

中药组分HJJB方对非酒精性脂肪肝大鼠PP1-DNA-PK-USF1信号通路的干预作用

李红山¹, 周飞², 胡爱荣¹, 李德周¹, 陈少东³

(¹宁波市第二医院肝病科, 宁波 315010; ²宁波大学医学院, 宁波 315010; ³厦门大学医学院, 厦门 361005)

摘要: 目的: 基于蛋白磷酸酶(PP1)-DNA依赖的蛋白激酶(DNA-PK)-上游刺激因子1(USF1)信号通路, 探讨中药组分HJJB方防治非酒精性脂肪肝(NAFLD)的作用机制。方法: 采用高脂饮食诱导的大鼠NAFLD模型。设模型组、HJJB方组和罗格列酮组, 分别灌胃给药6周。HE染色观察肝组织病理变化; 测定肝组织甘油三酯(TG)、游离脂肪酸(FFA)含量的变化; 肝组织PP1、DNA-PK、USF1 mRNA水平和蛋白含量的变化。结果: 模型组肝组织出现显著的肝细胞脂肪变性及空泡样变, 肝组织TG、FFA含量较正常组显著升高($P<0.01$), 肝组织PP1、DNA-PK、USF1 mRNA水平和蛋白含量较正常组均明显升高($P<0.01$)。HJJB方组的上述病理改变明显减轻, 肝组织TG、FFA含量较模型组显著降低($P<0.01$), 肝组织PP1、DNA-PK、USF1 mRNA水平和蛋白含量较模型组显著降低($P<0.01$)。结论: HJJB方能显著降低脂肪肝大鼠肝组织PP1 mRNA水平和蛋白含量, 进而抑制其下游信号通路, 这可能是其防治NAFLD的重要机制。

关键词: HJJB方; 非酒精性脂肪肝; 蛋白磷酸酶1; 上游刺激因子1; DNA依赖的蛋白激酶; 信号通路; 甘油三酯; 游离脂肪酸

基金资助: 国家自然科学基金项目(No.81503404), 浙江省自然科学基金项目(No.LY15H270002), 浙江省中医药科技计划项目(No.2015ZA187)

Intervention effect of Chinese herb components HJJB Compound on PP1-DNA-PK-USF1 signaling pathway of non-alcoholic fatty liver rats

LI Hong-shan¹, ZHOU Fei², HU Ai-rong¹, LI De-zhou¹, CHEN Shao-dong³

(¹Department of Hepatology, Ningbo No.2 Hospital, Ningbo 315010, China; ²Medical College of Ningbo University, Ningbo 315010, China; ³Medical College of Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Objective: To explore the mechanism of Chinese herb component HJJB Compound on non-alcoholic fatty liver disease based on PP1-DNA-PK-USF1 signaling pathway. Methods: SD male rats were induced by high-fat diet for non-alcoholic fatty liver disease model. The rats were randomly divided into model group, HJJB group and rosiglitazone group, and were given intragastric administration for six weeks. The observing items including: liver pathology (HE staining); hepatic triglyceride (TG) and free fatty acid (FFA) content; mRNA and protein content changes of hepatic protein phosphatase 1 (PP1), DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) and upstream stimulating factor 1 (USF1). Results: Significant hepatocyte fatty degeneration and vesicle changes were observed in liver tissue of model group. The hepatic TG and FFA contents of model group were significantly higher than those of normal group ($P<0.01$), and mRNA levels and protein contents of liver tissue PP1, DNA-PK, USF1 in model group were significantly higher than those in normal group ($P<0.01$). Hepatic pathological changes in HJJB Compound group were meliorated, liver tissue TG and FFA contents of HJJB Compound group were significantly lower than those of model group ($P<0.01$), and mRNA levels and protein contents of liver tissue PP1, DNA-PK, USF1 mRNA of HJJB Compound group were significantly lower than those of model group ($P<0.01$). Conclusion: HJJB Compound can significantly decrease mRNA level and protein content of PP1 in the liver tissue of fatty liver rats, and then inhibit the downstream signaling pathway of PP1, which may be an important mechanism of HJJB Compound for prevention and treatment of non-alcoholic fatty liver disease.

