五味保肝丸对非酒精性脂肪性肝病小鼠的干预作用及机制Δ

王　燕[1*]，陈翠青[2]，徐　岩[2]，王亿鹏[3,4#]［1.青岛大学附属青岛市海慈医院（青岛市中医医院）影像科，山东 青岛 266031；2.青岛市中心医院神经内科，山东 青岛　266042；3.青岛大学附属青岛市海慈医院（青岛市中医医院）消化内科，山东 青岛　266031；4.陇南市武都区中心医院内科，甘肃 陇南　742500］

中图分类号　R965；R285.5　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2024）11-1345-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.11.11

摘　要　目的　考察五味保肝丸对非酒精性脂肪性肝病（NAFLD）小鼠的干预作用及机制。**方法**　采用高脂高糖饲料持续喂养小鼠19周复制NAFLD模型。将造模成功的小鼠分为模型组、阳性对照组（多烯磷脂酰胆碱胶囊，23.30 mg/kg）和五味保肝丸低、中、高剂量组（0.11、0.23、0.45 g/kg），另设不造模的正常组，每组8只。药物组小鼠灌胃相应药物，模型组和正常组小鼠灌胃等体积生理盐水，每天1次，连续4周。末次给药结束后，检测各组小鼠的糖代谢（空腹血糖、空腹胰岛素、胰岛素抵抗指数）、肝功能[肝指数、丙氨酸转氨酶（ALT）、天冬氨酸转氨酶（AST）、肝组织病理评分]、脂代谢[甘油三酯（TG）、总胆固醇（TC）、低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）、高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）]相关指标；观察肝组织病理学形态以及纤维化、脂滴形成和糖原合成情况；检测血清中游离脂肪酸（FFA）和肝组织中炎症因子[肿瘤坏死因子α（TNF-α）、白细胞介素6（IL-6）、IL-1β]水平；检测肝组织中胰岛素受体底物/磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B/糖原合成酶激酶3β（IRS/PI3K/AKT/GSK3β）信号通路相关蛋白表达水平。**结果**　经高剂量的五味保肝丸干预后，NAFLD小鼠肝指数，血清中ALT、AST、FFA、TC、TG、LDL-C水平，肝组织中TNF-α、IL-6、IL-1β水平，空腹血糖、空腹胰岛素、胰岛素抵抗指数，肝组织病理评分、纤维化染色面积占比、脂滴染色面积占比均显著降低（$P<0.05$）；HDL-C水平、糖原染色面积占比和肝组织中IRS1、PI3K、AKT、GSK3β蛋白磷酸化水平均显著升高（$P<0.05$）；肝细胞坏死和脂肪变性程度均减弱，纤维化病变均减轻。五味保肝丸低、中剂量组小鼠的上述指标均有改善趋势，但部分差异无统计学意义。**结论**　五味保肝丸可调节NAFLD小鼠肝脏脂代谢、糖代谢紊乱，改善肝损伤，其作用机制可能与激活IRS/PI3K/AKT/GSK3β信号通路有关。

关键词　五味保肝丸；非酒精性脂肪性肝病；脂代谢；糖代谢；炎症因子；肝损伤；IRS/PI3K/AKT/GSK3β信号通路

Intervention effect and mechanism of Wuwei baogan pill on mice with non-alcoholic fatty liver disease

WANG Yan[1], CHEN Cuiqing[2], XU Yan[2], WANG Yipeng[3, 4]［1. Dept. of Imaging, Qingdao Hiser Hospital Affiliated of Qingdao University (Qingdao Traditional Chinese Medicine Hospital), Shandong Qingdao 266031, China; 2. Dept. of Neurology, Qingdao Central Hospital, Shandong Qingdao 266042, China; 3. Dept. of Gastroenterology, Qingdao Hiser Hospital Affiliated of Qingdao University (Qingdao Traditional Chinese Medicine Hospital), Shandong Qingdao 266031, China; 4. Dept. of Internal Medicine, Wudu District Central Hospital of Longnan City, Gansu Longnan 742500, China］

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the intervention effect and mechanism of Wuwei baogan pill on mice with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **METHODS** The mice were given high-fat and high-sugar diet for 19 weeks to induce NAFLD model. The model mice were randomly grouped into model group, positive control group (polyene phosphatidylcholine capsules, 23.30 mg/kg), Wuwei baogan pill low-dose, medium-dose and high-dose groups (0.11, 0.23, 0.45 g/kg), with 8 mice in each group; the normal group was additionally set up without modeling. Administration groups were given relevant medicine intragastrically, and model group and normal group were given constant volume of normal saline, once a day, for consecutive 4 weeks. After the last administration, glucose metabolism (including fasting blood glucose, fasting insulin, insulin resistance index), liver function [liver index, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), liver tissue pathological score], lipid metabolism [triglyceride (TG), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C)] were measured; the pathological morphology of liver tissue, as well as fibrosis, lipid droplet formation, and glycogen synthesis were observed; the levels of free fatty acid (FFA) in serum and inflammatory factors in liver tissue [tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-6 (IL-6) and IL-1β] were detected; the expressions of insulin receptor substrate/phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B/glycogen synthase kinase 3β (IRS/PI3K/AKT/GSK3β) signaling pathway-related protein in liver tissue were

