

基于 P2X7R/NLRP3 通路探讨枳葛口服液改善大鼠酒精性肝损伤的作用机制

熊仕英¹, 王晓栋¹, 李 波¹, 刘友平², 叶永慧¹, 魏 颀^{1*}

(1. 西南医科大学附属中医医院, 四川 泸州 646000; 2. 西南医科大学基础医学院, 四川 泸州 646000)

摘要: **目的** 探讨枳葛口服液改善大鼠酒精性肝损伤的作用机制。**方法** 60 只大鼠随机分为正常组, 模型组(白酒), 枳葛口服液高、中、低剂量组(10、5、2.5 mL/kg), 造模及给药 12 周后处死大鼠, 计算肝脏指数, HE 染色观察肝组织病理学改变, Western blot 法检测肝组织 P2X7R、NLRP3、caspase-1、ASC 蛋白表达, 免疫组织化学法检测肝组织 NLRP3 蛋白表达, ELISA 法检测血清 IL-6、IL-18、TNF- α 、NF- κ B 水平。**结果** 与模型组比较, 枳葛口服液高剂量组大鼠肝脏指数降低 ($P<0.05$), 大鼠肝组织形态正常, 基本无脂肪空泡及炎症细胞浸润, 肝组织 P2X7R、NLRP3、caspase-1、ASC、NLRP3 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 血清 IL-6、IL-18、TNF- α 、NF- κ B 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 枳葛口服液可能通过降低 P2X7R/NLRP3 通路相关蛋白表达, 减轻大鼠炎症因子产生, 从而发挥改善酒精性肝损伤的作用。

关键词: 枳葛口服液; 酒精性肝损伤; P2X7R/NLRP3 信号通路; 炎症因子

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)01-0233-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.01.043

酒精性肝病的发展过程由最初的酒精性脂肪肝, 逐步过渡到酒精性肝炎, 再到后来的酒精性肝纤维化甚至酒精性肝硬化^[1-2]。因此, 及时探索行之有效的防治措施对于延缓乃至阻断酒精性肝病的发生、发展十分重要。

枳葛口服液源自全国名老中医孙同郊教授, 本方由枳椇、葛根、山楂、白茅根等 6 味中药组成, 诸药相伍, 清泄并举、攻补兼施, 全方共奏解酒降脂、保肝护胃之功效^[3-4]。前期实验中收到良好效果, 但其发挥以上作用的具体机制仍有待探究。核苷酸结合寡聚化结构域 (NOD) 样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体是位于细胞内的多蛋白复合物, 在机体的炎症反应过程中发挥着一定的作用, 当其被上游嘌呤受体 P2X7 (P2X7R) 激活后, 引起 NLRP3 活化, 进一步激活其下游多种促炎细胞因子, 参与机体炎症反应过程^[5]。近年来, 关于乙醇介导 P2X7R/NLRP3 炎症小体激活肝脏炎症反应, 进而促使形成酒精性肝损伤的报道日益增多^[6]。基于此, 本研究将探讨枳葛口服液通过 P2X7R/NLRP3 通路改善大鼠酒精性肝损伤的作用机制, 以期为其临床应用提供参考。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只, 体质量 160~200 g, 由西南医科大学实验动物中心提供, 实验动物生产许可证号 SCXK (川) 2018-0017, 饲养于西南医科大学实验动物

中心, 自由饮水进食, 适应性饲养 1 周后进行实验。

1.2 试剂与药物 枳葛口服液由西南医科大学附属中医医院制剂室提供, 规格 20 mL $\times$ 6 支/盒, 批号 20190213。泸州老窖二曲白酒购自泸州老窖股份有限公司, 批号 20181126, 酒精度 52%; P2X7R 抗体 (货号 BA2808)、NLRP3 抗体 (货号 BA3677)、caspase-1 抗体 (货号 BM4291) 购自武汉博士德生物工程有限公司; ASC 抗体 (货号 ab175449) 购自英国 Abcam 公司; 山羊抗兔 IgG-HRP 购自爱必信 (上海) 生物科技有限公司; IL-6、IL-18、TNF- α 、NF- κ B ELISA 试剂盒购自上海桥杜生物科技有限公司。

