

4-羟基-苯丙噁唑-2-酮对非酒精性脂肪肝病模型大鼠炎症和凋亡信号通路的影响^Δ

徐万鹏^{1*}, 林 军¹, 梁英琴¹, 周焕芳¹, 张 华¹, 黄仕珍², 孙雪梅¹, 韦秀桂³, 王红园¹, 刘 林^{1#}(1.广西医科大学药学院, 南宁 530021; 2.南宁市第二人民医院神经外科, 南宁 530031; 3.南宁市第一人民医院药剂科, 南宁 530022)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)11-1298-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.11.04

摘要 目的:探讨4-羟基-苯丙噁唑-2-酮对非酒精性脂肪肝病(NAFLD)模型大鼠炎症和凋亡信号通路的影响。方法:将SD大鼠分为正常对照组(10只)和造模组(50只),正常对照组大鼠给予基础饲料,造模组大鼠给予高脂饲料以复制NAFLD模型。造模成功后,将大鼠分为正常对照组、模型组、水飞蓟宾组(26.25 mg/kg)和4-羟基-苯丙噁唑-2-酮高、中、低剂量组(100、50、25 mg/kg),每组8只,正常对照组和模型组大鼠灌胃0.6%羧甲基纤维素钠溶液,其余各组大鼠灌胃相应药物,灌胃体积为10 mL/kg,每天1次,连续4周。末次给药后,检测大鼠血清中白蛋白(ALB)、总蛋白(TP)、球蛋白(GLB)水平,ALB/GLB比值以及游离脂肪酸(FFA)水平;采用TUNEL染色法观察大鼠肝细胞凋亡情况;采用Western blot法检测大鼠肝组织中炎症信号通路相关蛋白[Toll样受体4(TLR4)、髓样分化因子88(MyD88)、核因子κB p65(NF-κB p65)、NF-κB抑制蛋白(IκBα)]的表达水平或磷酸化水平以及凋亡信号通路相关蛋白[B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、胱天蛋白酶3(caspase-3)]的表达水平。结果:与模型组比较,4-羟基-苯丙噁唑-2-酮各剂量组大鼠血清中TP(低剂量组除外)、GLB、FFA水平和肝组织中TLR4(低剂量组除外)、MyD88(中剂量组除外)、caspase-3蛋白表达水平以及NF-κB p65、IκBα的磷酸化水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),血清中ALB/GLB比值和肝组织中Bcl-2/Bax比值均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),肝细胞凋亡现象有所改善。结论:4-羟基-苯丙噁唑-2-酮可改善大鼠NAFLD状态,其作用机制可能与抑制肝组织中TLR4/MyD88/NF-κB信号通路相关蛋白和凋亡相关蛋白表达有关。

关键词 4-羟基-苯丙噁唑-2-酮;非酒精性脂肪肝病;炎症;凋亡;TLR4/MyD88/NF-κB信号通路;大鼠

[2021-01-30]. <http://www.sxfda.gov.cn/info/1006/41806.htm>.

[18] 贺盛亮,夏大华,董易达.基于提升服务能力的执业药师制度完善对策[J].中国药业,2016,25(16):1-3

[19] 湖北省药品监督管理局.执业药师“挂证”终极解决办法[EB/OL].(2020-11-16)[2020-12-17].http://fda.hubei.gov.cn/bmdt/ztzl/aqyyy/ympk/202011/t20201116_3033358.shtml.

[20] 李芳,赵梦遐,贺盛亮.Excel软件在卫生专业技术资格考试报考年限计算中的应用[J].卫生职业教育,2016,34(18):155-157.

[21] 国家药品监督管理局执业药师资格认证中心.关于加强执业药师管理工作的通知[EB/OL].(2004-07-08)[2020-12-20].<http://www.cqplp.org/info/link.aspx?id=45&page=1>.

[22] 国家药品监督管理局.关于现有执业药师使用管理问题的通知[EB/OL].(2015-11-20)[2020-12-20].<https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fgwj/gzwj/gzwjzh/20151120120001591.html>.

[23] 国家药品监督管理局.2019年度药品监管统计年报[EB/OL].(2020-08-05)[2020-12-20].<https://www.nmpa.gov.cn/zwgk/tjxx/tjnb/20200805110116109.html>.

[24] 国家卫生健康委员会.2019年我国卫生健康事业发展统计公报[EB/OL].(2020-06-06)[2020-12-20].<http://www.nhc.gov.cn/guihuaxxs/s10748/202006/ebfe31f24cc145b-198dd730603ec4442.shtml>.

[25] 国家药品监督管理局执业药师资格认证中心.全国执业药师确认登记名单[EB/OL].[2021-02-21].http://cqplp.org/info/link_gscyys.html.

