

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.13.013

苓桂术甘汤对非酒精性脂肪肝相关肝细胞癌模型小鼠肝脂肪酸代谢重编程的影响

曹慧敏¹, 孔亮¹, 隋国媛¹, 冷雪¹, 陈文娜², 贾连群[✉]

1. 辽宁中医药大学中医脏象理论及应用教育部重点实验室, 辽宁省沈阳市皇姑区崇山东路 79 号, 110847; 2. 辽宁中医药大学医学检验学院

[摘要] **目的** 从肝脂肪酸代谢重编程角度探讨苓桂术甘汤治疗非酒精性脂肪肝相关肝细胞癌(NAFLD-HCC)的可能作用机制。**方法** 将 60 只 C57BL/6 小鼠随机分为正常组、脂肪肝组、脂肪肝相关肝癌组以及苓桂术甘汤低、中、高剂量组, 每组 10 只。脂肪肝相关肝癌组及苓桂术甘汤低、中、高剂量组小鼠采用腹腔注射二乙基亚硝胺和高脂饲料喂养相结合方式建立 NAFLD-HCC 模型; 脂肪肝组小鼠采用高脂饲料喂养建立非酒精性脂肪性肝病模型; 正常组予普通饲料喂养。造模成功后, 苓桂术甘汤低、中、高剂量组小鼠分别给予苓桂术甘汤 4.875、9.750、19.500 g/(kg·d) 灌胃, 正常组、脂肪肝组、脂肪肝相关肝癌组小鼠每天给予 10 ml/kg 生理盐水灌胃, 各组均连续灌胃 30 天。检测各组小鼠血脂含量 [包括甘油三酯 (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)] 及肝脏游离脂肪酸 (FFA) 含量, HE 及油红 O 染色观察小鼠肝脏组织病理学改变; 检测各组小鼠血清甲胎蛋白 (AFP)、癌胚抗原 (CEA) 含量及肝脏肿瘤增殖抗原 Ki-67 蛋白表达, 肝脏脂蛋白脂肪酶 (LPL)、白细胞分化抗原 36 (CD36)、肉毒碱棕榈酰基转移酶 1 α (CPT1 α)、B 淋巴细胞瘤-2 基因 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 蛋白表达, LPL、CD36、CPT1 α mRNA 表达。**结果** 与正常组比较, 脂肪肝相关肝癌组小鼠肝脏炎性细胞浸润, 脂肪变性明显, 部分细胞出现小细胞性增生的病理改变, 血清 TC、TG、LDL-C、AFP、CEA 含量升高, HDL-C 含量下降 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 肝脏 Ki-67 蛋白、Bcl-2 蛋白表达均升高, LPL、CD36、CPT1 α mRNA 及蛋白表达升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 脂肪肝组仅血清 TC、TG 和 LDL-C 含量升高, 病理显示肝脏组织仅有脂肪变性和炎细胞浸润, AFP、CEA 含量及肝脏 Ki-67 蛋白表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与脂肪肝相关肝癌组比较, 苓桂术甘汤高剂量组可显著改善肝脏病理形态, 显著降低肝脏脂质沉积面积, 降低血清 TC、TG、LDL-C、AFP、CEA 含量, 升高 HDL-C 含量, 降低肝脏 Ki-67、Bcl-2 蛋白表达和 LPL、CD36、CPT1 α 蛋白及 mRNA 表达 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 苓桂术甘汤中、低剂量组上述各指标改善效果不及高剂量组。**结论** 苓桂术甘汤可能通过影响 LPL/CD36/CPT1 信号轴调控脂肪酸代谢重编程, 从而抑制 NAFLD-HCC 的发生发展。

[关键词] 非酒精性脂肪肝; 肝细胞癌; 苓桂术甘汤; 脂肪酸代谢重编程; 脂肪酸氧化

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC, 简称肝癌) 是致命的恶性肿瘤之一。2020 年全球癌症统计数据^[1]显示, 肝癌是全球第六大常见癌症, 是导致癌症相关死亡的第三大常见原因。非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是肝癌的独立危险因素, 已逐渐发展成

为增长最快的肝癌相关病因, 而 NAFLD 驱动的肝癌与病毒性肝细胞癌相比生存时间更短, 且与肿瘤分期相关^[2]。研究发现, 肝脏脂肪代谢异常及脂质代谢相关基因的失调与 NAFLD 和肝癌的发生密切相关^[3]。NAFLD 和肝癌的共同特征是脂质代谢的重编程, 且代谢重编程是 NAFLD 进展为肝癌的核心因素^[4]。因此, 预防和 (或) 恢复脂代谢重编程可能是抑制非酒精性脂肪肝相关肝细胞癌 (NAFLD-HCC) 发生发展的有效策略。

基金项目: 国家自然科学基金 (82074145, 82104552); 辽宁中医药大学校级课题 (2021LZY029); 辽宁中医药大学中医脏象理论及应用教育部重点实验室开放基金 (zyzx2102)

✉ 通讯作者: jllq-8@163.com

苓桂术甘汤出自《伤寒杂病论》，为健脾温阳化浊的代表方。现代研究表明，苓桂术甘汤化裁可改善高脂血症血脂异常，改善 NAFLD 的肝脏脂质沉积^[5-6]。本研究拟以肝脂肪酸代谢重编程为切入点，观察苓桂术甘汤对 NAFLD-HCC 的预防作用并探讨其可能的作用机制，以期为其临床应用提供依据。本研究经辽宁中医药大学实验动物伦理委员会批准（伦理批准号：21000042022042）。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 60 只，3 周龄，体重（10±2）g，购于北京维通利华实验动物技术有限公司，实验动物许可证号：SCXK（京）2016-0006。分笼饲养于辽宁中医药大学实验动物中心，相对湿度 50%，室温 22℃，自然采光，小鼠自由饮水和进食。

1.2 药物

苓桂术甘汤组成：茯苓 25 g、桂枝 25 g、白术 15 g、甘草 10 g，购自辽宁中医药大学附属医院。将药物加入 10 倍量水浸泡 1 h 后，加热回流提取 2 h，过滤回收中药煎煮液，再加入 10 倍量水继续加热回流提取 2 h，合并两次滤液，浓缩至浓度为含生药 1 g/ml，4℃保存。