1.3 仪器 RM-2135 型轮转石蜡切片仪 (德国 Leica 公司); 正置荧光显微镜 (日本 Nikon 公司); 全波长酶标仪 (美国 BioTek 公司); 水平摇床 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司); 台式高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); -80 $^{\circ}$ C 冰箱 (青岛海尔集团公司); 全自动雪花制冰机 (常熟市雪科电器有限公司); 电泳仪电源、垂直电泳槽、转移电泳槽、凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司); 移液器 [大龙兴创实验仪器 (北京) 股份公司]; PH 计 (瑞士梅特勒-托利多公司)。

2 方法

2.1 分组、造模及给药 大鼠随机分为正常组, 模型组

收稿日期: 2022-02-13

基金项目: 四川省科技厅-泸州市政府-泸州医学院联合课题项目 (14ZC0041); 四川省教育厅重点基金资助项目 (16ZA0201)

作者简介: 熊仕英 (1993—), 女, 硕士生, 从事中西医结合肝脏病的防治研究。Tel: 18121993582, E-mail: 894378430@qq.com

* **通信作者:** 魏 颀 (1962—), 女, 硕士, 主任医师, 从事中西医结合肝脏病的防治研究。Tel: (0830) 2293885, E-mail: weimei62@

(白酒), 枳葛口服液高、中、低剂量组 (10、5、2.5 mL/kg), 每组 12 只。正常组大鼠灌胃给予纯水 10 mL/kg, 其余各组大鼠灌胃给予泸州老窖二曲白酒 10 mL/kg, 枳葛口服液高、中、低剂量组大鼠给予白酒后 6 h 再分别灌胃给予枳葛口服液 10、5、2.5 mL/kg, 每天 1 次, 间隔 7 d 称定各组大鼠体质量, 按照其调整给药剂量, 其间各组大鼠均自由饮水进食, 持续 12 周。12 周后, 模型组随机抽取 2 只大鼠处死, 取肝组织证实造模成功。

2.2 取材 末次给药后, 大鼠禁食不禁水 12 h, 腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉, 腹主动脉取血, 血液静置 1 h 后离心, 收集血清, 用于 ELISA 法检测。脱颈处死大鼠, 无菌条件下摘取肝组织, 称定肝组织湿质量后取相同部位肝脏一部分保存于-80 ℃冰箱, 另一部分置于 4% 多聚甲醛中固定, 用于后续实验。

2.3 肝脏指数计算 称定各组大鼠肝组织湿质量, 计算肝脏指数, 公式为肝脏指数 = (肝组织湿质量/大鼠体质量) × 100%。

2.4 HE 染色观察大鼠肝组织病理学变化 取“2.2”项下各组大鼠肝组织进行固定、包埋, 石蜡切片, 脱蜡至水, HE 染色, 封片, 显微镜下观察大鼠肝组织病理学形态。

2.5 Western blot 法检测大鼠肝组织 P2X7R、NLRP3、caspase-1、ASC 蛋白表达 取“2.2”项下于-80 ℃冰箱中保存的大鼠肝组织, 剪成碎块, 加入 RIPA 组织裂解液、PMSF、蛋白酶抑制剂, 冰上匀浆, 放置 30 min (4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min), 收集上清, BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度, 加入上样缓冲液于 100 ℃中变性 10 min。配制 10% 分离胶、5% 浓缩胶, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 蛋白分离后转膜, 5% 脱脂牛奶-TBST 封闭 1.5 h, TBST 洗膜 3 次, 加入兔抗鼠 P2X7R、NLRP3、caspase-1、ASC 一抗, 在 4 ℃下孵育过夜, 次日 TBST 洗膜 3 次, 加入山羊抗兔 IgG-HRP 二抗, 室温孵育, TBST 洗膜 3 次, ECL 显色, 定影, 将胶片进行扫描, Image J 图像分析软件对条带进行分析, 以 GAPDH 为内参, 计算目的蛋白相对表达。

