

表 3 逍遥散对 OVX 模型大鼠肝脏促炎因子和 ERβ 的 mRNA 相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of XYX on relative mRNA expression levels of hepatic pro-inflammatory factor and ERβ in OVX rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-1β	IL-6	TNF-α	ERβ
OVX 模型	-	3.495 ± 1.028 ¹⁾	1.452 ± 0.157 ¹⁾	0.842 ± 0.259	0.604 ± 0.095
逍遥散	3	1.605 ± 0.876	0.873 ± 0.183 ³⁾	1.110 ± 0.498	1.467 ± 0.505 ³⁾
	9	0.903 ± 0.246 ³⁾	0.644 ± 0.171 ⁴⁾	1.179 ± 0.146	2.242 ± 0.254 ⁴⁾

注:设假手术组各指标 mRNA 相对表达量为 1.000。

4 讨论

绝经后女性的肥胖属于中医“肥满”“肥人”“胖人”等范畴。《黄帝内经》对其治疗指出“必先别其三形,血之多少,气之清浊,而后调之,治无常经。”《黄帝内经·素问·奇病论》曰:“肥者令人内热……治之以兰,除陈气也。”主张除了对肥胖类型、气血多少清浊的鉴别外,还可以通过芳香清化之品来治疗肥胖及其并发症。中医秉持着五脏藏神的理念,认为“怒伤肝”“思伤脾”,绝经后女性常因情志郁结、饮食不调,伤及脾胃,脾失健运,湿浊内停,气机失于疏泄,肝气郁结,肝胆疏泄失常而发为肥胖。临证常伴见头晕、耳鸣、心悸、失眠、烘热汗出、胸胁作胀、精神抑郁、烦躁易怒、善太息等症^[6]。逍遥散作为经典方剂,临床上对各科疾病肝郁脾虚证的治疗效果显著^[13-14],其应用范围不局限于某一种疾病,而是疾病发展过程中所出现的症状,即逍遥散方证^[15]。通过分析近 10 年由知网(CNKI)数据库收录的关于使用逍遥散的临床报道,得出逍遥散临床治疗常见症状为面色无华或晦暗、倦怠乏力、头晕、头痛、烦热、叹息、抑郁、烦躁、懒言并伴有消化道症状,舌淡苔薄,脉弦或沉细^[16]。与绝经后肥胖

妇女的症状基本相符,且方中柴胡疏肝解郁,臣以当归、白芍养血敛阴、柔肝缓急,佐以白术、茯苓、甘草健脾益气,更加少许薄荷、生姜作为芳香清化之品来疏散郁遏之气,与《黄帝内经》对肥胖的治则相符。

OVX 后的去势雌性大鼠通常用于模拟绝经后女性的状态,且存在血清雌二醇水平降低^[17]。既往研究已经证明 OVX 模型大鼠更易肥胖且会引发代谢综合征,如血脂、血糖异常及非酒精性脂肪肝等^[18-19],且与绝经后女性状态基本一致。本研究中 OVX 模型组较对照组大鼠体质量变化明显增加,出现血脂、肝功能异常,病理显示肝细胞结构紊乱,肝脂肪变性,伴随肝内部分促炎症因子转录水平增加,这些与之前的研究 OVX 模型大鼠出现的肥胖,血脂异常及非酒精性脂肪肝基本一致^[18]。发现逍遥散干预 6 周后改善了去势雌性大鼠的血清和肝脏内脂肪代谢和肝内炎症过程,说明逍遥散可改善 OVX 绝经状态大鼠的脂质代谢、修复肝细胞结构和功能。研究发现逍遥散可增加大鼠子宫质量,促进间情期大鼠动情^[20];逍遥散可提高 OVX 大鼠动情周期、增加血清雌二醇及子宫质量,减轻子宫萎缩^[21],均阐明逍遥散有雌激素样作用。逍遥散中槲皮素、山柰