Δ**基金项目** 山东省中医药科技项目（No.2020M111）

＊**第一作者** 主治医师。研究方向：消化内科。电话：0532-83777571。E-mail：nrgxmwrc@163.com

＃**通信作者** 副主任医师，博士。研究方向：中医内科学。电话：0532-83776952。E-mail：15680026228@163.com

investigated. **RESULTS** After intervention with high-dose Wuwei baogan pill, liver index of NAFLD mice, serum levels of ALT, AST, FFA, TC, TG and LDL-C, the levels of TNF-α, IL-6 and IL-1β in liver tissue, fasting blood glucose, fasting insulin, insulin resistance index, liver tissue pathological score, proportions of fibrotic staining area and lipid droplet staining area all significantly decreased ($P<0.05$); the level of HDL-C, proportion of glycogen staining area, the phosphorylation of IRS1, PI3K, AKT and GSK3β protein increased significantly ($P<0.05$); the degree of liver cell necrosis and steatosis was reduced, and the fibrotic lesions were alleviated. The above indexes of mice were improved in Wuwei baogan pill low-dose and medium-dose groups, but there was no statistically significant difference in some indexes. **CONCLUSIONS** Wuwei baogan pill can regulate lipid and glucose metabolism disorders in the liver of NAFLD mice, and improve liver injury, the mechanism of which may be associated with the activation of IRS/PI3K/AKT/GSK3β signaling pathway.

KEYWORDS Wuwei baogan pill; non-alcoholic fatty liver disease; lipid metabolism; glucose metabolism; inflammatory factors; liver injury; IRS/PI3K/AKT/GSK3β signaling pathway

非酒精性脂肪性肝病（non-alcoholic fatty liver disease，NAFLD）是指除由酒精和其他对肝脏有明确损害致病因素所引起的，以脂肪在肝细胞内过度沉积为主要病变特征的临床病理综合征[1]。该疾病与肥胖、脂代谢紊乱、糖尿病等多种代谢性疾病相关，极大地增加了这些慢性代谢性疾病的复杂性，并导致患者食欲不振、体能减弱、腹部胀痛等，严重影响患者的生活质量[2-3]。目前针对NAFLD多通过调理饮食、加强锻炼、服用保肝药等手段，起到一定的干预作用。然而，对于NAFLD的治疗，目前还没有批准上市的特效药，因此开发治疗NAFLD的新药具有重要意义。

以中医药为基础开发抗NAFLD药物具有辨证论治以及多成分、多靶点、多途径的治疗优势和特色[4]。五味保肝丸（降酶丸）是青岛市海慈医疗集团的传统中药制剂品种（鲁药制ZBZ1077），由五味子、丹参、山楂等5味中药组成，具有敛阴、活血、保肝降酶（转氨酶）的功效[5]。据报道，五味保肝丸对慢性乙型肝炎患者的症状和体征具有缓解作用[5]；且其对四氯化碳诱导的急性肝损伤大鼠的肝组织具有保护作用[6]。以上研究表明五味保肝丸具有保肝作用。基于此，本研究拟构建NAFLD小鼠模型，探讨五味保肝丸对NAFLD的影响，并探讨其可能的作用机制，以期为五味保肝丸在NAFLD中的应用提供理论参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有Pannoramic 250型数字切片扫描仪（匈牙利3DHISTECH公司）、BA210Digital型数码显微镜（麦克奥迪实业集团有限公司）、5200型化学发光凝胶成像仪（上海天能科技有限公司）、MK3型全功能酶标仪（美国Thermo Fisher Scientific公司）、DMI1型倒置生物显微镜（德国Leica公司）等。

1.2 主要药品与试剂

五味保肝丸（批号181023）由青岛市海慈医疗集团制剂室提供；多烯磷脂酰胆碱胶囊（阳性对照，批号8BJD217，规格228 mg）购自赛诺菲（北京）制药有限公司；兔源胰岛素受体底物1（insulin receptor substrate 1，IRS1）、蛋白激酶B（protein kinase B，AKT）单克隆抗体（批号分别为17509-1-AP、28731-1-AP）均购自武汉三鹰生物技术有限公司；兔源磷酸化IRS1（p-IRS1）单克隆抗体（批号2381T）购自美国CST公司；兔源磷脂酰肌醇3-激酶（phosphoinositide 3-kinase，PI3K）、磷酸化PI3K（p-PI3K）、磷酸化AKT（p-AKT）单克隆抗体（批号分别为AF4670、AF4372、AF4718）均购自江苏亲科生物研究中心有限公司；鼠源糖原合成酶激酶3β（glycogen synthase kinase 3β，GSK3β）、兔源磷酸化GSK3β（p-GSK3β）单克隆抗体和生物素标记的山羊抗鼠免疫球蛋白G（IgG）二抗、生物素标记的山羊抗兔IgG二抗（批号分别为ab93926、ab107166、ab6789、ab6721）均购自英国Abcam公司；兔源β-actin单克隆抗体（批号AC026）购自美国ABclonal公司；游离脂肪酸（free fatty acid，FFA）、白细胞介素6（interleukin-6，IL-6）、肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）、IL-1β的酶联免疫吸附测定（ELISA）试剂盒（批号分别为ZC-38978、ZC-37988、ZC-39024、ZC-37974）均购自上海茁彩生物科技有限公司；苏木精-伊红（HE）染液试剂盒、油红O染色试剂盒、Masson染色试剂盒（批号分别为C0105S、C0157S、C0189S）均购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 实验动物与饲料