2.6 免疫组织化学法检测肝组织 NLRP3 表达 取“2.2”项下于-80 ℃冰箱中保存的各组大鼠肝组织切片, 脱蜡, 抗原修复, 封闭, 加入一抗, 将切片放入 4 ℃冰箱孵育过夜, 洗涤后加二抗, 37 ℃孵育 30 min, 洗涤后用二氨基联苯胺 (DAB) 显色, 复染细胞核, 脱水封片, 显微镜镜检并采集图像进行分析。

2.7 ELISA 法检测血清 IL-6、IL-18、TNF-α、NF-κB 水平 取“2.2”项下各组大鼠血清, 严格按照相关试剂盒说明书检测血清 IL-6、IL-18、TNF-α、NF-κB 水平。

2.8 统计学分析 通过 SPSS 26.0 软件进行处理, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 Bonferroni 法。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠一般情况 正常组大鼠生长情况良好, 体质量逐

渐增加, 毛发润泽, 大鼠动作敏捷, 行为无异常; 模型组大鼠在此期间逐渐出现精神萎靡、行为迟缓、进食欠佳, 尤其在灌胃给予白酒后出现醉酒状态, 在约第 8 周之后上述症状更加明显; 枳葛口服液各剂量组大鼠灌胃给予白酒后同样表现出醉酒状态, 但枳葛口服液高、中剂量组大鼠不久之后便能清醒, 行为无异常, 进食无明显影响, 枳葛口服液低剂量组与模型组比较差别不明显。至灌胃结束时, 大鼠共计死亡 5 只, 其中模型组在灌胃结束时抽取 2 只大鼠进行肝脏病理学检查而死亡; 枳葛口服液高剂量组其中 1 只大鼠在灌胃初期由于操作不当致其死亡; 枳葛口服液低剂量组其中 2 只大鼠在灌胃中途由于酒精不耐受, 逐渐出现精神萎靡, 无法进食而死亡。

3.2 枳葛口服液对大鼠肝脏指数的影响 与正常组比较, 模型组大鼠肝脏指数升高 (P<0.01), 表明长期大量的乙醇刺激可导致肝细胞肿胀, 细胞脂肪病变明显, 导致肝重增加; 与模型组比较, 枳葛口服液高剂量组大鼠肝脏指数降低 (P<0.05), 枳葛口服液中、低剂量组大鼠肝脏指数降低, 但差异无统计学意义 (P>0.05), 见表 1。

表 1 枳葛口服液对大鼠肝脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数/只	肝脏指数/%
正常组	12	2.799±0.098
模型组	10	3.057±0.160**
枳葛口服液高剂量组	11	2.862±0.119 [#]
枳葛口服液中剂量组	12	3.013±0.166
枳葛口服液低剂量组	10	3.019±0.183

注: 与正常组比较, ** P<0.01; 与模型组比较, [#]P<0.05。

3.3 枳葛口服液对大鼠肝组织病理学变化的影响 正常组大鼠肝组织形态结构正常, 界限清楚, 细胞内未见脂肪空泡、无炎症细胞浸润; 模型组大鼠肝组织可见明显的形态结构紊乱, 肝细胞排列不规则, 细胞肿胀、胞质疏松, 边界模糊, 肝细胞内可见大小不一的脂滴形成, 且伴有部分肝细胞坏死及炎症细胞浸润, 说明酒精性肝病造模成功; 枳葛口服液各剂量组大鼠肝组织病理损伤均有不同程度的恢复, 其中又以枳葛口服液高剂量组恢复最明显, 大鼠肝组织形态正常, 肝小叶内以中央静脉为中心向四周呈放射状分布, 界限清楚, 肝索及肝血窦排列有序, 细胞内基本无脂肪空泡及炎症细胞浸润, 已基本接近正常组; 枳葛口服液中剂量组次之, 大鼠肝组织形态结构基本正常, 但部分肝细胞内仍有脂肪变性; 而枳葛口服液低剂量组大鼠与模型组相差不大, 同样可见细胞排列紊乱, 边界模糊, 胞内有大小不一的脂肪空泡, 见图 1。

