

## 绞股蓝皂苷干预2型糖尿病合并非酒精性脂肪肝病的机制

雷飞飞, 李云静, 李儒贵, 李刚, 李金科, 李芳, 谭华炳

雷飞飞, 李云静, 李儒贵, 李刚, 李金科, 李芳, 谭华炳, 湖北医药学院附属人民医院感染性疾病科 肝病研究所 湖北省十堰市 442000

雷飞飞, 主治医师, 从事肝病(感染)临床教学的科研工作.

基金项目: 湖北省卫生厅科研项目计划, No. JX4B58.

作者贡献分布: 课题设计、科研实施组织、论文定稿及审校工作主要由谭华炳完成; 雷飞飞、李云静、李儒贵、李刚、李金科及李芳在谭华炳的指导下, 开展动物实验、进行标本检测、分析实验数据、查阅参考文献、开展论文撰写.

通讯作者: 谭华炳, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 442000, 湖北省十堰市茅箭区朝阳中路39号, 湖北医药学院附属人民医院感染性疾病科; 肝病研究所. [renmthb@163.com](mailto:renmthb@163.com)

收稿日期: 2016-07-11

修回日期: 2016-08-12

接受日期: 2016-08-23

在线出版日期: 2016-10-28

### Mechanism underlying protective effect of gypenosides against type 2 diabetes mellitus and nonalcoholic fatty liver disease in rats

Fei-Fei Lei, Yun-Jing Li, Ru-Gui Li, Gang Li, Jin-Ke Li, Fang Li, Hua-Bing Tan

Fei-Fei Lei, Yun-Jing Li, Ru-Gui Li, Gang Li, Jin-Ke Li, Fang Li, Hua-Bing Tan, Department of Infections disease, Lab. of Liver disease, Renmin Hospital, Hubei University of Medical, Shiyan 442000, Hubei Province, China

Supported by: Scientific Research Plan of Health Department of Hubei Province, No. JX4B58.

Correspondence to: Hua-Bing Tan, Professor, Chief Physician, Department of Infections disease, Lab. of Liver disease, Renmin Hospital, Hubei University of Medical, 39 Chaoyang Middle Road, Maojian District, Shiyan

442000, Hubei Province, China. [renmthb@163.com](mailto:renmthb@163.com)

Received: 2016-07-11

Revised: 2016-08-12

Accepted: 2016-08-23

Published online: 2016-10-28

### Abstract AIM

To explore the mechanism underlying protective effect of gypenosides (GPS) against type 2 diabetes mellitus and nonalcoholic fatty liver disease (T2DM-NAFLD) in rats.

### METHODS

Sixty rats were randomly divided into five groups: blank control group, T2DM-NAFLD model group, low dose GPS group, medium dose GPS group, and high dose GPS group. The efficacy was confirmed by histopathology, and the expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) in the liver was analyzed by immunohistochemistry. In addition, the expression of peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) and cytochrome P4501A1 (CYP4501A1) mRNAs was detected by RT-PCR.

### RESULTS

Immunohistochemical study showed that the expression of TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B was significantly reduced by GPS, in a dose-dependent manner. The expression of PPAR $\gamma$  and CYP4501A1 mRNAs measured by RT-PCR was also significantly down-regulated by GPS. Moreover, GPS decreased the infiltration of liver fats and reversed the histopathological changes in a dose-dependent manner.

### ■背景资料

由于高营养、高脂饮食、运动量下降, 2型糖尿病并非酒精性脂肪肝(type 2 diabetes mellitus and nonalcoholic fatty liver disease, T2DM-NAFLD)发病率上升, 其导致的终末期肝病、心脑血管病已经成为影响人类健康的重要原因之一。但到目前为止, 没有治疗非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)的专用药物, 寻找和发现用于治疗NAFLD的药物显得十分迫切。

### ■同行评议者

刘长征, 副教授, 中国医学科学院基础医学研究所; 刘金钢, 教授, 中国医科大学第四医院党政办公室

## ■ 研发前沿

本文显示绞股蓝皂苷(gypenosides, GPS)作为NAFLD治疗药物机制明确, 可作为治疗NAFLD的候选药物。及时开展毒理和药理研究、临床试验, 确定该药能否应用于临床, 造福于NAFLD患者是亟待解决的问题。

## CONCLUSION

GPS protects against T2DM-NAFLD by down-regulating the expression of TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, PPAR $\gamma$  and CYP4501A1.

© The Author(s) 2016. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Gypenosides; T2DM-NAFLD; NF- $\kappa$ B; TNF- $\alpha$ ; PPAR $\gamma$ ; Cytochrome P4501A1

Lei FF, Li YJ, Li RG, Li G, Li JK, Li F, Tan HB. Mechanism underlying protective effect of gypenosides against type 2 diabetes mellitus and nonalcoholic fatty liver disease in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2016; 24(30): 4169-4176 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v24/i30/4169.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v24.i30.4169>

## 摘要

## 目的

研究绞股蓝皂苷对2型糖尿病合并非酒精性脂肪性肝病(type 2 diabetes mellitus and nonalcoholic fatty liver disease, T2DM-NAFLD)大鼠的作用机制。

## 方法

将60只SD大鼠随机分成5个实验组: 空白对照组(I组), T2DM-NAFLD模型组(II组), T2DM-NAFLD模型绞股蓝皂苷(gypenosides, GPS)小剂量治疗组(III组), T2DM-NAFLD模型GPS中剂量治疗组(IV组), T2DM-NAFLD模型GPS大剂量治疗组(V组)。肝组织病理学检查了解GPS治疗的效果, 免疫组织化学分析肝组织中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ), 核因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)表达情况, PCR对过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ , PPAR $\gamma$ )和细胞色素P4501A1(cytochrome P4501A1, CYP4501A1)的mRNA表达进行定量分析。