Key words: HJJB Compound; Non-alcoholic fatty liver; PP1; USF1; DNA-PK; Signaling pathway; TG; FFA

Funding: National Natural Science Foundation of China (No.81503404), Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.LY15H270002), Science and Technology Program of Traditional Chinese Medicine of Zhejiang Province (No.2015ZA187)

非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是遗传、环境、代谢应激相关性疾病, 具有慢性进展经过、可诱发肝硬化和肝细胞癌等特点^[1], 随着生活方式的改变和饮食结构的调整, 其发病率不断攀升且逐渐低龄化, 已成为西方发达国家最普遍的慢性肝病^[2]。在我国, 亦有成为慢性肝病首要原因的趋势, 流行病学调查发现, 广州市老年人NAFLD的患病率为29.8%^[3], 乌鲁木齐社区居民NAFLD检出率高达54.0%^[4]。NAFLD对人类健康和社会发展造成的威胁, 日益凸显, 积极防治NAFLD具有重要意义。既往研究表明, 由红景天苷、姜黄素、绞股蓝总皂苷、白术多糖特定配比组成的中药组分复方HJJB方具有显著的防治NAFLD的药效学效应^[5], 对肝脏脂肪沉积的抑制效应尤为突出^[6]。但其防治NAFLD的机制尚不明确, 为此, 本研究拟采用高脂饮食诱导的大鼠NAFLD模型, 围绕“蛋白磷酸酶 (protein phosphatase 1, PP1)–DNA依赖的蛋白激酶 (DNA-dependent protein kinase, DNA-PK)–上游刺激因子1 (upstream stimulating factor 1, USF1)” 信号通路, 观察HJJB方对PP1及其信号通路的影响, 以揭示HJJB方防治NAFLD的作用机制。

材料

1. 动物 清洁级雄性SD大鼠32只, 体质量100–120g, 1月龄, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。饲养于宁波大学实验动物中心屏障动物房, 自由饮水。实验动物合格证号: SCXK(沪)2012–0002。

2. 药物与试剂 HJJB方组成: 红景天苷 (批号: ZL141220122, 含量: 98%)、姜黄素 (批号: ZL15021004A, 含量: 98%)、绞股蓝总皂苷 (批号: ZL150307100, 含量: 98%)、白术多糖 (批号: ZL150102141, 含量: 50%) 均购自南京泽郎生物科技有限公司, HJJB方剂量参照文献[6], 具体如下: 红景天苷5.77+绞股蓝总皂苷17.68+姜黄素4.35+白术多糖69.75 (单位: $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)。罗格列酮购自成都恒瑞制药有限公司, 批号: 150109, 人的临床用量为4mg/d, 根据人临床应用剂量转换, 得出大鼠的临床用量为 $0.4 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。高脂饲料购自上海普路腾生物科技有限公司。甘油三酯 (triglyceride, TG) (批号: 20151029)、游离脂肪酸 (free fatty acid, FFA) (批号: 20151030) 试剂盒购自南京建成生物工程研究所。肝组织PP1 (批号: 201510)、DNA-PK (批号: 201509)、磷酸化DNA-PK (pDNA-PK) (批号: 201511)、USF1 (批号: 201510) ELISA试剂盒, 均购自上海源叶生物科技公司。RNA抽提试剂盒:

TakaRa公司, 批号: AK9108。反转录试剂: TakaRa公司, 批号: RR036A。定量PCR试剂: TakaRa公司, 批号: DRR820A。PCR引物由上海涵悦生物科技有限公司设计, 上海生工生物技术有限公司合成。引物序列见表1。

表1 目的基因引物序列

基因名称	序列 (5' to 3')
PP1	上游: TGG GCT GTG TGG TTG TGT
	下游: ATG GTG TCC GAG ATG TGC
DNA-PK	上游: TTT GAT TGG AAG GGT TTT GA
	下游: AGC GTA TTT TGT GTT GTG GA
USF1	上游: ATC CAA AGA CCG AGA ACG CT
	下游: TCC AAG AAG ACG CAA CCA GG

3. 仪器 德国Eppendorf 4℃离心机, 上海拜力生物科技有限公司。美国PRO200匀浆器, 上海博谊生物科技有限公司。CYTATION3酶标仪, BioTek公司。Leica819型切片刀, 上海徠卡仪器有限公司。Cryotome E型冰冻切片仪, 美国Thermo公司。定量PCR仪: 7900 HT Sequence Detection System (ABI, USA)。

