小白薇不同萃取物对非酒精性脂肪性肝炎的改善作用及机制Δ

乔　雪*，李欣坪，薛咏梅，方琼莲，王蒙蒙，林玉萍#（云南中医药大学中药学院/云南省南药可持续利用重点实验室，昆明　650500）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）10-1182-05
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.10.06

摘　要　目的　探讨小白薇不同萃取物对非酒精性脂肪性肝炎（NASH）的改善作用和作用机制。**方法**　用游离脂肪酸诱导人正常肝细胞LO2脂肪变性，实验分为正常组、模型组、水飞蓟宾组（100 μmol/mL）、小白薇乙醇萃取物（TYS）组（50 μg/mL）、小白薇乙酸乙酯萃取物（TYSA）组（50 μg/mL）、小白薇正丁醇萃取物（TYSB）组（50 μg/mL），药物干预24 h后观察各组LO2细胞内的脂滴沉积情况，检测细胞内总胆固醇（TC）、三酰甘油（TG）、丙二醛（MDA）、谷胱甘肽（GSH）含量和天冬氨酸转氨酶（AST）、丙氨酸转氨酶（ALT）、超氧化物歧化酶（SOD）活性以及Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1（Keap1）、核因子E2相关因子2（Nrf2）、血红素氧合酶1（HO-1）mRNA表达水平。用高脂饮食诱导建立NASH大鼠模型，实验分为正常组、模型组、水飞蓟宾组（12.6 mg/kg）、TYS组（80 mg/kg）、TYSA组（80 mg/kg）、TYSB组（80 mg/kg），每组6只。药物干预6周后计算各组大鼠的肝脏指数，观察肝脏病理形态变化，检测血清中TC、TG、HDL-C、LDL-C含量和AST、ALT活性以及肝组织中MDA、GSH含量和SOD活性。**结果**　与模型组比较，TYS、TYSA、TYSB可降低LO2细胞脂肪变性后的脂滴沉积和细胞内TC、TG、MDA含量以及AST、ALT活性，升高SOD活性、GSH含量和Keap1、Nrf2、HO-1 mRNA表达水平，部分差异有统计学意义（$P<0.05$）；还可显著改善NASH模型大鼠的肝损伤，降低其肝脏指数和TC、TG、LDL-C、MDA含量以及AST、ALT活性，升高HDL-C（TYS、TYSB除外）、GSH含量和SOD活性，以TYSA效果最明显（$P<0.05$）。**结论**　TYS、TYSA、TYSB对NASH具有一定的改善作用，其中TYSA效果最明显；其作用机制可能与上调Keap1/Nrf2/HO-1信号通路，抑制氧化应激有关。

关键词　小白薇；非酒精性脂肪性肝炎；游离脂肪酸；正常肝细胞LO2；肝功能；抗氧化活性；大鼠

Improvement effect and mechanism of different extracts from *Tylophora yunnanensis* on non-alcoholic steatohepatitis

QIAO Xue, LI Xinping, XUE Yongmei, FANG Qionglian, WANG Mengmeng, LIN Yuping (School of Chinese Materia Medica/Yunnan Key Laboratory of Southern Medicinal Resource, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the improvement effect and mechanism of different extracts from *Tylophora yunnanensis* on non-alcoholic steatohepatitis (NASH). **METHODS** Normal human liver LO2 cells were induced to steatosis by free fatty acid, then were divided into normal group, model group, silybin group (100 μmol/mL), *T. yunnanensis* ethanol extracts (TYS) group (50 μg/mL), *T. yunnanensis* ethyl acetate extracts (TYSA) group (50 μg/mL), and *T. yunnanensis* n-butanol extracts (TYSB) group (50 μg/mL). After 24 hours of drug intervention, the deposition of lipid droplets was observed in LO2 cells in each group. The contents of total cholesterol (TC), triacylglycerol (TG), malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH), the activities of aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT) and superoxide dismutase (SOD), the mRNA expressions of Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) and heme oxygenase 1 (HO-1) were detected. NASH rat model was induced by a high-fat diet, and then divided into normal group, model group, silybin group (12.6 mg/kg), TYS group (80 mg/kg), TYSA group (80 mg/kg) and TYSB group (80 mg/kg), with six rats in each group. The liver indexes of rats in each group were calculated after 6 weeks of drug intervention. The liver histopathological changes were observed, and the contents of TC, TG, HDL-C and LDL-C, AST and ALT activities in serum, the contents of MDA and GSH, SOD activities in liver tissue were detected. **RESULTS** Compared with model group, TYS, TYSA and TYSB could reduce lipid droplet deposition, intracellular TC, TG and MDA contents, AST and ALT activities, and increase SOD activity, GSH content, and Keap1, Nrf2, HO-1 mRNA expression levels in LO2 cells after steatosis to varying degrees, with some differences being statistically significant ($P<0.05$). They also significantly improved liver injury in NASH model rats, reduced their liver indexes, TC, TG, LDL-C and MDA contents, AST and ALT activities, and increased HDL-C (except for TYS and TYSB), GSH contents and SOD activity, with TYSA having the most significant effect ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** TYS, TYSA and TYSB have a certain improvement effect on NASH,