## 结果

GPS治疗组能显著降低血糖, 具有剂量依赖性。免疫组织化学分析发现, GPS治疗显著降低大鼠肝组织中细胞因子TNF- $\alpha$ 和NF- $\kappa$ B的表达, 并有剂量依赖关系。肝组织PCR检测发现, GPS治疗能下调肝组织PPAR $\gamma$ 和CYP4501A1的mRNA表达。GPS治疗能减轻治疗组大鼠肝脏脂肪浸润程度, 通过剂量依赖关系方式逆转脂肪肝程度。

## 结论

GPS通过下调细胞因子TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B以及PPAR $\gamma$ 和CYP4501A1 mRNA的表达对T2DM-NAFLD大鼠肝组织产生保护作用。

© The Author(s) 2016. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

关键词: 绞股蓝皂苷; 2型糖尿病合并非酒精性脂肪肝; 核因子- $\kappa$ B; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; 过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ ; 细胞色素P4501A1

**核心提要:** 本文通过动物实验的方法, 探索绞股蓝皂苷治疗2型糖尿病合并非酒精性脂肪性肝病(type 2 diabetes mellitus and nonalcoholic fatty liver disease, T2DM-NAFLD)的机制, 研究发现绞股蓝皂苷通过下调肝组织细胞因子肿瘤坏死因子- $\alpha$ , 核因子- $\kappa$ B表达情况, PCR对过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ 和细胞色素P4501A1 mRNA的表达对T2DM-NAFLD大鼠肝细胞产生保护作用。

雷飞飞, 李云静, 李儒贵, 李刚, 李金科, 李芳, 谭华炳. 绞股蓝皂苷干预2型糖尿病合并非酒精性脂肪肝的机制. *世界华人消化杂志* 2016; 24(30): 4169-4176 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v24/i30/4169.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v24.i30.4169>

## 0 引言

长期高营养、高脂饮食诱发胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)、2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)、非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)。目前, 人群中NAFLD患者比例约为20%-40%, 其中约30%的NAFLD患者病情进展成为非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)患者<sup>[1]</sup>。NAFLD是最常见的慢性肝脏疾病, 与血脂异常、高血压、IR、肥胖等代谢性综合征关系密切<sup>[2-4]</sup>。一般来说, IR及其后续的严重后果与NAFLD的发生与发展关系密切, 被认为是导致NAFLD的独立风险因子<sup>[5-7]</sup>。2型糖尿病合并非酒精性脂肪肝(type 2 diabetes mellitus and nonalcoholic fatty liver disease, T2DM-NAFLD)是一组代谢性疾病综合征, 相关的临床症状还包括IR、高血压和内脏肥胖<sup>[8]</sup>。T2DM和NAFLD是导致全球肥胖人群最主要的健康问题<sup>[9]</sup>。IR在T2DM-

NAFLD的发病机制上扮演着主要角色, 被认为是导致NASH开始出现和病情进展的关键原因<sup>[10]</sup>。目前有一些改善糖尿病患者IR的药物, 但没有批准用于NAFLD或NASH患者的专用药物<sup>[11]</sup>。研究和发现用于治疗NAFLD或NASH的药物显得十分必要, 国内外肝病学界均将寻找治疗NAFLD或NASH的期望寄托在中药及其提取物上, 其中绞股蓝及提取物绞股蓝皂苷(gypenosides, GPS)是被寄予较大希望的中药。绞股蓝是葫芦科多年生攀援草本植物, 其主要活性成分是GPS。既往研究<sup>[12]</sup>表明GPS可以增加免疫力, 改善高脂血症和保护心血管系统。近年来的药理学研究也证实GPS的药理学效应包括调节血脂代谢<sup>[13,14]</sup>, 抗高脂血症<sup>[13,15]</sup>, 抗肿瘤<sup>[16-18]</sup>, 抗炎<sup>[19]</sup>, 抗氧化<sup>[20,21]</sup>, 抗糖尿病<sup>[22]</sup>, 护肝<sup>[23]</sup>等作用。为临床推广应用, 需对GPS的作用机制深入研究。本研究通过检测肝组织肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ), 核因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)、细胞色素P4501A1(cytochrome 4501A1, CYP4501A1) mRNA、过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ (peroxisome proliferator activated receptor gamma, PPAR $\gamma$ )的表达, 探讨GPS治疗T2DM-NAFLD的机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** (1)实验动物: 60只SPF级♂SD大鼠, 体质量180-200 g, 湖北医药学院动物实验中心提供[合格证号: No.scxk(湘)2009-0004]。实验场地湖北省十堰市实验动物中心(设施合格证号: 0015644)。大鼠每6只/笼, 12 h光暗循环, 实验前1 wk适应性饲养。动物处于环境受控状态, 维持24℃, 湿度45%, 提供充足的食物和水供, 动物实验方法和目的符合人类的道德伦理标准和国际惯例, 湖北医药学院实验动物伦理委员会审查合规。取动物实验样本前12 h禁食; (2)主要实验试剂: 血糖(blood sugar, BS)检测试剂为设备原厂试剂; GPS(含量>98%)购自西安天丰生物科技有限公司; 链脲霉素(streptozotocin, STZ)购自美国Sigma公司; 蛋白分析试剂盒购自北京中山生物技术有限公司; 鼠抗TNF- $\alpha$ 、鼠抗NF- $\kappa$ B、HRP标记的羊抗鼠IgG购自美国Proteintech公司; RNAiso Plus(Total RNA extraction reagent)RNA提取试剂盒购自日本Takara公司; StarScript

II First-strand cDNA Synthesis Kit逆转录试剂盒和StarScript II SYBR Two-Step qRT-PCR Synthesis Kit实时荧光定量核酸扩增试剂盒购自美国Invitrogen公司; 高脂高糖饮食(high fat and sugar diet, HFSD)由湖北医药学院动物实验中心制备(83.25%基础饲料+10%猪油+5%糖+1.5%胆固醇+0.2%去氢胆酸钠+0.05%丙基硫氧嘧啶); (3)主要实验仪器: ZOlympus AU 2700全自动生化分析仪为日本Olympus公司产品; C1000 Touch™ 96孔快速PCR仪和CFX 385™ Real Time PCR扩增仪为美国Bio-Rad公司产品; Accu-Chek快速血糖仪为瑞士Roche公司产品; DL-45R-L冷冻低温离心机为上海中科生物医学高科技开发有限公司产品; 光学显微镜Olympus BX-50 Microscope为日本Olympus公司产品; 显微镜照相系统Leica Microsystems为德国Leica公司产品。

