

逍遥丸对代谢相关脂肪性肝炎 CYP2E1 及 FasL/TNF- α 信号通路的影响

张馨月¹, 张玉伟¹, 李梦琪¹, 孟雅楠¹, 李若瑜², 苗宇船¹

摘要 目的 研究逍遥丸治疗代谢相关脂肪性肝炎 (MASH) 大鼠的机制。方法 24 只雄性 SD 大鼠随机分为对照组 (CON 组 $n=8$) 和模型组 ($n=16$)。模型组给予高脂饮食 + 四氯化碳背部皮下注射 + 饥饱失常 + 夹尾 联合刺激 4 周建立 MASH 模型, 再随机分为 MOD 组和逍遥丸组 (XYW 组), 每组各 8 只。XYW 组大鼠给予逍遥丸灌胃, 其他两组给予 0.9% 氯化钠溶液灌胃。给药 4 周后, 对不同组别大鼠的血清生化及氧化应激指标进行检测。HE 染色和油红 O 染色对大鼠肝组织进行病理切片观察。Western blot 对大鼠肝脏中细胞色素 P450 2E1 (CYP2E1)、凋亡相关因子配

体 (FasL)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 的表达进行检测。RT-qPCR 检测肝组织 CYP2E1、FasL、TNF- α 、TGF- β 1 mRNA 相对含量。结果 XYW 组大鼠的一般情况较 MOD 组有显著改善, 肝指数较 MOD 组下降 ($P < 0.01$), 体质量指数较 MOD 组上升 ($P < 0.01$); XYW 组血清中三酰甘油、总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、天冬氨酸氨基转移酶、丙氨酸氨基转移酶、丙二醛、单核细胞趋化蛋白-1、TNF- α 、白细胞介素 (IL)-18 水平较 MOD 组降低 (均 $P < 0.05$), 高密度脂蛋白胆固醇、超氧化物歧化酶、IL-10 水平较 MOD 组升高 (均 $P < 0.05$); 光镜下可观察到 XYW 组肝细胞内脂滴含量较 MOD 组明显减少; XYW 组肝组织 CYP2E1、FasL、TNF- α 、TGF- β 1 的蛋白水平较 MOD 组降低 (均 $P < 0.05$), CYP2E1、FasL、TNF- α 、TGF- β 1 mRNA 相对含量较 MOD 组降低 (均 $P < 0.05$)。结论 逍遥丸通过调节 CYP2E1、FasL、TNF- α 、TGF- β 1 在 MASH 大鼠肝组织中的转录表达, 减少肝脏脂肪蓄积, 从而达到治疗 MASH 的目的。
关键词 逍遥丸; 代谢相关脂肪性肝炎; 细胞色素 P450 2E1; 凋亡相关因子配体; 肿瘤坏死因子- α ; 转化生长因子- β 1
中图分类号 R 575.5; R 589.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)07-1218-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.07.017

代谢相关脂肪性肝炎 (metabolic associated

2024-02-15 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81470190); 山西省卫生健康委项目 (编号: 2019089); 山西中医药大学科技创新能力培育计划“基础研究专项”项目 (编号: 2021PY-JC-04); 山西中医药大学风湿免疫性疾病中西医结合基础学科建设项目 (编号: 2023XKJS-03)

作者单位: ¹山西中医药大学病理教研室, 晋中 030619

²山西中医药大学附属医院脑病科, 太原 030000

作者简介: 张馨月, 女, 硕士研究生;

苗宇船, 女, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: mych65@163.com;

李若瑜, 男, 主治医师, 责任作者, E-mail: liroyu19874056571@163.com

cationic modification to reverse the negative potential on the surface of microspheres. In this study, the morphology, particle size distribution and potential changes of microspheres were detected by scanning electron microscope and dynamic light scattering particle size analyzer. In addition, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was used to identify whether the antigen was loaded into the microsphere preparation. The fluorescent labeled BSA and fluorescent labeled PLGA materials were used to observe the distribution of the antigen after loading by laser confocal microscope. The encapsulation efficiency and drug loading rate of the microsphere preparation were detected by BCA method. **Results** The results of scanning electron microscope and optical microscope showed that the porous microspheres had good pore formation, the particle size was (73.94 ± 0.81) nm, and the Polydispersity index was 0.038 ± 0.004 . Zeta potential changed from negative to positive, which indicated that chitosan had been successfully coated on the surface of microspheres. SDS-PAGE, laser confocal microscope and other detection methods confirmed that BSA had been successfully carried. The encapsulation rate of porous microspheres was $(3.01 \pm 0.04)\%$ and the drug loading rate was $(1.50 \pm 0.02)\%$ after detection by micro BCA kit. **Conclusion** CS-PLGA preparation carrying bilayer antigen was successfully prepared, which provided a new idea for the subsequent study of sustained and controlled release preparations.

