

# 温运清利法对非酒精性脂肪性肝炎大鼠肝组织 DAG-PKC $\epsilon$ 信号通路的作用研究

毛堂友 高康丽 赵唯含 王允亮 郭一 谢添弘 陈晨 谭祥 韩亚飞 李军祥

**【摘要】 目的** 探讨温运清利法对非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis,NASH)大鼠肝组织甘油二酯(diacylglycerol,DAG)/蛋白激酶 C $\epsilon$ (protein kinase C $\epsilon$ ,PKC $\epsilon$ )信号通路的影响。**方法** 高脂饮食饲养 SD 大鼠 8 周制备 NASH 模型,造模成功后,将大鼠随机分为模型组、苓桂术甘汤组、茵陈蒿汤组、合方组(苓桂术等与茵陈蒿汤)、罗格列酮组,共 5 组,每组 10 只;另有空白组 10 只。药物治疗 4 周后,运用自动生化分析仪检测血清生化指标,HE 染色、油红 O 染色观察肝组织病理,ELISA 法检测肝组织 DAG,RT-PCR 检测 PKC $\epsilon$  mRNA、TNF- $\alpha$  mRNA,Western blot 检测 PKC $\epsilon$  和 TNF- $\alpha$  蛋白的表达。**结果** (1)各给药组大鼠一般状况、肝组织脂肪变性和炎症反应程度、血清生化指标等均较模型组有一定的减轻;(2)苓桂术甘汤、合方组、罗格列酮组大鼠肝组织 DAG 较模型组明显降低( $P<0.05$ , $P<0.01$ );(3)各治疗组大鼠肝组织 PKC $\epsilon$  mRNA 和蛋白含量均显著降低( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),茵陈蒿汤组、合方组及罗格列酮组大鼠肝组织 TNF- $\alpha$  mRNA 和蛋白含量显著降低( $P<0.05$ )。**结论** 温运清利法可能是通过下调肝组织 DAG,抑制 PKC $\epsilon$  表达,降低 TNF- $\alpha$  水平,从而对肝内脂质代谢、胰岛素抵抗、炎症损伤起到了调节作用,DAG/PKC $\epsilon$  通路有可能成为治疗 NASH 的新靶点。

**【关键词】** 温运清利法; 非酒精性脂肪性肝炎; DAG-PKC $\epsilon$  信号通路; 作用研究

**【中图分类号】** R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2016.08.002

基金项目:高等学校博士学科点专项科研基金(20130013110007);北京中医药大学自主选题项目(2015-JYB-XS172)

作者单位:100078 北京中医药大学东方医院脾胃肝胆科[毛堂友(博士研究生)、高康丽(硕士研究生)、赵唯含(博士研究生)、王允亮、郭一(博士研究生)、谢添弘(博士研究生)、陈晨(硕士研究生)、谭祥(硕士研究生)、韩亚飞(硕士研究生)、李军祥]

作者简介:毛堂友(1989-),2014 级在读博士研究生。研究方向:中医药防治胃肠疾病的研究。E-mail:mao-tangyouqun@126.com

通讯作者:李军祥(1964-),博士,主任医师,博士生导师。研究方向:中医药防治慢性肝胆和胃肠道疾病。E-mail:lijunxiang1226@163.com

**Experimental study of “Wenyun Qingli” method on DAG-PKC $\epsilon$  signal pathway in liver tissue of NASH rats** MAO Tang-you, GAO Kang-li, ZHAO Wei-han, et al. Dongfang Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China