[26] 国家药品监督管理局执业药师资格认证中心.2019年度国家执业药师职业资格考试结果发布[EB/OL].(2020-06-29)[2021-02-21].<http://www.cqplp.org/info/link.aspx?id=4157&page=1>.

[27] 国家药品监督管理局执业药师资格认证中心.2020年12月全国执业药师注册情况[EB/OL].(2021-01-13)[2021-02-21].<http://www.cqplp.org/info/link.aspx?id=4489&page=1>.

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81660106);广西高校中青年骨干教师基础能力提升项目(No.2018KY0115)

* 硕士研究生。研究方向:中药药理学。E-mail: xuwanpeng688@126.com

通信作者: 讲师, 博士研究生。研究方向: 中药药理学。E-mail: 348660599@qq.com

(收稿日期:2021-01-01 修回日期:2021-03-26)
(编辑:刘明伟)

Effects of 4-hydroxy-2(3H)-benzoxazolone on Inflammatory and Apoptosis Signaling Pathways in Non-alcoholic Fatty Liver Disease Model Rats

XU Wanpeng¹, LIN Jun¹, LIANG Yingqin¹, ZHOU Huanfang¹, ZHANG Hua¹, HUANG Shizhen², SUN Xuemei¹, WEI Xiugui³, WANG Hongyuan¹, LIU Lin¹ (1. School of Pharmacy, Guangxi Medical University, Guangxi 530021; 2. Neurosurgery Department, the Second People's Hospital of Nanning, Guangxi 530031; 3. Pharmacy Department, the First People's Hospital of Nanning, Guangxi 530022)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the effects of 4-hydroxy-2(3H)-benzoxazolone on inflammatory and apoptosis signaling pathways in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) model rats. METHODS: SD rats were divided into normal control group (10 rats) and modeling group (50 rats). Normal control group was given basic diet, and modeling group were given high-fat diet to induce NAFLD model. After modeling, the rats were divided into normal control group, model group, silibinin group (26.25 mg/kg), and 4-hydroxy-2(3H)-benzoxazolone high-dose, medium-dose and low-dose groups (100, 50, 25 mg/kg), with 8 rats in each group. Normal control group and modeling group were given 0.6% CMC-Na intragastrically, and other groups were given relevant medicine 10 mL/kg intragastrically, once a day, for consecutive 4 weeks. After last medication, the serum levels of albumin (ALB), total protein (TP), globulin (GLB), ALB/GLB and free fatty acid (FFA) were detected; TUNEL staining was used to observe the apoptosis of rat hepatocytes. Western blot assay was used to detect the protein expression and phosphorylation level of inflammatory signaling pathway related proteins [Toll-like receptor 4 (TLR4), myeloid differentiation factor 88 (MyD88), nuclear factor- κ B p65 (NF- κ B p65), NF- κ B inhibitor protein (I κ B α)] in liver tissue as well as the expression of apoptosis signaling pathway related proteins [B cell lymphoma 2(Bcl-2), Bax, caspase-3]. RESULTS: Compared with model group, serum levels of TP (except for low-dose group), GLB and FFA, the protein expression of TLR4 (except for low-dose group), MyD88 (except for medium-dose group) and caspase-3, the phosphorylation levels of NF- κ B p65 and I κ B α protein were decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The ratio of ALB/GLB in serum and the ratio of Bcl-2/Bax in liver tissue were significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the phenomenon of hepatocyte apoptosis was improved. CONCLUSIONS: 4-hydroxy-2(3H)-benzoxazolone can ameliorate NAFLD in rats, and the mechanism may be associated with inhibiting the expression TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway-related proteins and apoptosis-related proteins in liver tissues.

KEYWORDS 4-hydroxy-2(3H)-benzoxazolone; Non-alcoholic fatty liver disease; Inflammation; Apoptosis; TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway; Rats

随着经济的快速发展,人们生活节奏和饮食方式也发生了变化,发生肥胖的人数越来越多,而肥胖人群也更容易患非酒精性脂肪性肝病(Nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)^[1-2]。NAFLD是由肝中脂质代谢失衡引起、超过5%肝细胞发生脂肪变性的疾病,若不进行相应治疗,NAFLD可发展为肝硬化或肝癌^[3-4]。NAFLD的发病机制复杂并伴随其他代谢系统的疾病,目前在临床上尚无特效治疗药物^[5-6]。因此,积极开发新型的天然药物来缓解该疾病的发生发展,已成为当今肝病领域研究的热点。

