

doi:10.3969/j.issn.1671-038X.2012.05.007

六味地黄汤对非酒精性脂肪性肝病大鼠 SREBP-1c 和 LXR- α 基因表达的影响

黄妙珍¹, 傅珍春¹, 谢军军², 孙丽伟³

¹ 杭州师范大学临床医学院 中医学教研室, 浙江 杭州 310036;

² 杭州师范大学临床医学院 内科实验室, 浙江 杭州 310036;

³ 杭州师范大学附属医院 消化科, 浙江 杭州 310015)

摘要:[目的]探讨六味地黄汤对非酒精性脂肪性肝病大鼠固醇调节元件结合蛋白(SREBP-1c)和肝 X 受体(LXR- α)的影响。[方法]选择雄性 SD 大鼠,随机分 3 组:正常组,六味地黄汤组(治疗组)和模型组。正常组喂养普通饲料,模型组和治疗组喂养高脂饲料建立非酒精性脂肪性肝病模型,治疗组并用六味地黄汤干预治疗;荧光定量 RT-PCR 检测各组大鼠 SREBP-1c 和 LXR- α 的基因表达。[结果]模型组大鼠 SREBP-1cmRNA 和 LXR- α mRNA 的相对表达均高于正常组(分别为 $t=2.361, P<0.05$ 和 $t=3.118, P<0.01$);与模型组相比,治疗组能显著降低 SREBP-1cmRNA 和 LXR- α mRNA 的表达(分别为 $t=3.816, P<0.01$ 和 $t=3.36, P<0.01$)。[结论]六味地黄汤能降低 SREBP-1c 和 LXR- α 的基因表达,改善脂质代谢。

关键词:非酒精性脂肪性肝病; 六味地黄汤; 固醇调节元件结合蛋白-1c; 肝 X 受体- α

中图分类号:R 575.5

文献标志码:A

文章编号:1671-038X(2012)05-0212-04

Effect of Liuweidihuang decoction on sterol regulatory element binding protein -1c and liver X receptor α in the nonalcoholic fatty liver disease of rats

HUANG Miao-zhen¹, FU Zhen-chun¹, XIE Jun-jun², SUN Li-wei³

(¹Traditional Chinese Medicine Teaching and Research Room, Clinical Medical School Hangzhou University, Hangzhou 310036, China; ²Medical Laboratory, Clinical Medical School, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China; ³Digestive Department, Affiliated Hospital of Hangzhou Normal University, Hangzhou 310015, China)

Corresponding author: HUANG Miao-zhen, E-mail: hmzhope@163.com

Abstract:[Objective]To explore the effect of Liuweidihuang decoction on sterol regulatory element binding protein -1c(SREBP-1c)and liver X receptor α (LXR- α)in the nonalcoholic fatty liver disease(NAFLD)of rats. [Methods]Male Sprague-Dawley rats were randomly divided into model group, treatment group, normal group. To produce a fatty liver model, a high-fat diet was given for ten weeks. The normal group rats were fed normal diet. The treatment group was given Liuweidihuang decoction while model group and normal group were given distilled water for six weeks. The expressions of SREBP-1cmRNA and LXR- α mRNA in rats liver were measured by fluorescent quantitation reverse transcription-polymerase chain reaction. [Results]The expression of SREBP-1cmRNA and LXR- α mRNA in model group was higher than the normal group($t=2.361$,

收稿日期:2012-03-20

基金项目:杭州市科技局资助项目(No:20090833B25)

作者简介:黄妙珍,教授,主任医师;主要从事脂肪肝的基础研究

通讯作者:黄妙珍, E-mail: hmzhope@163.com

$P < 0.05$ and $t = 3.118$, $P < 0.01$ respectively). The expression of SREBP-1c mRNA and LXR- α mRNA in treatment group was lower than that of the model group ($t = 3.816$, $P < 0.01$; $t = 3.36$, $P < 0.01$ respectively). [Conclusion] Liuweidi Huang decoction could reduce the expression of SREBP-1c mRNA and LXR- α mRNA in the nonalcoholic fatty liver disease of rats.