1.3 主要试剂及仪器

二乙基亚硝胺（DEN，批号 D0516），梯希爱（上海）化成工业发展有限公司；HE 染液（批号 C0105S）、油红 O 染液（批号 C0158S），上海碧云天生物技术有限公司；甲胎蛋白（AFP，批号 F2632-A）、癌胚抗原（CEA，批号 F2630-A），上海科兴生物科技有限公司；总胆固醇（TC，批号 20210806）、甘油三酯（TG，批号 20210809）、低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C，批号 20210806）、高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C，批号 20210809）测定试剂盒，南京建成生物科技有限公司；游离脂肪酸（FFA）含量检测试剂盒（批号 BC0595）、DAB 法显色试剂盒（批号 SW1040）、Trizol 试剂盒（批号 15596026）、4% 多聚甲醛（批号 P1110），北京索莱宝生物科技有限公司；免疫组化二抗试剂盒（批号 abs996），爱必信公司；脂蛋白脂肪酶（LPL，批号 bs-1973R）、白细胞分化抗原 36（CD36，批号 bs-1100R），北京博奥森生物科技有限公司；肉毒碱棕榈酰转移酶 1α（CPT1α，批号 15184-1-AP）、B 淋巴细胞瘤-2 基因（Bcl-2，批号 68103-1-Ig）、

Bcl-2 相关 X 蛋白（Bax，批号 50599-2-Ig）、甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH，批号 60004-1-Ig）、Ki-67 蛋白一抗（批号 bs-23103R-1），武汉 Proteintech 公司；RIPA 裂解液（批号 CW2333）、BCA 蛋白定量试剂盒（批号 CW0014）、羊抗兔 IgG（批号 CW0103）、羊抗鼠 IgG（批号 CW0102）、HiFi-Script 快速去基因组 cDNA 第一链合成试剂盒（批号 CW2582）、UltraSYBR 一步法荧光定量 PCR 试剂盒（批号 CW0659），江苏康为世纪生物科技有限公司。

7180 型全自动生化分析仪，日本日立公司；SpectraMaxi3 型多功能全波长酶标仪，美国 MD 公司；ASP 6025 型高性能组织脱水机、RM2235 型手动石蜡切片机、EG1150H 型包埋机、HI1220 型烘片机，德国 Leica 公司；M8 型数字扫描显微成像系统，德国 Precipoint 公司；1658033 型垂直板电泳装置，美国 Bio-Rad 公司；5200 型全自动化学发光图像分析系统，上海天能科技有限公司；7500 型实时荧光定量 PCR 仪、Veriti 型梯度 PCR 仪，美国 Life 公司。

1.4 动物分组及造模

60 只小鼠予普通饲料适应性喂养 1 周后，采用随机数字表法分为正常组、脂肪肝组、脂肪肝相关肝癌组及苓桂术甘汤低、中、高剂量组，每组 10 只。脂肪肝相关肝癌组及苓桂术甘汤低、中、高剂量组小鼠采用 DEN 溶液 50 mg/kg 腹腔注射，每周 1 次、连续 8 周，注射 4 周后给小鼠喂食高脂饲料 12 周 [10% 猪油、5% 蔗糖、1% 胆固醇、0.5% 胆酸钠、0.2% 甲基硫氧嘧啶、83.3% 普通饲料，批号 200426012，小泰有泰（北京）生物科技有限公司] 建立 NAFLD-HCC 小鼠模型^[7]。当小鼠肝脏大体观察有灰白色肿瘤结节，HE 染色有小细胞性增生病变，说明模型建立成功^[8]。同期脂肪肝组小鼠予高脂饲料喂养 12 周建立 NAFLD 模型^[9]。当观察到肝脏颜色变淡，HE 染色肝细胞含有大量的空泡及脂肪变性情况，说明模型建立成功^[9]。同期正常组仅予普通饲料喂养 12 周。

1.5 给药方法

所有小鼠均造模成功。按照小鼠体表面积进行换算^[10]，设中剂量为人临床等效剂量，苓桂术甘汤低、中、高剂量组小鼠分别给予苓桂术甘汤 4.875、9.750、19.500 g/（kg·d）灌胃；正常组、脂肪肝组、脂肪肝相关肝癌组小鼠每天给予 10 ml/kg 生理盐水灌胃。各组均连续灌胃 30 天。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 血脂及肝脏 FFA 含量 最后一次灌胃后次日, 每组采用随机数字表法选取 6 只小鼠眼球取血, 静置 2 h, 4 °C、3000 r/min 离心(离心半径 10 cm) 20 min, 取上清液, -80 °C 保存。取小鼠肝脏一半 4% 多聚甲醛固定, 一半冻存于 -80 °C 冰箱备用。采用全自动生化分析仪检测小鼠血清 TG、TC、LDL-C 和 HDL-C 的含量; 取小鼠肝脏组织 0.1 g 检测 FFA 含量, 具体操作严格按照试剂盒说明书。

1.6.2 血清 AFP、CEA 含量 上步收集的各组小鼠血清采用 ELISA 法检测, 具体操作严格按照试剂盒说明书, 绘制标准曲线并计算血清中 AFP、CEA 含量。

1.6.3 肝脏组织大体观察及 HE 染色 采用随机数字表法在各组剩余小鼠中随机选取 3 只取整个肝脏组织, 进行病理形态学检测及蛋白、mRNA 指标检测。肉眼观察小鼠肝脏形态, 取小鼠肝脏组织约 1.5 cm×1.5 cm×0.3 cm, 经梯度酒精脱水、二甲苯透明后用石蜡包埋、切片, HE 染色后用数字扫描显微成像系统观察组织形态并拍照。

1.6.4 肝脏组织脂质沉积情况 肝脏组织 0.1 g 于蔗糖中脱水, OTC 包埋, 制备冰冻切片约 10 μm。油红 O 染液染色 10 min, 60% 异丙醇稍冲洗, 蒸馏水洗, 苏木素中复染 2 min, 甘油明胶封片, 用数字扫描显微成像系统观察组织形态并拍照, 使用 Image Pro plus 6.0 分析细胞油红 O 染色结果, 计算面积百分比。

