

## 二黄祛脂颗粒对小鼠非酒精性脂肪肝病的治疗作用及机制研究

李 斯, 陈 文\*

(石河子大学药学院, 新疆植物药资源利用教育部重点实验室, 新疆 石河子 832000)

**摘要:** 二黄祛脂方是袁今奇等老中医在长期临床实践中总结出的“护肝抑毒系列方”之一, 治疗非酒精性脂肪肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 颇有成效, 但其作用机制尚不明确。本研究探讨了二黄祛脂颗粒 (Erhuang quzhi granules, EQG) 治疗 NAFLD 的作用机制。动物福利和实验过程均遵循石河子大学第一附属医院动物伦理委员会的规定。通过蛋氨酸胆碱缺乏饲料 (methionine and choline deficient diet, MCDD) 饮食诱导 5 周建立 NAFLD 小鼠模型, 治疗组喂养 MCDD 的同时分别灌胃给予 EQG (16.25 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)、阿托伐他汀 (atorvastatin, ATO, 7.20 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)。考察 EQG 对 NAFLD 小鼠相关血清生化指标、肝脏病理变化和炎症因子的影响, 并应用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 法、免疫组织化学 (immunocytochemistry, ICH) 法和 Western blot 法检测肝组织核因子- $\kappa$ B/Nod 样受体蛋白 3 (nuclear factor kappa B/Nod-like receptor protein 3, NF- $\kappa$ B/NLRP3) 信号通路相关 mRNA 和蛋白的水平。结果显示, EQG 显著降低小鼠血清中天冬氨酸转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST)、丙氨酸转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) 含量, 提高低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 水平。苏木素-伊红染色结果表明 EQG 减轻小鼠肝脏的脂质沉积。此外, EQG 显著降低小鼠肝组织中白介素 (interleukin, IL)-1 $\beta$ 、IL-6、IL-18、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 的含量和 NF- $\kappa$ B、NLRP3、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的 mRNA 水平, 下调 F4/80、I $\kappa$ B 激酶  $\beta$  (I $\kappa$ B kinase  $\beta$ , IKK $\beta$ )、NLRP3、含有 CARD 且与凋亡相关的斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC) 的表达, 抑制 NF- $\kappa$ B 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cysteiny aspartate specific proteinase-1, caspase-1) 蛋白的活化。以上研究揭示了 EQG 治疗 NAFLD 的作用机制可能与其抑制 NF- $\kappa$ B/NLRP3 信号通路有关, 这为 EQG 在临床上的进一步开发与利用提供了理论依据。

**关键词:** 二黄祛脂颗粒; 非酒精性脂肪肝病; 核因子- $\kappa$ B; Nod 样受体蛋白 3 炎症小体; 炎症反应

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)09-2743-08

## Therapeutic effect and mechanism of Erhuang quzhi granules on non-alcoholic fatty liver disease in mice

LI Si, CHEN Wen\*

(Key Laboratory of Xinjiang Phytomedicine Resource and Utilization, Ministry of Education, School of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

**Abstract:** Erhuang quzhi compounds is one of the protecting liver and inhibiting toxin prescriptions series summarized by Jinqi Yuan and other famous doctors of traditional Chinese medicine during the long-term clinical practice. It is very effective for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), but its mechanism is not clear. This research investigated mechanism of Erhuang quzhi granules (EQG) in the treatment of NAFLD. All the animal welfare and experimental procedures are in accordance with the regulations of the Animal Ethics Committee of the First Affiliated Hospital of Shihezi University. Mouse models of NAFLD were established by feeding with methionine and choline deficient diet (MCDD) for five weeks. While feeding MCDD, the treatment groups were

收稿日期: 2022-03-21; 修回日期: 2022-05-13.

基金项目: 兵团财政科技计划项目 (2020AA005).

\*通讯作者 Tel: 13179930326, E-mail: chen-wen2000@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0341

given EQG ( $16.25 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) and atorvastatin (ATO,  $7.20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) by gavage. The effects of EQG on serum biochemical indices, liver pathological changes, and inflammatory cytokines in mice of NAFLD were investigated. Quantitative real-time PCR (qPCR), immunocytochemistry (ICH) and Western blot assays were used to detect the levels of mRNA and protein associated with nuclear factor kappa B/Nod-like receptor protein 3 (NF- $\kappa$ B/NLRP3) in liver. The results showed that EQG significantly reduced the levels of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT), and improved the level of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C). The result of hematoxylin-eosin (HE) staining showed that EQG reduced lipid deposition in livers of mice. Meanwhile, EQG notably decreased the levels of interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-18 and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and mRNA levels of NF- $\kappa$ B, NLRP3, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , down-regulated the expression of F4/80, I $\kappa$ B kinase  $\beta$  (IKK $\beta$ ), NLRP3 and apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) and inhibited the activation of NF- $\kappa$ B and cysteinyl aspartate specific proteinase-1 (caspase-1). These findings announced that EQG could improve NAFLD via NF- $\kappa$ B/NLRP3 pathway possibly, which provides a theoretical basis for the further development and utilization of EQG in clinic.