3.4 枳葛口服液对大鼠肝组织 P2X7R、NLRP3、caspase-1、ASC 蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组大鼠肝组织 P2X7R、NLRP3、caspase-1、ASC 蛋白表达升高 (P<0.01); 与模型组比较, 枳葛口服液高剂量组 P2X7R、NLRP3、caspase-1、ASC 蛋白表达降低 (P<0.05, P<0.01), 见图 2~3。

3.5 枳葛口服液对大鼠肝组织 NLRP3 表达的影响 与正常组比较, 模型组大鼠肝组织 NLRP3 升高 (P<0.01); 与

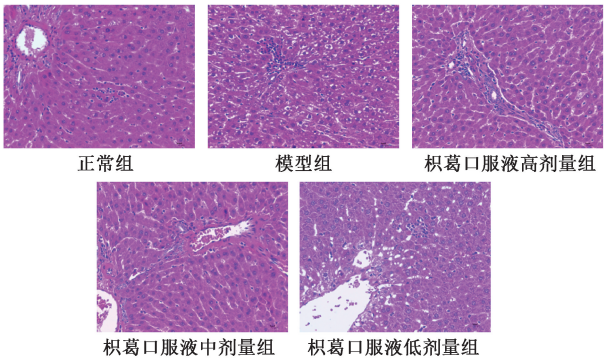


图 1 各组大鼠肝组织病理形态 (HE, ×400)

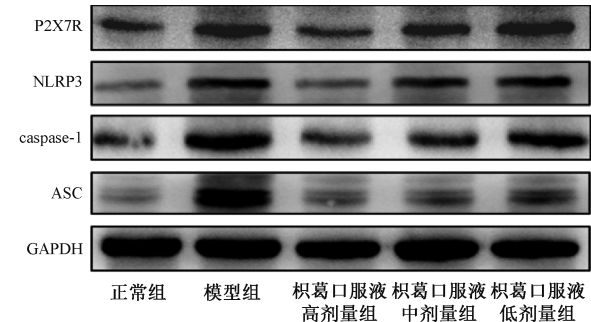
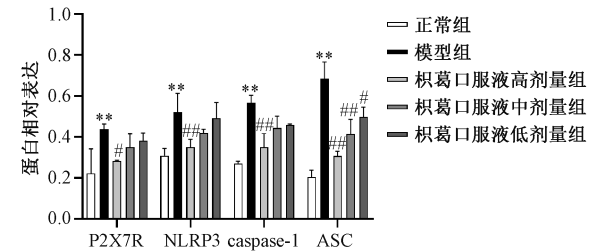
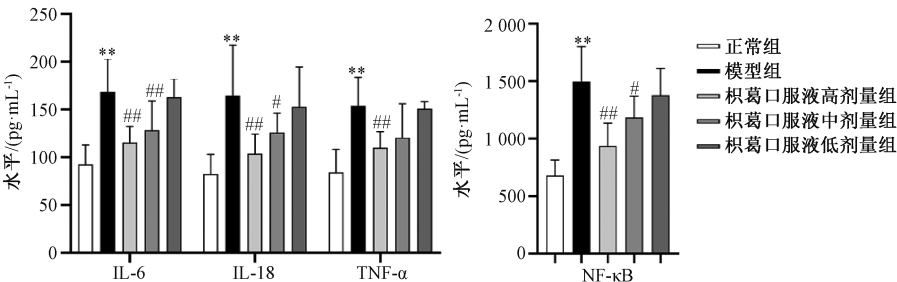