Key words poly(lactic-co-glycolic acid); chitosan; porous microspheres; antigen loading; self-healing

steatohepatitis, MASH) 系代谢相关脂肪性肝病向肝纤维化和肝硬化过渡的关键环节,其确切发病机制尚不明确,至今临床治疗 MASH 尚无公认的药物^[1]。逍遥丸以疏肝健脾、降脂保肝等功效在临床广泛应用。课题组前期已经摸索出逍遥丸治疗 MASH 的最佳剂量,并证实逍遥丸可以通过减轻胰岛素抵抗、氧化应激、炎症反应、肠源性内毒素血症从而治疗 MASH^[2-4],但其防治 MASH 的通路机制尚未明确。

在 MASH 的发病过程中,肝细胞中过剩的游离脂肪酸(free fatty acids, FFAs)可上调脂氧化酶细胞色素 P450 2E1 (cytochrome P450 2E1, CYP2E1) 表达,后者活性增加可刺激活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生,引起氧化应激^[5],继而促进肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的表达,激活凋亡相关因子配体(factor related apoptosis ligand, FasL)/TNF- α 信号通路^[6],导致细胞凋亡。TNF- α 能够活化肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC),促进转化生长因子- β 1 (tumor growth factor- β 1, TGF- β 1) 的分泌^[7],诱发肝纤维化。国内外研究显示,MASH 发生时,肝脏中 CYP2E1、TNF- α 与 TGF- β 1 表达受损^[8-10],通过降低 FasL/TNF- α 的表达可以减轻肝损害^[11],由此可见调控 CYP2E1 和 FasL/TNF- α 是治疗 MASH 的靶点。然而逍遥丸是否通过调控 CYP2E1 及 FasL/TNF- α 通路,从而发挥其对 MASH 的改善作用,尚不得而知。该研究通过建立 MASH 大鼠模型,基于 CYP2E1 及 FasL/TNF- α 通路阐述逍遥丸治疗 MASH 的作用机制,为其在临床上进一步推广应用提供部分基础实验支撑。

1 材料与方法

1.1 实验动物 24 只 8 周龄雄性 SPF 级 SD 大鼠,体质量 200 ~ 240 g,购自湖南斯莱克实验动物有限公司,许可证号为 SXK(湘)20190004;饲养于江西中洪博元生物技术有限公司动物实验中心,温度 20 ~ 24 °C,湿度 50% ~ 60%,光照 12 h,适应性喂养 1 周。本实验经江西中洪博元生物技术有限公司动物伦理委员会批准,批准号:2021081001。

1.2 主要试剂与仪器 大鼠天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、总胆固醇(total cholesterol, T-CHO)、三酰甘油(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density

lipoprotein cholesterol, HDL-C)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(南京建成生物工程研究所,货号: C010-2-1、C009-2-1、A111-1-1、A110-1-1、A113-1-1、A112-1-1、A003-1、A001-3);大鼠白细胞介素(interleukin, IL)-18、IL-10、TNF- α 、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)试剂盒(武汉贝茵莱生物科技有限公司,货号: RA20058、RA20090、RA20035、RA20492);HE 染色液(北京雷根生物技术有限公司,货号 DH0006);CYP2E1 抗体、TNF- α 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号: 67263-1-4G、60291-1-4G);TGF- β 1 抗体、FasL 抗体(武汉博士德生物工程有限公司,货号: MA00019、PB9068);M5 Sprint qPCR RT Kit with gDNA remover(北京聚合美生物技术有限公司,型号: MF949);电泳仪、转印槽(美国 Bio-Rad 公司,型号: 164-5050、170-3930);全自动多色荧光及化学发光凝胶成像系统(北京赛智创业科技有限公司,型号: ChampChemi professional);逆转录 PCR 仪(美国 Thermo Scientific 公司,型号: ProFlex);SpecfraMay 型全波长酶标仪(美国 Molecular Device 公司,型号: SLO-BLO)。