Δ **基金项目** 国家自然科学基金资助项目（No.82160781）；云南省应用基础研究项目-中医联合专项面上项目（No.202001AZ070001-042）

* **第一作者** 硕士研究生。研究方向：中药质量控制。E-mail：1208734974@qq.com

通信作者 教授，硕士生导师，硕士。研究方向：中药或天然药物活性成分。E-mail：11217005@qq.com

among which TYSA has the most obvious effect. Its mechanism of action may be related to upregulating the Keap1/Nrf2/HO-1 signaling pathway and inhibiting oxidative stress

KEYWORDS *Tylophora yunnanensis*; non-alcoholic steatohepatitis; free fatty acids; normal liver cells LO2; liver function; antioxidant activity; rat

非酒精性脂肪性肝病（non-alcoholic fatty liver disease，NAFLD）是一种代谢综合征，全球患病率约为25%，我国患病率为17%～33%，已成为全球最常见的慢性肝病之一，并将很快取代丙型肝炎成为肝移植的主要原因[1]。NAFLD包括非酒精性脂肪肝（non-alcoholic fatty liver，NAFL）和非酒精性脂肪性肝炎（non-alcoholic steatohepatitis，NASH）。NASH可发展为肝纤维化、肝硬化和肝细胞癌，严重威胁患者的生命健康[2－3]。因此，探寻有效预防NASH的药物具有重要意义。

小白薇是云南楚雄地区彝族广泛使用的一种野生药材，是萝藦科娃儿藤属植物云南娃儿藤 *Tylophora yunnanensis* Schltr.的根，广泛分布于西南及广西等地。其味苦、涩、性寒，归肝、脾经，具有舒筋活络、活血止痛等功效，民间常用于治疗风湿骨痛、肝炎、肾炎、痢疾等[4]，但其作用机制尚不明确。本研究为明确小白薇活性部位，以及为活性成分的追踪提供指导，考察了小白薇不同萃取物对LO2细胞脂肪变性后细胞内脂滴、脂质水平、氧化应激水平的影响，以及对高脂饮食诱导的NASH模型大鼠血清脂质水平和肝组织中氧化应激水平的影响。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括Infinite M200 Pro型酶标仪（瑞士Tecan公司）、JB-P5包埋机（武汉俊杰电子有限公司）、MCO-20AIC型CO_2培养箱（日本Sanyo公司）、RM2016型病理切片机（上海徕卡仪器有限公司）、ECLIPSE型倒置显微镜和NIKON DS-U3型成像系统（日本Nikon公司）。

1.2 主要药品与试剂

小白薇药材购于云南昆明，采购时间为2017年7月，药材经云南中医药大学药用植物教研室普春霞副教授鉴定为萝藦科娃儿藤属植物云南娃儿藤 *T. yunnanensis* Schltr.的根。水飞蓟宾胶囊（阳性对照药物，批号150202012，规格每粒含水飞蓟宾35 mg）购于天津天士力圣特制药有限公司；油红O染液、苏木精-伊红（HE）染液（批号分别为20220318、ZH202812）均购于北京索莱宝科技有限公司；油酸钠、棕榈酸钠（批号分别为C04D10A104983、C04D10A104981）均购于上海源叶生物科技有限公司；总胆固醇（total cholesterol，TC）、三酰甘油（triacylglycerol，TG）、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）、丙氨酸转氨酶（alanine transaminase，ALT）、天冬氨酸转氨酶（aspartate transaminase，AST）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、丙二醛（malondialdehyde，MDA）、谷胱甘肽（glutathione，GSH）测定试剂盒（批号分别为20191102、20191203、201911202、20191129、20191129、20191130、20220822、20220718、20220721）均购于南京建成生物工程研究所；SOD、MDA、GSH测定试剂盒（批号分别为20111011R、20111016R、20111008R）均购于江苏酶免实业有限公司；逆转录试剂盒、荧光定量聚合酶链式反应（PCR）试剂盒（批号分别为1174412081、1334412151）均购于江苏愚公生命科技有限公司；4%多聚甲醛通用性组织固定液（批号HJ203501）购于武汉市盖云天生物技术有限公司；甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）内参引物（批号I801KA5685）购于生工生物工程（上海）股份有限公司；乙醇、乙酸乙酯、正丁醇均为分析纯，水为超纯水。