本研究所用动物为C57/BL6J小鼠，共60只，体重18～20 g，6～8周龄，由成都达硕实验动物有限公司提供，实验动物生产许可证号为SCXK（川）2019-028。本研究已通过四川大学华西医院实验动物伦理委员会批准，批准号为20211145A。实验期间，小鼠自由饮水和进食；动物房保持安静，自然采光，温度为25 ℃。本研究所用高脂高糖饲料购买于北京科澳协力饲料有限公司。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

将60只C57/BL6J小鼠随机分为造模组（$n=50$）和正常组（$n=10$）。正常组小鼠给予正常饲料，造模组小鼠给予高脂高糖饲料，持续喂养19周，以建立NAFLD模型[7]。造模完成后，每组抽检2只小鼠进行HE染色以观察其肝组织病理学形态变化，并取血进行肝功能指标

[丙氨酸转氨酶（alanine transaminase，ALT）、天冬氨酸转氨酶（aspartate transaminase，AST）]和脂代谢指标[甘油三酯（triglyceride，TG）、总胆固醇（total cholesterol，TC）、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）]检测。当造模组小鼠肝组织结构紊乱，肝细胞出现明显脂肪变性，肝功能、脂代谢指标水平较正常组小鼠出现显著异常时，表明造模成功[7]。取造模成功的小鼠40只随机分为模型组（生理盐水）、阳性对照组（多烯磷脂酰胆碱胶囊，23.30 mg/kg，剂量参考文献[8]设置）和五味保肝丸低、中、高剂量组（0.11、0.23、0.45 g/kg，剂量根据人与小鼠体表面积换算而得，中剂量为临床等效剂量），每组8只。药物组小鼠灌胃相应药物，模型组和正常组小鼠灌胃等体积生理盐水，每天1次，连续4周。

2.2 小鼠糖代谢、肝功能、脂代谢指标检测

给药期间，每周测量小鼠体重，观察小鼠体重变化情况。末次给药结束后，各组小鼠空腹12～16 h，取尾尖血，测空腹血糖和空腹胰岛素，并计算胰岛素抵抗指数（胰岛素抵抗指数＝空腹血糖×空腹胰岛素/22.5）[9]。处死小鼠并称重，取血，血样以3 000 r/min离心10 min，留取血清，于－70℃条件下保存。取血完成后解剖小鼠，取肝脏，并计算肝指数[肝指数＝肝脏质量（mg）/体重（g）]。将肝脏分成3份，其中2份于－80 ℃条件下保存，1份于4%多聚甲醛中固定。取血清样品，采用动物生化分析仪检测血清中肝功能指标（ALT、AST）和脂代谢指标（TC、TG、HDL-C、LDL-C）水平。

2.3 小鼠肝组织病理学形态以及纤维化、脂滴形成和糖原合成情况观察

采用HE染色法对小鼠肝组织病理学形态进行观察和评分。取于4%多聚甲醛中固定的肝组织适量，经梯度乙醇脱水、石蜡包埋、切片（4 μm）后，取部分切片（剩余部分进行Masson染色、油红O染色、糖原染色）以二甲苯脱蜡、梯度乙醇脱苯；常规HE染色、封片后，采用光学显微镜观察小鼠肝组织病理学形态变化。每张切片随机选择5个视野进行肝组织病理评分[10]。

采用Masson染色法观察小鼠肝组织的纤维化进展情况。取部分切片常规脱蜡至水，然后进行染色、水洗、乙醇分化、磷钼酸溶液处理、乙醇脱水、二甲苯透明后，以中性树胶封固。采用Pannoramic 250型数字切片扫描仪对切片进行图像采集，采用Image Pro Plus 6.0软件对纤维化染色面积进行统计，并计算纤维化染色面积占视野面积的百分比（简称纤维化染色面积占比）。每张切片随机选择5个不同视野进行分析，结果取平均值。

采用油红O染色法观察小鼠肝组织中脂滴形成情况。取部分切片常规脱蜡至水，以甲醛固定10 min、油红O染液染色10 min、苏木精复染后，以甘油封片。采用BA210Digital型数码显微镜对切片进行图像采集，采用Image Pro Plus 6.0软件统计脂滴染色面积，并计算脂滴染色面积占视野面积的百分比（简称脂滴染色面积占比）。每张切片随机选择5个不同视野进行分析，结果取平均值。