酚、异鼠李素 3 种黄酮类成分,均有类雌激素作用^[22]。但是逍遥散究竟参与了调节内源性雌激素的分泌与代谢,还是直接作用于 ER 等途径,尚需进一步研究。

雌激素通过与 ER α 和 ER β 结合而在脂肪组织的分布中起着关键作用。研究发现,即使不激活 ER α ,单纯使用 ER β 选择性激活剂 Diarylpropionitrile (DPN) 可改善与肥胖相关的代谢疾病^[23]。使用 4-[2-(3,5-dimethylisoxazol-4-yl)-1H-indol-3-yl]phenol (DIP) 选择性激活 ER β 可改善非 OVX 雌性大鼠非酒精性脂肪肝的脂肪变性^[24]。ER β 选择性配体 (β -LGNDs) 可以通过增加能量消耗,减少脂肪储存,提高肌肉量来减轻雄性大鼠和 OVX 大鼠的肥胖^[25]。另一种 ER β 选择性配体 β -LGND2 还可以间接地调节孕烷 X 受体和胆汁酸受体两个途径来抑制大鼠的脂肪累积和脂肪性肝炎^[26]。因此 ER β 在调节脂肪组织和脂质/能量代谢中有重要作用。另外,通过微阵列分析发现 ER β 选择性激动剂可以抑制促炎因子如 IL-6, IL-8, TNF- α 的转录基因^[27],从而缓解相关炎症性疾病。总之,选择性激活 ER β 可以减少脂质合成、促进外周组织如内脏脂肪组织的脂类动员,提高产热,进而对机体的代谢产生一系列有益的作用^[24,28]。本研究发现逍遥散可调高 OVX 模型大鼠肝内 ER β mRNA 转录,且显著降低 OVX 模型组的促炎因子 IL-1 β 和 IL-6 转录水平,改善血清和肝脏的脂质代谢。因植物性雌激素对 ER β 的亲合力高于 ER α ^[29],因此推测逍遥散调节脂肪代谢可能的作用机制之一是通过激活肝内 ER β 发挥效应的,但是逍遥散通过何种信号通路活化 ER 介导的转录尚待挖掘,将是本课题组下一步工作的重点。

综上所述,逍遥散可以减轻 OVX 去势大鼠的体质质量,纠正其脂质代谢的紊乱,改善脂肪性肝炎,其机制可能与其拟雌激素作用,选择性激活肝内 ER β 有关。但逍遥散的成分复杂,可能通过更多途径、靶点以及系统的参与发挥作用,因此还需要更多的研究来探讨其机制。

[参考文献]

[1] SHI H, Clegg D J. Sex differences in the regulation of body weight[J]. *Physiol Behav*, 2009, 97(2): 199-204.
[2] Geer E B, SHEN W. Gender differences in insulin resistance, body composition, and energy balance[J]. *Gend Med*, 2009, 6(S1): 60-75.
[3] Lovejoy J C, Champagne C M, De Jonge L, et al. Increased visceral fat and decreased energy expenditure