1.3 方法

1.3.1 造模、分组与给药 所有大鼠适应性饲养 1 周,随机分为 2 组:对照组(CON 组)8 只,模型组 16 只。CON 组喂予常规饲料;模型组喂予高糖高脂饲料(68.6% 基础饲料、1% 胆固醇、20% 猪油、0.2% 丙硫氧嘧啶、10% 蔗糖、0.2% 胆酸钠),每隔 2 d 喂 1 次,每日给予 3 h 夹尾处理,自第 3 周起,背部皮下以 0.2 ml/100 g 注射四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl₄) 豆油溶液(CCl₄: 豆油 = 2 : 3),1 周 2 次,造模成功后再将其随机分为 2 组,MOD 组($n = 8$)和逍遥丸组(XYW 组, $n = 8$)。第 5 周开始 CON 组和 MOD 组给予 0.9% 氯化钠溶液 2 ml 灌胃,XYW 组给予相同剂量的逍遥丸水溶液灌胃,连续给药 4 周。实验总周期为 8 周。逍遥丸水溶液按成人每日所需药量换算成大鼠等效药量,即成人每日浓缩丸用量为 9 丸(1 次 3 丸,1 日 3 次),重 3.72 g,大鼠每日所需药量则为 $3.72 \text{ g} \times 0.018 / 0.2 \text{ kg} = 0.3348 \text{ g/kg}$ (0.018 为大鼠体表面积转换系数)。

1.3.2 一般情况 对每组大鼠的活动程度、精神状态、毛发、摄食量、体质量、身长及大小便等进行观察和记录。

1.3.3 肝指数与体质量指数 取材时,先将肝脏进

行分离,然后用0.9%氯化钠溶液洗涤,用滤纸吸去表面水分,称量并记录肝重,依据公式算出肝指数和体质量指数:肝指数=肝重/体质量、体质量指数=体质量(kg)/身高的平方(m²)。

1.3.4 肝脏组织病理学检测 取组织固定液固定的大鼠肝组织进行切片,HE、油红O染色观察肝细胞形态,以半定量统计分析评估MASH活性评分(nash activity score, NAS),见表1。

表1 MASH组织学评分系统

参数	得分(分)	定义
脂肪变性	0	<5%
	1	5%~33%
	2	>33%~66%
	3	>66%
炎细胞浸润	0	无
	1	200倍光镜下观察,每个视野<3个焦点
	2	200倍光镜下观察,每个视野3~4个焦点
	3	200倍光镜下观察,每个视野>4个焦点
气球样变	0	无
	1	少量气球样变细胞
	2	大量气球样变细胞
纤维化	0	无纤维化
	1	汇管区纤维化,局限于窦周及小叶内纤维化
	2	汇管区周围纤维化,纤维间隔形成,小叶结构保留
	3	纤维间隔伴小叶结构紊乱,无肝硬化
	4	肝硬化
NAS	<3	非MASH
	3~4	临界MASH
	>4	MASH

1.3.5 血清生化、氧化应激指标检测 取各组大鼠血清,采用微板法检测TG、T-CHO、LDL-C、HDL-C、AST、ALT含量,ELISA法检测MCP-1、IL-18、TNF-α、IL-10含量,TBA法检测MDA含量,WST-1法检测SOD含量。

1.3.6 Western blot 检测肝组织 CYP2E1、TGF-β1、TNF-α、FasL 蛋白表达 BCA法确定大鼠肝组织蛋白浓度,再进行电泳、转膜、封闭,再分别添加至一抗CYP2E1(1:3 000)、TGF-β1(1:1 000)、TNF-α(1:4 000)、FasL(1:1 000)、GAPDH(1:10 000),4℃过夜,TBST洗涤,二抗(1:10 000)室温2h洗涤,采用ECL技术成像,通过ImageJ软件计算其灰度值。

1.3.7 RT-qPCR 检测肝组织相关基因表达 采用试剂盒对肝脏总RNA进行提取,利用反转录获得cDNA,构建qPCR反应体系。扩增条件:95℃预变性30s;95℃变性15s;60℃退火30s;72℃延伸

30s,循环数40次。用2^{-ΔΔC_T}计算出CYP2E1、TGF-β1、TNF-α、FasL mRNA相对含量。引物序列见表2。

表2 qPCR引物序列

目的基因	引物序列(5'-3')
GAPDH	F: GGTGTCTCTCCTCGCACTCA
	R: TGCTCCAGGGTTTCTTACTCC
CYP2E1	F: GAATGGGAAACAGGTAATG
	R: CAGAAATGTGGGTCAAAGG
TGF-β1	F: TGAGTGGCTGTCTTTGACG
	R: ACTTCCAACCCAGGTCCTTC
TNF-α	F: GGGCCACCACGCTCTTCTGTC
	R: CCTCCGCTTGGTGGTTGCTAC
FasL	F: AATAGCCAACCCAGCACAC
	R: GTGTCTTCCATTCCAGAGGG