**Key words:** Erhuang quzhi granules; non-alcoholic fatty liver disease; nuclear factor kappa B; Nod-like receptor protein 3 inflammasome; inflammation

非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是指除酒精和其他明确损肝因素外所致的肝细胞内脂肪过度沉积为主要特征的临床病理综合征, 其发病率与肥胖症、代谢综合征和2型糖尿病的患病率相关<sup>[1]</sup>。目前, 较为公认的“二次打击”学说表明, 肝脏炎症在NAFLD的发生和发展中起重要作用<sup>[2,3]</sup>。当摄入过多脂质使得肝脏无法正常代谢时, 脂质会沉积于肝脏产生脂毒性, 损害肝细胞, 受损肝细胞会释放危险相关分子模式激活 Kupffer 细胞, 诱导细胞内的核因子- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B, NF- $\kappa$ B) 信号激活<sup>[4]</sup>, 该信号促使 Nod 样受体蛋白 3 (Nod-like receptor protein 3, NLRP3)、含有 CARD 且与凋亡相关的斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC) 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 前体 (pro-cysteinyl aspartate specific proteinase-1, pro-caspase 1) 结合形成完整且有活性的 NLRP3 炎性小体, 介导白细胞介素 (interleukin, IL)-1 $\beta$  和 IL-18 的分裂和成熟, 炎症细胞因子水平的增加可引起肝实质细胞受损、炎症细胞浸润增强和肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 被激活<sup>[5]</sup>, 促使病情向肝纤维化发展。因此, 如能有效抑制参与 NAFLD 进展的 NF- $\kappa$ B/NLRP3 信号通路, 就可减轻肝脏炎症反应, 减缓 NAFLD 的进程, 这也为临床抗 NAFLD 的新药开发提供了方向。

二黄祛脂颗粒 (Erhuang quzhi granules, EQG) 由大黄、姜黄、甘草等 13 味药材组成, 是袁今奇等多名老中医临床实践积累的验方, 前期已被证明在临床上治疗 NAFLD 效果显著<sup>[6]</sup>, 其中的大黄蒽醌类成分<sup>[7,8]</sup>、姜黄素<sup>[9-11]</sup>、绞股蓝皂苷<sup>[12]</sup>和甘草酸<sup>[13,14]</sup>等也被多次报道可有效改善 NAFLD 所引发的炎症等病理症状, 为探究 EQG 治疗 NAFLD 的作用机制提供了参考。近年

来, 由于中药材质量的不可控、煎煮步骤繁琐等问题, 中医的现代化发展一直停滞不前, 配方颗粒的出现及时解决了这些问题, 其在生产和监督中可实现质量标准可控, 且免去了煎煮, 可直接冲泡<sup>[15]</sup>。本研究拟建立由蛋氨酸胆碱缺乏饲料 (methionine and choline deficient diet, MCDD) 诱导的 NAFLD 小鼠模型, 观察 EQG 对 NAFLD 小鼠的治疗作用, 并基于 NF- $\kappa$ B/NLRP3 信号通路探讨其作用机制。

## 材料与方法

**动物** C57BL/6 雄性小鼠 32 只, 体质量 ( $20 \pm 2$ ) g, 购自河南斯克贝斯生物科技股份有限公司, 许可证号: SCXK (豫) 2020-0005。小鼠饲养在温度  $22 \sim 28 \text{ }^\circ\text{C}$ 、湿度  $45\% \sim 50\%$ 、标准 12 h 光照的屏障环境, 实验前适应性饲养 1 周, 自由饮水。动物福利和实验过程均遵循石河子大学第一附属医院动物伦理委员会的规定。

**仪器** AR1140 电子分析天平 (Sartorius 公司); Sorvall Legend Micro 21R 高速冷冻离心机、Varioskan Flash 多功能读数仪 (Thermo Fisher 公司); U410-86 超低温冰箱 (Eppendorf 公司); Axio Imager A2 蔡司正置荧光显微镜 (Zeiss 公司); DHG-9240 电热恒温鼓风干燥箱 (上海赛欣科学仪器有限公司); 实时荧光定量 PCR 仪 (Rotor-Gene Q, Qiagen 公司); Q5000 超微量核酸蛋白测定仪 (美国 Quawell Technology 公司); UVP 化学发光成像系统 (美国 UVP 公司); DYCZ-40G 转印电泳仪 (北京六一生物科技有限公司)。