方法

1. 模型制备 参照文献[7]方法, 以高脂饲料 (10%猪油+2%胆固醇+88%基础饲料) 喂养14周建立大鼠NAFLD模型, 正常组大鼠给予正常饲料。

2. 动物分组与给药 自造模开始, 32只大鼠按随机数字表法随机分为正常组 (8只) 和造模组 (24只), 造模组第9周开始, 将造模组大鼠按随机数字表法随机分为模型组、HJJB方组和罗格列酮组, 每组各8只, 并灌胃给予对应药物, 正常组与模型组灌胃饮用水。共持续6周。

3. 检测指标与方法 在造模和用药周期完成后, 用2%戊巴比妥钠3mL/kg腹腔注射麻醉, 经下腔静脉采血, 3 000r/min离心15min后吸取血清, -70℃低温保存。在同一肝叶位置切取两小块组织, 置入10%中性福尔马林缓冲液中固定, 另定位取肝组织分装于离心管中, -70℃低温保存。分别检测以下指标: ①肝组织TG、FFA含量; 具体方法参照文献[8]; ②肝组织PP1、DNA-PK、pDNA-PK、USF1蛋白含量: 取100mg湿肝, 加入1mL PBS缓冲液, 冰浴中匀浆 (10 000r/min) 20s, 重复2次, 将匀浆液4℃ (3 600r/min) 离心20min, 取上清液, ELISA试剂盒检测; ③肝组织PP1、DNA-PK、USF1 mRNA水平: 每组大鼠各随机抽取5个样本, 定量PCR法检测: RNA提取按抽提试剂盒进

行,反转录按反转录试剂盒操作;④肝组织病理变化:HE常规染色。

4. 统计学方法 数据使用SPSS 16.0软件包进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析 Q 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1. 各组大鼠肝组织病理变化 见图1。HE染色结果显示:正常组大鼠肝细胞形态、结构正常,未见明显脂肪变性。模型组大鼠肝细胞脂肪变性明显,胞浆疏松,内可见大量脂肪滴聚集,伴有轻度的炎细胞浸润。HJJB方组和罗格列酮组的上述表现明显减轻,尤以HJJB方组减轻较为明显。

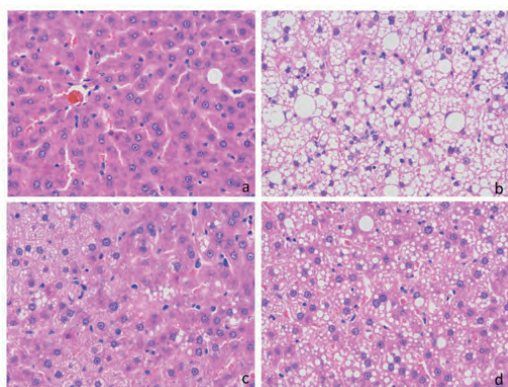


图1 各组大鼠肝组织脂肪变性示意图(HE×400)
注: a. 正常组; b. 模型组; c. HJJB方组; d. 罗格列酮组。

2. 各组大鼠肝组织TG、FFA含量的变化 见图2。模型组大鼠的肝组织TG、FFA含量较正常组均显著升高($P < 0.01$), HJJB方组及罗格列酮组肝组织TG、FFA含量较模型组均显著降低($P < 0.01$), HJJB方组肝组织TG、FFA含量显著低于罗格列酮组($P < 0.01$)。

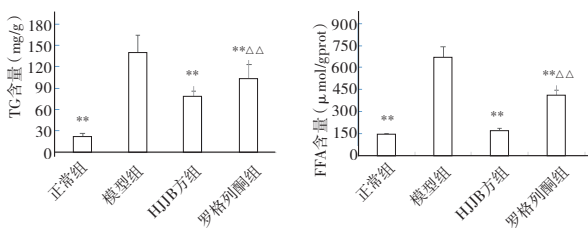


图2 各组大鼠肝组织TG、FFA含量的变化
注:与模型组比较,** $P < 0.01$;与HJJB方组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

3. 各组大鼠肝组织PP1、DNA-PK、USF1 mRNA水平的变化 见表2。模型组大鼠肝组织PP1、DNA-PK、USF1 mRNA水平较正常组显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,HJJB方组肝组织PP1、DNA-PK、USF1 mRNA水平显著降低($P < 0.01$)。罗格列酮组肝组织PP1、USF1 mRNA水平显著降低($P < 0.01$),DNA-PK mRNA水平无明显差异。HJJB方组的肝组织PP1、DNA-PK、USF1 mRNA水平显著低于罗格列酮组($P < 0.01$)。