1.4 统计学处理 采用SPSS 25.0软件对数据进行统计分析,所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,利用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行多组间的比较,利用Bonferroni法进行组间两两比较。 $P < 0.05$ 示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般情况 给药期间,CON组大鼠精神佳,毛发光滑,动作灵敏,食量、二便未见异常;MOD组大鼠毛发晦暗、枯燥,早期暴躁、易惹怒,后期情绪低落、无精打采、动作迟缓、食量减退、排便稀溏;与MOD组比较,XYW组大鼠的一般情况有显著改善。

2.2 大鼠肝指数、体质量指数 与CON组比较,MOD组大鼠的肝指数升高($P < 0.01$),体质量指数降低($P < 0.01$);与MOD组比较,XYW组大鼠的肝指数下降($P < 0.01$),体质量指数升高($P < 0.01$)。见表3。

表3 各组大鼠肝指数、体质量指数含量($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	肝指数(g/g)	体质量指数(kg/m ²)
CON	0.039 ± 0.003	5.95 ± 0.22
MOD	0.043 ± 0.002**	4.99 ± 0.61**
XYW	0.039 ± 0.002##	5.84 ± 0.51##
F值	7.24	10.01
P值	<0.01	<0.01

与CON组比较:** $P < 0.01$;与MOD组比较:## $P < 0.01$

2.3 大鼠肝组织病理学变化 HE染色和油红O染色结果(图1、2)所示,CON组肝细胞边界清楚,胞质丰富,胞核居中,肝索整齐,肝细胞呈放射状于中央静脉周围分布,无脂肪浸润,无炎性细胞浸润,

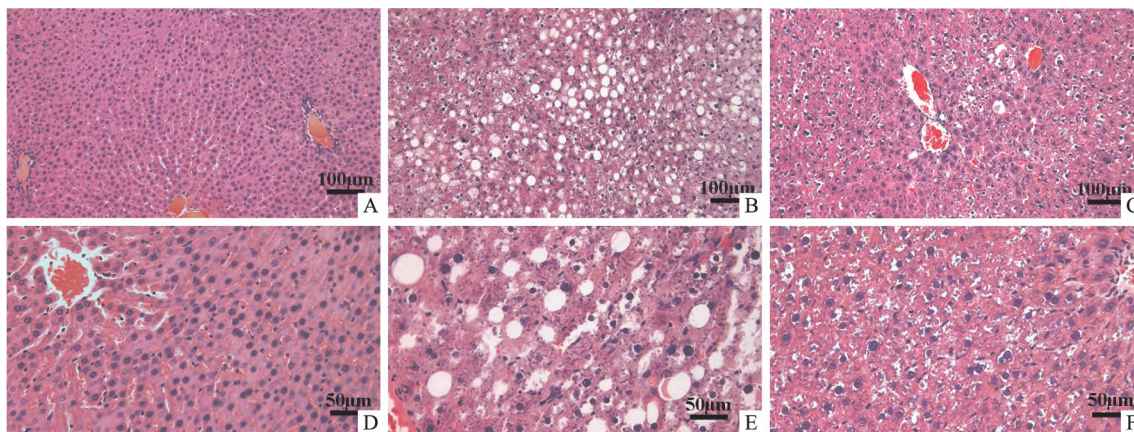


图1 大鼠肝脏石蜡切片 HE 染色

A: CON 组 ×200; B: MOD 组 ×200; C: XYW 组 ×200; D: CON 组 ×400; E: MOD 组 ×400; F: XYW 组 ×400

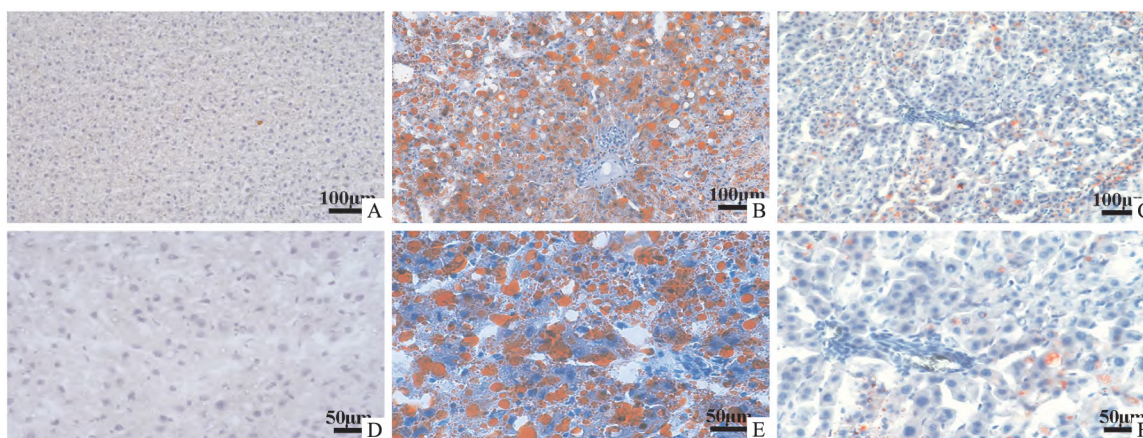


图2 肝脏冰冻切片油红 O 染色

A: CON 组 ×200; B: MOD 组 ×200; C: XYW 组 ×200; D: CON 组 ×400; E: MOD 组 ×400; F: XYW 组 ×400