**药物与试剂** 二黄祛脂方是由姜黄 12 g、大黄 9 g、白术 10 g、葛根 10 g、荷叶 10 g、泽泻 10 g、丹参 10 g、虎杖 15 g、水蛭 3 g、僵蚕 10 g、礞石 10 g、绞股蓝 10 g、甘

草 6 g 组成, 共计 125 g, 其相应中药配方颗粒购自广东一方制药有限公司, 产品批号分别为 0042052、1052451、1031221、9115982、1016041、0112291、1010471、0100781、0090751、9090042、0115881、1036521、0129341, 该剂量参照临床研究<sup>[6]</sup>和专利<sup>[16]</sup>。阿托伐他汀 (atorvastatin, ATO, 辉瑞制药有限公司, 批号 EP8454); 蛋氨酸胆碱正常含量饲料 (methionine and choline supplement diet, MCSD), MCDD (美国 Dyets 公司); 总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglycerides, TG)、丙氨酸转氨酶 (alanine transaminase, ALT)、天冬氨酸转氨酶 (aspartate transaminase, AST)、高密度脂蛋白胆固醇 (high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、无毒环保苏木素-伊红 (HE) 染液试剂盒 (南京建成生物工程研究所); IL-1 $\beta$ 、IL-18、IL-6、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司); 总 RNA 提取试剂盒 (北京天根生化科技有限公司, 批号 W9401); 逆转录试剂盒 (Thermo Fisher Scientific 公司, 批号 01118944); QuantiNova SYBR<sup>®</sup> Green PCR Kit 试剂盒 (Qiagen GmbH 公司, 批号 169031766); DAB 显色液 (索莱宝生物科技有限公司); NLRP3 (15101)、cleaved-caspase 1 (89332)、caspase-1 (24232)、ASC (67824)、NF- $\kappa$ B p65 (8242)、I $\kappa$ B 激酶  $\beta$  (I $\kappa$ B kinase  $\beta$ , IKK $\beta$ , 8943) 抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (Cell Signaling Technology 公司); phospho-NF- $\kappa$ B p65 抗体 (江苏亲科生物研究中心有限公司, 批号 AF2006); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (北京中杉金桥生物技术有限公司)。

**动物分组、造模与给药** C57BL/6 小鼠适应性饲养 1 周后, 随机分成蛋氨酸胆碱正常含量 (methionine and choline supplement, MCS) 组、蛋氨酸胆碱缺乏 (methionine and choline deficient, MCD) 组、ATO 组 (7.20 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)、EQG 组 (16.25 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), 每组 8 只。MCS 组小鼠给予 MCS 对照鼠粮, 其余各组均给予 MCD 饲料。EQG 是取与药材饮片相当量的配方免煎颗粒, 加入 80~100 °C 的水, 制成含生药量 1.625 g·mL<sup>-1</sup> 的溶液, 置于 4 °C 保存备用。ATO 溶液由 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液稀释而成, 置于 4 °C 保存备用。从造模开始, ATO 组和 EQG 组即开始灌服相应药物, MCS 组和 MCD 组灌服 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液, 每日 1 次, 周期为 5 周, 其中 ATO 和 EQG 的剂量均是根据临床推荐给药剂量<sup>[6,16]</sup>并结合相关参考文献<sup>[17]</sup>进行人与小鼠的等效剂量系数折算确定的。

**组织及血液收集方法** 给药结束后小鼠禁食禁水 12 h, 使用 1% 戊巴比妥钠麻醉小鼠, 称重后进行摘眼球取血, 经室温静置、离心后, 取上清液用于测定相关生化指标。处死小鼠并摘取小鼠肝脏, 称重后, 剪取部分肝组织, 放置于 10% 中性甲醛溶液中进行固定, 其余肝组织放入 -80 °C 冰箱中保存备用。计算肝脏系数 [肝脏系数 (%) = 肝脏重量/体重 × 100%]。

**生化指标的测定** 按照试剂盒说明书检测小鼠血清中 TC、TG、LDL-C、HDL-C、AST、ALT 含量。

**肝脏病理学检查** 肝组织块用 10% 中性甲醛溶液固定后, 用不同浓度的乙醇进行梯度脱水, 石蜡包埋后切片, 按照 HE 染色试剂盒进行染色, 于正置显微镜下观察并采集图像。

**肝脏炎症因子含量的测定** 取适量肝组织按照 ELISA 试剂盒说明书处理样本得到组织匀浆, 离心后吸取上清, 测定肝脏中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-18、TNF- $\alpha$  含量。

**实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 实验** 称取小鼠肝组织适量, 加入 Trizol 试剂, 置冰上匀浆, 匀浆后在室温下静置 5 min。按照总 RNA 抽提试剂盒说明书操作提取得到 RNA 溶液, 于 -80 °C 保存备用。取小鼠 RNA 溶液按照逆转录试剂盒说明书操作合成 cDNA, 得到的样品使用 Q5000 超微量核酸蛋白测定仪检测单链 DNA (single-stranded DNA, ssDNA) 含量, 将其浓度调至统一后, 于 -80 °C 保存备用。按照 QuantiNova SYBR<sup>®</sup> Green PCR Kit cDNA 试剂盒说明书, 将 cDNA 与定量的 SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix 试剂混合均匀后置于实时荧光定量 PCR 仪中进行扩增及检测。扩增完成后, 根据溶解曲线判断扩增反应的准确性。以 GAPDH 为内参基因, 采用 2<sup>- $\Delta$ ACT</sup> 法计算目标基因的相对表达量。所用引物序列见表 1。

**免疫组织化学 (immunohistochemistry, IHC) 实验** 肝脏石蜡切片脱蜡后, 浸泡于 1×柠檬酸盐修复液

**Table 1** The primer sequence of quantitative real-time PCR (qPCR). NF- $\kappa$ B: Nuclear factor kappa B; TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor- $\alpha$ ; NLRP3: Nod-like receptor protein 3; IL-1 $\beta$ : Interleukin-1 $\beta$ ; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; F: Forward; R: Reverse