采用糖原染色法观察小鼠肝组织中糖原合成情况。取部分切片常规脱蜡至水，经高碘酸氧化液浸泡10～20 min、Schiff液染色10 min、苏木精复染2～3 min、乙醇分化、二甲苯透明后，以中性树胶封固。采用Pannoramic 250型数字切片扫描仪对切片进行图像采集，采用Image Pro Plus 6.0软件统计糖原染色面积，并计算糖原染色面积占视野面积百分比（简称糖原染色面积占比）。每张切片随机选择5个不同视野进行分析，结果取平均值。

2.4 小鼠血清中FFA和肝组织中炎症因子水平的检测

采用ELISA法检测。取“2.2”项下保存的小鼠血清和肝脏样品，根据试剂盒说明书方法检测小鼠血清中FFA水平以及肝组织中炎症因子TNF-α、IL-6、IL-1β水平。

2.5 小鼠肝组织中IRS/PI3K/AKT/GSK3β信号通路相关蛋白表达的检测

采用Western blot法检测。取“2.2”项下－80 ℃条件下保存的肝组织适量，经裂解后，提取总蛋白。经BCA法定量后，加热使蛋白变性。取30 μg蛋白样品上样，经10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后，转移至聚偏二氟乙烯膜上；用5%脱脂牛奶封闭1 h，加入IRS1（稀释度为1∶1 000）、p-IRS1（稀释度为1∶1 000）、PI3K（稀释度为1∶2 000）、p-PI3K（稀释度为1∶1 000）、AKT（稀释度为1∶2 000）、p-AKT（稀释度为1∶1 000）、p-GSK3β（稀释度为1∶1 000）、GSK3β（稀释度为1∶1 000）和β-actin（稀释度为1∶2 000）一抗，于4 ℃下孵育过夜；加入相应二抗（稀释度为1∶4 000）于37 ℃孵育2 h。采用化学发光剂显色，采用Image J软件分析蛋白条带灰度值，以p-IRS1与IRS1、p-PI3K与PI3K、p-AKT与AKT、p-GSK3β与GSK3β的灰度值比值分别表示IRS1、PI3K、AKT、GSK3β蛋白的磷酸化水平。

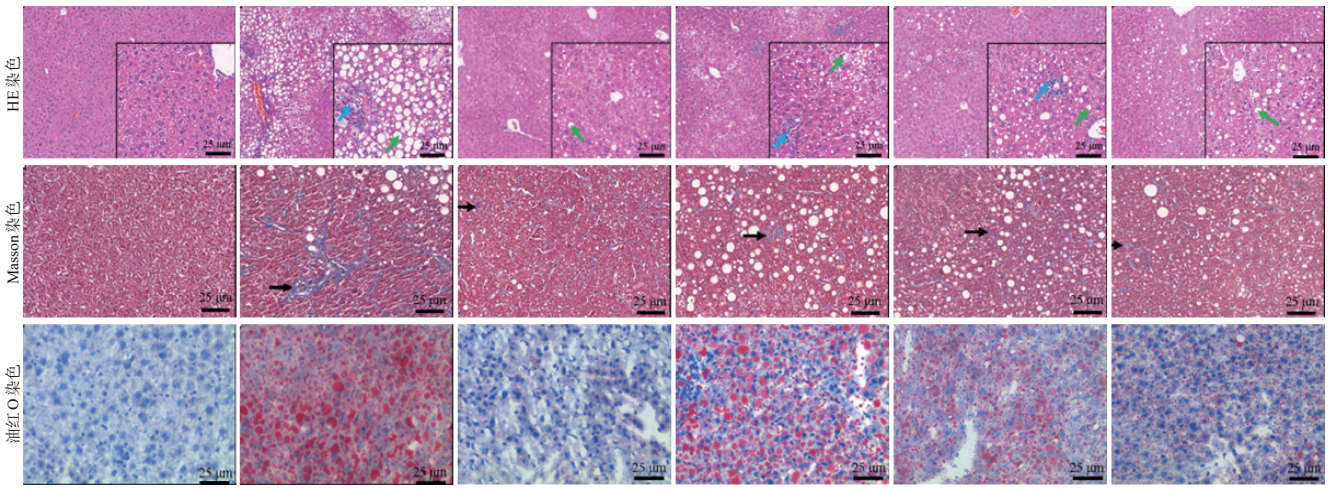
2.6 统计学方法

采用SPSS 25.0统计软件分析数据。计量资料通过Shapiro-Wilk检验进行正态性检验，均服从正态分布，以$\bar{x} \pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用SNK-q检验。检测水准α＝0.05。

3 结果

3.1 五味保肝丸对NAFLD小鼠肝功能的影响

与正常组相比，模型组小鼠肝指数，血清中ALT、AST水平，肝组织病理评分、纤维化染色面积占比、脂滴染色面积占比均显著升高（P＜0.05）；肝组织中出现大量坏死的肝细胞和脂肪变性细胞，纤维化病变严重。与模型组相比，阳性对照组和五味保肝丸中、高剂量组小鼠上述指标均显著逆转（P＜0.05），五味保肝丸低剂量组小鼠上述部分指标显著逆转（P＜0.05）；各给药组小鼠肝细胞坏死和脂肪变性程度均减弱，纤维化病变均减轻。结果见图1和表1。