Corresponding author: Li Jun-xiang; E-mail: lijunxiang1226@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of Wenyun Qingli method on DAG-PKC $\epsilon$  signal pathway in NASH rats. **Methods** High fat diet was used to induce NASH model on SD rats for 8 weeks. After 4 weeks of treatment, the automatic biochemical analyzer was used to measure the serum liver function (AST, ALT), blood lipid (TC, LDL, HDL, TG) level. HE staining and oil-red O staining method was used to observe the pathological changes of liver tissue, ELISA was used to detect the DAG of liver tissue, RT-PCR was used to detect the PKC $\epsilon$  mRNA and TNF- $\alpha$  mRNA, Western blot was used to observe the expression of PKC $\epsilon$  and TNF- $\alpha$ . **Results** (1) The mental state; general condition, liver index, inflammation and serum biochemical indices of treated groups were decreased compared with the model group; (2) The DAG levels of Linggui Zhugan decoction group, combination group, rosiglitazone group were decreased significantly compared with the model group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); (3) The PKC mRNA and protein content of treated groups were decreased significantly compared with the model group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), TNF- $\alpha$  mRNA and protein content in liver tissue of Yinchenhao decoction group, combination group, rosiglitazone group were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Wenyun Qingli method plays a role in protecting and treating NASH by down-regulating hepatic DAG and PKC expression, decreasing the levels of TNF alpha. DAG/ PKC $\epsilon$  pathway may be a new target for treating NASH.

**【Key words】** Wenyun Qingli method; NASH; DAG-PKC $\epsilon$  signal pathway; Experimental study

目前,非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis,NASH)的发病机制尚不清楚,较为普遍接受的是“二次打击”学说,初次打击的核心主要是胰岛素抵抗(insulin resistance,IR)及脂质代谢紊乱,及在此基础上引发的第二次打击——氧化应激和脂质过氧化反应,而甘油二酯(diacylglycerol,DAG)/蛋白激酶 C $\epsilon$ (protein kinase C $\epsilon$ ,PKC $\epsilon$ )信号通路参与这个过程。本课题组前期研究发现<sup>[1-3]</sup>,苓桂术甘汤可调节肝内脂质代谢和改善 IR,减轻肝脏炎性损伤;而茵陈蒿汤亦可改善脂代谢紊乱及高胰岛素血症状态,抑制脂质过氧化反应,但二者合方能否增强治疗效果,尚未可知。因此,本研究以 DAG-PKC $\epsilon$  信号通路为切入点,探讨进一步苓桂术甘汤、茵陈蒿汤及其合方治疗 NASH 的作用机制。

## 1 材料

### 1.1 动物

健康 SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只,体质量(120 $\pm$ 20)g,购自斯贝福(北京)实验动物科技有限公司合格证号:SCXK(京)2011-0004,常规饲养于中国中医科学院中药研究所 SPF 级动物房。高脂饲料(88%基础饲料+10%猪油+2%胆固醇)购自北京科澳协力饲料有限公司。

### 1.2 药物

苓桂术甘汤颗粒(茯苓 12 g、桂枝 9 g、白术 6 g、炙甘草 6 g);茵陈蒿汤颗粒(茵陈蒿 18 g、栀子 9 g、大黄 6 g);茵陈蒿与苓桂术甘汤合方颗粒(茯苓 12 g、桂枝 9 g、白术 6 g、炙甘草 6 g、茵陈蒿 18 g、栀子 9 g、大黄 6 g),均购自北京中医药大学东方医院配方颗粒药房;阳性药物罗格列酮片,购自成都恒瑞制药有限公司(批号:H20051706)。

### 1.3 试剂与仪器

总胆固醇(total cholest,TC)试剂盒、甘油三酯(triglyceride,TG)试剂盒、高密度脂蛋白(high density lipid-cholesterol,HDL-C)试剂盒、低密度脂蛋白(low density lipoprotein-cholesterol,LDL-C)试剂盒,均购自中生北控生物科技股份有限公司。油红 O 染色及苏木精-伊红染色相关试剂(Sigma,USA)。TRNzol 总 RNA 提取试剂(天根生化科技有限公司),BCA 蛋白定量试剂盒、2 mg/mL BSA 标准品、考马斯亮蓝染色液等均购自北京赛诺博生物技术中心。PKC- $\epsilon$  抗体(CST,2683);TNF- $\alpha$  抗体(abcam,ab6671)。7160 全自动生化仪(日本日立公司);BT224S 电子天平(德国 Sartorius 公司);QL-902 涡旋振荡仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);HB-202 恒温水浴箱(北京中西远大);UCT