Toll样受体4(TLR4)/髓样分化因子88(MyD88)/核因子 κ B(NF- κ B)是典型的炎症信号通路。有研究指出,抑制该通路活化可减少中性粒细胞等炎症介质的释放,从而改善肝损伤^[7-8]。另有研究发现,促凋亡蛋白B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)相关X蛋白(Bax)、胱天蛋白酶3(caspase-3)和抑凋亡蛋白Bcl-2在NAFLD进展中扮演着不可替代的角色^[9-10]。由此推测,可通过抑制炎症和凋亡这两条信号通路,来改善NAFLD。

老鼠筋 *Acanthus ilicifolius* L. 为爵床科老鼠筋属的灌木植物,常年生长在潮间带、亚热带、海岸带和热带地区,是红树林植物群落中的重要品种之一,主要含有黄

酮、多糖和萜类等活性成分,具有一定的药用价值^[11-12]。本课题组前期从老鼠筋生物碱中分离出了单体化合物4-羟基-苯并噁唑-2-酮,经动物实验证明其对小鼠急、慢性肝损伤和大鼠肝纤维化均有较好的改善作用^[13-14],但其是否可改善NAFLD尚不明确。鉴于此,本研究拟通过高脂饮食喂养大鼠以诱导建立NAFLD模型,以水飞蓟宾为阳性对照药^[15],研究4-羟基-苯并噁唑-2-酮对NAFLD模型大鼠炎症和凋亡信号通路的影响,以期为该化合物的后续开发应用提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有:BS-2000型全自动生化分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司),Nanodrop2000型微量分光光度计(美国Thermo Fisher Scientific公司),SpectraMaxPlus384型酶标仪(香港分子仪器有限公司),BX53型显微镜(日本Olympus公司),Micro CL17R型高速低温离心机(德国Thermoieic公司),OdysseyClx型双色红外荧光成像仪(美国Licor公司),EM20-7-10型电泳仪、SWB-20L-1型恒温摇床(美国Major Science公司),RM2255型自动轮转切片机(德国Leica公司)。

1.2 主要药品与试剂

本研究所用主要药品与试剂有:4-羟基-苯并噁唑-2-酮(广西医科大学药化合成实验室,纯度>99%),水飞蓟宾胶囊(天津天士力圣特制药有限公司,批号950701001,规格35 mg),白蛋白(ALB)、总蛋白(TP)试剂盒(深圳迈瑞生物医疗有限公司,批号分别为140918006、140818007),游离脂肪酸(FFA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号20190826),TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号031819190506),RIPA裂解液(北京索莱宝科技有限公司,批号20200903),PVDF膜(美国Millipore公司,批号R0JB89871),兔源TLR4多克隆抗体、鼠源Bcl-2单克隆抗体、鼠源Bax单克隆抗体(美国Proteintech公司,批号分别为19811-1-AP、60178-1-Ig、60267-2-Ig),兔源MyD88多克隆抗体、兔源磷酸化NF- κ B p65(p-NF- κ B p65)多克隆抗体、兔源NF- κ B p65多克隆抗体、兔源磷酸化I κ B α (p-I κ B α)多克隆抗体、兔源I κ B α 单克隆抗体、兔源caspase-3多克隆抗体、兔源 β -actin多克隆抗体(美国CST公司,批号分别为4283S、3033S、8242S、2859T、4812S、9662S、4970S),荧光标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(美国Licor公司,批号D00804-07),荧光标记的山羊抗鼠IgG二抗(美国Invitrogen公司,批号TI268740);其余试剂为实验室常用规格,水为纯净水。

1.3 动物与饲料

本研究所用动物为SPF级SD大鼠,雄性,体质量114~138 g,购自广西医科大学实验动物中心,动物生产许可证号为SCXK(桂)2014-0002。大鼠分笼饲养,饲养房间温度为21~25℃、湿度为40%~60%、每日光照明暗交替,大鼠自由饮水和摄食。高脂饲料购自北京博爱港生物技术有限公司,基础饲料购自北京科澳协力饲料有限公司。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

大鼠适应性饲养一段时间后,随机分为正常对照组(10只)、造模组(50只),正常对照组大鼠给予基础饲料,造模组大鼠给予高脂饲料,持续喂养8周后,分别挑选1、3只大鼠进行肝组织病理学检查,当造模组大鼠出现显著的肝细胞脂肪变性和脂肪空泡时,表明NAFLD造模成功^[6]。将造模成功的大鼠分为模型组、水飞蓟宾组(阳性对照,26.25 mg/kg,剂量参考文献[15]设置)和4-羟基-苯并噁唑-2-酮高、中、低剂量组(100、50、25 mg/kg,剂量参考课题组前期研究结果设置^[7]),每组8只。各给药组大鼠灌胃相应药物(临用时以0.6%羧甲基纤维素钠溶液为溶剂),正常对照组与模型组大鼠灌胃等体积溶剂,灌胃体积为10 mL/kg,每天1次,连续4周。