## 1.2 方法

**1.2.1 实验设计:** 适应性饲养1 wk后, 将60只SPF SD大鼠随机分为2组: 正常组(I组,  $n=8$ ), 正常饲料喂养; 模型组( $n=52$ ), HFSD喂养。HFSD喂养4 wk后, SD大鼠隔夜空腹腹腔注射STZ 40 mg/kg, 48 h后尾静脉取血, 血糖>11.1 mmol/L, 纳入实验组, 造模成功率为100%, 继续HFSD喂养4 wk。第9周第1天开始, 将T2DM-NAFLD模型大鼠分为模型组(II组)和3个GPS治疗组(III组、IV组、V组)。III组、IV组、V组分别给予200、400、800 mg/(kg·d)灌胃干预, 同时继续HFSD喂养, 实验周期14 wk。实验结束后, 通过眼窝静脉取血。右肝叶取出后立即用甲醛固定进行组织病理学检查和免疫组织化学分析。余下的肝脏组织和血液样本储存于-80℃冰箱用于后续的生物化学分析。

**1.2.2 血清生化检测:** 按设备操作常规检测BS。

**1.2.3 肝脏病理学检测:** 肝组织常规固定、石蜡包埋、切片。HE染色, Olympus BX-50光学显微镜检测, 分析脂肪肝变性程度评分并用Leica Microsystems显微镜照相系统选取典型图片保存。

**1.2.4 免疫组织化学检测:** 将1.2.3制备的切片脱蜡后用3% $H_2O_2$ 浸泡10 min猝灭细胞内的过氧化物酶活性。处理后的切片分别用鼠抗TNF- $\alpha$ 和鼠抗NF- $\kappa$ B单克隆抗体4℃孵育过夜, 然后用羊血清封闭20 min, 接着用二抗(HRP标记的羊抗鼠抗体)37℃孵育30 min, 最后与DAB- $H_2O_2$

## □ 相关报道

既往药理研究发现GPS具有调节血脂代谢、抗高脂血症、抗炎、抗氧化、抗糖尿病、护肝等与NAFLD治疗相关作用。本研究从分子水平进一步明确了GPS治疗NAFLD的机制, 为进一步开展临床毒理和药理研究打下了基础。



**创新盘点**

本文应用国际上成熟的T2DM-NAFLD模型,发现GPS通过下调肝组织细胞因子TNF- $\alpha$ 、核因子- $\kappa$ B,以及过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ 和细胞色素P4501A1 mRNA的表达对T2DM-NAFLD大鼠肝细胞产生保护作用,为开展临床研究打下了基础。

室温孵育放置10 min, Olympus BX-50光学显微镜放大400倍观察并用Leica Microsystems显微镜照相系统留存图片。

**1.2.5 PCR检测:** I组-V组肝脏样本总RNA的提取按照RNAiso Plus reagent试剂盒说明书进行操作,使用StarScript II First-strand cDNA Synthesis Kit逆转录试剂盒进行反转录操作, RNA通过C1000 PCR仪反转录得到cDNA。在CFX 385™ Real Time PCR扩增仪上使用StarScript II SYBR Two-Step qRT-PCR Synthesis Kit定量核酸扩增试剂盒检测mRNA的表达水平。PPAR $\gamma$ 引物: 上游引物: 5'-GGAGCCTAAGTTTGAGTTTGCTGTG-3'; 下游引物: 5'-TGCAGCAGGTTGCTTGGATG-3'(GenBank: NM\_0131-24.3)。细胞色素P4501A1(cytochrome P4501A1, CYP4501A1)引物: 上游引物: 5'-CTGGTTCTGGATACCCAGCTG-3'; 下游引物: 5'-CCTAGGGTTGGTTACCAGG-3'(GenBank: HQ\_0047-97.1)。GAPDH基因作为内参, 分别扩增并分析样本中各基因的表达情况。I组和II组、III组、IV组、V组之间的倍数变化用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法<sup>[24]</sup>计算。

**统计学处理** 所有数据采用SPSS23.0统计学软件处理, 数据以mean $\pm$ SD的方式表示, 用one-way ANOVA法进行数据分析, 治疗前后组内及组间比较用Dunnett's *t*-test检验。P<0.05为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 GPS治疗对BS影响** GPS治疗组BS水平显著低于II组, 呈剂量依赖性。数据将在其他论文发表, 本文不再赘述。

**2.2 组织病理学检查** 肉眼观 I组肝脏呈深红色, 表面光滑湿润, 富有弹性(图1A I)。II组肝脏体积增大, 表面可见黄色坏死病灶(图1A II)。干预组肝脏损伤明显减轻, 并呈剂量依赖性(图1A III-V)。显微镜观, I组见正常、清晰和规则的肝小叶组织结构, 及围绕中央静脉的肝细胞单层结构, 细胞质中含有丰富的嗜碱颗粒(图1B I), II组肝细胞中严重且广泛存在的脂质空泡, 肝小叶内灶状坏死并出现淋巴细胞浸润(图1B II)。干预组肝脏损伤明显减轻, 呈剂量依赖性(图1B III-V)。

### 2.3 免疫组织化学分析

**2.3.1 肝组织TNF- $\alpha$ 表达检测:** 免疫组织化学

分析正常组显示最低的TNF- $\alpha$ 表达水平(图2A I), 其他各个实验组都显示显著增高的TNF- $\alpha$ 表达水平(图2A II-V), II组TNF- $\alpha$ 表达水平最高(图2A II)。尽管GPS治疗组(200、400和800 mg/kg)TNF- $\alpha$ 表达水平明显低于II组, 但仍然高于I组(图2A III-V)。对SD大鼠肝脏中的TNF- $\alpha$ 表达细胞进行定量分析, 结果以mean $\pm$ SD表示, II组与I组比较, 有显著差异; 治疗组与II组比较, 有显著差异, 且呈剂量依赖性(图3)。