1.6.5 肝脏肿瘤组织中 Ki-67 蛋白表达 采用免疫组化法进行检测。常规石蜡切片, 经热抗原修复、灭活内源酶活性、封闭、一抗 (1:500) 37 °C 孵育 2 h、二抗 (1:100) 37 °C 孵育 1 h、DAB 显色、苏木素复染、盐酸酒精分化、脱水、封片观察, 利用 Image Pro plus 6.0 软件进行免疫组化分析, 以平均光密度值作为蛋白表达量。

1.6.6 肝脏凋亡相关蛋白及脂肪酸代谢途径蛋白表达 采用 Western blot 法检测。取 0.1 g 肝脏组织, 加入 1 ml RIPA 裂解液, 充分匀浆并置于冰上裂解 30 min, 4 °C、12 000 r/min (离心半径 10 cm) 离心 15 min, 离心后取上清, BCA 试剂盒检测各组蛋白浓度。以 50 μg 蛋白/泳道上样, 经 SDS-PAGE 电泳后, 转膜至 PVDF 膜 (半干转), 按比例配制 LPL (1:1000)、CD36 (1:1000)、CPT1α (1:2000)、Bcl-2 (1:1000)、Bax (1:1000)、GAPDH (1:5000)

一抗, 4 °C 封闭过夜, TBST 洗涤 3 次, 每次 15 min, 加入二抗 (1:10 000)。配制化学发光液, 将膜放在曝光板上, 膜上滴适量的发光液, 应用化学发光成像系统曝光并分析目的蛋白曝光条带图片的灰度值。

1.6.7 肝脏脂肪酸代谢途径相关 mRNA 表达 采用 RT-PCR 法检测。Trizol 裂解肝组织提取总 RNA, 按试剂盒说明书依次将 RNA 反转录为 cDNA, 然后加入扩增反应体系, 95 °C 10 min、95 °C 15 s、60 °C 1 min, 扩增 40 个循环。引物由上海生工生物工程有限公司合成, LPL: 上游 5'-GTCATCT-CATTCCTGGATTAGCA-3', 下游 5'-GGCACCCAAC-TCTCATACATTC-3', 产物长度 20 bp; CD36: 上游 5'-GG-ACATTGAGATTCTTTTCTCTG-3', 下游 5'-GCAAAGGCATTGGCTGGAAGAAC-3', 产物长度 23 bp; CPT1α: 上游 5'-AGCGACTCTTCAATACT-TCCCG-3', 下游 5'-GCAAAATAGGTCTGCCGACAC-3', 产物长度 22 bp; GAPDH: 上游 5'-CCTACCCCCAA-TGTGTCCGT-3', 下游 5'-AGCCCAAGATGCCCTTCA-GT-3', 产物长度 20 bp。以 GAPDH 为内参照, 检测各基因 mRNA 的相对表达水平, 共重复检测 3 次。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量分析。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理, 计量资料均符合正态分布, 以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 方差齐选择单因素方差分析中的 Bonferroni 检验, 如方差不齐则选择 Tamhane's T^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠肝脏形态及 HE 染色

肉眼观察小鼠肝脏形态: 正常组小鼠肝脏大小正常, 表面光滑, 颜色红润, 质地柔软。脂肪肝组小鼠肝脏见少许黄褐色, 体积增大, 质地坚韧, 边缘圆钝, 切面有油腻感。脂肪肝相关肝癌组小鼠肝脏肿大, 颜色明显泛黄, 表面粗糙, 边缘钝而厚, 触之有油腻感, 仔细观察有灰白色结节。与脂肪肝相关肝癌组比较, 苓桂术甘汤高剂量组小鼠肝脏表面颜色明显变红润, 结节数目明显减少; 苓桂术甘汤中剂量组小鼠肝脏表面颜色稍显红润, 结节数目有所减少; 苓桂术甘汤低剂量组肝脏表面仍颜色泛黄且粗糙, 结节数目未见减少。

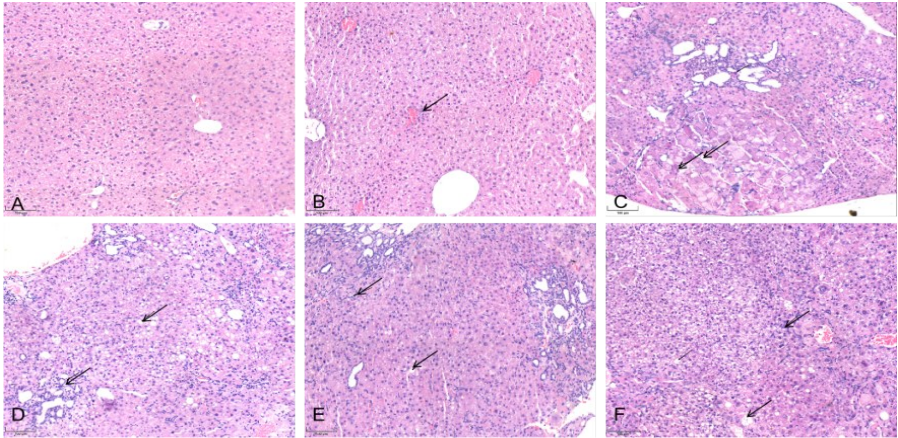
HE 染色结果示, 正常组小鼠肝小叶结构清晰、完整, 细胞排列整齐, 细胞核位于中央, 细胞无脂

肪变性,未见炎性细胞浸润。脂肪肝组小鼠肝小叶结构破坏,细胞肿胀变形,见脂肪变性,见大小不等的空泡,细胞核位于边缘,可见炎性细胞浸润。脂肪肝相关肝癌组小鼠肝细胞体积增大,肝细胞脂肪变性明显,有大量的空泡状细胞,炎性细胞大量浸润,细胞核被挤向一边,部分细胞出现气球样变、细胞密度增大、小细胞性增生的病变。与脂肪肝相关肝癌组比较,苓桂术甘汤高剂量组肝小叶结构明显恢复,空泡样变及炎性细胞浸润明显减轻;苓桂术甘汤中剂量组肝细胞胞浆内可见细小空泡,炎性细胞浸润减轻;苓桂术甘汤低剂量组肝细胞空泡样变及炎性细胞浸润改善效果不明显。具体见图1。