型超薄切片机(德国莱卡公司);MR23i 台式高速低温离心机(美国 Thermo 公司);Nikon50I 光学显微镜(日本 Nikon 公司);美国 Bio-Rad 稳压稳流电泳仪;NANODROP2000 分光光度计(Thermo scientific 公司)等。

#### 1.4 分组、造模及标本采集

造模方式同前期研究<sup>[46]</sup>,将 60 只大鼠适应性喂养 7 天后,空白组(10 只)给予普通饲料,其余大鼠(50 只)给予高脂饲料,自由摄食、饮水。造模 8 周后,高脂饲料饲养组依据体重随机分为模型组、苓桂术甘汤组、茵陈蒿汤组、合方组(苓桂术甘与茵陈蒿汤)、罗格列酮组。各给药组分别以苓桂术甘汤、茵陈蒿汤、苓桂术甘与茵陈蒿汤合方、罗格列酮混悬液,按 1 mL/100g 大鼠等效剂量比例灌胃治疗;模型组和正常对照组按 1 mL/100g 鼠重给予去离子水灌胃,均为每天上午灌胃 1 次,治疗 4 周。每天观察动物进食、饮水、行为、精神状态、毛发及二便等情况,每周动物称体重 1 次。末次给药后,禁食禁水 24 小时,10% 水合氯醛腹腔注射麻醉,抽取大鼠腹主动脉血,分离血清-80℃ 冰箱保存;在肝脏最大叶边缘处取 9 小块肝脏组织(1×1 cm),1 份用 10% 中性福尔马林固定液固定,制作石蜡切片;一份用 OCT 固定液固定,制作冰冻切片;剩下的放置于冻存管,-80℃ 冰箱冻存备用。

#### 1.5 血清指标检测

血清(ALT、AST)、血脂(TC、TG、HDL、LDL)均采用自动生化分析仪检测。

#### 1.6 肝组织病理检测

常规方法进行石蜡包埋切片(4 μm),HE 染色;冰冻切片(10 μm)行油红 O 染色,并在光镜下观察肝脂肪变性程度、炎症活动度。

#### 1.7 肝组织 PKCε mRNA、TNF-α mRNA 的检测

肝组织样本中提取总 RNA 后,计算其纯度和浓度。逆转录后进行 PCR 扩增,PKCε 上游引物 5'-AAGGGATTCTGAATGGCGTGACA-3',下游引物 5'-CACTGAGGGGCGTACTCCAAC-3',扩增片段长度 98 bp;TNF-α 上游引物 5'-GGGCAGGTCTACTTTGGAGTCATTG-3',下游引物 5'-GGGCTCTGAGGAGTAGACGATAAAG-3',扩增片段长度 128 bp;内参 GAPDH 上游引物 5'-TGGAGTCTACTGGCGTCTT-3',下游引物 5'-TGTCATATTTCTCGTGGTTCA-3',扩增片段长度 138bp。PCR 产物经电泳后,采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法进行数据的相对定量分析,计算 PKCε、TNF-α 值。

#### 1.8 肝组织 PKCε、TNF-α 蛋白的检测

将肝组织裂解后,离心取上清液,置于 BSA 标准液中,检测样品蛋白含量。调整浓度后,进行电泳分离,分别加入一抗、二抗,漂洗后凝胶图像分析,得出数值。

#### 1.9 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,计量资料采用均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,本实验中各组大鼠体重及肝指数、血清血脂、血清肝功能及 DAG 的数据均符合正态分布,且方差齐,因此采用单因素方差分析中的两两比较 LSD 法;PKCε mRNA 和蛋白、TNF-α mRNA 和蛋白的数据方差不齐,因此采用 Games-Howell 法进行两两比较,以  $P<0.05$  为差异存在统计学意义的界限; $P<0.01$  为具有显著差异。

## 2 结果

### 2.1 一般情况

模型组大鼠较空白组大鼠精神差、毛发凌乱无光泽、行动笨拙、活动减弱、精神萎靡、体质量明显减轻。各给药组大鼠精神状态、毛发光泽、活动行为以及体质量增长较模型组相比,均有不同程度的好转。见表 1。