Gene	Sequence (5'-3')
GAPDH	F: TCCTTGAGGCCATGTGGGCCAT
	R: TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG
NF- $\kappa$ B	F: ATGGCAGACGATGATCCCTAC
	R: TGTTGACAGTGGTATTCTGGTG
TNF- $\alpha$	F: CCCTCACACTCAGATCATCTTCT
	R: GCTACGACGTGGGCTACAG
NLRP3	F: ATTACCCGCCGAGAAAGG
	R: TCGCAGCAAAGATCCACACAG
IL-1 $\beta$	F: GAAATGCCACCTTTTGACAGTG
	R: TGGATGCTCTCATCAGGACAG

中,转移至微波炉中加热至沸腾,保持亚沸腾 8 min,于冰水浴中冷却 30 min,用蒸馏水清洗后放入 3% 过氧化氢水溶液中孵育 10 min,蒸馏水清洗后在切片上滴加 F4/80 一抗稀释液 (1:100), 4 °C 孵育过夜。次日,将切片从 4 °C 取出,平衡至室温,清除一抗稀释液并用磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 清洗,滴加 1~3 滴相应二抗稀释液, 37 °C 孵育 30 min, PBS 清洗,滴加 DAB 显色液,观察切片颜色,得到合适的染色强度后, PBS 清洗,苏木素复染切片后蒸馏水清洗,脱水、封片,进行观察。

**Western blot 实验** 剪取适量小鼠肝脏组织,加入高效 RIPA 裂解液 [含 1 mmol·L<sup>-1</sup> 苯甲基磺酰氟 (PMSF) 和 1 mmol·L<sup>-1</sup> 广谱磷酸酶抑制剂], 置冰上匀浆后,在 4 °C 下静置 60 min,离心 (4 °C, 12 000 r·min<sup>-1</sup>, 10 min),测定蛋白浓度,加入相应体积的总蛋白样品与 4×蛋白上样缓冲液,将样品蛋白浓度调为一致,于 100 °C 水浴加热 10 min,流水冷却,分装,于 -80 °C 保存备用。取适量样品到十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 凝胶上进行电泳分离后,转至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上,置于封闭液中封闭 1 h。用 1×TBST (Tris buffered saline with Tween-20) 洗涤后置于含目的蛋白一抗的稀释缓冲液 (稀释度为 1:1 000) 中 4 °C 孵育过夜。次日,用 1×TBST 洗涤 3 次,置于相应二抗室温孵育 60 min 后,用 1×TBST 洗膜,显色并曝光,采用 Image J 软件测定目的条带灰度值。

**统计学分析** 采用 SPSS26.0 软件对实验数据进行分析。统计值以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA),  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结果

### 1 EQG 对小鼠体重和肝脏系数的影响

如表 2 所示,在喂养 MCD 饲料的第 2 周, MCD 组

小鼠的体重就显著低于 MCS 小鼠 ( $P < 0.001$ ),且持续至第 5 周。给予 ATO 治疗 5 周,与 MCD 组相比,小鼠体重显著下降 ( $P < 0.05$ ),EQG 对 MCD 饮食引起的小鼠体重下降现象并无显著影响。如图 1A 所示,与 MCS 组比, MCD 组小鼠的肝脏系数并无显著差异,与 MCD 组比,各给药组的小鼠肝脏湿重也无显著差异。在体重和肝脏系数上, EQG 组与 ATO 组相比并无显著差异。

**Table 2** The effect of Erhuang quzhi granules (EQG) on body weight of mice. While feeding methionine and choline deficient (MCD) diet for five weeks to establish mice of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) model, the treatment group was given atorvastatin (ATO, 7.20 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) and EQG (16.25 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) by gavage. MCS: Methionine and choline supplement.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ . \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  vs MCS group; # $P < 0.05$  vs MCD group

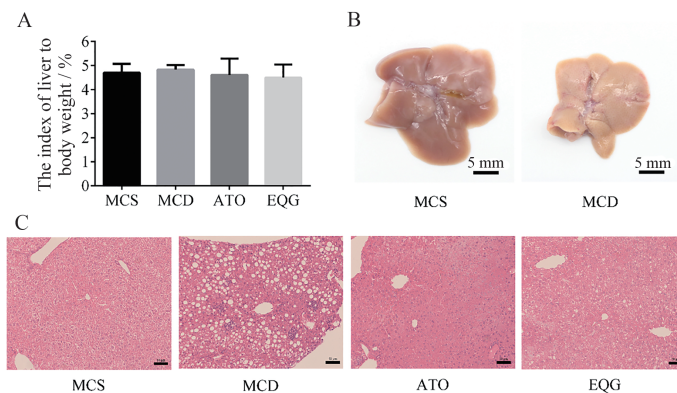
Time/week	Body weight/g			
	MCS	MCD	ATO	EQG
1	21.38 ± 1.56	21.86 ± 1.43	20.93 ± 1.01	21.87 ± 1.20
2	21.35 ± 1.51	18.39 ± 1.29***	17.95 ± 0.82	17.85 ± 1.85
3	22.17 ± 1.63	15.92 ± 1.21****	14.93 ± 0.73	15.70 ± 1.33
4	22.75 ± 1.71	15.03 ± 1.04****	13.90 ± 0.56	14.18 ± 1.14
5	23.32 ± 1.57	14.23 ± 1.10****	13.05 ± 0.46#	13.72 ± 0.86