A. 正常组　B. 模型组　C. 阳性对照组　D. 五味保肝丸低剂量组　E. 五味保肝丸中剂量组　F. 五味保肝丸高剂量组

蓝色箭头：坏死的肝细胞；绿色箭头：脂肪变性的肝细胞；黑色箭头：纤维化结构。

图1　各组小鼠肝组织HE染色、Masson染色、油红O染色观察的显微图

表1　各组小鼠肝功能相关指标比较（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	肝指数/(mg/g)	AST/(U/L)	ALT/(U/L)	肝组织病理评分/分	纤维化染色面积占比/%	脂滴染色面积占比/%
正常组	35.20±3.55	114.94±12.04	18.62±1.49	0	0.06±0.04	1.13±0.24
模型组	56.81±2.91[a]	176.37±21.00[a]	76.42±11.31[a]	3.75±0.54[a]	1.01±0.16[a]	40.50±5.96[a]
阳性对照组	40.83±6.45[b]	112.79±11.86[b]	36.70±7.28[b]	0.75±0.19[b]	0.29±0.08[b]	6.34±0.78[b]
五味保肝丸低剂量组	42.64±3.33[b]	141.10±17.35[b]	58.28±7.76[b]	3.43±0.47	0.70±0.11[b]	37.36±3.67
五味保肝丸中剂量组	41.63±4.11[b]	144.14±19.78[b]	53.05±6.86[b]	1.75±0.25[b]	0.51±0.07[b]	26.64±3.41[b]
五味保肝丸高剂量组	40.48±4.59[b]	115.17±18.63[b]	37.28±10.62[b]	1.25±0.21[b]	0.30±0.05[b]	20.21±2.23[b]

a：与正常组相比，$P<0.05$；b：与模型组相比，$P<0.05$。

3.2　五味保肝丸对NAFLD小鼠糖代谢的影响

与正常组相比，模型组小鼠空腹血糖、空腹胰岛素、胰岛素抵抗指数均显著升高（$P<0.05$），糖原染色面积占比显著降低（$P<0.05$），糖原分解增加。与模型组相比，阳性对照组和五味保肝丸高剂量组小鼠的上述指标均显著逆转（$P<0.05$），五味保肝丸中剂量组小鼠糖原染色面积占比显著升高（$P<0.05$），上述各给药组小鼠肝组织中糖原分解均减少。结果见表2和图2。

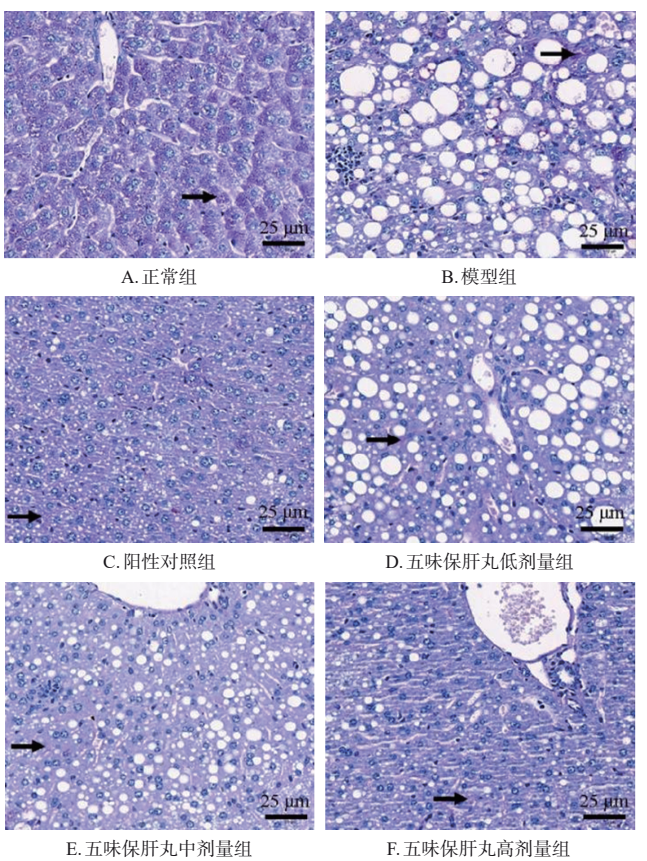
表2　各组小鼠糖代谢相关指标比较（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	空腹血糖/(mmol/L)	空腹胰岛素/(μIU/mL)	胰岛素抵抗指数	糖原染色面积占比/%
正常组	4.05±0.73	12.11±1.41	2.20±0.64	46.94±6.91
模型组	7.05±0.83[a]	17.75±1.38[a]	5.60±1.04[a]	22.46±1.66[a]
阳性对照组	5.47±0.77[b]	15.50±1.48[b]	3.79±0.77[b]	36.13±3.10[b]
五味保肝丸低剂量组	6.80±0.81	17.48±1.26	5.30±0.84	26.06±2.71
五味保肝丸中剂量组	6.80±0.84	17.12±1.39	5.22±1.00	30.03±2.19[b]
五味保肝丸高剂量组	6.26±0.85[b]	1.69±1.90[b]	4.38±0.84[b]	32.99±4.07[b]

a：与正常组相比，$P<0.05$；b：与模型组相比，$P<0.05$。

3.3　五味保肝丸对NAFLD小鼠脂代谢的影响

与正常组相比，模型组小鼠血清中FFA、TC、TG、LDL-C水平均显著升高（$P<0.05$），HDL-C水平显著降低（$P<0.05$）。与模型组相比，阳性对照组及五味保肝丸中、高剂量组的上述指标均显著逆转（$P<0.05$），五味保肝丸低剂量组的上述部分指标显著逆转（$P<0.05$）。结果见表3。