2.2 标本收集

各组大鼠给药结束后禁食、不禁水,于次日上午称其体质量,然后腹腔注射水合氯醛(3 mL/kg)进行麻醉,以真空采血管收集全血,静置1 h后,以3 500 r/min离心

15 min,收集上层血清,备用。取血后,快速剖取大鼠肝组织,以生理盐水洗去其表面的血迹,以吸水纸吸干后,于肝大叶相同地方切取约1 cm³的肝组织,固定于10%甲醛溶液中,备用;剩余的肝组织分装到1.5 mL离心管中,进行后续检测。

2.3 大鼠血清中ALB、TP、GLB和FFA水平检测

取“2.2”项下血清样品,采用全自动生化检测仪进行分析,检测各组大鼠血清中肝功能指标(ALB、TP、GLB)水平,并计算ALB/GLB比值。另外,参照相应试剂盒说明书方法操作,测定各组大鼠血清中脂质代谢指标FFA水平。

2.4 大鼠肝细胞凋亡情况观察

取“2.2”项下固定于10%甲醛溶液中的肝组织,经常规石蜡包埋处理后,切片(4 μ m)并贴附于防脱载玻片上,待烘干后,依次置于二甲苯、无水乙醇、90%乙醇、70%乙醇中进行脱蜡、脱水;再将切片按TUNEL细胞凋亡检测试剂盒说明书方法操作后,置于显微镜下观察,切片中出现的棕褐色斑点即为凋亡细胞。

2.5 大鼠肝组织中TLR4/MyD88/NF- κ B通路相关蛋白和凋亡相关蛋白的表达水平或磷酸化检测

采用Western blot法进行检测。取“2.2”项下各组大鼠肝组织适量,加入RIPA裂解液和液氮进行研磨,提取肝组织中的蛋白质,然后于4℃条件下以12 000 r/min离心20 min,取上清液,采用蛋白分析仪测定其蛋白浓度。蛋白经变性后,取适量进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜;以TBST清洗5 min \times 3次,放入封闭液中室温孵育1 h;以TBST清洗5 min \times 3次,加入TLR4、MyD88、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、I κ B α 、p-I κ B α 、caspase-3、Bcl-2、Bax一抗(除Bax一抗稀释度为1:6 000、Bcl-2一抗稀释度为1:2 000外,其余抗体的稀释度均为1:1 000),于4℃条件下孵育过夜;次日以TBST清洗5 min \times 3次,加入相对应的二抗(稀释度均为1:10 000),于室温在摇床上孵育1 h;再以TBST清洗5 min \times 3次,采用Odyssey Clx型双色红外荧光成像仪进行扫描,并保留图片。采用Image J 2 \times 软件对图片进行分析,以p-NF- κ B p65蛋白与NF- κ B p65蛋白灰度值的比值、p-I κ B α 蛋白与I κ B α 蛋白灰度值的比值分别表示NF- κ B p65和I κ B α 的磷酸化水平;以Bcl-2蛋白与Bax蛋白灰度值的比值表示凋亡水平;以TLR4、MyD88、caspase-3蛋白灰度值分别与内参(β -actin)蛋白灰度值的比值表示其表达水平。

2.6 统计学方法

采用SPSS 24.0软件对数据进行统计分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 4-羟基-苯并噁唑-2-酮对NAFLD模型大鼠血清中肝功能指标水平的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠血清中TP、GLB水

平均显著升高($P<0.01$), ALB/GLB 比值显著降低($P<0.01$);与模型组比较,水飞蓟宾组和4-羟基-苯并噁唑-2-酮各剂量组大鼠血清中TP(低剂量组除外)、GLB水平均显著降低,ALB/GLB 比值均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),详见表1。

表1 4-羟基-苯并噁唑-2-酮对NAFLD模型大鼠血清中肝功能指标和FFA水平的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Tab 1 Effects of 4-hydroxy-2(3H)-benzoxazolone on liver function indexes levels in serum of NAFLD model rats($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	ALB, g/L	TP, g/L	GLB, g/L	ALB/GLB	FFA, $\mu\text{mol/L}$
正常对照组	31.72 \pm 1.60	58.61 \pm 3.42	26.89 \pm 2.20	1.18 \pm 0.08	546.24 \pm 65.25
模型组	29.52 \pm 2.52	65.09 \pm 4.82**	35.56 \pm 3.54**	0.84 \pm 0.10**	1275.71 \pm 168.76**
水飞蓟宾组	31.51 \pm 1.89	59.35 \pm 3.42**	27.84 \pm 2.31**	1.14 \pm 0.09**	752.59 \pm 120.69**
4-羟基-苯并噁唑-2-酮高剂量组	31.34 \pm 2.14	59.64 \pm 3.43**	28.30 \pm 2.35**	1.11 \pm 0.10**	780.79 \pm 107.36**
4-羟基-苯并噁唑-2-酮中剂量组	30.53 \pm 2.76	61.14 \pm 3.33*	30.61 \pm 1.68**	0.99 \pm 0.11**	954.62 \pm 139.54**
4-羟基-苯并噁唑-2-酮低剂量组	30.01 \pm 1.01	62.11 \pm 4.19	32.08 \pm 3.29*	0.94 \pm 0.07*	1087.73 \pm 155.72**