表2 各组大鼠肝组织PP1、DNA-PK及USF1 mRNA的变化($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	PP1	DNA-PK	USF1
正常组	1.02 ± 0.22**	1.01 ± 0.16**	1.01 ± 0.16**
模型组	4.09 ± 0.49	3.48 ± 0.22	2.83 ± 0.30
HJJB方组	2.09 ± 0.25**	1.62 ± 0.19**	1.55 ± 0.21**
罗格列酮组	2.90 ± 0.23** $\Delta\Delta$	3.26 ± 0.54 $\Delta\Delta$	2.20 ± 0.18** $\Delta\Delta$

注:与模型组比较,** $P < 0.01$;与HJJB方组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。下表同。

4. 各组大鼠肝组织PP1、USF1蛋白含量的变化 见表3。模型组大鼠肝组织PP1、USF1蛋白含量较正常组显著升高($P < 0.01$),HJJB方组和罗格列酮组肝组织PP1、USF1蛋白含量较模型组显著降低($P < 0.01$)。HJJB方组肝组织PP1、USF1蛋白水平显著低于罗格列酮组($P < 0.05, P < 0.01$)。

表3 各组大鼠肝组织PP1及USF1蛋白含量的变化($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	PP1 (U/g)	USF1 (ng/g)
正常组	15.07 ± 3.43**	81.59 ± 12.88**
模型组	33.70 ± 5.97	196.79 ± 18.49
HJJB方组	20.59 ± 4.31**	125.61 ± 10.05**
罗格列酮组	25.17 ± 3.14** Δ	155.05 ± 17.67** $\Delta\Delta$

5. 各组大鼠肝组织DNA-PK、pDNA-PK蛋白水平的变化 见表4。模型组大鼠肝组织DNA-PK、pDNA-PK蛋白含量较正常组显著升高($P < 0.01$),HJJB方组肝组织DNA-PK、pDNA-PK蛋白含量和罗格列酮组肝组织pDNA-PK蛋白含量较模型组显著降低($P < 0.01$)。HJJB方组肝组织DNA-PK、pDNA-PK蛋白水平显著低于罗格列酮组($P < 0.01$)。

表4 各组大鼠肝组织DNA-PK及pDNA-PK蛋白含量的变化($\bar{x} \pm s, n=8, U/g$)

组别	DNA-PK	pDNA-PK
正常组	54.77 ± 6.25**	13.99 ± 2.79**
模型组	146.31 ± 17.41	36.90 ± 4.79
HJJB方组	72.12 ± 13.76**	20.34 ± 3.02**
罗格列酮组	137.67 ± 20.29 $\Delta\Delta$	29.45 ± 4.80** $\Delta\Delta$

讨论

近年来,西方医学对NAFLD的机制和治疗研究已逐步重视,但其仍然缺乏有效的治疗手段,对某一靶点产生阳性效应的药物,对其他靶点可能具有阴性作用,远不能适应临床实践的需要。而具有多靶点药效学特点的中医药显示出一定优势,成为我国临床治疗脂肪肝的重要方法,祛湿化痰方、健脾疏肝方等临床经验方对临床症状和实验室指标具有明显的药理效应,显示出良好的临床疗效和安全性^[9-10]。但传统中药复方存

在成分复杂,物质基础不明确的缺点,已成为制约中医药推广普及和疗效进一步提高的障碍,迫切需要研制基于中药有效成分的中药组分复方。本文的研究对象——HJJB方即是由红景天苷、姜黄素、绞股蓝总苷、白术多糖特定配比组成的中药组分复方,既往已证实,HJJB方具有良好的防治NAFLD的药效学效应^[5-6]。本研究结果表明,HJJB方对模型组大鼠显著升高的TG、FFA含量具有高强度的抑制效应($P<0.01$)。

PP1属于丝/苏氨酸蛋白磷酸酶,是蛋白磷酸酶家族的重要成员,广泛存在于真核细胞中,是调控蛋白质活性的关键酶分子,可调控多种细胞生物学过程。作为胰岛素信号转导的关键环节,PP1介导了胰岛素的多种生物学效应^[11]。PP1表达的异常上调,可激活DNA-PK,进而导致USF1的表达上调^[12]。USF1是脂肪酸合成的重要激活因子之一,在脂肪酸合成代谢中发挥着重要作用^[13],由此形成与脂肪代谢密切相关的信号通路,即,PP1-DNA-PK-USF1信号通路^[12]。有研究表明,USF1基因多态性增加了中国人NAFLD患病风险^[14],有望成为NAFLD治疗研究的重要靶点。