图 2 各组大鼠肝组织 P2X7R、NLRP3、caspase-1、ASC 蛋白条带图



注：与正常组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。

图 3 枳葛口服液对大鼠肝组织 P2X7R、NLRP3、caspase-1、ASC 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10 \sim 12$)



注：与正常组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。

图 6 枳葛口服液对大鼠血清 IL-6、IL-18、TNF-α、NF-κB 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

模型组比较，枳葛口服液高、中剂量组大鼠肝组织 NLRP3 降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，见图 4~5。

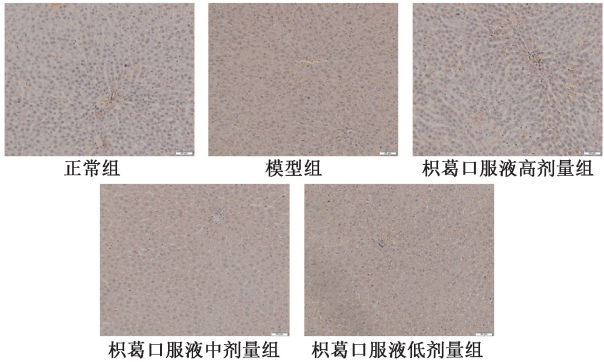
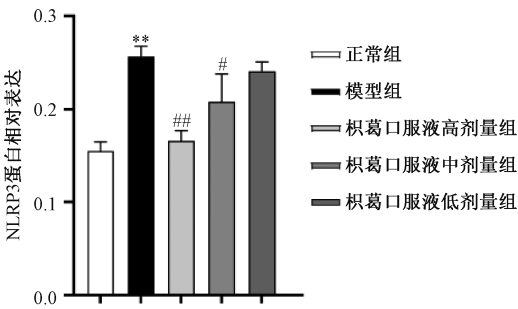


图 4 各组大鼠肝组织 NLRP3 免疫组化染色图 (×200)



注：与正常组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。

图 5 枳葛口服液对大鼠肝组织 NLRP3 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

3.6 枳葛口服液对大鼠血清 IL-6、IL-18、TNF-α、NF-κB 水平的影响 与正常组比较，模型组大鼠血清 IL-6、IL-18、TNF-α、NF-κB 水平升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，枳葛口服液高、中剂量组大鼠血清 IL-6、IL-18、TNF-α、NF-κB 水平降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，见图 6。

4 讨论

课题组前期临床病例研究以及动物实验均证实，枳葛口服液对于酒精性肝病肝功及血脂指标具有改善作用，王绍登等^[3]使用枳葛口服液对 120 例酒精性肝病患者进行对比治疗，发现相较于单纯戒酒组而言，使用枳葛口服液治