表4 各组大鼠血脂转氨酶指标比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	TG(mmol/L)	T-CHO(mmol/L)	LDL-C(mmol/L)	HDL-C(mmol/L)	AST(U/L)	ALT(U/L)
CON	0.80 ± 0.29	1.73 ± 0.69	1.72 ± 0.53	1.94 ± 0.38	25.22 ± 8.84	18.78 ± 6.48
MOD	1.21 ± 0.29*	2.70 ± 0.60**	2.58 ± 0.52**	1.39 ± 0.33**	37.35 ± 9.83*	29.09 ± 9.13**
XYW	0.81 ± 0.34#	1.81 ± 0.38##	1.76 ± 0.46##	1.92 ± 0.32##	26.32 ± 9.48#	19.11 ± 4.92#
F 值	4.48	7.26	7.45	6.40	4.08	5.51
P 值	<0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.05	<0.05

与 CON 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 MOD 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

无肝小叶损伤;与 CON 组比较,MOD 组肝细胞排列不均匀,结构被破坏,肝索分布较乱,脂肪空泡较多,细胞核向一边挤压,炎症细胞浸润明显,脂肪变性明显;与 MOD 组比较,XYW 组肝细胞分布较整齐,结构比较完整,胞浆内脂肪空泡减少,炎症细胞浸润程度减轻,脂肪变性减轻。NAS 组织学评分进一步证实了组织学观察结果(图 3)。

2.4 大鼠血清生化指标变化 与 CON 组比较,MOD 组大鼠血清中 TG、T-CHO、LDL-C、AST、ALT

含量增加(均 $P < 0.05$),HDL-C 含量减少($P < 0.01$);与 MOD 组比较,XYW 组大鼠的 TG、T-CHO、LDL-C、AST 及 ALT 含量减少(均 $P < 0.05$),HDL-C 含量增加($P < 0.01$)。见表 4。

2.5 大鼠血清氧化应激指标变化 与 CON 组比较,MOD 组大鼠血清中 MDA 含量增加($P < 0.01$),SOD 含量减少($P < 0.01$);与 MOD 组比较,XYW 组大鼠血清中 MDA 含量减少($P < 0.01$),而 SOD 含量增加($P < 0.01$)。见表 5。

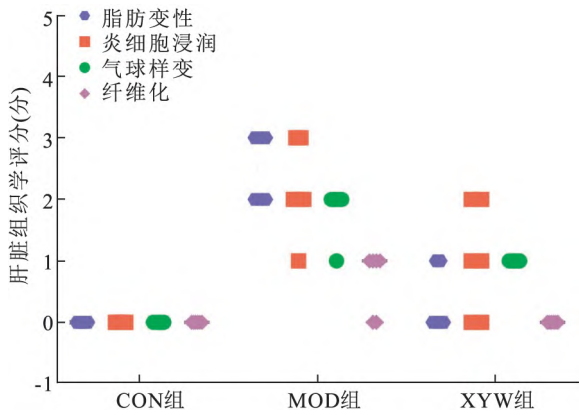


图3 肝脏组织学评分(n=6)

表5 各组大鼠血清MDA、SOD水平比较($\bar{x} \pm s$ n=8)

组别	MDA(nmol/ml)	SOD(U/ml)
CON	7.33 ± 1.41	97.78 ± 6.47
MOD	9.72 ± 1.60**	84.25 ± 6.69**
XYW	7.39 ± 1.43##	94.98 ± 7.07##
F值	6.75	8.95
P值	<0.01	<0.01

与CON组比较: **P<0.01; 与MOD组比较: ##P<0.01

2.6 大鼠血清中炎症因子表达水平 与CON组比较,MOD组大鼠血清中MCP-1、IL-18、TNF-α含量上升(均P<0.01),而IL-10含量下降(P<0.01);与MOD组比较,XYW组大鼠MCP-1、IL-18、TNF-α含量下降(均P<0.05),而IL-10含量上升(P<0.05)。见表6。