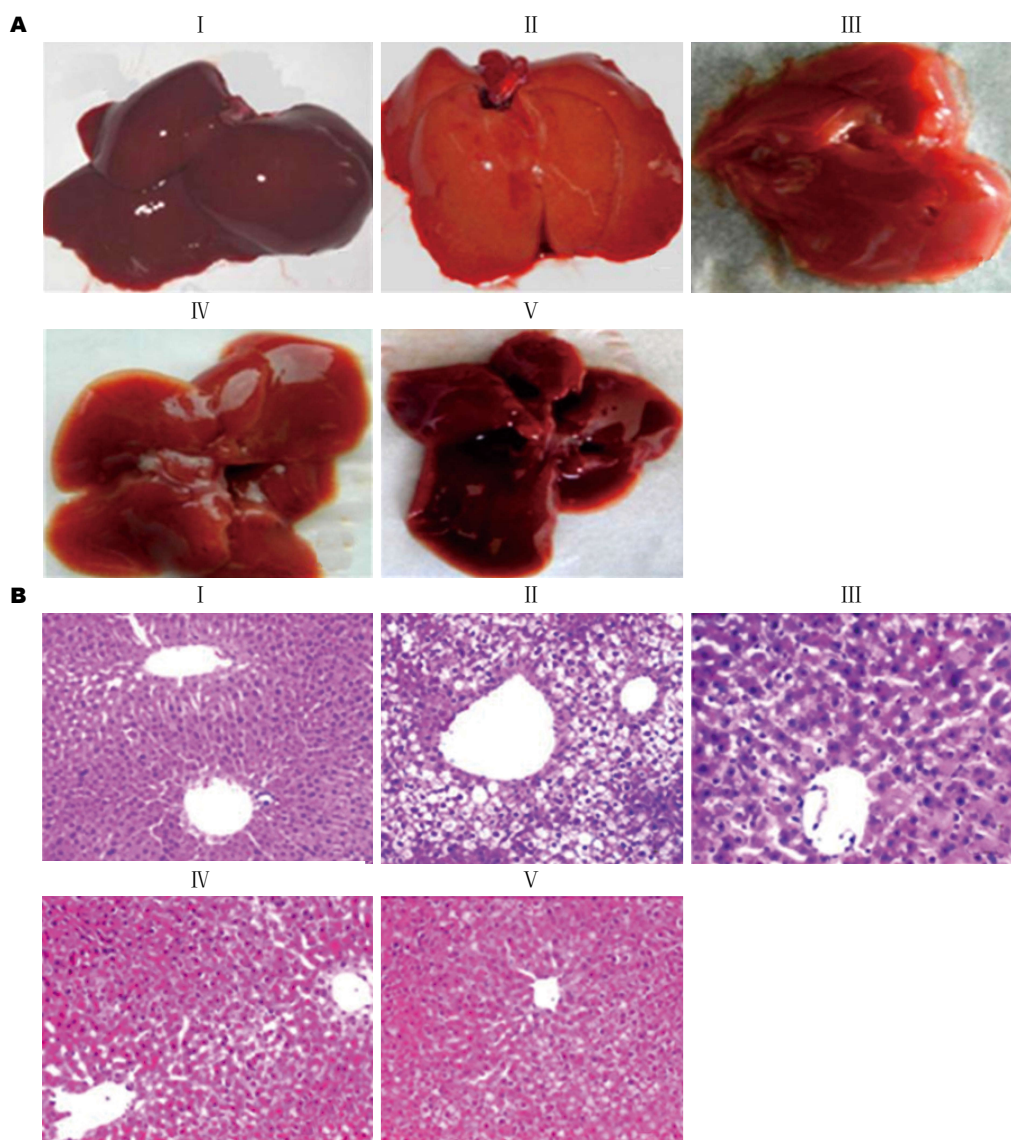
**2.3.2 肝组织NF- $\kappa$ B检测:** I组肝组织显示最低的NF- $\kappa$ B表达水平(图2B I), II组NF- $\kappa$ B表达水平最高(P<0.01, 图2B II)。GPS治疗组(200、400和800 mg/kg)NF- $\kappa$ B表达水平明显低于II组(图2B III-V)。对SD大鼠肝脏中的NF- $\kappa$ B表达细胞进行定量分析, 结果以mean $\pm$ SD表示, II组与I组比较, 有显著差异; 治疗组与II组比较, 有显著差异, 且呈剂量依赖性(图4)。

**2.4 肝组织PPAR $\gamma$  mRNA和CYP4501A1 mRNA表达变化** 为研究GPS治疗对T2DM-NAFLD模型大鼠的作用机制, 对大鼠GPS治疗前后肝组织PPAR $\gamma$  mRNA和CYP4501A1 mRNA表达变化进行检测。与II组比较, GPS治疗组PPAR $\gamma$  mRNA的表达明显减少, 尤其是V组(P<0.01, 图5)。与I组比较, II组CYP4501A1 mRNA的表达明显上调(P<0.01, 图6)。与II组比较, GPS治疗组CYP4501A1 mRNA的表达明显下调, 尤其是V组(P<0.05, 图6)。

## 3 讨论

通过HFSD联合胰岛素注射的方法建立SD大鼠T2DM-NAFLD模型是国内外常规的方法, 本研究应用这种得到国内外学术界认同的方法建立T2DM-NAFLD模型。在此基础上观察不同剂量GPS对T2DM-NAFLD大鼠脂肪肝程度的影响, 并通过检测肝组织有关因子探讨其干预T2DM-NAFLD的机制。

合理膳食, 适量锻炼和必要的药物干预(二甲双胍, 他汀类和贝特类)是治疗NAFLD的主要方法。但是, 这些方法并没有达到治疗NAFLD的理想效果, 其均有不良反应或有禁忌证, 且无公认的最有效药物疗法<sup>[25]</sup>。因此, 寻找治疗NAFLD或NASH有效方法且不良反应轻微的新药物疗法显得尤为迫切。皂苷被认为是一些民间医药或天然植物药的主要成分, 是



#### 应用要点

GPS是临床常用药物, 本研究在分子水平探索了GPS治疗NAFLD的机制, 为临床应用该药治疗NAFLD打下了基础, 具有广泛的临床应用前景. 研究发现TNF- $\alpha$ 与脂肪肝程度相关, 对临床观察NAFLD治疗效果具有重要意义.