### 2 EQG 对小鼠肝脏病理学的影响

观察小鼠肝脏发现 (图 1B), MCS 组小鼠肝脏色泽红润,表面光滑有弹性, MCD 组小鼠肝脏体积缩小,色黄,有油腻感。HE 染色结果显示 (图 1C), MCS 组肝细胞为多边形,呈放射状排列,较为整齐,有轻微肿胀但无脂肪变性; MCD 组小鼠肝组织发生明显的脂肪变性,大部分肝细胞中脂滴融合成大的脂肪空泡,且有炎症细胞浸润;各 EQG 给药组肝细胞脂肪变性程度均减轻。

### 3 EQG 对小鼠血清生化指标的影响

如图 2A 所示, MCD 组小鼠血清 TC、TG、HDL-C、LDL-C 含量明显低于 MCS 组 ( $P < 0.01$ ),与 MCD 组相比, ATO、EQG 给药 5 周后, LDL-C 含量显著升高

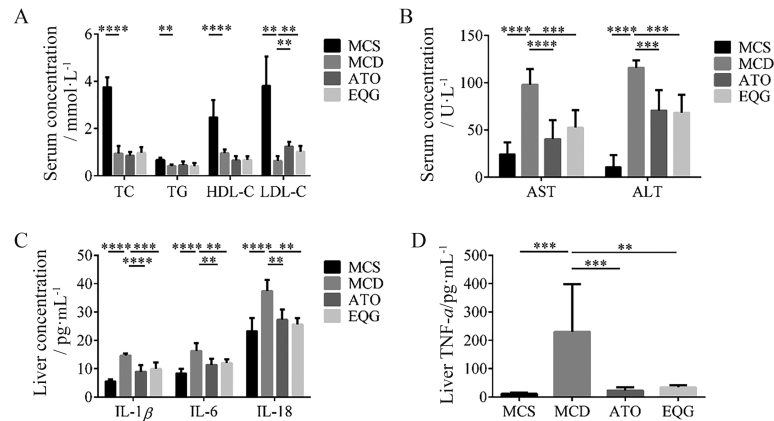


**Figure 1** The effect of EQG on livers of mice. A: The index of liver to body weight; B: Representative image of the liver. Scale bar: 5 mm; C: Histological examination detected by hematoxylin-eosin (HE) staining. Scale bar: 50 μm.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$

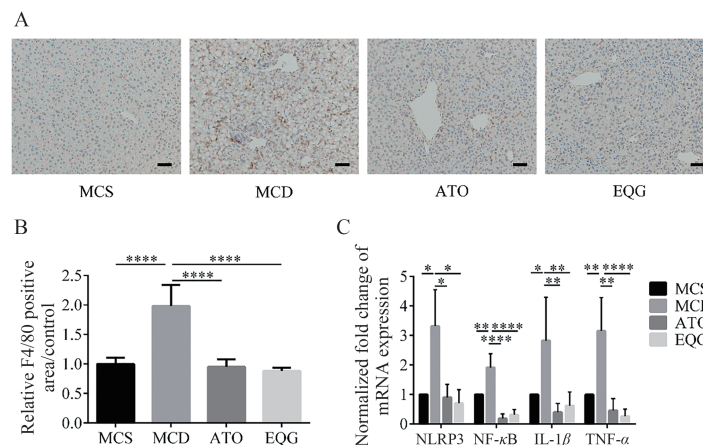
( $P < 0.01$ )。ALT和AST是评判肝损伤的重要指标。如图2B所示,与MCS组相比,MCD组小鼠血清中的AST和ALT含量显著升高( $P < 0.0001$ );与MCD组相比,ATO和EQG能显著降低血清中AST和ALT水平( $P < 0.001$ );与ATO组相比,EQG组小鼠血清TC、TG、HDL-C、LDL-C、AST和ALT含量并无显著差异。

#### 4 EQG对小鼠肝组织炎症因子的影响

使用ELISA试剂盒检测小鼠肝组织中炎症细胞因子IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-18、TNF- $\alpha$ 水平(图2C、D)。与MCS组相比,MCD组小鼠肝组织中的IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-18、TNF- $\alpha$ 水平显著升高( $P < 0.001$ );与MCD组相比,ATO和EQG组的IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-18、TNF- $\alpha$ 水平显著下降( $P < 0.01$ );EQG组与ATO组相比,并无显著差异。



**Figure 2** The effect of EQG on serum biochemical indices and inflammatory cytokines in liver tissues of mice. The levels of inflammatory cytokines in liver tissues were evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). A: The levels of serum total cholesterol (TC), triglycerides (TG), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C); B: The levels of aspartate transaminase (AST) and serum alanine transaminase (ALT); C: The levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-18; D: The level of TNF- $\alpha$ .  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ . \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$