表 1 各组大鼠体重及肝指数比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	体质量(g)	肝指数(%)
空白组	10	520.14±43.27	2.39±0.28
模型组	10	712.38±53.19 <sup>a</sup>	4.19±0.17 <sup>a</sup>
苓桂术甘汤组	10	650.24±48.50 <sup>b</sup>	3.26±0.20 <sup>b</sup>
茵陈蒿汤组	10	641.93±45.78 <sup>b</sup>	3.11±0.24 <sup>b</sup>
合方组	10	618.37±50.74 <sup>b</sup>	2.93±0.18 <sup>b</sup>
罗格列酮组	10	629.85±46.85 <sup>b</sup>	3.09±0.16 <sup>b</sup>

注:与空白组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ 。

### 2.2 血清指标

2.2.1 对血清肝功能的影响 与空白组比较,模型组大鼠血清 ALT、AST 含量均显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,苓桂术甘汤组、合方组、罗格列酮组大鼠血清 ALT、AST 明显降低( $P<0.05$ ),茵陈蒿汤组大鼠血清 ALT 明显降低( $P<0.01$ ),血清 AST 的含量无明显改变( $P>0.05$ )。见表 2。

2.2.2 对血清血脂的影响 与空白组比较,模型组大鼠血清 TC、TG、LDL 含量均显著升高( $P<0.05$ ),HDL 含量显著降低( $P<0.05$ );与模型组比较,苓桂术甘汤组、茵陈蒿汤组、罗格列酮 TG 明显降低( $P<0.05$ ),TC、LDL、HDL 含量无明显变化( $P>0.05$ );

合方组 TC、TG、LDL 明显降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), HDL 含量无明显变化 ( $P>0.05$ )。见表 3。

表 2 各组大鼠血清肝功能的含量比较 (U/L,  $\bar{x}\pm s$ )

组别	<i>n</i>	ALT	AST
空白组	10	16.95±8.49	82.41±49.65
模型组	10	41.78±14.04 <sup>b</sup>	172.09±47.30 <sup>a</sup>
苓桂术甘汤组	10	21.52±6.86 <sup>d</sup>	108.25±50.51 <sup>c</sup>
茵陈蒿汤组	10	25.49±12.90 <sup>d</sup>	165.41±88.46
合方组	10	18.06±4.12 <sup>d</sup>	76.17±27.20 <sup>c</sup>
罗格列酮组	10	22.61±9.73 <sup>d</sup>	104.09±38.43 <sup>c</sup>

注:与空白组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ,<sup>b</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ ,<sup>d</sup> $P<0.01$ 。

2.3 肝组织病理学检测

HE 染色显示:空白组大鼠肝组织着色均匀,肝小叶结构正常,肝索排列整齐呈放射状(图 1A);模型组大鼠存在明显的肝细胞脂肪变性,肝小叶界限不清,肝索结构紊乱,肝组织可见弥漫性、混合性的空泡及气球样改变,汇管区和小叶内可见大量中性粒细胞浸润呈灶状积聚(图 1B);各治疗组病变较

模型组均有不同程度的减轻,肝细胞形态和小叶结构有不同程度恢复,胞内脂滴及炎性细胞浸润减少。(图 1C、D、E、F)。

油红 O 染色显示:空白组肝组织不着色(图 2A);模型组大鼠肝组织可见大量脂滴(图 2B);各治疗组肝组织中脂滴明显减少,呈不均匀分布(图 2C、D、E、F)。

2.4 对肝组织 DAG 的影响

与正常组比较,模型组大鼠肝组织 DAG 含量显著升高 ( $P<0.05$ );与模型组比较,苓桂术甘汤、合方组、罗格列酮明显降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),茵陈蒿汤组降低,但差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ),见表 4。