Key words: nonalcoholic fatty liver disease; Liuweidi Huang decoction; sterol regulatory element binding protein-1c; liver X receptor α

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是指由肝细胞脂肪变性发展到炎症纤维化的一组疾病谱^[1]。NAFLD 常合并脂代谢紊乱,而六味地黄汤能改善脂肪肝患者的血脂水平^[2-3]。固醇调节元件结合蛋白-1c(sterol regulatory element binding protein-1c, SREBP-1c)主要在啮齿类动物和人类的肝脏和脂肪细胞表达,是参与脂肪合成基因的主要转录调节因子^[4]。肝 X 受体(liver X receptor α , LXR- α)为目前研究发现的与 NAFLD 的发生发展密切相关的一种核转录因子,可通过上调其下游与脂质合成相关的基因(如 SREBP-1c)的表达,促进脂质在肝脏沉积,从而与 NAFLD 的发生和发展密切相关^[5-6]。本研究从 SREBP-1c 和 LXR- α 角度探讨六味地黄汤对 NAFLD 大鼠的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 50 只 SD 大鼠,购自上海斯莱克动物实验有限责任公司(许可证号: SCK(沪)2003-0003),清洁级,雄性,体质量 180~220 g。

1.1.2 药品 六味地黄汤由熟地、山茱萸、山药、泽泻、丹皮、茯苓以 24:12:12:9:9:9 比例组成。按处方购置药材,清水浸泡 2 h,加水煎煮 2 h,浓缩成 1.25 g/ml 药液,4 层纱布过滤,高压蒸气锅灭菌消毒,4℃冰箱保存备用。

1.1.3 主要试剂 逆转录试剂盒:宝生物工程(大连)有限公司,TRIzol;上海生工工程技术服务有限公司,氯仿;上海生工工程技术服务有限公司,Perfect RealTime - SYBR Premix EX Taq™ 试剂盒:宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 模型建立及干预 大鼠适应性饲养 3d 后,随机分 3 组:正常组(10 只),六味地黄汤组(治疗组,20 只)和模型组(20 只)。正常组喂养普通饲料,模型组和治疗组喂养高脂饲料(含猪油 18.4%,胆固醇 1%,胆盐 0.2%)。实验第 10 周处死模型组和治疗组各 5 只,肝脏病理切片显示造模成功。第 10 周后治疗组每天灌服六味地黄汤,按 1 ml/100 g 体

质量计算,相当于成人剂量的 10 倍。正常组和模型组灌服等量蒸馏水。各组饲料不变。

1.2.2 标本收集 实验 16 周后各大鼠禁食不禁水 16 h,腹腔注射 10%水合氯醛(4 ml/kg)麻醉后股动脉取血,取相同部位左肝组织小块,10%中性甲醛液固定,作病理检测。肝右叶中部取数块肝组织置于冷冻试管,液氮速冻后-80℃冰箱保存备用。

1.2.3 血清指标的测定 采用全自动生物化学仪测定血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、游离脂肪酸(FFA)。

1.2.4 肝组织测定 从-80℃冰箱中取出肝组织,称重后剪碎,以 1:9 的比例准备 0.9%氯化钠溶液,用玻璃匀浆器中,制成 10%的肝组织匀浆,以 3 500 次/min 离心 15 min,取上清用全自动生物化学仪测定肝组织 TG、TC、FFA。

1.2.5 肝组织的病理观察 取大鼠肝左叶组织以 10%甲醛固定,经脱水、浸蜡包埋、切片(厚 4 μ m)、切片脱蜡、苏木精-伊红(H-E)染色、脱水、封片,放大 200 倍观察。

1.2.6 荧光定量 PCR 检测 SREBP-1c、LXR- α 的 mRNA ①合成相关引物:采用 Primer 5.0 引物设计软件和引物设计原则进行荧光引物的设计,然后由上海生物工程有限公司负责合成,引物序列(5'→3'): SREBP-1c 上游: CGGGCAGCGAGTGAG-CAT, SREBP-1c 下游: CGGGGTGAGAGCCTT-GAGAC,扩增片段长度 356bp; LXR- α 上游: AT-TCTTCCGCCGAGTGTCATCA, LXR- α 下游: GGGCAGCCACCAACTTCTCAATC,扩增片段长度 302 bp; GAPDH 上游: GACAACTTTG-GCATCGTGGA, GAPDH 下游: ATGCAGGGAT-GATGTTCTGG,扩增片段长度 133bp。②总 RNA 提取:取出冷冻的肝组织,液氮研磨,加入预冷 TRIzol 试剂 300 μ l 混匀,室温放置 5 min;;加入氯仿 0.2 ml,用力振摇,室温放置 2~3 min;最大转速 12 000 次/min 离心 15 min,吸取上层水相,移置另一离心管;加入 0.5 ml 异丙醇,将管中液体轻轻混匀,室温静置 10 min;4℃最大转速 12 000 次/min