疗组患者血液中乙醇相关代谢酶类指标恢复。蔡丽君等^[7]在防治大鼠酒精性肝损伤的过程中发现，枳葛口服液能降低酒精性肝病大鼠血清中肝功能、血脂等指标，提示枳葛

口服液对酒精性肝病有治疗作用。酒精性肝病的发病机制研究近年来主要集中在脂质代谢紊乱、氧化应激、炎症反应、内毒素等方面，其中炎症

反应会加速酒精性肝损伤的发生发展。研究表明,由 P2X7R 介导的炎症通路是加速酒精性肝损伤发生发展的一条重要通路^[8],P2X7 作为 ATP 激活的嘌呤受体家族成员,能促进炎症反应的发生,在敲除 P2X7 受体基因或者使用 P2X7 受体拮抗剂的肝损伤模型中,其肝脏毒性反应较未敲除该受体基因或未使用受体拮抗剂的动物模型降低^[9-10]。P2X7R 作为酒精诱导肝细胞脂质沉积的上游关键受体,被活化后进而激活其下游受体 NLRP3,而 NLRP3 作为一种细胞内的模式识别受体,属于 NLRs 炎性体家族成员,在免疫应答和炎症进展过程中起着重要作用^[11]。研究表明,酒精性肝病模型大鼠体内 NLRP3 蛋白表达升高后,产生有活性的 caspase-1,其下游炎症因子 IL-6、IL-18、TNF- α 、NF- κ B 等被大量释放,进一步引起肝脏炎症级联放大反应^[12-14]。本研究为探讨枳葛口服液防治酒精性肝病的具体作用机制,采用单纯酒精灌胃的方法诱导慢性酒精性肝损伤模型,并同时检测 P2X7R/NLRP3 信号通路关键蛋白表达及其下游炎症损伤因子水平,结果证实模型组大鼠肝组织 P2X7R、NLRP3、caspase-1、ASC 蛋白表达及其下游相关炎症细胞因子 IL-6、IL-18、TNF- α 、NF- κ B 水平升高,而枳葛口服液各剂量组对以上指标均有不同程度的逆转作用。

综上所述,枳葛口服液可能通过降低 P2X7R/NLRP3 信号通路相关蛋白表达,抑制炎症因子产生,从而达到减轻酒精性肝损伤所致的炎症反应作用。

参考文献:

[1] Childers R E, Ahn J. Diagnosis of alcoholic liver disease[J]. *Clin Liver Dis*, 2016, 20(3): 457-471.

[2] Rehm J, Samokhvalov A V, Shield K D, *et al.* Global burden of alcoholic liver diseases[J]. *J Hepatol*, 2013, 59(1): 160-168.

[3] 王绍登,魏 颀,杨国川,等. 枳葛口服液治疗酒精性肝病患者的临床疗效观察[J]. *中药材*, 2018, 41(9): 2220-2223.

[4] 侯 英,刘友平,李 志,等. 枳葛口服液防治大鼠酒精性肝病的相关机制[J]. *世界华人消化杂志*, 2018, 26

(5): 296-304.

[5] Di Virgilio F, Dal Ben D, Sarti A C, *et al.* The P2X7 receptor in infection and inflammation[J]. *Immunity*, 2017, 47(1): 15-31.

[6] 白 雪,孙淑红,周俊英. NLRP3 炎症小体在酒精性肝病发病机制中的作用[J]. *中华肝脏病杂志*, 2019, 27(7): 567-571.

[7] 蔡丽君,刘友平,李 志,等. 枳葛口服液对酒精性肝病大鼠脂质代谢的影响[J]. *世界科学技术(中医药现代化)*, 2018, 20(6): 929-934.

[8] 潮 蓉,武小娟,王羽辉,等. P2X7R/NLRP3 信号通路在酒精性肝损伤中的作用[J]. *中国药理学通报*, 2018, 34(4): 491-495.

[9] Das S, Seth R K, Kumar A, *et al.* Purinergic receptor X7 is a key modulator of metabolic oxidative stress-mediated autophagy and inflammation in experimental nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2013, 305(12): G950-G963.

[10] Hoque R, Sohail M A, Salhanick S, *et al.* P2X7 receptor-mediated purinergic signaling promotes liver injury in acetaminophen hepatotoxicity in mice[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012, 302(10): G1171-G1179.

[11] Kong X X, Wu G C, Chen S, *et al.* Chalcone derivative L6H21 reduces EtOH + LPS-induced liver injury through inhibition of NLRP3 inflammasome activation[J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2019, 43(8): 1662-1671.

[12] Wang Z D, Zhang Y, Dai Y D, *et al.* *Tamarix chinensis* Lour inhibits chronic ethanol-induced liver injury in mice[J]. *World J Gastroenterol*, 2020, 26(12): 1286-1297.

[13] 邓谷霖,李万平,李国春,等. 卡托普利对大鼠酒精性肝病的防治作用及抗炎机制研究[J]. *西南医科大学学报*, 2020, 43(3): 242-246.

[14] Kinoshita T, Imamura R, Kushiyaama H, *et al.* NLRP3 mediates NF- κ B activation and cytokine induction in microbially induced and sterile inflammation[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0119179.