A. 正常组　B. 模型组　C. 阳性对照组　D. 五味保肝丸低剂量组　E. 五味保肝丸中剂量组　F. 五味保肝丸高剂量组

黑色箭头：染色糖原。

图2　各组小鼠肝组织糖原染色观察的显微图

表3　各组小鼠脂代谢相关指标比较（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	FFA/(μmol/L)	TC/(mmol/L)	TG/(mmol/L)	LDL-C/(mmol/L)	HDL-C/(mmol/L)
正常组	123.02±10.03	2.60±0.23	1.60±0.16	5.14±0.72	3.40±0.28
模型组	174.08±13.58[a]	3.77±0.46[a]	2.50±0.26[a]	8.45±0.60[a]	1.62±0.23[a]
阳性对照组	139.80±12.86[b]	3.50±0.36[b]	2.20±0.20[b]	6.14±0.46[b]	2.74±0.21[b]
五味保肝丸低剂量组	136.09±8.03	3.21±0.46	2.35±0.18[b]	7.06±0.74[b]	1.99±0.38
五味保肝丸中剂量组	153.47±18.18[b]	3.43±0.25[b]	2.35±0.20[b]	7.40±0.69[b]	1.85±0.30[b]
五味保肝丸高剂量组	141.67±14.18[b]	3.06±0.53[b]	1.86±0.17[b]	6.55±0.75[b]	2.42±0.48[b]

a：与正常组相比，$P<0.05$；b：与模型组相比，$P<0.05$。

3.4 五味保肝丸对NAFLD小鼠肝组织中炎症因子水平的影响

与正常组相比，模型组小鼠肝组织中TNF-α、IL-6、IL-1β水平均显著升高（$P<0.05$）。与模型组相比，阳性对照组和五味保肝丸高剂量组小鼠肝组织中上述指标水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见表4。

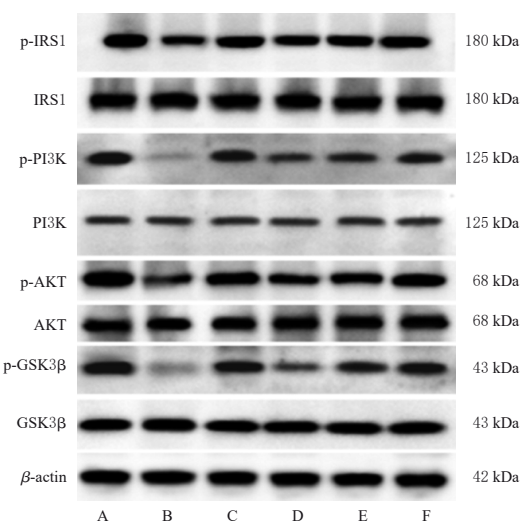
表4 各组小鼠肝组织中炎症因子水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=8$，pg/mL）

组别	IL-1β	IL-6	TNF-α
正常组	59.31±1.28	12.82±2.65	26.01±10.21
模型组	65.81±1.72[a]	22.33±2.07[a]	62.83±11.10[a]
阳性对照组	61.80±1.51[b]	16.15±2.36[b]	40.92±11.37[b]
五味保肝丸低剂量组	64.92±1.27	21.48±1.95	57.35±9.30
五味保肝丸中剂量组	63.59±2.28	19.62±2.98	48.31±12.12
五味保肝丸高剂量组	62.71±1.20[b]	17.16±1.72[b]	42.56±10.45[b]

a：与正常组相比，$P<0.05$；b：与模型组相比，$P<0.05$。

3.5 五味保肝丸对NAFLD小鼠肝组织中IRS/PI3K/AKT/GSK3β信号通路相关蛋白表达的影响

与正常组相比，模型组小鼠肝组织中IRS1、PI3K、AKT、GSK3β蛋白磷酸化水平均显著降低（$P<0.05$）。与模型组相比，阳性对照组和五味保肝丸中、高剂量组小鼠肝组织中上述指标水平均显著升高（$P<0.05$）。结果见图3和表5。