离心 10 min,弃上清;加入 75%乙醇 1 ml,充分洗涤沉淀后于 4℃、10 000 次/min 离心 5 min,弃上清,室温干燥;加入 20 μl 的 DEPC 水溶解。③逆转录反应:短暂离心后,加入如下组分:5×第一链反应缓冲液 2 μl,Oligo dT 引物 0.5 μl 逆转录酶 0.5 μl,总 RNA 2 μl,采用 DEPC 水补齐到 10 μl;轻轻混匀后,混合物在 37℃中放置 20 min;85℃加热 15 s 终止反应。④荧光定量 PCR:PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳,紫外透视分光仪观察并摄片,经凝胶密度扫描系统处理,测定各电泳灰度值。各反应体系以 GAPDH mRNA 的 RT-PCR 产物为内参照,计算待测 mRNA 的 RT-PCR 产物与它的灰度比值,作为待测 mRNA 的表达值。PCR 反应条件:94℃ 5 min,再将反应条件变为 94℃、15s,60℃、45s,循环扩增 40 次。60℃检测荧光值。

1.3 统计学处理方法

所有数据处理分析应用 SPSS 统计软件进行单因素分析。计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间比较采用单因素 t 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠肝脏大体及病理观察

肉眼观正常组肝表面颜色普遍暗红,色泽鲜亮,中等硬度,切面略有颗粒感,无油腻感;模型组多数肝脏表面颜色发黄,肝脏体积明显增大,包膜紧张,部分肝脏呈奶黄色,切面油腻,有油滴,无颗粒感。治疗组颜色、质地介于两者之间,肝脏较正常组偏大,大部分红润,个别淡黄,略增厚。

H-E 染色切片光镜下观察可见,正常组大鼠肝组织的形态学表现正常,肝小叶结构完整,肝细胞索清晰;治疗组大鼠肝小叶结构紊乱,肝细胞明显肿胀,有较多的脂滴存在;模型组大鼠肝小叶结构紊乱明显,广泛肝细胞变性,脂肪变肝细胞>75%,腺泡内点状坏死,门管区轻~中度炎症。各组大鼠病理观察见图 1。

2.2 各组大鼠血清指标变化

模型组和治疗组肝功能 ALT 较正常组升高(P

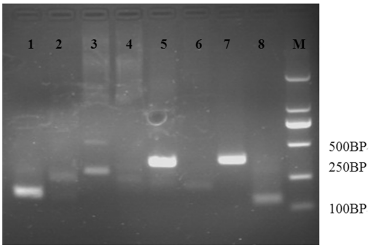
<0.05);各组 AST 相比较差异无统计学意义($P>0.05$);模型组和治疗组 TC 较正常组升高(分别 $P<0.05, P<0.01$),正常组 TG、FFA 与模型组无差异。

2.3 各组大鼠肝组织指标变化

模型组和治疗组肝组织 TG、TC、FFA 均明显高于正常组($P<0.01$)。

2.4 各组大鼠肝组织 SREBP-1c、LXR-α 的基因表达

用荧光实时定量 RT-PCR 检测 3 组大鼠肝组织 SREBP-1、LXR-α 的基因表达,SREBP-1c、LXR-α 的 RT-PCR 产物电泳结果见图 2,与预期设计的目的片段大小相同。模型组大鼠 SREBP-1c mRNA 和 LXR-α mRNA 的相对表达均高于正常组(分别为 $t=2.361, P=0.030<0.05$ 和 $t=3.118, P=0.006<0.01$);与模型组相比,治疗组能显著降低 SREBP-1c mRNA 和 LXR-α mRNA 的表达(分别为 $t=3.816, P=0.004<0.01$ 和 $t=3.36, P=0.003<0.01$);详见表 1。