图1 组织病理学观察: A: 肝脏肉眼观(I组肝脏呈深红色, 光滑湿润, 富有弹性; II组体积增大, 表面可见黄色坏死病灶; III组-V组肝脏损伤减轻, 呈现剂量依赖性); B: 肝脏显微镜观(HE染色 $\times 200$ , I组肝组织结构正常, 细胞质中含有丰富的嗜碱颗粒; II组肝细胞严重且广泛存在的脂质空泡, 肝小叶内灶状坏死并出现淋巴细胞浸润; III组-V组干预组肝细胞脂质空泡减轻, 呈现剂量依赖性).

天然存在的三萜烯糖苷或类固醇, 具有多种药理学作用或生物学效应. 尤其要指出的是皂苷具有调节动物免疫系统的作用, 具有成为有效疫苗佐剂的潜能<sup>[26]</sup>. 既往研究证明GPS具有降低T2DM-NAFLD大鼠模型血糖、血脂作用, 并有抑制脂肪肝程度的作用<sup>[27-29]</sup>, 本研究在既往研究的基础上探讨GPS干预T2DM-NAFLD的机制.

TNF- $\alpha$ 是一种促炎细胞因子, 在HFSD法诱导T2DM-NAFLD大鼠模型的建立中起主要作用. 肝脏中单核巨噬细胞系统的主要成员枯否细胞是产生TNF- $\alpha$ 的主要细胞, 激活枯否细胞能增加TNF- $\alpha$ 的表达, 与NAFLD的产生发

展密切相关. 既往研究<sup>[30]</sup>发现T2DM-NAFLD大鼠模型中抑制TNF- $\alpha$ 能降低肝中的脂肪存储. 本研究中用TNF- $\alpha$ 的免疫组织化学分析评估肝脏的损伤程度, 与对照组相比, 模型组TNF- $\alpha$ 表达水平上升, 而GPS治疗组能下调TNF- $\alpha$ 的表达, 说明GPS通过抑制TNF- $\alpha$ 的表达达到降低T2DM-NAFLD大鼠脂肪肝程度的目的.

NF- $\kappa$ B是一种可被致炎因子和反应性氧介导物激活的转录因子, 调控多种基因产物参与肝脏炎症、肝纤维化及干细胞的再生和凋亡等进程<sup>[31]</sup>, 同时氧自由基又反过来诱导NF- $\kappa$ B的活化, NAFLD大鼠模型NF- $\kappa$ B表达增加,



### 名词解释

2型糖尿病合并非酒精性脂肪肝(T2DM-NAFLD): 一组代谢性疾病综合征, 相关的临床症状还包括胰岛素抵抗、高血压和内脏肥胖, 是在T2DM基础上发生的NAFLD.