注:与正常对照组比较, ** $P<0.01$;与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

Note: vs. normal control group, ** $P<0.01$; vs. model group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

3.2 4-羟基-苯并噁唑-2-酮对NAFLD模型大鼠血清中FFA水平的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠血清中FFA水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,水飞蓟宾组和4-羟基-苯并噁唑-2-酮各剂量组大鼠血清中FFA水平均显著降低($P<0.01$),详见表1。

3.3 4-羟基-苯并噁唑-2-酮对NAFLD模型大鼠肝细胞凋亡的影响

显微镜下可见,正常对照组大鼠肝细胞呈现微量棕褐色斑点,肝细胞凋亡现象较轻;模型组大鼠肝细胞呈现大量棕褐色斑点,较为密集,肝细胞凋亡现象严重;水飞蓟宾组和4-羟基-苯并噁唑-2-酮各剂量组大鼠肝细胞呈现少量棕褐色斑点,肝细胞凋亡现象相较于模型组有所改善,详见图1。

3.4 4-羟基-苯并噁唑-2-酮对NAFLD模型大鼠肝组织中TLR4/MyD88/NF- κ B通路相关蛋白和凋亡相关蛋白表达的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠肝组织中TLR4、MyD88、caspase-3蛋白表达水平和NF- κ B p65、I κ B α 蛋白磷酸化水平均显著升高($P<0.01$), Bcl-2/Bax 比值显著降低($P<0.01$);与模型组比较,水飞蓟宾组和4-羟基-苯并噁唑-2-酮各剂量组大鼠肝组织中TLR4(低剂量组除外)、MyD88(中剂量组除外)、caspase-3蛋白表达水平和NF- κ B p65、I κ B α 蛋白磷酸化水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), Bcl-2/Bax 比值均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),详见图2、表2。

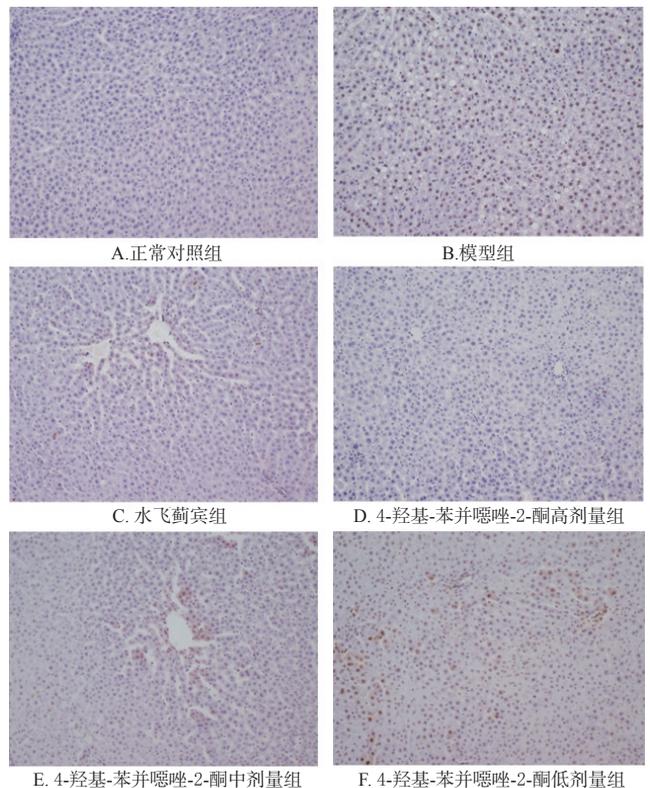


图1 4-羟基-苯并噁唑-2-酮对NAFLD模型大鼠肝细胞凋亡影响的显微图($\times 200$)

Fig 1 Micrograph of the effects of 4-hydroxy-2(3H)-benzoxazolone on hepatocyte apoptosis in NAFLD model rats($\times 200$)