1.3 实验动物与饲料

6～8周SPF级雄性SD大鼠36只，体质量190～210 g，购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司，动物生产许可证号为SCXK（湘）2016-0002。基础饲料购于江苏美迪森生物医药有限公司。将82.5%基础饲料、10%猪油、5%蛋黄粉、2%胆固醇、0.5%胆酸钠混匀，制备成形后于50 ℃烘干，即得高脂饲料。本实验方案经云南中医药大学实验动物伦理委员会批准（批准号为R062019046）。

1.4 细胞

人正常肝细胞LO2购于中国科学院昆明细胞库。

2 方法

2.1 小白薇萃取物的制备

将小白薇药材粉碎，取粉末2 kg，加入8倍量的95%乙醇，浸泡后回流提取3次，合并3次滤液，浓缩，得小白薇醇提物（TYS，得率24.74%）。取部分TYS，加水溶解成混悬溶液，先用小极性乙酸乙酯萃取3次后，再用大极性正丁醇萃取3次，分别合并相同的萃取液，经浓缩后冷冻干燥，得小白薇乙酸乙酯萃取物（TYSA，得率16.23%）和小白薇正丁醇萃取物（TYSB，得率22.57%）。

2.2 体外实验

2.2.1 分组与给药 取LO2细胞，用含10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素的DMEM完全培养液，在培养箱中培育至80%增长时进行实验，并在前期实验基础上设计分组与给药剂量。将1×10^5个/mL细胞接种于6孔板中，分为正常组、模型组、水飞蓟宾组（100 μmol/mL）、TYS组（50 μg/mL）、TYSA组（50 μg/mL）、TYSB组（50 μg/mL），每组3个复孔。待细胞贴壁后，除正常组外，其余各组均用1 mmol/L游离脂肪酸（油酸钠-棕榈酸钠质量比为2∶1）诱导24 h使细胞脂肪变性，再加入相应药物干预24 h。

2.2.2 细胞内脂质、肝功能和抗氧化相关指标的测定 按

“2.2.1”项下方法分组、给药后，收集细胞，用磷酸盐缓冲液（PBS）清洗3次，加入PBS 1 mL，收集细胞悬液，以2 000 r/min离心5 min，弃去上清液，加入2%Triton X-100反复冻融3次，按试剂盒说明书操作，测定LO2细胞内TG、TC、MDA、GSH含量和AST、ALT、SOD活性。

2.2.3　细胞内脂滴沉积的观察　按“2.2.1”项下方法分组、给药后，弃去药液，用PBS清洗，加入4%多聚甲醛溶液固定，再用PBS清洗后加入60%异丙醇漂洗，用配制好的油红O染液避光染色，弃去染色液后加入60%异丙醇分化，随后加入蒸馏水终止染色，在显微镜下观察脂滴沉积并拍照。

2.2.4　细胞内Keap1、Nrf2、HO-1 mRNA表达的测定　按“2.2.1”项下方法分组、给药后，提取细胞内RNA，经过逆转录后，运用实时定量PCR法检测细胞内Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1（Kelch-like ECH-associated protein，Keap1）、核因子E2相关因子2（nuclear factor E2-related factor 2，Nrf2）、血红素氧合酶1（heme oxygenase 1，HO-1）mRNA表达水平。扩增条件（反应体系20 μL）为：95 ℃预变性30 s；95 ℃变性10 s，60 ℃退火延伸30 s，共40个循环。以GAPDH为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算目标基因的mRNA的表达水平。各引物由江苏愚公生物科技有限公司设计合成，其引物序列与产物长度见表1。