**Figure 3** The effect of EQG on inflammation in mice livers induced by MCD diet. A: representative images of immunohistochemical (IHC) staining of F4/80. Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ ; B: Quantitative result of IHC staining of F4/80; C: The expression levels of mRNA associated with nuclear factor kappa B/Nod-like receptor protein 3 (NF- $\kappa\text{B}$ /NLRP3) in liver tissues by qPCR assay.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$

#### 5 EQG对小鼠肝组织F4/80蛋白的影响

如图3A、B所示,与MCS组比,MCD组小鼠巨噬细胞标志物F4/80蛋白的表达显著增加( $P < 0.0001$ );与MCD组比,ATO和EQG组小鼠肝组织中F4/80的表达显著降低( $P < 0.0001$ );EQG组与ATO组相比,并无显著差异。

#### 6 EQG对小鼠肝组织NF- $\kappa\text{B}$ /NLRP3通路相关基因的影响

采用qPCR法检测小鼠肝组织NF- $\kappa\text{B}$ /NLRP3通路相关基因的表达水平(图3C)。与MCS组相比,MCD组小鼠肝组织NF- $\kappa\text{B}$ 、NLRP3、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 的mRNA水平显著升高( $P < 0.05$ );与MCD组相比,EQG、ATO组的NF- $\kappa\text{B}$ 、NLRP3、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 的mRNA水平表达显著降低( $P < 0.05$ );EQG组与ATO组相比,并无显著差异。

### 7 EQG对小鼠肝组织NF-κB/NLRP3通路相关蛋白的影响

如图4所示,与MCS组相比,MCD组小鼠肝组织中IKKβ、NLRP3、ASC蛋白表达和NF-κB p65、caspase-1的活化显著上调,给药5周后,与MCD组相比,EQG组小鼠肝组织IKKβ、NLRP3、ASC蛋白表达和NF-κB p65、caspase-1的活化均显著下调( $P < 0.05$ ),与ATO相比,EQG能显著下调IKKβ蛋白( $P < 0.05$ )。

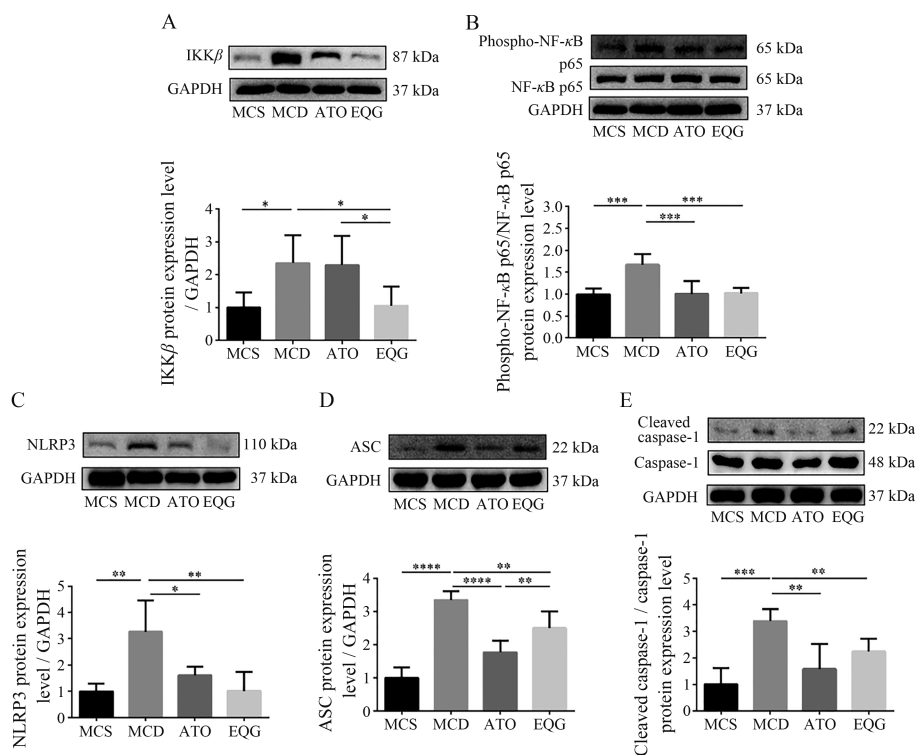
### 讨论

喂养MCD饲料可快速诱导出小鼠转氨酶升高和包括脂肪变性、局灶性炎症、肝细胞坏死和纤维化等NAFLD相关肝脏组织病理学变化,这些组织形态学与NASH患者的十分相似,且该模型的重复性好,因此常被用于研究药物治疗NAFLD有关抗炎、抗纤维化通路<sup>[18,19]</sup>。MCD饲料中缺乏蛋氨酸和胆碱,导致肝线粒体β氧化和极低密度脂蛋白(VLDL)合成受阻,TG无法输出而在肝脏中蓄积,因而,在本研究中MCD组小鼠出现体重减轻、血清中TG含量降低的现象。LDL-C大部分是由VLDL异化代谢转变而来,主要功能是将TC运输到全身组织。VLDL合成受阻,MCD组小鼠血清中LDL-C含量也随之下降,抑制了TC从肝脏运