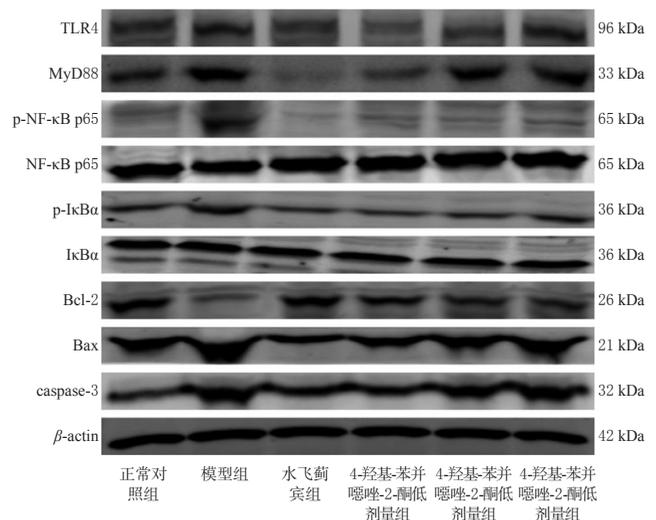


图2 4-羟基-苯并噁唑-2-酮对NAFLD模型大鼠肝组织中TLR4/MyD88/NF- κ B通路相关蛋白和凋亡相关蛋白表达影响的电泳图

Fig 2 Electrophoresis diagram of the effects of 4-hydroxy-2(3H)-benzoxazolone on the expression of TLR4/MyD88/NF- κ B pathway-related proteins and apoptosis-related proteins in liver tissues of NAFLD model rats

表2 4-羟基-苯并噁唑-2-酮对NAFLD模型大鼠肝组织中TLR4/MyD88/NF-κB通路相关蛋白和凋亡相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 2 Effects of 4-hydroxy-2(3H)-benzoxazolone on the expression of TLR4/MyD88/NF-κB pathway-related proteins and apoptosis-related proteins in liver tissues of NAFLD model rats($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	TLR4	MyD88	p-NF-κB p65/NF-κB p65	p-IκBα/IκBα	Bcl-2/Bax	caspase-3
正常对照组	0.77 ± 0.40	0.43 ± 0.19	0.23 ± 0.03	0.15 ± 0.01	0.67 ± 0.09	0.49 ± 0.30
模型组	1.93 ± 0.46**	1.02 ± 0.13**	0.57 ± 0.16**	0.36 ± 0.07**	0.10 ± 0.01**	1.28 ± 0.09**
水飞蓟宾组	0.66 ± 0.21**	0.52 ± 0.34*	0.18 ± 0.07**	0.14 ± 0.03**	0.62 ± 0.16**	0.58 ± 0.20**
4-羟基-苯并噁唑-2-酮高剂量组	0.65 ± 0.12**	0.27 ± 0.16**	0.27 ± 0.03**	0.14 ± 0.07**	0.69 ± 0.15**	0.56 ± 0.26**
4-羟基-苯并噁唑-2-酮中剂量组	0.83 ± 0.25*	0.91 ± 0.14	0.31 ± 0.05**	0.19 ± 0.09**	0.40 ± 0.01**	0.71 ± 0.15**
4-羟基-苯并噁唑-2-酮低剂量组	1.24 ± 0.88	0.62 ± 0.16*	0.37 ± 0.03**	0.22 ± 0.07*	0.31 ± 0.07*	0.80 ± 0.15*

注:与正常对照组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note:vs. normal control group,** $P < 0.01$; vs. model group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

4 讨论

NAFLD是代谢综合征定位在肝中的一种表现,目前研究者认为,其发病机制与胰岛素抵抗、氧化应激、脂质过氧化、炎症和凋亡等因素有关^[18-19]。肝在储存肝糖原、分泌胆汁、去氧化、蛋白质及脂质合成中扮演着关键性角色,是人体重要的代谢功能器官^[20]。一旦肝发生病变,则会影响蛋白质合成与分解代谢平衡,从而引起血清中TP、ALB、GLB水平发生变化,ALB/GLB比值降低^[21]。本研究发现,成功造模后,大鼠血清中TP、GLB水平显著升高,ALB/GLB比值显著降低;经4-羟基-苯并噁唑-2-酮干预后,大鼠血清中TP、GLB水平显著降低,ALB/GLB比值显著升高,表明4-羟基-苯并噁唑-2-酮对NAFLD模型大鼠的肝损伤有一定改善作用。

另有研究发现,胰岛素抵抗的发生能减弱胰岛素对激素敏感性脂肪酶的抑制效应,加快外周脂肪组织的分解速率,增加FFA水平;当肝中FFA水平远超过其在线粒体中氧化消耗的量时,则会引起肝脂质的堆积,从而造成肝细胞一系列的损伤^[22-23]。线粒体在氧化消耗FFA的过程中会生成过多的活性氧,从而触发氧化应激、脂质过氧化、炎症等反应以及肝细胞的凋亡;另外,未消耗的FFA还能诱导胰岛素抵抗的发生,进一步加重对肝的损伤^[24]。因此,FFA代谢失衡是NAFLD的典型特征表现,并始终贯穿着NAFLD的发生与发展过程。本研究发现,与正常对照组比较,模型组大鼠血清中FFA水平显著升高;经4-羟基-苯并噁唑-2-酮干预后,大鼠血清中FFA水平显著降低,表明4-羟基-苯并噁唑-2-酮对大鼠NAFLD状态下的代谢失衡有一定调控作用。