2.7 大鼠肝组织CYP2E1、FasL、TNF-α、TGF-β1蛋白表达 与CON组比较,MOD组肝组织CYP2E1、FasL、TNF-α、TGF-β1蛋白含量上调(均P<0.05);与MOD组比较,XYW组CYP2E1、FasL、TNF-α、TGF-β1蛋白含量下调(均P<0.05)。见图4。

2.8 大鼠肝组织CYP2E1、FasL、TNF-α、TGF-β1 mRNA表达 与CON组比较,MOD组肝组织CYP2E1、FasL、TNF-α、TGF-β1 mRNA表达升高(均P<0.05);与MOD组比较,XYW组肝组织

CYP2E1、FasL、TNF-α、TGF-β1 mRNA表达下降(均P<0.05)。见图5。

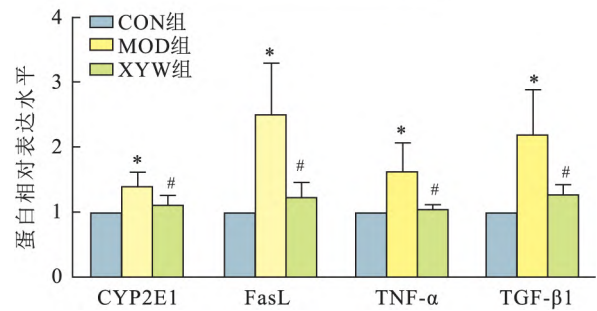
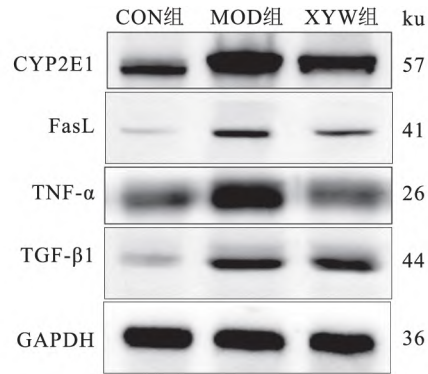


图4 各组大鼠肝组织CYP2E1、FasL、TNF-α、TGF-β1蛋白表达水平(n=3)

与CON组比较: *P<0.05; 与MOD组比较: #P<0.05

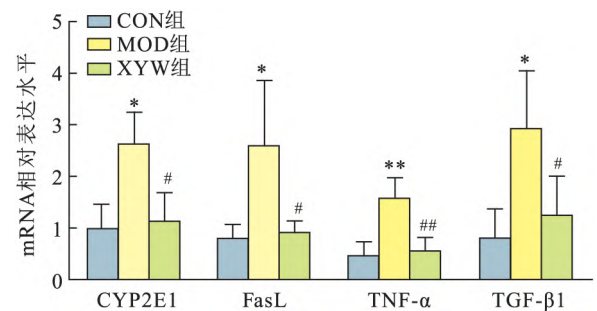


图5 各组大鼠肝组织CYP2E1、FasL、TNF-α、TGF-β1 mRNA表达水平(n=3)

与CON组比较: *P<0.05, **P<0.01; 与MOD组比较: #P<0.05, ##P<0.01

表6 各组大鼠血清炎症因子表达水平比较(pg/ml $\bar{x} \pm s$ n=8)

组别	MCP-1	IL-18	TNF-α	IL-10
CON	437.09 ± 44.53	102.64 ± 20.75	143.17 ± 11.49	112.34 ± 10.76
MOD	570.11 ± 63.01**	127.69 ± 10.52**	158.66 ± 9.16**	97.89 ± 9.28**
XYW	463.64 ± 84.38##	109.70 ± 15.38#	144.64 ± 8.73#	110.38 ± 9.17#
F值	9.10	5.15	6.01	5.16
P值	<0.01	<0.05	<0.01	<0.05

与CON组比较: **P<0.01; 与MOD组比较: #P<0.05, ##P<0.01

3 讨论

MASH 的发病机制复杂,目前的研究主要集中在“多重打击”所导致的肝细胞损伤方面,如胰岛素抵抗、氧化应激、内质网应激、肠源性内毒素诱导及 TLR4 依赖的炎症因子释放等^[12]。通常认为,脂质毒性通路的激活可导致细胞损伤、炎症、坏死等,是 MASH 发病机制中的一个关键环节。FFAs 及其代谢物是引起肝细胞脂质毒性的主要诱因,FFAs 的蓄积可以促进脂氧化酶 CYP2E1 表达。CYP2E1 是氧化应激及脂质过氧化的主要来源,当其表达过度时可启动脂质过氧化的过程,导致肝脏内过量 ROS 的形成,组织细胞氧化应激^[13]。氧化应激和脂质过氧化还可释放 MDA,MDA 是一种由自由基与脂肪相互作用而产生的氧化终产物,其水平能间接反映细胞损伤情况;SOD 是一种机体的抗氧化酶,具有清除体内自由基的功能^[14-15],MDA 与 SOD 联用评估细胞氧化应激水平,氧化应激增强可诱导炎症因子 TNF- α 的合成。