表1　引物序列与产物长度

目标基因	引物序列	产物长度/bp
Keap1	上游：5′-GTGTCCATTGAGGGTATCCACC-3′	41
	下游：5′-GCTCAGCGAAGTTGGCGAT-3′	
Nrf2	上游：5′-TCAGCGACGGAAAGAGTATGA-3′	43
	下游：5′-CCACTGGTTTCTGACTGGATGT-3′	
HO-1	上游：5′-AAGACTGCGTTCCTGCTCAAC-3′	42
	下游：5′-AAAGCCCTACAGCAACTGTCG-3′	

2.3　体内实验

2.3.1　建模、分组与给药　在前期实验基础上设计分组与给药剂量。将36只大鼠适应性饲养1周后，随机分为正常组、模型组、水飞蓟宾组（12.6 mg/kg）、TYS组（80 mg/kg）、TYSA组（80 mg/kg）、TYSB组（80 mg/kg），每组6只。正常组大鼠给予基础饲料；其余各组大鼠给予高脂饲料，饲养12周建立NASH大鼠模型。建模成功后，正常组和模型组每天给予同体积的生理盐水，各给药组大鼠分别给予相应药液，每天1次，连续灌胃6周。

2.3.2　大鼠体质量的测定　给药期间每周测定各组大鼠的体质量。

2.3.3　大鼠肝脏指数的计算　各组大鼠末次给药后禁食12 h，然后用10%戊巴比妥钠麻醉，取血后处死，迅速取出肝脏，用生理盐水清洗并吸干多余水分，记录肝脏湿质量并计算肝脏指数：肝脏指数＝肝脏湿质量/体质量×100%。

2.3.4　肝脏病理形态学观察　取各组大鼠肝组织，用4%多聚甲醛溶液固定，常规石蜡包埋、切片（厚5～7 μm）后，用HE染色，在显微镜下观察并拍照。

2.3.5　血清中血脂和肝功能相关指标的测定　取“2.3.3”项下大鼠全血，于4 ℃下以3 500 r/min离心10 min，取上层血清，按试剂盒说明书操作，测定各组大鼠血清中TC、TG、HDL-C、LDL-C含量和AST、ALT活性。

2.3.6　肝组织中抗氧化相关指标的测定　取各组大鼠肝组织，用生理盐水清洗后，按肝组织（g）与生理盐水（mL）1∶9的比例制备肝匀浆，于4 ℃下以3 500 r/min离心15 min，取上清液，按试剂盒说明书操作，测定各组大鼠肝组织中MDA、GSH含量和SOD活性。

2.4　统计学方法

利用SPSS 21.0软件进行统计分析。数据用$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较方差齐时采用LSD-t检验，方差不齐时采用非参数检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3　结果

3.1　体外实验

3.1.1　小白薇不同萃取物对细胞内脂质、肝功能和抗氧化水平的影响　与正常组比较，模型组细胞内TC、TG、MDA含量和ALT、AST活性均显著升高（$P<0.05$），GSH含量和SOD活性均显著降低（$P<0.05$）。与模型组比较，各给药组细胞内TC（TYS组、TYSA组、TYSB组除外）、TG、MDA含量（TYSB组除外）和AST、ALT活性均显著降低（$P<0.05$），GSH含量（水飞蓟宾组除外）和SOD活性（TYS组、TYSB组除外）均显著升高（$P<0.05$），其中TYSA组的TG、MDA、ALT变化较TYS组、TYSB组更明显（$P<0.05$）。结果见表2。