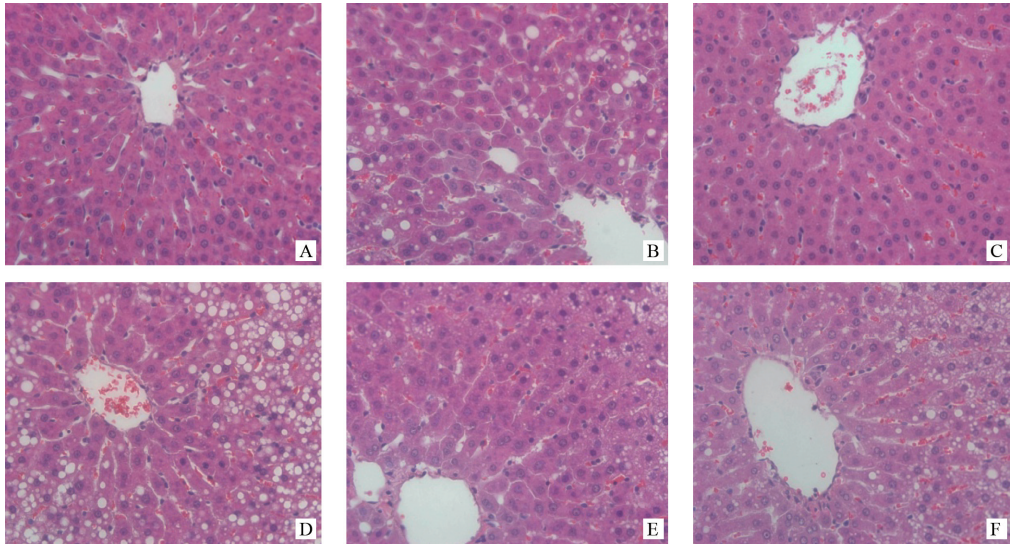
2.5 对肝组织 PKCε mRNA 和蛋白表达的影响

与正常组比较,模型组大鼠肝组织 PKCε mRNA 和蛋白均显著升高 ( $P<0.05$ ),茵陈蒿汤组、合方组及罗格列酮组的 PKCε mRNA 显著升高 ( $P<0.05$ );与模型组比较,各治疗组大鼠肝组织 PKCε mRNA 和蛋白含量均显著降低 ( $P<0.05$ ),见表 5、图 3。

表 3 各组大鼠血清血脂的含量比较 (mmol/L,  $\bar{x}\pm s$ )

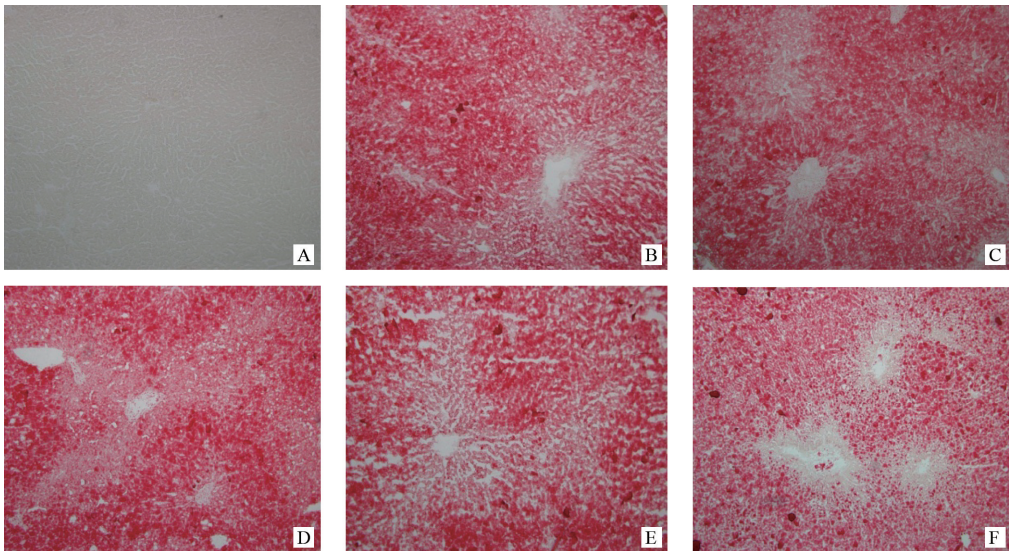
组别	<i>n</i>	TC	TG	LDL	HDL
空白组	10	0.68±0.63	0.24±0.19	0.34±0.23	0.60±0.36
模型组	10	1.28±0.46 <sup>b</sup>	0.42±0.08 <sup>a</sup>	0.65±0.29 <sup>a</sup>	0.38±0.05 <sup>a</sup>
苓桂术甘汤组	10	0.86±0.52	0.28±0.13 <sup>c</sup>	0.48±0.35	0.33±0.14 <sup>b</sup>
茵陈蒿汤组	10	1.30±0.69	0.30±0.11 <sup>c</sup>	0.59±0.29	0.50±0.22
合方组	10	0.60±0.32 <sup>d</sup>	0.26±0.85 <sup>c</sup>	0.35±0.11 <sup>c</sup>	0.29±0.13
罗格列酮组	10	0.97±0.41	0.28±0.09 <sup>c</sup>	0.46±0.20	0.27±0.76