当 TNF- α 大量分泌时,线粒体通透性增强,跨膜电位遭到破坏,线粒体功能受损^[16],激活 FasL/TNF- α 通路,后者是细胞凋亡的重要通路。死亡受体 FasL 属于肿瘤坏死因子受体超家族,前者通过与 TNF- α 的相互作用,启动细胞凋亡途径,导致细胞凋亡^[17];TNF- α 可抑制线粒体呼吸,导致生成的 ROS 不能被体内抗氧化剂及时清除,加重氧化应激和脂质过氧化,激活肝脏星状细胞,导致 TGF- β 1 分泌增多,最终导致肝纤维化^[18]。因此,CYP2E1、FasL/TNF- α 、TGF- β 1 表达上调可导致 MASH。研究^[19]显示,逍遥丸治疗 MASH 的机制可能与上调肝脏组织中过氧化物酶体增殖物激活受体 α 、过氧化物酶体增殖子活化受体 γ 共激活因子 1 α 、酰基辅酶 A 氧化酶和肉毒碱棕榈酰基转移酶 1 α 的转录表达,促进肝脏脂肪酸 β 代谢有关。本研究结果发现,高糖高脂饮食及 CCl₄ 皮下注射诱导的 MASH 大鼠经逍遥丸治疗后血清中促炎因子 MCP-1、IL-18、TNF- α 和氧化应激指标 MDA 水平显著降低,抑炎因子 IL-10 和氧化应激指标 SOD 水平显著升高,肝组织中 CYP2E1、FasL/TNF- α 、TGF- β 1 的蛋白表达和基因表达水平明显降低。以上研究结果表明,逍遥丸具有良好的抗炎效果和减轻氧化应激的作用,并通过调节 CYP2E1、FasL/TNF- α 、TGF- β 1 在 MASH 大鼠肝组织中的转录表达,减少了肝脏脂肪酸的蓄积,从而达到治疗 MASH 的目的。本研究为逍遥丸对 MASH

的治疗作用研究奠定了一定基础,有助于加深对 MASH 发病机制的理解,同时为 MASH 的治疗提供思路,尚需更多的体内外实验进一步深入研究和探讨。

参考文献

- [1] 刘家茏,杨晓莉,张雪苗,等. GP73 中和抗体抑制 MCD 饮食诱导的非酒精性脂肪肝机制研究[J]. 安徽医科大学学报, 2022, 57(9): 1398-403.
- [2] 苗宇船,刘杨,李若瑜,等. 大鼠非酒精性脂肪性肝炎肝郁脾虚证模型的建立[J]. 世界中西医结合杂志, 2018, 13(4): 445-8, 461.
- [3] 孟雅楠,高艳,郝健亨,等. 基于网络药理学探讨逍遥散治疗非酒精性脂肪性肝炎的作用机制[J]. 世界中西医结合杂志, 2021, 16(9): 1626-32.
- [4] 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炎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.
- [5] Leung T M, Nieto N. CYP2E1 and oxidant stress in alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease [J]. J Hepatol, 2013, 58(2): 395-8.
- [6] 杨强,钦丹萍,杨新艳,等. Fas/FasL、p38 MAPK 通路在溃疡性结肠炎大鼠中的表达及雷公藤多苷的作用[J]. 中国药理学通报, 2019, 35(2): 218-23.
- [7] 张文青,顾广祥,夏强,等. 转化生长因子 β 和信号转导和转录激活因子 3 在肝纤维化发生中的相互作用[J]. 中华肝脏病杂志, 2018, 26(10): 792-6.
- [8] Daly A K. Relevance of CYP2E1 to non-alcoholic fatty liver disease [J]. Subcell Biochem, 2013, 67: 165-75.
- [9] 陈五一,黄盖,田邦妮,等. GLP-1 对非酒精性脂肪性肝病大鼠 TNF- α 、TGF- β 1 及氧化应激的影响[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2014, 23(11): 1335-7.
- [10] Ahmed H, Umar M I, Imran S, et al. TGF- β 1 signaling can worsen NAFLD with liver fibrosis backdrop [J]. Exp Mol Pathol, 2022, 124: 104733.
- [11] 周静,王成蹊,侯连兵,等. 因宁片对甲亢性肝损害大鼠肝脏 Fas、FasL、TNF- α 表达的影响[J]. 中国药房, 2011, 22(7): 597-9.
- [12] Bessone F, Razori M V, Roma M G, et al. Molecular pathways of nonalcoholic fatty liver disease development and progression [J]. Cell Mol Life Sci, 2019, 76(1): 99-128.
- [13] Chiang D J, Pritchard M T, Nagy L E, et al. Obesity, diabetes mellitus, and liver fibrosis [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011, 300(5): G697-702.
- [14] 王爱芳,钟兴,潘天荣,等. 利拉鲁肽对非酒精性脂肪性肝病大鼠 ERp46 蛋白和脂联素及氧化应激的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(2): 249-53.
- [15] Li Y, Deng X, Guo X, et al. Preclinical and clinical evidence for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease with soybean: A systematic review and meta-analysis [J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1088614.