输到组织,血清中TC含量也随之下降。MCD组小鼠血清中AST、ALT水平升高表明小鼠肝脏受损,喂养MCD饲料5周可在肝脏中观察到大泡性脂肪变性,表明MCD饲料成功诱导出NAFLD模型,相较于其他饮食诱导模型而言,时间较短。

在中医学上,非酒精性脂肪肝属于“胁痛”“肝癖”“积聚”等病症范畴,病变部位在肝,病机为痰、湿瘀阻肝络,治疗宜活血化痰、祛湿消积。二黄祛脂方中姜黄、大黄行气解郁,通腑化瘀,推陈致新,共为君药;丹参、白术、虎杖、水蛭养血活血、清热解毒、利胆退黄,葛根、荷叶、泽泻升清降浊,调节血脂,共为臣药;青礞石涤痰消食、软坚消痞,绞股蓝益气健脾、清热化痰,共为佐药;甘草和中解毒,善调诸药,为使药。诸药合用共奏健脾利湿、祛痰化瘀、消积导滞之功。与MCD组相比,EQG组小鼠血清中LDL-C含量升高,但TC、TG含量并无明显变化,推测EQG是直接作用于肝,促进其直接合成LDL-C。

在NAFLD病程中,炎症是促使单纯性脂肪肝发展为脂肪性肝炎的重要驱动因素之一<sup>[20]</sup>,因此,抑制其发展对NAFLD的治疗具有重要意义。NF-κB/NLRP3信号通路已被多次报道参与NAFLD中炎症反应<sup>[21-23]</sup>,并可激活HSC进而促进肝纤维化<sup>[24]</sup>。一般情况下,



**Figure 4** The expression levels of IκB kinase β (IKKβ, A), NLRP3 (C), apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC, D) and activation levels of NF-κB (B) and cysteinyl aspartate specific proteinase-1 (caspase-1, E) in liver tissues by Western blot.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$

NF- $\kappa$ B 与 I $\kappa$ B 蛋白结合分布在细胞质中, 不发挥作用, 当脂质沉积、巨噬细胞浸润小鼠肝脏时, I $\kappa$ B 激酶 (I $\kappa$ B kinase, IKK) 复合物 (IKK $\alpha$  和 IKK $\beta$ ) 被激活, 诱导 I $\kappa$ B $\alpha$  的磷酸化和降解, NF- $\kappa$ B 活化并转移到细胞核, 上调编码炎症介质的靶基因表达, 如 TNF- $\alpha$  和 IL-6, 也可上调 NLRP3、pro-IL-1 $\beta$  和 pro-IL-18 的转录, NLRP3 炎症小体组装完成后, 激活的 caspase-1 会切割 pro-IL-1 $\beta$  和 pro-IL-18, 促进 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的成熟, 从而扩大炎症反应。MCD 组小鼠肝组织中巨噬细胞标志物 F4/80 蛋白表达增多且 NF- $\kappa$ B、NLRP3、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的 mRNA 水平上调, IKK $\beta$ 、phospho-NF- $\kappa$ B p65、NLRP3、ASC 及 cleaved caspase-1 蛋白表达增加, 促炎细胞因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-18、TNF- $\alpha$  水平升高, 这些现象可表明 MCD 饲料可诱发巨噬细胞浸润小鼠肝脏, 激活 NF- $\kappa$ B/NLRP3 通路, 诱发炎症。在经过 5 周 EQG 的治疗, F4/80、IKK $\beta$ 、phospho-NF- $\kappa$ B p65、NLRP3、ASC 及 cleaved caspase-1 的蛋白表达下降, 表明 EQG 可减少浸润性巨噬细胞在肝脏中的聚集, 通过抑制 IKK $\beta$  蛋白表达抑制 NF- $\kappa$ B p65 的活化及后期 NLRP3 的转录和 caspase-1 的活化, 从而抑制 NF- $\kappa$ B/NLRP3 通路的表达, 减少 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-18、TNF- $\alpha$  炎症因子的分泌, 控制炎症。ATO 的治疗可抑制 NAFLD 小鼠肝脏中 NF- $\kappa$ B p65、caspase-1 的活化和下调 NLRP3、ASC 蛋白的表达, 但对 IKK $\beta$  的蛋白表达并无显著影响, 这说明 ATO 与 EQG 治疗 NAFLD 的作用机制略有差别, ATO 是通过直接抑制 NF- $\kappa$ B p65 的活化从而抑制 NLRP3 炎症小体的形成, 发挥抗炎作用。有研究表明 NLRP3 炎症小体也有可能是作为 NF- $\kappa$ B p65 信号的上游激活子<sup>[25]</sup>, 这反映了 NAFLD 中炎症反应的复杂性, 仍有待深入探究。

综上所述, 本研究发现 EQG 治疗 NAFLD 的机制可能与其抑制 NF- $\kappa$ B/NLRP3 信号通路有关。该研究为临床上治疗 NAFLD 开发新药提供参考依据, 也为众多患者提供了一个使用方便、质量稳定、符合卫生标准又经济的中药新剂型, 应予以临床推广。