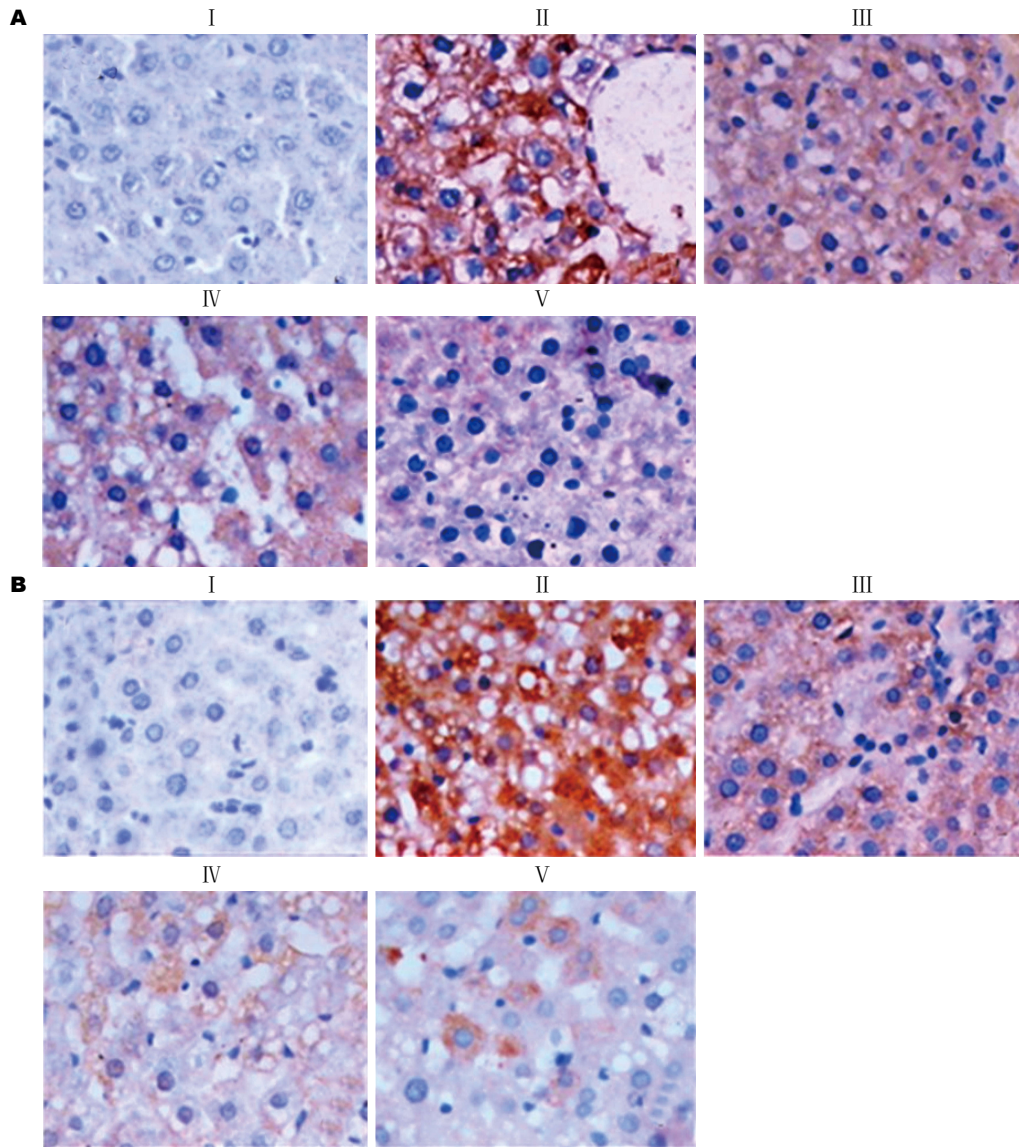


图 2 免疫组织化学检测( $\times 40$ ). A: 肝组织TNF- $\alpha$ 免疫组织化学表达检测( I 组最低, II 组最高, III组 - V 组低于 II 组, 但高于 I 组); B: 肝组织NF- $\kappa$ B免疫组织化学表达检测( I 组最低, II 组最高, III组 - V 组低于 II 组, 但高于 I 组). TNF- $\alpha$ : 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; NF- $\kappa$ B: 核因子- $\kappa$ B.

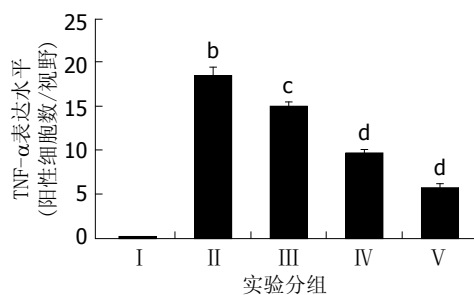


图 3 TNF- $\alpha$ 阳性细胞定量分析结果(mean  $\pm$  SD,  $n = 12$ ). <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs I 组; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs II 组. TNF- $\alpha$ : 肿瘤坏死因子- $\alpha$ .

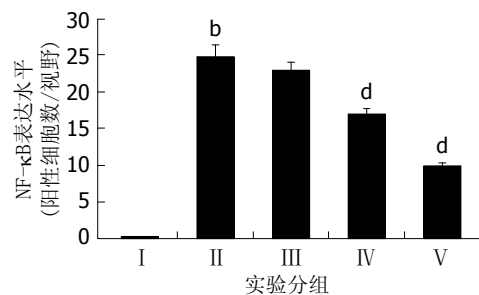


图 4 NF- $\kappa$ B阳性细胞定量分析结果(mean  $\pm$  SD,  $n = 12$ ). <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs I 组; <sup>c</sup> $P < 0.01$  vs II 组. NF- $\kappa$ B: 核因子- $\kappa$ B.

通过药物干预可以使TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B表达水平下降<sup>[32]</sup>. 本研究与上述结果相似, 且其下降程度呈剂量依赖性.

PPAR $\gamma$ 是核激素受体超家族成员, 位于染色体的3p25, 编码核转录因子影响上百种基因的标志物. 之前的研究<sup>[33]</sup>发现, NASH患者肝脏

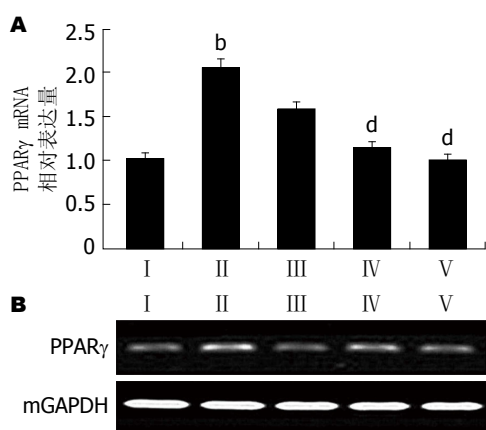


图 5 PCR检测PPAR $\gamma$  mRNA的变化(mean  $\pm$  SD,  $n = 12$ ). A: PPAR $\gamma$  mRNA相对表达量; B: PPAR $\gamma$  mRNA的表达条带图。<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs I组; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs II组。PPAR $\gamma$ : 过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ 。

中PPAR $\gamma$ 的水平都出现了升高。PPAR $\gamma$ 能增加脂蛋白脂肪酶的表达, 后者分配脂肪到达肝脂肪细胞, 限制脂肪酸流动到肝脏。在本研究中, 与模型组对比, GPS治疗组PPAR $\gamma$ 的表达下调, 证实GPS的护肝机制可能与改善PPAR $\gamma$ 的表达密切相关。

CYP4501A1是一种导致活性氧产生的最有效微粒体细胞色素同工酶, 肝脏中的CYP4501A1表达是判断氧化应激程度的主要指标<sup>[34]</sup>。本研究发现, 模型组CYP4501A1的表达水平相比于对照组明显升高; 与模型组相比, 小剂量、中剂量的GPS干预虽然可以降低CYP4501A1的表达, 但差异无统计学意义; 大剂量GPS治疗组中CYP4501A1的表达量明显下降, 差异具有统计学意义。说明抑制CYP4501A1的表达存在剂量依赖性, 抑制机体过氧化需要大剂量的GPS才能实现。

总之, TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B、PPAR $\gamma$ 、CYP4501A1的表达水平与T2DM-NAFLD的发生发展关系密切, 且TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B、PPAR $\gamma$ 、CYP4501A1之间相互影响。GPS通过影响这些因子在肝脏的表达, 从而达到干预T2DM-NAFLD脂肪肝程度的作用, 其有望成为治疗该病的专用药物, 值得进一步开展临床试验, 观察临床疗效及不良反应。

#### 4 参考文献

- 1 Sanyal AJ. NASH: A global health problem. *Hepatol Res* 2011; 41: 670-674 [PMID: 21711426 DOI: 10.1111/j.1872-034X.2011.00824.x]
- 2 Jou J, Choi SS, Diehl AM. Mechanisms of disease progression in nonalcoholic fatty liver disease.