- [16] Van Horsen J, Van Schaik P, Witte M, et al. Inflammation and mitochondrial dysfunction: A vicious circle in neurodegenerative disorders? [J]. *Neurosci Lett*, 2019, 710: 132931.
- [17] Diaz Arguello O A, Haisma H J. Apoptosis-inducing TNF superfamily ligands for cancer therapy [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(7): 1543.
- [18] 王乐, 丁腾, 龚伟玲, 等. 中药对肝纤维化 TGF- β 1/Smads 信号通路调控的有效成分 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(4): 666-74.
- [19] 张玉伟. 逍遥丸对非酒精性脂肪性肝炎肝郁脾虚证大鼠肠道代谢产物及脂肪酸 β 氧化的影响 [D]. 太原: 山西省中医药研究院, 2023.

Effect of Xiaoyao Wan on CYP2E1 and FasL/TNF- α signal pathway in metabolic associated steatohepatitis

Zhang Xinyue¹, Zhang Yuwei¹, Li Mengqi¹, Meng Yanan¹, Li Ruoyu², Miao Yuchuan¹

(¹Dept of Pathology, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619;

²Dept of Encephalopathy, Shanxi University of Chinese Medicine Affiliated Hospital, Taiyuan 030000)

Abstract Objective To study the mechanism of the treatment of metabolism associated steatohepatitis (MASH) in rats with Xiaoyao Wan. **Methods** Twenty-four SD male rats were randomly divided into control group (CON group $n=8$) and model group ($n=8$). The model group was given high-fat diet, carbon tetrachloride (CCl_4) subcutaneous injection, hunger and satiety disorder and tail clamping for four weeks to establish the MASH model, and the rats were randomly divided into the MOD group and the Xiaoyao Wan group (XYW group), with 8 rats in each group. The rats of the XYW group were given Xiaoyao Wan, the other two groups were given normal saline. Four weeks after administration, the serum biochemical indexes and oxidative stress indexes of rats in different groups were detected. The pathological sections of rat liver tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining and oil red O staining. The expression of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1), factor-related apoptosis ligand (FasL), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and tumor growth factor- β 1 (TGF- β 1) in rat liver were detected by Western blot method. The relative contents of CYP2E1, FasL, TNF- α and TGF- β 1 mRNA in liver tissue were detected by RT-qPCR. **Results** The general condition of rats in the XYW group was significantly improved compared with the MOD group; the level of hepatic index was significant decrease compared with the MOD group ($P < 0.01$) and the level of body mass index was significant increase compared with the MOD group ($P < 0.01$); the serum levels of triglyceride, total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, malondialdehyde, monocyte chemotactic protein-1, TNF- α , and interleukin (IL)-18 were significantly reduced compared with the MOD group (all $P < 0.05$), and the levels of high-density lipoprotein cholesterol, superoxide dismutase, and IL-10 were significantly elevated compared with the MOD group (all $P < 0.05$); the content of lipid droplets in hepatocytes of rats was significantly reduced compared with the MOD group under light microscope; the protein levels of CYP2E1, FasL, TNF- α and TGF- β 1 in liver tissues were significantly reduced compared with the MOD group (all $P < 0.05$), and the relative contents of CYP2E1, FasL, TNF- α and TGF- β 1 mRNA were significantly reduced compared with the MOD group (all $P < 0.05$). **Conclusion** Xiaoyao Wan can regulate the expression of CYP2E1, FasL, TNF- α and TGF- β 1 in the liver tissue of MASH rats by reducing the accumulation of fat in the liver, so as to achieve the purpose of treating MASH.

Key words Xiaoyao Wan; metabolic associated steatohepatitis; cytochrome P450 2E1; factor-related apoptosis ligand; tumor necrosis factor- α ; tumor growth factor- β 1