during the menopausal transition[J]. *Int J Obes*, 2008, 32(6): 949.
[4] Ley C J, Lees B, Stevenson J C. Sex-and menopause-associated changes in body-fat distribution[J]. *Am J Clin Nutr*, 1992, 55(5): 950-954.
[5] Oztekin E, Tiftik A M, Baltaci A K, et al. Lipid peroxidation in liver tissue of ovariectomized and pinealectomized rats: effect of estradiol and progesterone supplementation[J]. *Cell Biochem Funct*, 2007, 25(4): 401-405.
[6] 陈家旭, 万霞, 胡立胜. 围绝经期综合征辨证分型的文献研究[J]. *中华中医药杂志*, 2006, 21(11): 649-651.
[7] 石博宇, 饶志粒, 罗杰, 等. 逍遥散对 LPS 所致海马神经元细胞损伤的保护作用及机制研究[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(4): 781-786.
[8] 岳利峰, 刘佳, 王文慧, 等. 基于汉密尔顿焦虑抑郁量表评价加味逍遥散两种剂型调节围绝经期情绪障碍的疗效差异[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(4): 1796-1798.
[9] 陈峰. 逍遥散加减治疗肝郁脾虚型非酒精性脂肪性肝炎 33 例[J]. *福建中医药*, 2010, 41(3): 43.
[10] 刘杨, 李明磊, 贾飞, 等. 逍遥散对非酒精性脂肪性肝炎肝郁脾虚证大鼠 TLR-4/TRIF 信号转导通路的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(17): 108-113.
[11] 关伟, 李若瑜, 郭继龙, 等. 基于¹H-NMR 代谢组学技术分析逍遥丸干预非酒精性脂肪性肝郁脾虚证大鼠的作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(19): 99-105.
[12] 蔡熙, 黄晖, 王岚. 围绝经期动物模型的研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2007, 13(10): 71-72.
[13] 秦雪梅, 高晓霞. 从逍遥散证与逍遥散抗应激研究看中医药现代化的思路[J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2010, 12(4): 521-525.
[14] 吴丹, 高耀, 邢婕, 等. 逍遥散治疗肝郁脾虚型抑郁症的药理作用机制研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(8): 187-193.
[15] 黄煌. 关于药证的思考[J]. *南京中医药大学学报*, 1997, 39(1): 9-11.
[16] 刘中兴, 王岚, 阎博华, 等. 逍遥散临床应用特点及疗效分析[J]. *光明中医*, 2015, 30(11): 2311-2312.
[17] LIU L, YAN J, GE F, et al. Saikosaponin D improves fear memory deficits in ovariectomized rats via the action of estrogen receptor α in the hippocampus[J]. *Mol Med Report*, 2019(20): 332-340.
[18] Kamada Y, Kiso S, Yoshida Y, et al. Estrogen deficiency worsens steatohepatitis in mice fed high-fat and high-

- cholesterol diet [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2011, 301(6): G1031-G1043.
- [19] Brunt E M. Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology [J]. *Semin Liver Dis*, 2001, 21(1): 3-16.
- [20] 訾晓梅, 刘青云. 逍遥口服液药效学研究 [J]. *安徽中医学院学报*, 2000, 19(6): 39-41.
- [21] 刘海洋, 杨新顺, 张宁, 等. 逍遥散对去卵巢模型小鼠雌激素样作用的实验研究 [J]. *中成药*, 2014, 36(10): 2193-2195.
- [22] CHEN J H, ZHANG N, WANG Y Q, et al. Estrogenic effects of flavonoid components in Xiaoyao powder [J]. *Genet Mol Res*, 2016, 15(1): 1-9.
- [23] Nilsson S, Gustafsson J. Estrogen receptors: therapies targeted to receptor subtypes [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2011, 89(1): 44-55.
- [24] González-Granillo M, Savva C, LI X, et al. ER β activation in obesity improves whole body metabolism via adipose tissue function and enhanced mitochondria biogenesis [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2019, 479(5): 147-158.
- [25] Yepuru M, Eswaraka J, Kearbey J D, et al. Estrogen receptor- β -selective ligands alleviate high-fat diet-and ovariectomy-induced obesity in mice [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(41): 31292-31303.
- [26] Ponnusamy S, Tran Q T, Harvey I, et al. Pharmacologic activation of estrogen receptor β increases mitochondrial uncton, energy expenditure, and brown adipose tissue [J]. *FASEB J*, 2016, 31(1): 266-281.
- [27] Cvorovic A, Tatamer D, Tee M K, et al. Selective estrogen receptor- β agonists repress transcription of proinflammatory genes [J]. *J Immunol*, 2008, 180(1): 630-636.
- [28] Chondronikola M, Volpi E, Børsheim E, et al. Brown adipose tissue activation is linked to distinct systemic effects on lipid metabolism in humans [J]. *Cell Metab*, 2016, 23(6): 1200-1206.
- [29] 朱迪娜, 王磊, 王思彤, 等. 植物雌激素的研究进展 [J]. *中草药*, 2012, 43(7): 1422-1429.

[责任编辑 周冰冰]