注:与空白组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ,<sup>b</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ ,<sup>d</sup> $P<0.01$ 。



注: A 正常组;B 模型组;C 茵陈蒿汤组;D 苓桂术甘汤组;E 组合方组;F 罗格列酮组

图 1 温运清利法对 12 周时大鼠肝组织石蜡切片苏木精-伊红染色的影响 (×400)



注：A 正常组；B 模型组；C 茵陈蒿汤组；D 苓桂术甘汤组；E 组合方组；F 罗格列酮组

图 2 温运清利法对 12 周时大鼠肝组织石蜡切片油红 O 染色的影响(×100)

表 4 各组大鼠肝组织 DAG 的比较 (mmol/L,  $\bar{x}\pm s$ )

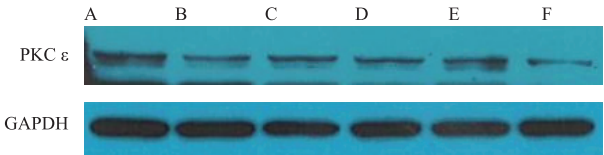
组别	n	DAG
空白组	10	1.81±0.28
模型组	10	2.66±0.23 <sup>a</sup>
苓桂术甘汤组	10	1.80±0.25 <sup>b</sup>
茵陈蒿汤组	10	1.90±0.22
合方组	10	1.20±0.20 <sup>b</sup>
罗格列酮组	10	1.41±0.31 <sup>c</sup>

注：与空白组比较，<sup>a</sup> $P<0.05$ ；与模型组比较，<sup>b</sup> $P<0.05$ ，<sup>c</sup> $P<0.05$ 。

表 5 对肝组织 PKCε mRNA 和蛋白表达的影响 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	PKCε mRNA	PKCε 蛋白
空白组	10	1.27±0.26	0.39±0.01
模型组	10	2.47±0.38 <sup>a</sup>	0.51±0.01 <sup>a</sup>
苓桂术甘汤组	10	1.60±0.97 <sup>b</sup>	0.33±0.01 <sup>c</sup>
茵陈蒿汤组	10	1.64±0.00 <sup>b</sup>	0.45±0.01 <sup>b</sup>
合方组	10	0.72±0.35 <sup>c</sup>	0.26±0.01 <sup>c</sup>
罗格列酮组	10	0.51±0.13 <sup>c</sup>	0.18±0.01 <sup>c</sup>

注：与空白组比较，<sup>a</sup> $P<0.01$ ；与模型组比较，<sup>b</sup> $P<0.05$ ，<sup>c</sup> $P<0.01$ 。



注：A 正常组；B 模型组；C 茵陈蒿汤组；D 苓桂术甘汤组；E 组合方组；F 罗格列酮组

图 3 大鼠肝组织 PKCε 的 Western blot 的表达

2.5 对肝组织 TNF-α mRNA 和蛋白表达的影响

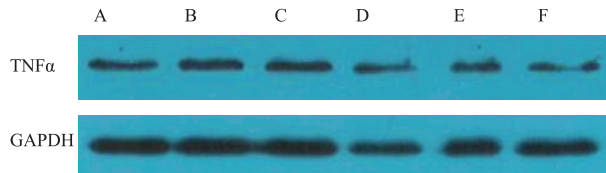
与正常组比较，模型组大鼠肝组织 TNF-α mRNA 和蛋白均显著升高 ( $P<0.01$ )；与模型组比较，茵陈蒿汤组、合方组及罗格列酮组大鼠肝组织