本实验结果显示,模型组大鼠肝组织PP1、DNA-PK、USF1的基因表达水平及蛋白含量均明显升高,提示脂肪肝大鼠PP1-DNA-PK-USF1信号通路明显激活。HJJB方干预后,肝组织PP1、DNA-PK、USF1的基因表达水平及蛋白含量均显著降低,提示HJJB方对PP1-DNA-PK-USF1信号通路具有明显的抑制作用,这可能是其防治NAFLD的重要机制。

中医认为,痰、湿、瘀、积是NAFLD的主要病理基础,痰瘀互结为脂肪肝的基本病机,痰瘀同治为脂肪肝的基本治法^[15]。HJJB方的组分红景天苷、姜黄素、绞股蓝总苷、白术多糖分别来源于益气活血中药红景天、活血化瘀中药姜黄、祛痰活血中药绞股蓝、健脾祛湿中药白术。方药组成简单,且切合NAFLD中医基本病机,寓中医药理论内涵,如能阐明其作用机制,最终有望为临床提供物质基础明确的抗NAFLD的中药组分复方。

参 考 文 献

[1] 胡义扬.中医药治疗非酒精性脂肪性肝病的优势与展望.世界中医药,2015,10(2):149-152
[2] Ibrahim M A,Kelleni M,Geddawy A.Nonalcoholic fatty liver disease:Current and potential therapies.Life Sci,2013,92(2):114-118

[3] 甘小玲,陈庆瑜,陈锦武,等.广州老年人非酒精性脂肪肝的流行情况及其与代谢综合征的关系.国际医药卫生导,2015,21(23):3432-3434
[4] 宋江美,咸亚静,莫合德斯·斯依提,等.乌鲁木齐市社区居民非酒精性脂肪肝流行现状调查.世界华人消化杂志,2016,24(12):1880-1884
[5] 李红山,朱德东,郑南红,等.基于均匀设计的防治非酒精性脂肪肝中药有效组分复方研究.中华中医药学刊,2014,32(10):2497-2500
[6] 李红山,朱德东,郑南红,等.高脂饮食大鼠脂肪肝脂质代谢轴的变化及中药对其的干预作用.中华全科医学杂志,2015,13(12):1929-1931
[7] Ding W J,Wang Y,Fan J G,et al.Regulation of adipokines by polyunsaturated fatty acids in a rat model of non-alcoholic steatohepatitis.Arch Iran Med,2014,7(8):563-568
[8] 李红山,朱德东,应豪,等.姜黄素-红景天苷组合对单纯高脂饮食诱导大鼠脂肪肝的干预作用.中药材,2015,38(5):1027-1029
[9] 李红山,冯琴,朱德东,等.祛湿化痰方治疗痰瘀互结型非酒精性脂肪性肝炎临床观察.中华中医药学刊,2013,31(8):1764-1767
[10] 李军祥,王允亮,刘敏,等.健脾疏肝方治疗非酒精性脂肪性肝炎多中心随机、对照的临床研究.中国中西医结合杂志,2014,34(1):15-19
[11] Zhang X,Ma D,Caruso M,et al.Quantitative phosphoproteomics reveals novel phosphorylation events in insulin signaling regulated by protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A.J Proteomics,2014,109:63-75
[12] Wong R H,Sul H S.Insulin signaling in fatty acid and fat synthesis:a transcriptional perspective.Curr Opin Pharmacol,2010,10(6):684-691
[13] Yuyama M,Fujimori K.Suppression of adipogenesis by valproic acid through repression of USF1-activated fatty acid synthesis in adipocytes.The Biochemical Journal,2014,459(3):489-503
[14] Wang Ying,Wang Bai-fang,Tong Jing,et al.USF-1 genetic polymorphisms confer a high risk of nonalcoholic fatty liver disease in Chinese population.International Journal of Clinical and Experimental Medicine,2015,8(2):2545-2553
[15] 孟胜喜,冯琴,彭景华,等.从痰瘀角度论治非酒精性脂肪性肝病.中华中医药杂志,2013,28(3):623-626

(收稿日期:2016年10月11日)