**作者贡献:** 李斯完成相关实验、数据采集、分析及论文撰写; 陈文负责指导实验与修改论文。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Targher G, Tilg H, Byrne CD. Non-alcoholic fatty liver disease: a multisystem disease requiring a multidisciplinary and holistic approach [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2021, 6: 578-588.
- [2] Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA, et al. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. *Metab Clin Exp*, 2016, 65: 1038-1048.
- [3] Raeman R. Inflammation: the straw that broke the NAFLD liver! [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2022, 13: 1273-1274.
- [4] Gregorio ED, Colell A, Morales A, et al. Relevance of SIRT1-NF- $\kappa$ B axis as therapeutic target to ameliorate inflammation in liver disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 3858.
- [5] Knorr J, Wree A, Tacke F, et al. The NLRP3 inflammasome in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Semin Liver Dis*, 2020, 40: 298-306.
- [6] Wu X, Yuan M, He NS, et al. Effect of Erhuang quzhi granules on liver function and blood lipid in patients with nonalcoholic fatty liver disease [J]. *J Tradit Chin Med (中医杂志)*, 2021, 62: 1243-1246.
- [7] Shen C, Pan Z, Wu S, et al. Emodin palliates high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease in mice *via* activating the farnesoid X receptor pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 279: 114340.
- [8] Hu YZ, Li JM, Lu ZZ, et al. The effect of chrysophanol on high fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in neonatal rats [J]. *Immunol J (免疫学杂志)*, 2018, 34: 869-874.
- [9] Islam T, Katsani G, Koboziev I, et al. Curcumin reduces hepatic and white adipose tissue inflammation and expression of specific zinc transporters in diet-induced obese mice [J]. *Curr Dev Nutr*, 2021, 5: 325.
- [10] Saadati S, Sadeghi A, Mansour A, et al. Curcumin and inflammation in non-alcoholic fatty liver disease: a randomized, placebo controlled clinical trial [J]. *BMC Gastroenterol*, 2019, 19: 133.
- [11] Ghosh S. Curcumin as a potential therapeutic option for NAFLD and other metabolic diseases: need for establishing the underlying mechanism(s) of action [J]. *Hepatol Int*, 2019, 13: 245-247.
- [12] Lee JH, Oh JY, Kim SH, et al. Pharmaceutical efficacy of gypenoside LXXV on non-alcoholic steatohepatitis (NASH) [J]. *Biomolecules*, 2020, 10: 1426.
- [13] Yan T, Wang H, Cao L, et al. Glycyrrhizin alleviates nonalcoholic steatohepatitis *via* modulating bile acids and meta-inflammation [J]. *Drug Metab Dispos*, 2018, 46: 1310-1319.
- [14] Zhao LZ, Yan B, Sun XM, et al. Chemical constituents of Huangqi decoction and their mechanisms in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2021, 56: 3082-3090.
- [15] Wu XZ, Sun CG, Shang HC, et al. International expert consensus on clinical application of traditional Chinese medicine formula granules [J]. *Tradit Med Res*, 2021, 6: 7.
- [16] Qing DM, Zou N, Li C, et al. The invention relates to a traditional Chinese medicine composition for treating hyperlipidemia: China, 202210275417.3 [P]. 2021-3-21.
- [17] Su ZL, Hang PZ, Hu J, et al. Aloe-emodin exerts cholesterol-lowering effects by inhibiting proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 in hyperlipidemic rats [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41: 1085-1092.
- [18] Li XY, Wang TX, Huang XM, et al. Targeting ferroptosis

- alleviates methionine-choline deficient (MCD)-diet induced NASH by suppressing liver lipotoxicity [J]. *Liver Int*, 2020, 40: 1378-1394.
- [19] Schneider KM, Mohs A, Kilic K, et al. Intestinal microbiota protects against MCD diet-induced steatohepatitis [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 308.
- [20] Colak Y, Hasan B, Erkalma B, et al. Pathogenetic mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease and inhibition of the inflammasome as a new therapeutic target [J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2021, 45: 101710.
- [21] Flores-Costa R, Duran-Güell M, Casulleras M, et al. Stimulation of soluble guanylate cyclase exerts antiinflammatory actions in the liver through a VASP/NF- $\kappa$ B/NLRP3 inflammasome circuit [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117: 28263-28274.
- [22] Dong ZX, Zhuang Q, Ye X, et al. Adiponectin inhibits NLRP3 inflammasome activation in nonalcoholic steatohepatitis *via* AMPK-JNK/ErK1/2-NF- $\kappa$ B/ROS signaling pathways [J]. *Front Med*, 2020, 7: 546445.
- [23] Franceschetti L, Bonomini F, Rodella LF, et al. Critical role of NF $\kappa$ B in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease: a widespread key regulator [J]. *Curr Mol Med*, 2021, 21: 495-505.
- [24] Sommerhalder C, Cummins CB, Wang X, et al. HJC0416 attenuates fibrogenesis in activated hepatic stellate cells *via* STAT3 and NF- $\kappa$ B pathways [J]. *J Surg Res*, 2021, 261: 334-342.
- [25] Kelley N, Jeltema D, Duan Y, et al. The NLRP3 inflammasome: an overview of mechanisms of activation and regulation [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 3328.