2.2 各组小鼠肝脏脂质沉积情况比较

油红O染色结果显示,正常组小鼠肝细胞内未见橘红色脂滴;脂肪肝组及脂肪肝相关肝癌组肝细胞胞浆内见大量橘红色脂滴沉积,脂肪变性明显;苓桂术甘汤低、中、高剂量组肝细胞胞浆内橘红色脂滴较脂肪肝相关肝癌组均显著减少。具体见图2。

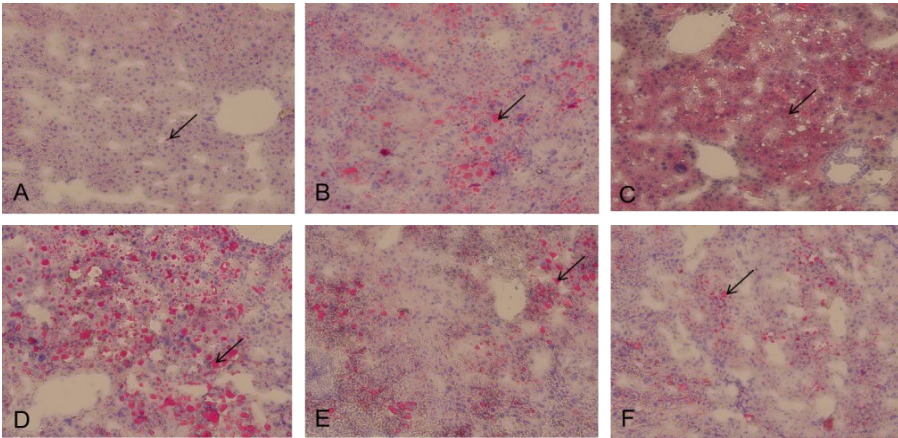
表1示,与正常组比较,脂肪肝组及脂肪肝相关肝癌组肝脏脂质沉积面积百分比显著升高($P<0.01$);与脂肪肝相关肝癌组比较,苓桂术甘汤低、中、高剂量组肝脏脂质沉积面积百分比显著降低($P<0.01$),且苓桂术甘汤高剂量组肝脏脂质沉积面积百分比显著低于苓桂术甘汤低剂量组($P<0.05$);苓桂术甘汤中、低剂量组肝脏脂质沉积面积百分比差异无统计学意义($P>0.05$)。



注:图中黑色箭头指示为炎性细胞浸润;A,正常组;B,脂肪肝组;C,脂肪肝相关肝癌组;D,苓桂术甘汤低剂量组;E,苓桂术甘汤中剂量组;F,苓桂术甘汤高剂量组。

图1 各组小鼠肝脏组织病理学观察结果(HE,×400)

Figure 1 Histopathological observation results of mouse liver in each group



注:图中黑色箭头指示为橙红色脂滴;A,正常组;B,脂肪肝组;C,脂肪肝相关肝癌组;D,苓桂术甘汤低剂量组;E,苓桂术甘汤中剂量组;F,苓桂术甘汤高剂量组。

图2 各组小鼠肝脏组织脂质沉积情况(油红O染色,×400)

Figure 2 Histopathological observation results of mouse liver in each group

表 1 各组小鼠肝脏脂质沉积面积百分比比较

Table 1 Comparison of the percentage of liver lipid deposition area of mice in each group (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	脂质沉积面积百分比
正常组	3	0
脂肪肝组	3	0.19±0.010 ^{a)}
脂肪肝相关肝癌组	3	0.33±0.003 ^{a)}
苓桂术甘汤低剂量组	3	0.30±0.007 ^{b)}
苓桂术甘汤中剂量组	3	0.18±0.001 ^{b)}
苓桂术甘汤高剂量组	3	0.08±0.005 ^{b) c)}

注: a) 与正常组比较, $P<0.01$; b) 与脂肪肝相关肝癌组比较, $P<0.01$; c) 与苓桂术甘汤低剂量组比较, $P<0.05$ 。

2.3 各组小鼠血清 AFP、CEA 含量比较

表 2 示, 与正常组比较, 脂肪肝相关肝癌组 AFP、CEA 含量升高 ($P<0.01$); 与脂肪肝相关肝癌组比较, 苓桂术甘汤各剂量组 AFP、CEA 含量降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 苓桂术甘汤各剂量组间比较, AFP、CEA 含量差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 2 各组小鼠血清 AFP、CEA 含量比较

Table 2 Comparison of serum AFP and CEA contents of mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	AFP/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	CEA/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$
正常组	6	101.15±30.00	1.39±0.25
脂肪肝组	6	115.70±18.63	1.27±0.18
脂肪肝相关肝癌组	6	265.85±45.88 ^{a)}	2.81±0.34 ^{a)}
苓桂术甘汤低剂量组	6	201.91±7.80 ^{b)}	2.02±0.39 ^{b)}
苓桂术甘汤中剂量组	6	215.55±20.51 ^{c)}	2.10±0.13 ^{b)}
苓桂术甘汤高剂量组	6	199.48±21.59 ^{b)}	2.05±0.10 ^{b)}

注: AFP, 甲胎蛋白; CEA, 癌胚抗原。

a) 与正常组比较, $P<0.01$; b) 与脂肪肝相关肝癌组比较, $P<0.01$; c) 与脂肪肝相关肝癌组比较, $P<0.05$ 。

2.4 各组小鼠血脂及肝脏 FFA 含量比较

表 3 示, 与正常组比较, 脂肪肝组、脂肪肝相关肝癌组小鼠血清 TC、TG、LDL-C 均显著升高,

表 3 各组小鼠血脂及肝脏 FFA 含量比较

Table 3 Comparison of blood lipid and liver FFA content of mice in each group

组别	鼠数	TC/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	TG/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	LDL-C/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	HDL-C/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	FFA/ $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$
正常组	6	1.63±0.53	0.68±0.24	1.02±0.28	12.20±6.60	0.12±0.01
脂肪肝组	6	3.61±0.35 ^{a)}	1.91±0.37 ^{a)}	4.83±0.50 ^{a)}	7.19±3.25	0.18±0.04 ^{a)}
脂肪肝相关肝癌组	6	3.81±0.98 ^{a)}	2.75±0.28 ^{a)}	4.88±1.16 ^{a)}	2.80±1.42 ^{b)}	0.15±0.01
苓桂术甘汤低剂量组	6	3.32±0.92	1.85±0.28 ^{d)}	3.79±0.64	8.76±3.84	0.13±0.03
苓桂术甘汤中剂量组	6	2.79±0.76 ^{c)}	1.33±0.17 ^{d) e)}	3.60±0.52	7.87±4.18	0.10±0.02 ^{c)}
苓桂术甘汤高剂量组	6	2.47±0.38 ^{c) f)}	1.21±0.10 ^{d) f)}	3.27±1.02 ^{d)}	11.40±5.33 ^{c)}	0.12±0.03