TLR4是炎症反应中关键的信号传导受体之一,当肝细胞发生脂肪变性时,可激活TLR4的一系列级联信号传导,进而触发MyD88的聚集,导致MyD88依赖性的信号传导通路被激活^[7-8]。MyD88作为一种信号适配器分子,可引起下游信号通路中NF-κB二聚体与抑制因子IκB的分离;解离后的IκB可快速磷酸化,从而推动NF-κB转移至细胞核内κB结合位点,使NF-κB信号通路得

以活化,进而调控多种炎症介质的合成与分泌,加重肝损伤的发展^[25]。本研究发现,与正常对照组比较,模型组大鼠肝组织中TLR4、MyD88蛋白表达水平和NF-κB p65、IκBα蛋白磷酸化水平均显著升高;经4-羟基-苯并噁唑-2-酮干预后,大鼠肝组织中上述指标均显著改善,表明4-羟基-苯并噁唑-2-酮可通过调控炎症信号通路从而改善大鼠NAFLD状态。

Bcl-2是一类保守的家族蛋白,其家族成员在涉及肝细胞凋亡的调控机制中发挥着主导性影响,并伴随NAFLD的整个致病过程^[26-27]。另有研究显示,caspase家族蛋白作为细胞凋亡信息的重要运输者,在细胞凋亡过程中居于关键地位;其中,caspase-3蛋白不仅是细胞凋亡信号的执行者,也是发挥凋亡效应的主要因子,其可启动初期的细胞凋亡级联反应,诱导凋亡的发生^[28-29]。本研究发现,大鼠成功造模后,其肝组织中Bcl-2/Bax比值显著降低,caspase-3蛋白表达水平显著升高;经4-羟基-苯并噁唑-2-酮干预后,大鼠肝组织中Bcl-2/Bax比值显著升高,caspase-3蛋白表达水平显著降低,表明4-羟基-苯并噁唑-2-酮可通过调控凋亡相关蛋白表达从而改善大鼠的NAFLD状态。

综上所述,4-羟基-苯并噁唑-2-酮可改善大鼠NAFLD,其机制可能与抑制肝组织中TLR4/MyD88/NF-κB信号通路相关蛋白和凋亡相关蛋白表达有关。

参考文献

- [1] 王芹,滕金艳,姚敏,等.穴位埋线治疗痰湿体质单纯性肥胖合并非酒精性脂肪肝的疗效[J].中西医结合肝病杂志,2020,30(5):457-459.
- [2] BRUNNER K T, HENNEBERG C J, WILECHANSKY R M, et al. Nonalcoholic fatty liver disease and obesity treatment[J]. Curr Obes Rep, 2019, 8(3): 220-228.
- [3] PERUMPAIL B J, KHAN M A, YOO E R, et al. Clinical epidemiology and disease burden of nonalcoholic fatty liver disease[J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(47): 8263-8276.
- [4] YOUNOSSI Z, TACKE F, ARRESE M, et al. Global per-