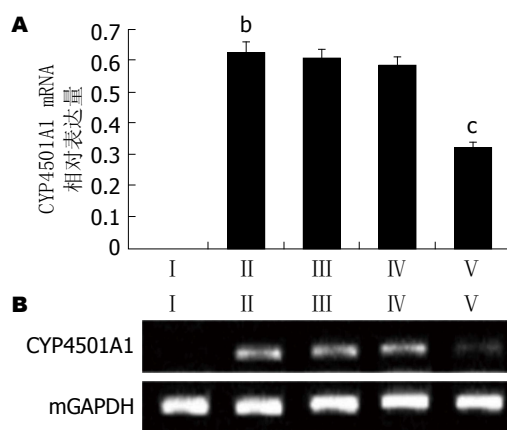


图 6 GPS治疗HFSD诱导的T2DM-NAFLD模型大鼠后CYP4501A1 mRNA的变化(mean  $\pm$  SD,  $n = 12$ ). A: CYP4501A1 mRNA相对表达量; B: CYP4501A1 mRNA的表达条带图。<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs I组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs II组。GPS: 绞股蓝皂苷; HFSD: 高脂高糖饮食; T2DM-NAFLD: 2型糖尿病合并非酒精性脂肪性肝病。

□ 同行评价  
本文通过动物实验的方法, 探讨了GPS治疗T2DM-NAFLD的机制, 对指导临床应用GPS应用具有指导意义, 对应用TNF- $\alpha$ 观察药物疗效也有一定的指导意义。

- Semin Liver Dis* 2008; 28: 370-379 [PMID: 18956293 DOI: 10.1055/s-0028-1091981]
- 3 Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002; 346: 1221-1231 [PMID: 11961152 DOI: 10.1056/NEJMr011775]
- 4 Angulo P. NAFLD, obesity, and bariatric surgery. *Gastroenterology* 2006; 130: 1848-1852 [PMID: 16697746 DOI: 10.1053/j.gastro.2006.03.041]
- 5 Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, Bianchi G, Bugianesi E, McCullough AJ, Forlani G, Melchionda N. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med* 1999; 107: 450-455 [PMID: 10569299 DOI: 10.1016/S0002-9343(99)00271-5]
- 6 Marchesini G, Marzocchi R, Agostini F, Bugianesi E. Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol* 2005; 16: 421-427 [PMID: 15990591 DOI: 10.1097/01.mol.0000174153.53683.f2]
- 7 Park SH, Kim BI, Yun JW, Kim JW, Park DI, Cho YK, Sung IK, Park CY, Sohn CI, Jeon WK, Kim H, Rhee EJ, Lee WY, Kim SW. Insulin resistance and C-reactive protein as independent risk factors for non-alcoholic fatty liver disease in non-obese Asian men. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 694-698 [PMID: 15151626 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2004.03362.x]
- 8 Farrell GC. The liver and the waistline: Fifty years of growth. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24 Suppl 3: S105-S118 [PMID: 19799688 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2009.06080.x]
- 9 Feneberg A, Malfertheiner P. Epidemic trends of obesity with impact on metabolism and digestive diseases. *Dig Dis* 2012; 30: 143-147 [PMID: 22722428 DOI: 10.1159/000336660]
- 10 Larter CZ, Chitturi S, Heydet D, Farrell GC. A fresh look at NASH pathogenesis. Part 1: the metabolic movers. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 672-690 [PMID: 20492324 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2010.06253.x]
- 11 Dowman JK, Armstrong MJ, Tomlinson JW, Newsome PN. Current therapeutic strategies in