A：正常组；B：模型组；C：阳性对照组；D：五味保肝丸低剂量组；E：五味保肝丸中剂量组；F：五味保肝丸高剂量组。

图3 各组小鼠肝组织中IRS/PI3K/AKT/GSK3β信号通路相关蛋白表达的电泳图

表5 各组小鼠肝组织中IRS/PI3K/AKT/GSK3β信号通路相关蛋白磷酸化水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	p-IRS1/IRS1	p-PI3K/PI3K	p-AKT/AKT	p-GSK3β/GSK3β
正常组	1.07±0.14	1.24±0.80	1.01±0.14	1.02±0.23
模型组	0.42±0.11[a]	0.16±0.17[a]	0.33±0.12[a]	0.16±0.10[a]
阳性对照组	0.93±0.11[b]	0.68±0.36[b]	0.80±0.14[b]	0.71±0.21[b]
五味保肝丸低剂量组	0.59±0.08	0.30±0.21	0.47±0.13	0.30±0.14
五味保肝丸中剂量组	0.75±0.09[b]	0.44±0.29[b]	0.61±0.11[b]	0.44±0.19[b]
五味保肝丸高剂量组	0.88±0.10[b]	0.65±0.38[b]	0.77±0.13[b]	0.64±0.21[b]

a：与正常组相比，$P<0.05$；b：与模型组相比，$P<0.05$。

4 讨论

五味保肝丸在临床上应用多年，效果理想。其与NAFLD肝失疏泄、脾失健运、痰瘀互结的主要病机相契合，五味子、丹参等5味药协同作用，可达到敛阴柔肝、活血健脾、化痰散结的目的，从而舒发肝气。本研究结果发现，经五味保肝丸干预后，NAFLD小鼠肝指数等肝功能相关指标均显著改善，坏死肝细胞和脂肪变性肝细胞减少。这提示五味保肝丸对NAFLD引起的肝损伤具有较好的改善作用。

NAFLD不仅与肝代谢障碍有关，更与脂肪组织代谢紊乱密切相关[11]。肝脏是脂质代谢的重要脏器，是脂质稳态主要的调节器，高脂饮食的长期摄入导致大量FFA从脂肪组织释放，或者从肠道吸收入血，使血液中FFA水平升高，从而导致FFA在肝脏中沉积，进一步使FFA与胆固醇脂滴结合为TG，最终造成脂肪的蓄积而形成脂肪肝[12]。另外，FFA过度产生所带来的脂毒性还会导致肝脏发生炎症反应，从而形成脂肪性肝炎[13]。本研究发现，经五味保肝丸干预后，NAFLD小鼠血清中FFA、TC、TG、LDL-C水平和肝组织中TNF-α、IL-6、IL-1β水平均降低，血清中HDL-C水平升高。这提示五味保肝丸对NAFLD引起的脂代谢紊乱和炎症反应具有较好的改善作用。

NAFLD也与胰岛素抵抗密切相关，而胰岛素抵抗可促进肝组织发生脂肪变性、纤维化及炎症反应[14]。胰岛素抵抗指数越高表明肝脏、脂肪等组织对胰岛素的敏感性越低[15]。肝脏中脂质积聚是诱发NAFLD的重要因素，肝组织脂代谢与胰岛素抵抗有关[16]。相关研究发现，IRS/PI3K/AKT/GSK3β信号通路是胰岛素在肝脏中发挥生理作用的重要信号通路[17—18]。IRS1可影响胰岛素信号转导，其磷酸化将导致胰岛素途径被激活，从而诱导PI3K磷酸化，产生“瀑布”效应，进而激活下游分子AKT、GSK3β的磷酸化，使其共同参与糖代谢等生理过程[19]。本研究发现，经五味保肝丸干预后，NAFLD小鼠空腹血糖、空腹胰岛素水平和胰岛素抵抗指数均降低，肝组织中IRS1、PI3K、AKT、GSK3β蛋白磷酸化水平均升高，且肝组织中糖原分解减少。这提示五味保肝丸可能是通过激活IRS/PI3K/AKT/GSK3β信号通路，减少胰岛素抵抗，进而改善NAFLD。

综上所述，五味保肝丸可调节NAFLD小鼠肝脏脂代谢、糖代谢紊乱，改善肝损伤，其作用机制可能与激活IRS/PI3K/AKT/GSK3β信号通路有关。本研究不足之处在于未采用IRS/PI3K/AKT/GSK3β信号通路抑制剂进行验证。后续本课题组将进一步采用该通路抑制剂验证五味保肝丸的作用机制，为五味保肝丸在NAFLD中的应用提供更多的参考依据。

参考文献

[1] CHALASANI N, YOUNOSSI Z, LAVINE J E, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases[J]. Hepatology, 2018, 67(1): 328-357.

[2] 王宇威,刘近春,安秀琴,等. 肠道微生态与非酒精性脂肪性肝病研究进展[J]. 中国现代医生,2022,60(15):192-196.
WANG Y W, LIU J C, AN X Q, et al. Research progress of intestinal microecology and non-alcoholic fatty liver disease[J]. China Mod Dr, 2022, 60(15): 192-196.

[3] 陈艳,王珍茹,张丽,等. 单纯性脂肪肝患者认知行为现状调查及生活方式干预[J]. 齐鲁护理杂志,2018,24(13):78-81.
CHEN Y, WANG Z R, ZHANG L, et al. Investigation on cognitive behavior of patients with simple fatty liver and lifestyle intervention[J]. J Qilu Nurs, 2018, 24(13): 78-81.