表2　各组细胞内脂质、肝功能和抗氧化相关指标比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	TC/（mmol/L）	TG/（mmol/L）	MDA/（nmol/mg prot）	GSH/（μmol/g prot）	ALT/（U/L）	AST/（U/L）	SOD/（U/mg prot）
正常组	0.03±0.01	0.04±0.01	0.11±0.01	49.17±3.61	0.22±0.05	0.15±0.07	532.77±20.14
模型组	0.10±0.02^{a}	0.38±0.01^{a}	0.22±0.02^{a}	40.20±1.24^{a}	2.25±0.17^{a}	2.26±0.24^{a}	408.31±11.87^{a}
水飞蓟宾组	0.05±0.01^{b}	0.17±0.01^{b}	0.19±0.02^{b}	41.69±1.44	0.26±0.13^{b}	0.66±0.24^{b}	476.25±48.19^{b}
TYS组	0.09±0.02	0.20±0.03^{b}	0.20±0.01^{b}	47.37±1.48^{b}	0.89±0.08^{b}	0.92±0.26^{b}	460.73±39.91
TYSA组	0.08±0.01	0.17±0.04^{bcd}	0.18±0.01^{bcd}	47.84±0.41^{b}	0.64±0.14^{bcd}	0.83±0.19^{b}	472.39±11.06^{b}
TYSB组	0.09±0.02	0.27±0.03^{b}	0.21±0.01	45.94±3.16^{b}	0.88±0.20^{b}	1.05±0.31^{b}	452.12±29.52

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与TYSB组比较，$P<0.05$；d：与TYS组比较，$P<0.05$

3.1.2　小白薇不同萃取物对细胞内脂滴沉积的影响　如图1所示，正常组细胞内未见红色脂滴；模型组细胞内有大量红色脂滴，部分区域出现脂滴融合；与模型组比较，各给药组细胞内脂滴均有不同程度的减少，说明水飞蓟宾和TYS、TYSA、TYSB均能减轻LO2细胞脂肪变性后的脂滴沉积。

3.1.3　小白薇不同萃取物对细胞内Keap1、Nrf2、HO-1 mRNA表达水平的影响　与正常组比较，模型组细胞内Keap1、Nrf2、HO-1 mRNA表达水平均显著降低（$P<0.05$）。与模型组比较，各给药组细胞内Keap1、Nrf2（水飞蓟宾组、TYS组、TYSB组除外）、HO-1（水飞蓟宾组、TYS组、TYSB组除外）mRNA表达水平均显著升高（$P<0.05$），其中TYSA组的Nrf2和HO-1 mRNA表达水平变化较TYS组、TYSB组更明显（$P<0.05$）。结果见表3。

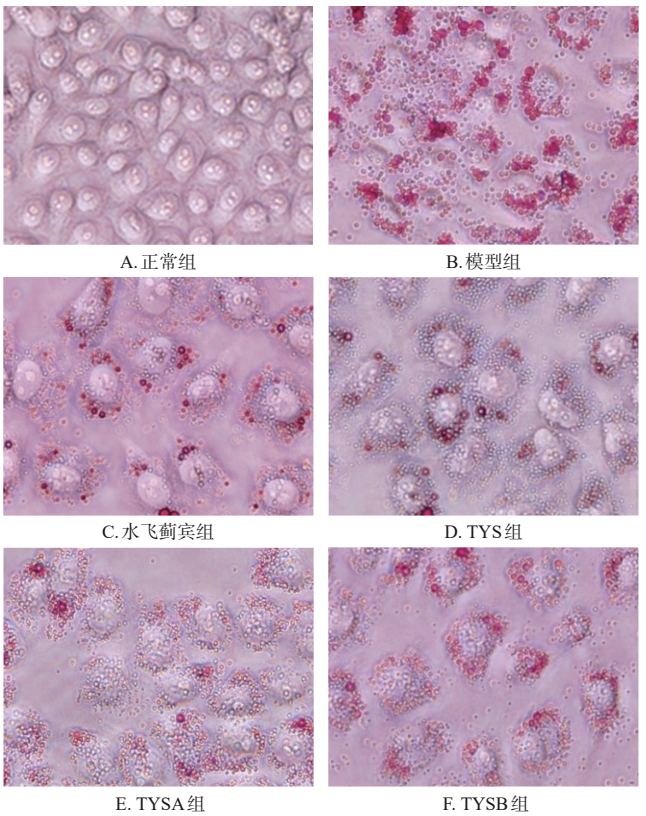


图1　各组细胞内脂滴沉积的显微镜图（油红O染色，×400）

表3　各组细胞内Keap1、Nrf2、HO-1 mRNA表达水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	Keap1	Nrf2	HO-1
正常组	0.50±0.01	0.50±0.01	0.50±0.01
模型组	0.40±0.01[a]	0.48±0.01[a]	0.48±0.01[a]
水飞蓟宾组	0.50±0.01[b]	0.49±0.01	0.48±0.01
TYS组	0.50±0.01[b]	0.48±0.01	0.48±0.01
TYSA组	0.50±0.01[b]	0.50±0.01[bcd]	0.50±0.01[bcd]
TYSB组	0.53±0.01[b]	0.48±0.01	0.48±0.02