TNF-α mRNA 和蛋白含量显著降低 ( $P<0.05$ )，苓桂术甘汤组大鼠也降低，但差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )，见表 6、图 4。

表 6 对肝组织 TNF-α mRNA 和蛋白表达的影响 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	TNFα mRNA	TNFα 蛋白
空白组	10	0.85±0.12	1.16±0.12
模型组	10	3.30±0.84 <sup>a</sup>	2.19±0.24 <sup>a</sup>
苓桂术甘汤组	10	2.10±1.00	1.87±0.15
茵陈蒿汤组	10	0.94±0.27 <sup>b</sup>	1.58±0.21 <sup>b</sup>
合方组	10	0.62±0.32 <sup>c</sup>	1.53±0.14 <sup>b</sup>
罗格列酮组	10	1.29±0.18 <sup>b</sup>	1.66±0.19 <sup>b</sup>

注：与空白组比较，<sup>a</sup> $P<0.01$ ；与模型组比较，<sup>b</sup> $P<0.05$ ，<sup>c</sup> $P<0.01$ 。



注：A 正常组；B 模型组；C 茵陈蒿汤组；D 苓桂术甘汤组；E 组合方组；F 罗格列酮组

图 4 大鼠肝组织 TNF-α 的 Western blot 的表达

3 讨论

胰岛素抵抗是 NASH 发病的重要机制之一<sup>[7]</sup>，几乎所有的 NASH 患者都存在周围组织和肝脏的 IR。高脂饮食状态下，脂肪在肝脏大量蓄积，致使其对胰岛素的敏感性下降，从而发生 IR，而 IR 又可反过来增加脂肪在肝细胞内蓄积，形成恶性循环。持续的脂肪蓄积会诱发炎症、氧化应激及脂质过氧化，从而造成肝脏的炎性损伤。因此，改善 IR 及炎

症反应是防治 NASH 的关键。

DAG 是甘油三酯和磷脂合成的中间物质,与 NASH 密切相关<sup>[8]</sup>。DAG 含量的升高是 NASH 发生 IR 的一个重要标志,其与胰岛素敏感性的相关度达到 64%,并与胰岛素抵抗指数呈显著正相关<sup>[8]</sup>。PKC $\epsilon$  是 DAG 的靶蛋白,其被激活后,可下调胰岛素受体,抑制胰岛素受体底物的酪氨酸磷酸化<sup>[9]</sup>,从而引起胰岛素生物效应的减弱,影响胰岛素的信号传导,促进 IR 的发生。因此,DAG/PKC $\epsilon$  信号通路的异常可引起脂质代谢紊乱和 IR,是形成 NASH 的发病基础<sup>[8]</sup>。

DAG 在肝细胞内大量合成并蓄积后,会引发肝细胞的脂肪变性,造成持续的肝脏损伤,从而引起 TNF- $\alpha$  的过度分泌,其一方面通过降低胰岛素受体底物的酪氨酸磷酸化来加重 IR,另一方面同时又直接损伤肝细胞,增加肝内 ROS 的产生,增强氧化应激及脂质过氧化反应,诱导肝细胞的炎症、坏死<sup>[10]</sup>,促进 NASH 的发生发展。

本次实验以高脂饲料诱导大鼠 NASH 模型,8 周后可见大鼠体重及肝指数、血清生化指标等均明显升高,肝脏组织病理可见大量脂肪空泡及气球样变,证明模型构建成功。研究结果显示,模型组大鼠肝组织 DAG、PKC $\epsilon$ 、TNF- $\alpha$  mRNA 和蛋白均较正常组升高,提示 DAG-PKC $\epsilon$  通路参与了 NASH 的发生发展。而苓桂术甘汤组及含有苓桂术甘汤成分的合方组能显著降低肝组织 DAG 的含量,同时下调 PKC $\epsilon$  mRNA 和蛋白的表达水平较茵陈蒿汤组明显,推测苓桂术甘汤在针对第一次打击的脂质代谢和 IR 发挥着更为重要的作用;而茵陈蒿汤组及含有茵陈蒿汤组能够显著下调 TNF- $\alpha$  mRNA 和蛋白的表达,推测茵陈蒿汤可能更针对第二次打击,而合方组的疗效均优于单用苓桂术甘汤组及茵陈蒿汤组。