注: TC, 总胆固醇; TG, 甘油三酯; LDL-C, 低密度脂蛋白胆固醇; HDL-C, 高密度脂蛋白胆固醇; FFA, 游离脂肪酸。

a) 与正常组比较, $P<0.01$; b) 与正常组比较, $P<0.05$; c) 与脂肪肝相关肝癌组比较, $P<0.05$; d) 与脂肪肝相关肝癌组比较, $P<0.01$; e) 与苓桂术甘汤低剂量组比较, $P<0.01$; f) 与苓桂术甘汤低剂量组比较, $P<0.05$ 。

脂肪肝相关肝癌组小鼠 HDL-C 降低, 脂肪肝组 FFA 升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与脂肪肝相关肝癌组比较, 苓桂术甘汤低剂量组仅 TG 显著降低, 苓桂术甘汤中剂量组 TG 及肝脏 FFA 含量显著降低, 苓桂术甘汤高剂量组 TC、TG、LDL-C 均显著降低, HDL-C 升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与苓桂术甘汤低剂量组比较, 苓桂术甘汤中、高剂量组 TC、TG 显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。苓桂术甘汤中、高剂量组各指标比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.5 各组小鼠肝脏组织中 Ki-67 蛋白表达比较

表 4 示, 与正常组比较, 脂肪肝相关肝癌组 Ki-67 蛋白表达升高 ($P<0.01$); 与脂肪肝相关肝癌组比较, 苓桂术甘汤中、高剂量组 Ki-67 蛋白表达降低 ($P<0.01$); 与苓桂术甘汤低剂量组比较, 苓桂术甘汤高剂量组 Ki-67 蛋白表达降低 ($P<0.01$)。

表 4 各组小鼠肝脏组织中 Ki-67 蛋白表达比较

Table 4 Comparison of Ki-67 protein expression in liver tumor tissues of mice in each group (平均光密度值, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Ki-67
正常组	3	0.03±0.000
脂肪肝组	3	0.03±0.002
脂肪肝相关肝癌组	3	0.05±0.004 ^{a)}
苓桂术甘汤低剂量组	3	0.05±0.002
苓桂术甘汤中剂量组	3	0.04±0.002 ^{b)}
苓桂术甘汤高剂量组	3	0.04±0.002 ^{b) c)}

注: a) 与正常组比较, $P<0.01$; b) 与脂肪肝相关肝癌组比较, $P<0.01$; c) 与苓桂术甘汤低剂量组比较, $P<0.01$ 。

由于苓桂术甘汤高剂量组上述各指标改善效果最好, 故后续研究指标均只对苓桂术甘汤高剂量组、脂肪肝相关肝癌组、正常组进行比较。

2.6 各组小鼠肝脏 Bcl-2、Bax、LPL、CD36、CPT1 α 蛋白表达比较

表 5 示, 与正常组比较, 脂肪肝相关肝癌组

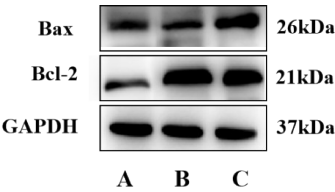
表 5 各组小鼠肝脏 Bcl-2、Bax、LPL、CD36、CPT1α 蛋白表达比较
Table 5 Comparison of protein expressions of Bcl-2, Bax, LPL, CD36, and CPT1α in the liver of mice in each group (灰度值, $\bar{x} \pm s$)

分组	鼠数	Bcl-2	Bax	LPL	CD36	CPT1α
正常组	3	0.95±0.01	1.00±0.03	0.52±0.03	0.92±0.03	0.91±0.03
脂肪肝相关肝癌组	3	1.18±0.06 ^{a)}	0.93±0.06	1.17±0.09 ^{a)}	1.10±0.08 ^{b)}	1.07±0.04 ^{a)}
苓桂术甘汤高剂量组	3	1.04±0.02 ^{c)}	1.18±0.04 ^{d)}	0.62±0.04 ^{d)}	0.95±0.04 ^{c)}	0.97±0.00 ^{c)}

注：Bcl-2，B 淋巴细胞瘤-2 基因；Bax，Bcl-2 相关 X 蛋白；LPL，脂蛋白脂肪酶；CD36，白细胞分化抗原 36；CPT1α，肉毒碱棕榈酰基转移酶 1α。

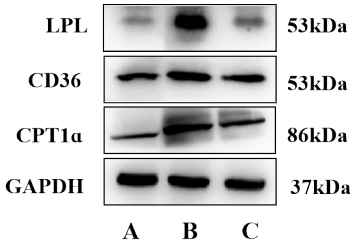
a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与正常组比较， $P<0.05$ ；c) 与脂肪肝相关肝癌组比较， $P<0.05$ ；d) 与脂肪肝相关肝癌组比较， $P<0.01$ 。

Bcl-2、LPL、CD36、CPT1α 蛋白表达升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，Bax 蛋白表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)；与脂肪肝相关肝癌组比较，苓桂术甘汤高剂量组 Bcl-2、LPL、CD36、CPT1α 蛋白表达降低，Bax 蛋白表达升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组小鼠肝脏 Bcl-2、Bax、LPL、CD36、CPT1α 蛋白电泳图分别见图 3、图 4。