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与TYSB组比较，$P<0.05$；d：与TYS组比较，$P<0.05$

3.2　体内实验

3.2.1　小白薇不同萃取物对大鼠体质量、肝脏湿质量、肝脏指数的影响　与正常组比较，模型组大鼠体质量、肝脏湿质量、肝脏指数均显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，各给药组大鼠体质量（水飞蓟宾组、TYS组、TYSB组除外）、肝脏湿质量、肝脏指数均显著降低（$P<0.05$）。结果见表4。

表4　各组大鼠体质量、肝脏湿质量、肝脏指数的比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	体质量（18周）/g	肝脏湿质量/g	肝脏指数/%
正常组	509.67±26.33	12.12±0.92	2.39±0.14
模型组	557.42±38.63[a]	18.98±4.35[a]	3.68±0.88[a]
水飞蓟宾组	543.05±32.53	13.92±1.66[b]	2.52±0.14[b]
TYS组	525.15±32.77	13.77±1.80[b]	2.55±0.25[b]
TYSA组	504.53±31.15[b]	12.20±1.27[b]	2.50±0.31[b]
TYSB组	522.18±26.94	12.20±1.91[b]	2.29±0.17[b]

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$

3.2.2　小白薇不同萃取物对大鼠肝组织病理形态的影响　如图2所示，正常组大鼠肝脏小叶组织完好，形态正常；模型组大鼠肝脏小叶结构明显缺损，有炎性细胞浸润，存在大量的脂肪空泡，显示肝损伤模型建立成功。与模型组比较，各给药组大鼠肝细胞排列相对整齐，分界清楚，无明显的炎性细胞浸润，脂肪空泡减少，表明肝损伤均有所改善，其中TYSA组的脂肪空泡最少，肝损伤改善最为明显。

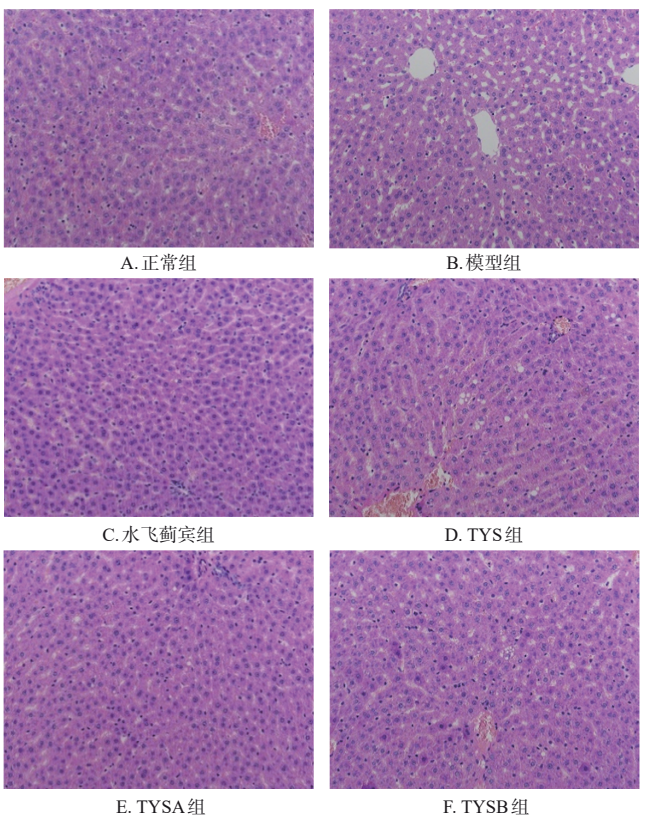


图2　各组大鼠肝组织病理形态显微图（HE染色，×200）

3.2.3　小白薇不同萃取物对大鼠血脂和肝功能相关指标的影响　与正常组比较，模型组大鼠血清中TC、TG、LDL-C含量和ALT、AST活性均显著升高（$P<0.05$），HDL-C含量显著降低（$P<0.05$）。与模型组比较，各给药组大鼠血清中TC、TG、LDL-C含量和ALT、AST活性均显著降低（$P<0.05$），HDL-C含量（TYS组、TYSB组除外）均显著升高，其中TYSA组的TC、ALT、AST、HDL-C、LDL-C变化较TYS组、TYSB组更明显（$P<0.05$）。结果见表5。