[4] 张菊艳,张萃. 荔枝核化学成分及其药理作用的研究进展[J]. 广东药学院学报,2014,30(6):792-797.
ZHANG J Y, ZHANG C. Progress of litchi seeds on the main active ingredients and pharmacological effects[J]. J Guangdong Pharm Univ, 2014, 30(6): 792-797.

[5] 王兰青,王琳,丁广智. 五味保肝丸治疗慢性乙型肝炎疗效观察[J]. 中国中医药信息杂志,2011,18(11):78-79.
WANG L Q, WANG L, DING G Z. Observation on the therapeutic effect of Wuwei baoganwan on chronic hepatitis B[J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2011, 18(11): 78-79.

[6] 张伟,谢旭善,于爽,等. 五味保肝丸对急性肝损伤动物模型的作用[J]. 齐鲁医学杂志,2011,26(3):219-221,224.
ZHANG W, XIE X S, YU S, et al. Effect of Wuwei baoganwan on rat models of acute hepatic damage[J]. Med J Qilu, 2011, 26(3): 219-221, 224.

[7] 曾海燕,简丽娜,吴辉星,等. 异甘草素调控肠道菌群和肠屏障功能改善小鼠非酒精性脂肪性肝病的作用机制[J]. 中国药房,2023,34(23):2848-2854.
ZENG H Y, JIAN L N, WU H X, et al. The mechanism of isoliquiritigenin on ameliorating non-alcoholic fatty liver disease in mice by regulating gut microbiota and repairing gut barrier function[J]. China Pharm, 2023, 34(23): 2848-2854.

[8] 李晓霞,许莹,徐波,等. 橙皮苷对果糖饮食诱导的非酒精性脂肪肝小鼠的作用研究[J]. 世界中医药,2021,16(2):249-253.
LI X X, XU Y, XU B, et al. Effects of hesperidin on nonalcoholic fatty liver rats induced by high fructose diet[J]. World Chin Med, 2021, 16(2): 249-253.

[9] 陆少君,蔡肇栩,陈文健,等. 和厚朴酚对非酒精性脂肪肝模型大鼠的改善作用[J]. 广东药科大学学报,2021,37(6):71-76.
LU S J, CAI Z X, CHEN W J, et al. Ameliorative effects of honokiol on non-alcoholic fatty liver disease of rat models[J]. J Guangdong Pharm Univ, 2021, 37(6): 71-76.

[10] KLEINER D E, BRUNT E M, VAN NATTA M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease[J]. Hepatology, 2005, 41(6): 1313-1321.

[11] BERARDO C, DI PASQUA L G, CAGNA M, et al. Nonalcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis: current issues and future perspectives in preclinical and clinical research[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(24): 9646.

[12] 黄华清,向爱民,赖大行,等. 利拉鲁肽对2型糖尿病非酒精性脂肪肝的治疗作用及可能机制研究[J]. 江西医药,2020,55(4):382-385,389.
HUANG H Q, XIANG A M, LAI D H, et al. Therapeutic effect and mechanism of liraglutide on type 2 diabetes nonalcoholic fatty liver disease[J]. Jiangxi Med J, 2020, 55(4): 382-385, 389.

[13] PIERANTONELLI I, SVEGLIATI-BARONI G. Nonalcoholic fatty liver disease: basic pathogenetic mechanisms in the progression from NAFLD to NASH[J]. Transplantation, 2019, 103(1): e1-e13.

[14] FUJII H, KAWADA N, Japan Study Group of Nafld Jsg-Nafld. The role of insulin resistance and diabetes in nonalcoholic fatty liver disease[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(11): 3863.

[15] DINIZ M F H S, BELEIGOLI A M R, SCHMIDT M I, et al. Homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) and metabolic syndrome at baseline of a multicentric Brazilian cohort: ELSA-Brasil study[J]. Cad Saude Publica, 2020, 36(8): e00072120.

[16] ZHANG F F, HU Z M, LI G P, et al. Hepatic CREBZF couples insulin to lipogenesis by inhibiting insig activity and contributes to hepatic steatosis in diet-induced insulin-resistant mice[J]. Hepatology, 2018, 68(4): 1361-1375.

[17] HONMA M, SAWADA S, UENO Y, et al. Selective insulin resistance with differential expressions of IRS-1 and IRS-2 in human NAFLD livers[J]. Int J Obes, 2018, 42(9): 1544-1555.

[18] LEE G H, OH K J, KIM H R, et al. Effect of BI-1 on insulin resistance through regulation of CYP2E1[J]. Sci Rep, 2016, 6: 32229.

[19] 徐俊,张瑶,胡昭端,等. “养元通络”针法对2型糖尿病大鼠肝脏IRS-1/PI3K/AKT/GSK-3β通路的影响[J]. 中国中医基础医学杂志,2021,27(11):1765-1768,1813.
XU J, ZHANG Y, HU Z D, et al. Effects of “Yangyuan Tongluo” acupuncture on hepatic IRS-1/PI3K/AKT/GSK-3β pathway in type 2 diabetes mellitus model rats[J]. J Basic Chin Med, 2021, 27(11): 1765-1768, 1813.

（收稿日期：2023-11-22　修回日期：2024-03-18）

（编辑：唐晓莲）