本课题组认为,“痰浊内阻,湿热瘀结,肝体用失调”是 NASH 中医病机的关键,结合现代医学“二次打击学说”,痰浊内阻,阻滞气机,壅塞肝络,肝体用失调,病情较轻,是造成脂类物质在肝细胞内堆积,形成对肝脏“第一次打击”的发病基础;痰浊内阻,久郁化热,湿热瘀结,损伤肝络,肝体用失调,病情渐重,是致使脂肪氧化增强,进而出现氧化应激和脂质过氧化的肝脏“第二次打击”的病理机制。因此创立温运清利法治疗 NASH,以苓桂术甘汤着眼中焦,茵陈蒿汤擅入肝胆,两方合用,兼顾肝脾,既可

运脾温化痰浊,又可清利肝胆郁积之湿热,温运清利并用,增强疗效。本研究的结果也证实,苓桂术甘汤和合方组针对第一次打击的 IR,效果要优于茵陈蒿汤组;针对第二次打击之炎症损伤,茵陈蒿汤组及合方组要优于苓桂术甘汤组,而合方组又要优于单用苓桂术甘汤组及茵陈蒿汤组,由此可推测,苓桂术甘汤与茵陈蒿汤合方可同时针对引起 NASH 发病的二次打击,从而达到治疗 NASH 的目的。

本次研究通过动物实验探讨了 DAG-PKC $\epsilon$  信号通路对 NASH 大鼠的调控机制,对温运清利法治疗 NASH 的作用机制做了初步研究,进一步深化了 NASH 发病机制的认识。但本次研究仅是动物实验,DAG-PKC $\epsilon$  信号通路能否促进人类 NASH 的发生发展,还有待今后进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] 张会存,苏冬梅,刘莹,等. 二陈汤与苓桂术甘汤治疗非酒精性脂肪性肝病炎症损伤的机制研究[J]. 中国中西医结合消化杂志,2015,23(8):525-530.
- [2] 刘莹,张会存,段娜,等. 茵陈蒿汤对高脂饮食诱导大鼠非酒精性脂肪性肝病的药效学观察[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(13):217-220.
- [3] 刘莹,陈晓伟,李健,等. 茵陈蒿汤拆方对非酒精性脂肪性肝病的正交实验研究[J]. 中国中西医结合消化杂志,2013,21(4):182-187.
- [4] 苏冬梅,李健,李军祥,等. 健脾疏肝方对非酒精性脂肪性肝炎大鼠 ADP、TNF- $\alpha$  的影响[J]. 北京中医药大学学报,2011,34(12):826-831.
- [5] 苏冬梅,诸葛丽,李军祥,等. 健脾疏肝方对非酒精性脂肪性肝炎大鼠肝脂代谢分子网络的影响[J]. 世界华人消化杂志,2012,20(2):91-99.
- [6] 王允亮,诸葛丽,李军祥,等. 调肝解毒方对非酒精性脂肪性肝炎大鼠肝组织抗氧化能力的影响[J]. 吉林中医药,2012,32(10):1042-1045.
- [7] Ong JP, Younossi ZM. Epidemiology and natural history of NAFLD and NASH[J]. Clin Liver Dis,2007,11(1):1-16.
- [8] Kumashiro N, Erion DM, Zhang D, et al. Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease[J]. PNAS, 2011,108(39):16381-16385.
- [9] Samuel VT, Liu ZX, Wang A, et al. Inhibition of protein kinase C epsilon prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease[J]. J Clin Invest,2007,117(3):739-745.
- [10] Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance[J]. Science,1993,259(5091):87-91.

(收稿日期:2016-02-26)

(本文编辑:蒲晓阳)