3.2.4　小白薇不同萃取物对大鼠肝组织中MDA、GSH含量和SOD活性的影响　与正常组比较，模型组大鼠肝组织中MDA含量显著升高（$P<0.05$），SOD活性和GSH含量均显著降低（$P<0.05$）。与模型组比较，各给药组大鼠肝组织中MDA含量均显著降低，SOD活性和GSH含量均显著升高（$P<0.05$），其中TYSA组的MDA、GSH变化较TYS组、TYSB组及SOD变化较TYSB组更明显（$P<0.05$）。结果见表6。

表5　各组大鼠血清中血脂和肝功能相关指标比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	TC/（mmol/L）	TG/（mmol/L）	ALT/（U/L）	AST/（U/L）	HDL-C/（mmol/L）	LDL-C/（mmol/L）
正常组	1.05±0.08	0.42±0.05	9.72±1.25	10.33±1.41	1.22±0.27	0.59±0.18
模型组	1.62±0.17[a]	0.78±0.11[a]	17.10±1.56[a]	17.10±1.56[a]	0.71±0.24[a]	1.18±0.28[a]
水飞蓟宾组	1.37±0.11[b]	0.61±0.21[b]	11.62±2.79[b]	11.62±2.79[b]	0.97±0.16[b]	0.79±0.06[b]
TYS组	1.39±0.22[b]	0.52±0.16[b]	13.13±1.16[b]	13.36±1.96[b]	0.89±0.15	0.79±0.07[b]
TYSA组	1.14±0.29[bcd]	0.55±0.08[b]	10.07±1.93[bcd]	10.85±2.32[bcd]	1.14±0.28[bcd]	0.61±0.07[bcd]
TYSB组	1.38±0.05[b]	0.51±0.09[b]	13.16±2.68[b]	13.56±3.13[b]	0.89±0.78	0.79±0.04[b]

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与TYSB组比较，$P<0.05$；d：与TYS组比较，$P<0.05$

表6　各组大鼠肝组织中MDA、GSH含量和SOD活性比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	MDA/（nmol/mg prot）	GSH/（μmol/g prot）	SOD/（U/mg prot）
正常组	22.71±5.88	106.54±10.73	83.11±4.26
模型组	41.11±8.30[a]	69.88±16.40[a]	44.65±9.65[a]
水飞蓟宾组	31.62±5.35[b]	122.45±27.36[b]	76.56±13.44[b]
TYS组	32.33±3.76[b]	96.74±17.14[b]	63.95±12.59[b]
TYSA组	26.15±3.51[bcd]	117.60±21.20[bcd]	65.47±5.90[bc]
TYSB组	32.96±3.28[b]	96.20±4.50[b]	53.42±9.84[b]

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与TYSB组比较，$P<0.05$；d：与TYS组比较，$P<0.05$

4　讨论

水飞蓟宾是从水飞蓟果实中提取到的一种水飞蓟素，包含活性黄酮木素和类黄酮的混合物，可以通过降低氧化应激和细胞毒性来改善肝细胞的损伤，临床常用作保肝药物[5]。因此，本文以水飞蓟宾胶囊作为阳性对照药。

当肝细胞摄入过量脂肪酸时，肝脏中的脂肪酸主要有两种代谢方式：一是线粒体β氧化；二是游离脂肪酸与甘油进行酯化形成TG，储存在脂滴中。β氧化途径受到抑制，脂质沉积加剧，可导致脂肪变性[6]。肝细胞受损造成血脂代谢异常，机体摄入较多脂肪后，TC、TG含量将会明显上升[7]。肝细胞受损后会影响细胞膜的通透性，导致大量可溶性酶进入血液，使ALT和AST含量明显升高[8]。2019年，《欧洲血脂管理指南》指出，LDL-C摄入量应越低越好；HDL-C是人体的保护性胆固醇，具有抗炎作用，能抵抗低密度脂蛋白的氧化[9]。Keap1/Nrf2是机体内维持氧化应激平衡的重要通路，以二聚体的形式存在于胞浆中，细胞内活化的Nrf2与Keap1解离，解离后的Nrf2进入细胞核，激活*HO-1*、*SOD*等下游基因的转录与表达[10]。HO-1是Nrf2诱导的最具代表性的抗氧化酶[11]。SOD是一种内源性自由基清除剂，可清除体内新陈代谢产生的氧自由基[12]。GSH可防止脂质过氧化物的形成，保护细胞膜免受损伤[13]。MDA是脂质过氧化的终产物，其水平可有效反映细胞氧化损伤程度[14]。本研究的体外实验结果显示，与模型组比较，TYS、TYSA、TYSB可不同程度地降低LO2细胞脂肪变性后的脂滴沉积和细胞内TC、TG、MDA含量以及AST、ALT活性，升高SOD活性、GSH含量和Keap1、Nrf2、HO-1 mRNA表达水平；体内实验结果显示，与模型组比较，TYS、TYSA、TYSB可显著改善NASH模型大鼠的肝损伤，降低其肝脏指数和TC、TG、LDL-C、MDA含量以及AST、ALT活性，升高HDL-C（TYS、TYSB除外）、GSH含量和SOD活性，其中TYSA的效果最明显。