- spectives on nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Hepatology*, 2019, 69(6): 2672-2682.
- [5] KIM D, TOUROS A, KIM W R. Nonalcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome[J]. *Clin Liver Dis*, 2018, 22(1): 133-140.
- [6] ZHAO W, SONG F, HU D, et al. The protective effect of *Myristica fragrans* Houtt. extracts against obesity and inflammation by regulating free fatty acids metabolism in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Nutrients*, 2020, 12(9): 2507.
- [7] 赵梓铭, 武俊紫, 姚政, 等. 决明子蒽醌苷通过降低Toll样受体4和核因子- κ B的表达对非酒精性脂肪肝病大鼠的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2019, 35(22): 2863-2867.
- [8] XU X, WANG W, LIN L, et al. Liraglutide in combination with human umbilical cord mesenchymal stem cell could improve liver lesions by modulating TLR4/NF- κ B inflammatory pathway and oxidative stress in T2DM/NAFLD rats[J]. *Tissue Cell*, 2020, 66: 101382.
- [9] 肖阳, 侯云鹤, 尹鑫, 等. 人参皂苷Rg₁干预非酒精性脂肪肝病模型大鼠肝细胞的凋亡[J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(3): 384-390.
- [10] 孙晓红, 李洪涛, 李嘉仪, 等. 中性粒细胞凋亡与炎症损伤的关系[J]. *中国免疫学杂志*, 2017, 33(12): 1907-1910.
- [11] 祁平, 樊惠, 刘林, 等. 4-羟基苯并噻唑-2-酮对四氯化碳致小鼠急性肝损伤保护作用[J]. *蛇志*, 2012, 24(1): 5-7, 10.
- [12] 赵丹, 于蕾, 程守前, 等. 红树植物老鼠簕根化学成分的研究[J]. *广东化工*, 2015, 42(18): 24-25.
- [13] 王红园, 韦秀桂, 孙雪梅, 等. 老鼠簕生物碱A对D-GalN/LPS致小鼠急性肝损伤的影响[J]. *中药材*, 2019, 42(9): 2177-2180.
- [14] 黄秀昆, 孙雪梅, 朱勋帅, 等. 4-羟基苯并噻唑-2-酮对四氯化碳诱导大鼠肝纤维化的改善作用及机制研究[J]. *中国药房*, 2019, 30(6): 747-751.
- [15] WANG D, LAO L, PANG X, et al. Asiatic acid from *Potentilla chinensis* alleviates non-alcoholic fatty liver by regulating endoplasmic reticulum stress and lipid metabolism[J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 65: 256-267.
- [16] 廖媛, 池晓玲, 吴宇金, 等. 脂必泰对非酒精性脂肪肝病大鼠模型疗效评价[J]. *中国医院药学杂志*, 2020, 40(22): 2317-2321, 2326.
- [17] SUN X, HUANG X, ZHU X, et al. HBOA ameliorates CCl₄-induced liver fibrosis through inhibiting TGF- β 1/Smads, NF- κ B and ERK signaling pathways[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 115: 108901.
- [18] 秦阳, 高颖, 高英, 等. 桑白皮黄酮提取物对2型糖尿病大鼠非酒精性脂肪肝病血管生成相关基因的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(17): 144-148.
- [19] 郭亮, 汤其群. 非酒精性脂肪肝病机制和治疗的研究进展[J]. *生命科学*, 2018, 30(11): 1165-1172.
- [20] 张学峰, 杨光旭, 朱友, 等. NAFLD对大鼠葡萄糖、胰岛素代谢和肝糖原合成的影响[J]. *东南大学学报(医学版)*, 2020, 39(4): 420-424.
- [21] 唐外姣, 姚育法, 殷锦锦, 等. 护肝清脂片对非酒精性脂肪肝病模型大鼠肝脏蛋白质合成及胆汁代谢的影响[J]. *中药材*, 2014, 37(8): 1452-1454.
- [22] ZHENG F, CAI Y. Concurrent exercise improves insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease by upregulating PPAR- γ and genes involved in the beta-oxidation of fatty acids in ApoE-KO mice fed a high-fat diet[J]. *Lipids Health Dis*, 2019, 18(1): 6.
- [23] 李新征, 陈宝炳, 康云平. 非酒精性脂肪肝病血清游离脂肪酸与胰岛素抵抗的关系[J]. *检验医学*, 2012, 27(1): 48-49.
- [24] 李利阳, 杨蕾. 非酒精性脂肪肝病与胰岛素抵抗的关系[J]. *医学综述*, 2011, 17(18): 2840-2842.
- [25] 马燕花, 杨少军, 白洲霞, 等. 慈菇消脂丸对NF- κ B介导的非酒精性脂肪肝病大鼠肝细胞凋亡的干预作用[J]. *北京中医药大学学报*, 2017, 40(10): 856-863.
- [26] 李阳, 舒德军, 彭慈军, 等. 促红细胞生成素对脂肪肝病大鼠模型肝脏缺血再灌注损伤凋亡基因 bcl-2、bax mRNA 表达的影响[J]. *临床肝胆病杂志*, 2019, 35(1): 157-160.
- [27] ZHU J, ZHOU M, ZHAO X, et al. Blueberry, combined with probiotics, alleviates non-alcoholic fatty liver disease via IL-22-mediated JAK1/STAT3/BAX signaling[J]. *Food Funct*, 2018, 9(12): 6298-6306.
- [28] SHIFFMAN M, FREILICH B, VUPPALANCHI R, et al. Randomised clinical trial: emricasan versus placebo significantly decreases ALT and caspase 3/7 activation in subjects with non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2019, 49(1): 64-73.
- [29] 杨海峰, 薛玲, 郑彩娟, 等. Caspase-3在慢性病毒性乙、丙型肝炎及非酒精性肝炎中的表达及意义[J]. *世界华人消化杂志*, 2012, 20(36): 3701-3706.

(收稿日期: 2021-01-09 修回日期: 2021-03-27)

(编辑: 唐晓莲)