注：A，正常组；B，脂肪肝相关肝癌组；C，苓桂术甘汤高剂量组；Bcl-2，B 淋巴细胞瘤-2 基因；Bax，Bcl-2 相关 X 蛋白。

图 3 各组小鼠肝脏 Bax、Bcl-2 蛋白电泳图
Figure 3 Electrophoresis of Bax and Bcl-2 proteins in liver of mice in each group



注：A，正常组；B，脂肪肝相关肝癌组；C，苓桂术甘汤高剂量组；LPL，脂蛋白脂肪酶；CD36，白细胞分化抗原 36；CPT1α，肉毒碱棕榈酰基转移酶 1α。

图 4 各组小鼠肝脏 LPL、CD36、CPT1α 蛋白电泳图
Figure 4 Electrophoresis of LPL, CD36, and CPT1α proteins in the liver of mice in each group

2.7 各组小鼠肝脏组织 LPL、CD36、CPT1α mRNA 表达比较

表 6 示，与正常组比较，脂肪肝相关肝癌组 LPL、CD36、CPT1α mRNA 表达显著升高 ($P<$

0.01)；与脂肪肝相关肝癌组比较，苓桂术甘汤高剂量组 LPL、CD36、CPT1α mRNA 表达显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

表 6 各组小鼠肝脏组织 LPL、CD36、CPT1α mRNA 表达比较
Table 6 Comparison of LPL, CD36, CPT1α mRNA expression in liver tissue of mice in each group ($2^{-\Delta\Delta C_t}$, $\bar{x} \pm s$)

分组	鼠数	LPL	CD36	CPT1α
正常组	3	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
脂肪肝相关肝癌组	3	3.20±0.83 ^{a)}	7.08±1.30 ^{a)}	6.80±1.67 ^{a)}
苓桂术甘汤高剂量组	3	1.43±0.22 ^{b)}	0.81±0.26 ^{c)}	1.37±0.32 ^{c)}

注：LPL，脂蛋白脂肪酶；CD36，白细胞分化抗原 36；CPT1α，肉毒碱棕榈酰基转移酶 1α。

a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与脂肪肝相关肝癌组比较， $P<0.05$ ；c) 与脂肪肝相关肝癌组比较， $P<0.01$ 。

3 讨论

目前 NAFLD 是全球肝相关死亡增长最快的原因，并逐渐成为终末期肝病、原发性肝癌、肝移植的重要病因，带来了巨大的疾病经济负担^[11]。根据其症状 NAFLD 可归属中医学“肝积”“癥瘕”“积聚”等范畴。《杂病源流犀烛·痰饮源流》云：“饮啖过度，好食油面猪脂，以至脾气不利，壅滞为痰”，提示饮食失节，过食肥甘厚味，则脾伤。脾伤则脾失散精，水谷不化，痰浊内生，痰浊滞留于肝脏，发为肝积。脾阳对于“散精”的作用尤为重要，如《金匱悬解·痰饮咳嗽》所言：“盖饮食入胃，脾阳蒸动，化为精气”。脾阳受损后，其散精的功能不足，气化不利，痰浊内生，痰浊凝滞于肝脉，客于肝脏而发为肝积。痰浊日久，致肝气机升降失常，进一步导致气滞血瘀，滞、痰、瘀合而化热，熏蒸肝胆，久成“肝之癌毒”^[12]，则发展成为肝癌。因此，早期当以健脾温阳、祛痰化浊为基本治则。苓桂术甘汤为健脾温阳化浊之代表方，其中茯苓为君药，健脾以化痰湿；桂枝为臣药，温通阳气；白术为佐药，健脾燥湿兼补益脾阳；甘草为

使药,补中益气,调和诸药。四药合用可使脾气健运,恢复其“散精”之功,进而防止 NAFLD-HCC 的演变发展。

研究表明,脂质分子在肿瘤的发生发展中发挥着重要作用,其中脂质代谢发生高度重编程^[13]是关键环节。一方面,脂代谢重编程使得肿瘤细胞产生更多的能量,有利于肿瘤细胞在营养匮乏的微环境中存活;另一方面,脂代谢重编程产生的信号分子可激活肿瘤相关信号通路,促进肿瘤细胞增殖、侵袭和转移^[14]。肝癌细胞脂代谢重编程主要表现为异于正常组织细胞的脂肪酸的合成和脂肪酸氧化等脂代谢过程,在肝癌中外源性脂肪酸支持肝癌细胞的生长^[15-16],因此,调控脂肪酸的代谢重编程可能是抑制 NAFLD-HCC 的有效策略。

本研究结果显示,脂肪肝相关肝癌组小鼠肝脏出现灰白色结节,HE 染色发现肝细胞脂肪变性明显,炎性细胞大量浸润,部分细胞出现气球样变及小细胞性增生的病变;而脂肪肝组小鼠 HE 染色可见脂肪变性,炎性细胞浸润及大小不等的空泡。油红 O 染色结果示,脂肪肝组及脂肪肝相关肝癌组小鼠可见肝脏脂质沉积。脂肪肝组小鼠肝脏中 FFA 含量较正常组明显升高,而脂肪肝相关肝癌组差异无统计学意义。分析原因,可能因肿瘤细胞增殖需消耗 FFA 提供能量,导致脂肪肝相关肝癌组小鼠肝脏 FFA 含量有所降低,但其机制仍需进一步证实。AFP 是临床中原发性肝癌特异性最高的肿瘤标志物,CEA 是一种广谱性的肿瘤标志物^[17]。本研究检测发现,与正常组比较,脂肪肝相关肝癌组小鼠血清 AFP 和 CEA 含量显著升高,脂肪肝组小鼠血清 AFP 和 CEA 含量无明显变化。Ki-67 蛋白是一种增殖细胞的相关抗原,是在增殖的细胞中普遍表达且在静息细胞中不存在的非组蛋白核蛋白,Ki-67 蛋白阳性表达率越高,提示肿瘤细胞增殖活性越强,恶性程度越高^[18]。免疫组化结果显示,脂肪肝相关肝癌组 Ki-67 蛋白表达较正常组显著升高,而脂肪肝组 Ki-67 蛋白无明显变化。以上结果均提示,单独高脂饲料喂养仅仅建立 NAFLD 模型,DEN 加高脂饲料喂养则可成功建立 NAFLD-HCC 模型。本研究给予模型小鼠不同剂量的苓桂术甘汤进行干预,结果发现苓桂术甘汤高剂量可显著降低 NAFLD-HCC 模型小鼠血清肿瘤标记物 AFP、CEA 含量及 Ki-67 蛋白表达,降低血清 TC、TG 和 LDL-C 水平,升高 HDL-C 水平,调节了异常的血脂水平。此外,HE 染色及油红 O 染色发现,苓桂术甘汤高