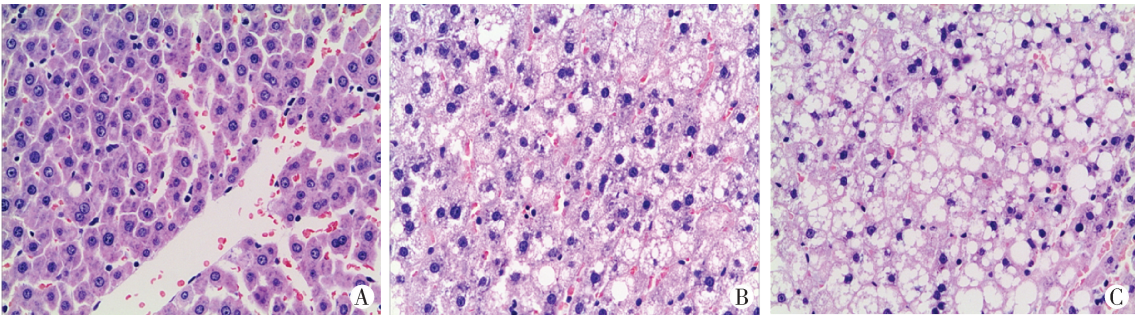


3:LXR-α 5:SREBP-1c 8:GAPDH M:marker
图 2 肝脏 LXR-α、SREBP-1c mRNA 的表达

表 1 各组大鼠肝组织 SREBP-1c mRNA、LXR-α mRNA 的表达 $\bar{x} \pm s$

组别	例数	SREBP-1c mRNA	LXR-α mRNA
正常组	10	237.65±160.86	78.77±44.03
治疗组	15	112.64±47.03 ¹⁾³⁾	71.51±33.05 ³⁾
模型组	15	507.59±323.87 ¹⁾	214.82±130.26 ²⁾

与正常组比较,¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较,³⁾ $P<0.01$ 。



A: 正常组;B: 治疗组;C: 模型组

图 1 各组大鼠病理图片(H-E 染色,×200)

3 讨论

NAFLD 是一种以无过量饮酒史的肝实质细胞脂肪变性和脂肪贮积为特征的临床病理综合征。多种因素参与了 NAFLD 的发病过程,其中脂质代谢异常是最关键和基础环节之一。固醇调节元件结合蛋白(sterol regulatory element binding protein, SREBPs)是一类位于内质网上的膜连接蛋白。SREBPs 异构体有 SREBP-1a、1c 和 SREBP-2。SREBP-1c 主要在啮齿类动物和人类的肝脏和脂肪细胞表达,是参与脂肪合成基因的主要转录调节因子,又称脂肪细胞定向和分化因子 1(ADD1)^[4]。SREBP-1c 是调控细胞内脂质积聚的关键分子,当食物富含碳水化合物时,它能将葡萄糖转化为 TG。通过转基因小鼠和基因剔除小鼠的研究发现 SREBP-1c 主要与脂肪酸代谢和糖代谢有关^[7]。高脂饮食引起幼年大鼠 SREBP-1c 表达增强^[8],成年大鼠 SREBP-1c 表达增强,脂肪酸代谢失衡, TG 合成增多,引起 NAFLD 发生^[9]。LXRs 属于孤核受体超家族,是目前为国内外学者所关注的脂代谢通路的关键信号因子,已知的主要有 LXR- α 和 LXR- β 两种同源亚型,其中肝脏以 LXR- α 的表达最多。LXR- α 激活剂 TO901317 可诱导小鼠肝脏 SREBP-1c 的表达^[10]。国内外的研究还发现 NAFLD 患者和 NAFLD 模型大鼠肝脏 LXR- α 的表达均明显高于正常对照组^[11-13],且 NAFLD 患者 LXR- α 的表达与 SREBP-1c 的表达密切相关^[11]。本实验结果显示,模型组大鼠 SREBP-1c mRNA 和 LXR- α mRNA 的相对表达量高,而六味地黄汤能降低 SREBP-1c mRNA 和 LXR- α mRNA 的表达量,显示了六味地黄汤的作用机制;但治疗组血清和肝组织血脂水平与模型组比较无明显差异,可能与治疗时间短有关。