- non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Obes Metab* 2011; 13: 692-702 [PMID: 21449949 DOI: 10.1111/j.1463-1326.2011.01403.x]
- 12 Bai MS, Gao JM, Fan C, et al. Bioactive dammarane-type triterpenoids derived from the acid hydrolysate of *Gynostemma pentaphyllum* saponins. *Food Chem* 2010; 119: 306-310 [DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.06.033]
  - 13 Megalli S, Aktan F, Davies NM, Roufogalis BD. Phytopreventative anti-hyperlipidemic effects of *gynostemma pentaphyllum* in rats. *J Pharm Pharm Sci* 2005; 8: 507-515 [PMID: 16401396]
  - 14 Shen N, Xu WP, Li M, Ouyang X, Ma J, Luo HZ, Li WD. Effect of five leaf *gynostemma* herb saponin on lipid metabolism in hyperlipidemia rats. *Zhongxiyi Jiehe Xinnaoxueguanbing Zazhi* 2011; 9: 1081-1083
  - 15 la Cour B, Mølgaard P, Yi Z. Traditional Chinese medicine in treatment of hyperlipidaemia. *J Ethnopharmacol* 1995; 46: 125-129 [PMID: 7650951 DOI: 10.1016/0378-8741(95)01234-5]
  - 16 Wang QF, Chen JC, Hsieh SJ, Cheng CC, Hsu SL. Regulation of Bcl-2 family molecules and activation of caspase cascade involved in gypenosides-induced apoptosis in human hepatoma cells. *Cancer Lett* 2002; 183: 169-178 [PMID: 12065092 DOI: 10.1016/S0304-3835(01)00828-X]
  - 17 Chen JC, Lu KW, Tsai ML, Hsu SC, Kuo CL, Yang JS, Hsia TC, Yu CS, Chou ST, Kao MC, Chung JG, Wood WG. Gypenosides induced G0/G1 arrest via CHK2 and apoptosis through endoplasmic reticulum stress and mitochondria-dependent pathways in human tongue cancer SCC-4 cells. *Oral Oncol* 2009; 45: 273-283 [PMID: 18674953 DOI: 10.1016/j.oraloncology.2008.05.012]
  - 18 Lin JJ, Hsu HY, Yang JS, Lu KW, Wu RS, Wu KC, Lai TY, Chen PY, Ma CY, Wood WG, Chung JG. Molecular evidence of anti-leukemia activity of gypenosides on human myeloid leukemia HL-60 cells in vitro and in vivo using a HL-60 cells murine xenograft model. *Phytomedicine* 2011; 18: 1075-1085 [PMID: 21596541 DOI: 10.1016/j.phymed.2011.03.009]
  - 19 Quan Y, Qian MZ. [Effect and mechanism of gypenoside on the inflammatory molecular expression in high-fat induced atherosclerosis rats]. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 2010; 30: 403-406 [PMID: 20669679]
  - 20 Li L, Jiao L, Lau BH. Protective effect of gypenosides against oxidative stress in phagocytes, vascular endothelial cells and liver microsomes. *Cancer Biother* 1993; 8: 263-272 [PMID: 7804367 DOI: 10.1089/cbr.1993.8.263]
  - 21 Aktan F, Henness S, Roufogalis BD, Ammit AJ. Gypenosides derived from *Gynostemma pentaphyllum* suppress NO synthesis in murine macrophages by inhibiting iNOS enzymatic activity and attenuating NF-kappaB-mediated iNOS protein expression. *Nitric Oxide* 2003; 8: 235-242 [PMID: 12895433 DOI: 10.1016/S1089-8603(03)00032-6]
  - 22 Yeo J, Kang YJ, Jeon SM, Jung UJ, Lee MK, Song H, Choi MS. Potential hypoglycemic effect of an ethanol extract of *Gynostemma pentaphyllum* in C57BL/KsJ-db/db mice. *J Med Food* 2008; 11: 709-716 [PMID: 19053864 DOI: 10.1089/jmf.2007.0148]
  - 23 Chen JC, Tsai CC, Chen LD, Chen HH, Wang WC. Therapeutic effect of gypenoside on chronic liver injury and fibrosis induced by CCl4 in rats. *Am J Chin Med* 2000; 28: 175-185 [PMID: 10999436 DOI: 10.1142/S0192415X00000222]
  - 24 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402-408 [PMID: 11846609 DOI: 10.1006/meth.2001.1262]
  - 25 Raszeja-Wyszomirska J, Lawniczak M, Marlicz W, Mieżyńska-Kurtycz J, Milkiewicz P. [Non-alcoholic fatty liver disease--new view]. *Pol Merkur Lekarski* 2008; 24: 568-571 [PMID: 18702346]
  - 26 Kukhetpitakwong R, Hahnvajjanawong C, Homchampa P, Leelavatcharamas V, Satra J, Khunkitti W. Immunological adjuvant activities of saponin extracts from the pods of *Acacia concinna*. *Int Immunopharmacol* 2006; 6: 1729-1735 [PMID: 16979128 DOI: 10.1016/j.intimp.2006.08.004]
  - 27 贺琴, 雷飞飞, 李儒贵, 谭华炳. 绞股蓝皂苷降低2型糖尿病并非酒精性脂肪性肝病大鼠血糖、血脂的机理研究. *湖北医药学院学报* 2013; 32: 39-43, 封3
  - 28 闵怀臻, 贺琴, 李金科, 任永生, 谭华炳. 绞股蓝皂苷对2型糖尿病并NAFLD大鼠肝组织TNF- $\alpha$ mRNA表达和血硫化氢的影响. *湖北医药学院学报* 2013; 32: 317-324
  - 29 贺琴, 李芳, 谭华炳. 绞股蓝皂苷对2型糖尿病并非酒精性脂肪性肝病大鼠脂质过氧化的影响. *医药导报* 2014; 33: 1549-1553
  - 30 Gao HY, Huang J, Wang HY, Du XW, Cheng SM, Han Y, Wang LF, Li GY, Wang JH. Protective effect of Zhuyeqing liquor, a Chinese traditional health liquor, on acute alcohol-induced liver injury in mice. *J Inflamm (Lond)* 2013; 10: 30 [PMID: 24090365 DOI: 10.1186/1476-9255-10-30]
  - 31 Malaguarnera M, Di Rosa M, Nicoletti F, Malaguarnera L. Molecular mechanisms involved in NAFLD progression. *J Mol Med (Berl)* 2009; 87: 679-695 [PMID: 19352614 DOI: 10.1007/s00109-009-0464-1]
  - 32 彭继升, 杨晋翔, 安静, 魏玥, 邱岳. 降浊化痰合剂对2型糖尿病合并非酒精性脂肪肝大鼠NF- $\kappa$ B通路的作用. *上海中医药杂志* 2013; 47: 74-77
  - 33 Wang J, Guo X, Wu P, Song J, Ye C, Yu S, Zhang J, Dong W. Association between the Pro12Ala polymorphism of PPAR- $\gamma$  gene and the non-alcoholic fatty liver disease: a meta-analysis. *Gene* 2013; 528: 328-334 [PMID: 23891820 DOI: 10.1016/j.gene.2013.07.14]
  - 34 Weltman MD, Farrell GC, Hall P, Ingelman-Sundberg M, Liddle C. Hepatic cytochrome P450 2E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1998; 27: 128-133 [PMID: 9425928 DOI: 10.1002/hep.510270121]

编辑: 闫晋利 电编: 胡珊







Published by **Baishideng Publishing Group Inc**  
8226 Regency Drive, Pleasanton,  
CA 94588, USA  
Fax: +1-925-223-8242  
Telephone: +1-925-223-8243  
E-mail: [bpgoffice@wjgnet.com](mailto:bpgoffice@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