剂量可明显恢复肝小叶结构,减轻空泡样变、炎性细胞浸润及脂肪变性,改善肝脏脂质的沉积,效果优于中、低剂量组。因此,后续机制研究中,我们使用了高剂量的苓桂术甘汤进行观察。

Bcl-2 与 Bax 基因是 Bcl-2 家族中最具有代表性的抑制凋亡和促进凋亡的基因,在肿瘤细胞凋亡中具有重要的调控作用^[19]。脂肪肝相关肝癌组 Bcl-2 表达较正常组升高,苓桂术甘汤高剂量干预后 Bcl-2 蛋白表达降低,而 Bax 蛋白表达升高,说明苓桂术甘汤高剂量可促进肝癌细胞凋亡。因此,高剂量苓桂术甘汤对小鼠 NAFLD-HCC 的发生发展具有一定抑制作用。控制脂肪酸代谢的 LPL/CD36/肉碱棕榈酰转移酶 1 (CPT1) 信号轴具有多种生物学功能,LPL 是机体水解脂蛋白的关键酶,LPL 在人类 HCC 中的高表达与不良预后相关^[16]。CD36 是促进脂肪酸运输的关键蛋白,在肿瘤中表达升高,可增加肿瘤细胞对外源性脂质摄取的依赖性^[20]。CPT1 是调节脂肪酸氧化和维持能量稳态的主要因素,其亚型 CPT1 α 能够促进肿瘤的生长,故抑制 CPT1 α 活性和表达具有明显的抗肿瘤作用^[21]。本研究发现,脂肪肝相关肝癌组小鼠肝脏中 LPL、CD36 和 CPT1 α mRNA 及蛋白表达升高,可能是通过激活外源性脂肪酸代谢而促进肿瘤的发生发展。高剂量的苓桂术甘汤干预后 LPL、CD36 和 CPT1 α mRNA 及蛋白表达显著降低,提示其可能通过 LPL/CD36/CPT1 信号轴调控脂肪酸代谢重编程,进而改善肝脏脂肪酸代谢。

综上所述,苓桂术甘汤可能通过抑制 LPL/CD36/CPT1 信号轴,调控脂肪酸代谢重编程,改善脂肪酸的代谢,促进肝癌细胞凋亡,从而抑制 NAFLD-HCC 的发生发展。但本研究也存在一定的局限性,即在动物实验中未设置代谢轴阻断,后续将运用细胞实验继续验证。

参考文献

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] JUN TW, YEH ML, YANG JD, et al. More advanced disease and worse survival in cryptogenic compared to viral hepatocellular carcinoma [J]. Liver Int, 2018, 38(5): 895-902.
- [3] CURRIE E, SCHULZE A, ZECHNER R, et al. Cellular fatty acid metabolism and cancer [J]. Cell Metab, 2013, 18(2):

- 153-161.
- [4] SATRIANO L, LEWINSKA M, RODRIGUES PM, et al. Metabolic rearrangements in primary liver cancers: cause and consequences [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(12):748-766.
- [5] XU J, WANG R, YOU S, et al. Traditional Chinese medicine Lingguizhugan decoction treating non-alcoholic fatty liver disease with spleen-yang deficiency pattern: study protocol for a multicenter randomized controlled trial [J]. *Trials*, 2020, 21(1):512.
- [6] 宋清武, 李慧臻. 加味苓桂术甘汤治疗非酒精性脂肪性肝病的临床研究[J]. *四川中医*, 2013, 31(8):60-62.
- [7] FU H, TANG B, LANG J, et al. High-Fat diet promotes macrophage-mediated hepatic inflammation and aggravates diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in mice [J]. *Front Nutr*, 2020, 7: 585306. doi: 10.3389/fnut.2020.585306.
- [8] GAO J, XIONG R, XIONG D, et al. The adenosine monophosphate (AMP) analog, 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR) inhibits hepatosteatosis and liver tumorigenesis in a high-fat diet murine model treated with diethylnitrosamine (DEN)[J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24:8533-8543. doi:10.12659/MSM.910544.
- [9] 李美蓁, 田书云, 张迪. 非酒精性脂肪肝 C57BL/6J 小鼠模型建立[J]. *山东化工*, 2021, 50(20):162-164, 167.
- [10] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(9):4.
- [11] POWELL EE, WONG VW, RINELLA M. Non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Lancet*, 2021, 397(10290):2212-2224.
- [12] 姜家康, 陈瑞睿, 刘洪星, 等. 关于“肝之癌毒”理论的简述[J]. *中医药信息*, 2012, 29(4):12-13.
- [13] SNAEBJORNSSON MT, JANAKI-RAMAN S, SCHULZE A. Greasing the wheels of the cancer machine: the role of lipid metabolism in cancer [J]. *Cell Metab*, 2020, 31(1):62-76.
- [14] LI Z, KANG Y. Lipid metabolism fuels cancer's spread [J]. *Cell Metab*, 2017, 25(2):228-230.
- [15] LEI L, PILO GM, LI X, et al. Inactivation of fatty acid synthase impairs hepatocarcinogenesis driven by AKT in mice and humans [J]. *J Hepatol*, 2016, 64(2):333-341.
- [16] CAO D, SONG X, CHE L, et al. Both de novo synthesized and exogenous fatty acids support the growth of hepatocellular carcinoma cells [J]. *Liver Int*, 2017, 37(1):80-89.
- [17] 王瑾. 肿瘤标志物 AFP 与 CEA 的联合检测在肝癌诊断中的临床价值 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2011, 10(16):2.
- [18] MENON SS, GURUVAYOORAPPAN C, SAKTHIVEL KM, et al. Ki-67 protein as a tumour proliferation marker [J]. *Clin Chim Acta*, 2019, 491:39-45. doi: 10.1016/j.cca.2019.01.011.
- [19] 黄炳臣, 龙喜带. Bcl-2 与 Bax 蛋白在肝细胞癌中的研究进展 [J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2012, 33(3):355-356.
- [20] TAO L, DING X, YAN L, et al. CD36 accelerates the progression of hepatocellular carcinoma by promoting FAs absorption [J]. *Med Oncol*, 2022, 39(12):202.
- [21] SCHLAEPFER IR, JOSHI M. CPT1A-mediated fat oxidation, mechanisms, and therapeutic potential [J]. *Endocrinol*, 2020, 161(2):bqz046. doi: 10.1210/endo/bqz046.