NAFLD 的治疗包括病因治疗和病机治疗。中医认为,NAFLD 多因饮食不节、起居无常、情志失调、久病体虚,引起肝失疏泄、脾失健运、湿邪内生、痰浊内蕴、肾精亏损、痰浊不化、酿脂为膏、异位沉积于肝内、阻滞肝脉而导致,与痰、湿、瘀、积有关。病位主要在肝,与胆、脾、肾关系密切。肾者主水,受五脏六腑之精而藏之,肝肾同源,肾精亏耗则水不能滋木,肾阴虚损累及肾阳命门以致肝失疏泄,脾失健运,血脂失之运化,血行涩滞,瘀血内停。而且肾精亏虚,膏脂不藏,化入血中,痰瘀互结以致血脂升高,沉积于肝形成脂肪肝,可见,脂肪肝的形成是一个正虚邪实的病理过程,与肾虚有密切关系。

六味地黄汤中熟地滋阴养血补肾,山茱萸养肝肾而涩精,山药补脾阴而固精,茯苓淡渗健脾,泽泻清泄肾火,丹皮清泄肝火,各药合用,使之滋补不留邪,降泄而不伤正。从整体上滋阴补肾,局部上祛痰化湿,并为传统中药组方在脂肪肝的治疗中提供了实验依据,其机制有待进一步研究探讨。

参考文献

- [1] MAGER D, ROBERTS E. Nonalcoholic fatty liver disease[J]. Can Med Assoc J, 2005, 173: 735-735.
- [2] 肖建珍, 龙湘珍, 冯会明, 等. 六味地黄汤加减治疗脂肪肝 67 例[J]. 中国实验方剂学杂志, 2002, 8(4): 51-52.
- [3] 陈国新. 六味地黄丸加味治疗脂肪肝 64 例[J]. 陕西中医, 2004, 25(9): 778-779.
- [4] JUMP B D, BOTOLIN D, WANG Y, et al. Fatty acid regulation of hepatic gene transcription [J]. J Nutr, 2005, 135: 2503-2506.
- [5] CHAWLA A, REPA J J, EVANS R M, et al. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files[J]. Science, 2001, 294: 1866-1870.
- [6] HIGUCHI N, KATO M, SHUNDO Y, et al. Liver X receptor in cooperation with SREBP-1c is a major lipid synthesis regulator in nonalcoholic fatty liver disease [J]. Hepatol Res, 2008, 38: 782-783.
- [7] WANG H, KOURI G, WOLLHEM G B. ER stress and SREBP-1 activation are implicated in beta-cell glucolipotoxicity[J]. J Cell Sci, 2005, 118(pt17): 3905-3915.
- [8] 苏慧敏, 张知新, 潘琳, 等. 高脂饮食诱导幼鼠脂肪肝模型的建立及其相关代谢研究[J]. 中华肝脏病杂志, 2010, 18(1): 54-58.
- [9] 艾正琳, 陈东风. SREBP-1c 在大鼠非酒精性脂肪性肝病中的表达意义[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(10): 1063-1065.
- [10] WEI Ming-fen, 王冰, 程丽静, 等. 肝 X 受体的激活对小鼠糖尿病肝脏脂肪酸合成酶表达的调节[J]. 中华医学杂志, 2008, 88(12): 848-852.
- [11] HIGUCHI N, KATO M, SHUNDO Y, et al. Liver X receptor in cooperation with SREBP-1c is a major lipid synthesis regulator in nonalcoholic fatty liver disease [J]. Hepatol Res, 2008, 38: 1122-1129.
- [12] 艾正琳, 陈东风. 非酒精性脂肪性肝病大鼠肝 X 受体 α 基因表达变化及意义[J]. 中华肝脏病杂志, 2007, 15(2): 127-130.
- [13] 陈洁, 郑瑞丹, 徐成润, 等. LXR- α 在大鼠非酒精性脂肪肝组织中的表达及其意义[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2009, 23(4): 265-268.