综上所述，TYS、TYSA、TYSB对NASH具有一定的改善作用，其中TYSA效果最明显；其作用机制可能与上调Keap1/Nrf2/HO-1信号通路，抑制氧化应激有关。

参考文献

[1] SCHUSTER S，CABRERA D，ARRESE M，et al. Triggering and resolution of inflammation in NASH[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol，2018，15（6）：349-364.

[2] DECZKOWSKA A，DAVID E，RAMADORI P，et al. XCR1$^+$ type 1 conventional dendritic cells drive liver pathology in non-alcoholic steatohepatitis[J]. Nat Med，2021，27（6）：1043-1054.

[3] 方琼莲，王蒙蒙，乔雪，等. 核桃青皮提取物对非酒精性脂肪肝的作用[J]. 食品与发酵工业，2021，47（18）：159-164.

[4] 林玉萍，李欣坪，付胜男，等. 小白薇根化学成分的研究[J]. 中成药，2020，42（9）：2342-2346.

[5] 肖素军，肖亚君，吴培赛，等. 水飞蓟宾缓解油酸诱导的HepG2细胞脂质沉积的机制探讨[J]. 中国临床新医学，2021，14（11）：1092-1096.

[6] 李晨驰，韩萧萧，杨柳，等. 蓝莓花青素对油酸诱导肝细胞脂肪变性小鼠Plin5蛋白表达的影响[J]. 中国现代医学杂志，2021，31（24）：7-12.

[7] 王培柱，张豪壮，王海洋. 肝功能与血脂水平检验在脂肪肝诊断中的临床价值研究[J]. 中国医药指南，2021，19（34）：26-28.

[8] 都梦帆，胥冰，向汝，等. 苦参碱注射液对小鼠急性酒精性肝损伤的保护作用[J]. 中国现代医学杂志，2021，31（24）：13-18.

[9] MACH F，BAIGENT C，CATAPANO A L，et al. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias：lipid modification to reduce cardiovascular risk[J]. Eur Heart J，2020，41（1）：111-188.

[10] 汤建华，詹旭莉，冯平，等. 苹果多酚通过调控Keap1/Nrf2通路减轻脂多糖诱导的大鼠急性肺损伤[J]. 中国病理生理杂志，2022，38（10）：1840-1847.

[11] 杜自力. Keap1/Nrf2/HO-1与动脉瘤性蛛网膜下腔出血患者预后关系的相关性研究[D]. 遵义：遵义医科大学，2022.

[12] 杨庆华，杨隆良，杨晓莉. lncRNA Gm4419靶向miR-703对Aβ25-35诱导的PC12细胞氧化应激和凋亡的影响[J]. 河北医药，2021，43（24）：3690-3694.

[13] SUN Z Q，SUN L，TU L X. GABAB receptor-mediated PI3K/Akt signaling pathway alleviates oxidative stress and neuronal cell injury in a rat model of Alzheimer's disease[J]. J Alzheimers Dis，2020，76（4）：1513-1526.

[14] 冯毅翀，荆纯祥，赵莹曦，等. 半夏生物总碱对运动氧化应激大鼠胃黏膜的保护作用及机制研究[J]. 中药新药与临床药理，2021，32（12）：1757-1761.

（收稿日期：2022-11-27　修回日期：2023-04-23）
（编辑：邹丽娟）