Effect of *Lingguizhugan Decoction* (苓桂术甘汤) on Reprogramming of Liver Fatty Acid Metabolism in Mice Model of Hepatocellular Carcinoma Associated with Non-alcoholic Fatty Liver

CAO Huimin¹, KONG Liang¹, SUI Guoyuan¹, LENG Xue¹, CHEN Wenna², JIA Lianqun¹

1. Key Laboratory of Ministry of Education for TCM Viscera-State Theory and Applications, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, 110847; 2. School of Medical Laboratory, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To observe the potential mechanism of *Lingguizhugan Decoction* (苓桂术甘汤, LZD) in the treatment of nonalcoholic fatty liver disease-associated hepatocellular carcinoma (NAFLD-HCC) from fatty acid metabolism reprogramming. **Methods** Sixty C57BL/6 mice were randomly divided into normal group, NAFLD group, NAFLD-HCC group, low-, medium- and high-dose LZD groups, with 10 mice in each group. NAFLD-HCC mouse models were established by intraperitoneal injection of diethylnitrosamine (DEN) combined with a high-fat diet (HFD) in the NAFLD-HCC group, low-, medium- and high-dose LZD groups, while NAFLD models were made through HFD in the NAFLD group; the mice in the normal group were fed with normal diet. After the model was successfully established, low-, medium- and high-dose LZD groups were intragastrically administered with 4.875, 9.750 and 19.500 g/(kg·d) of LZD solutions, respectively, while the other groups were intragastrically administered with

10ml/kg of normal saline, all for 30 days. The levels of blood lipid indicators including triglyceride (TG), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) as well as free fatty acid (FFA) content in liver tissue were measured; pathological changes in liver tissue were observed by hematoxylin and eosin (HE) and Oil Red O staining; serum alpha-fetoprotein (AFP) and carcinoembryonic antigen (CEA) levels were measured, and Ki-67 protein expression in liver was examined; liver lipoprotein lipase (LPL), leukocyte differentiation antigen 36 (CD36), carnitine palmitoyltransferase 1 α (CPT1 α), B lymphocytoma-2 gene (Bcl₂), and Bcl-2 related X protein (Bax) protein expression as well as LPL, CD36 and CPT1 α mRNA expression were detected. **Results** Compared to those in the normal group, the mice in the NAFLD-HCC group had liver inflammatory cell infiltration, obvious fatty degeneration, and small cell hyperplasia in certain cells; the contents of TC, TG, LDL-C, AFP and CEA significantly increased, and the content of HDL-C significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the expression of Ki-67 protein and Bcl₂ protein increased, and the expression of LPL, CD36 and CPT1 α mRNA and protein increased as well ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). In the NAFLD group, only serum TC, TG and LDL-C content significantly increased compared to those in the normal group, and only steatosis and inflammatory cell infiltration in the liver tissue were found through pathological observation; there was no significant difference in AFP and CEA content and liver Ki-67 protein expression between the two groups ($P > 0.05$). Compared to those in the NAFLD-HCC group, the pathological morphology of the liver was significantly improved in the high-dose LZD group, and the area of lipid deposition was reduced; the serum TC, TG, LDL-C, AFP and CEA content decreased, while the HDL-C content increased; Ki-67 and Bcl₂ protein expression decreased, as well as LPL, CD36, CPT1 α mRNA and protein expression ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); and the above indexes in high-dose LZD group were superior to those in the low- and medium-dose LZD group. **Conclusion** LZD may inhibit the occurrence and development of NAFLD-HCC by regulating fatty acid metabolism reprogramming through LPL-CD36-CPT1 metabolic axis.

Keywords nonalcoholic fatty liver disease; hepatocellular carcinoma; *Linggui Zhugan Decoction* (苓桂术甘汤); fatty acid metabolism reprogramming; fatty acid oxidation

(收稿日期: 2022-10-25; 修回日期: 2023-02-27)

[编辑: 邓媛]

广告

《中医杂志(英文版)》欢迎投稿

Journal of Traditional Chinese Medicine [《中医杂志(英文版)》] (ISSN 0255-2922, CN 11-2167/R, 双月刊) 由中华中医药学会与中国中医科学院联合主办, 是我国中医药界具有权威的中医药英文科技期刊, 现发行和交换 90 多个国家和地区。

《中医杂志(英文版)》自 1981 年创刊以来一直坚持正确的办刊宗旨, 国际影响力不断提升。2010 年入选 SCI-E (《科学引文索引》扩刊版), 2011 年获得中国中医科学院自主选题项目资助, 2013 年获得“中国科技期刊国际影响力提升计划”资助, 自 2012 年起连续被评为“中国最具国际影响力学术期刊”。本刊先后被国际知名文献数据库 MEDLINE、《化学文摘》(CA)、《医学文摘》(EM) 等收录, 是 MEDLINE 收录的第一份中国出版的中医药期刊, 是 SCI 收录的 30 余种全科医学和替代医学期刊中的中国传统医学综合性学术期刊之一。

《中医杂志(英文版)》主要栏目包括循证研究、理论研究、基础研究、临床观察、中药研究、文献研究, 思路与方法、综述等。内容以报道中医药基础、临床研究成果和科研前沿进展为主, 覆盖中医药学科各个领域。欢迎广大专家学者积极投稿。作者可直接登录本刊网站 <http://www.journaltcm.com> 投稿。

联系邮箱: jtcmen@126.com。电话: 010-64089190。

本社地址: 北京市东城区东直门内南小街 16 号, 邮政编码: 100700。