

本文引用: 勾阳阳, 曾广娴, 喻 嵘, 陈 聪. 2型糖尿病合并非酒精性脂肪性肝病肝细胞损伤模型的建立及探讨 [J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(1): 47-52.

2型糖尿病合并非酒精性脂肪性肝病肝细胞损伤模型的建立及探讨

勾阳阳¹, 曾广娴², 喻 嵘^{3*}, 陈 聪^{1*}

1. 贵州中医药大学, 贵州 贵阳 550025; 2. 黔西南州中医院, 贵州 兴义 562400; 3. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

[摘要] **目的** 探讨2型糖尿病合并非酒精性脂肪性肝病“毒损肝络”肝细胞损伤模型建立的可行性。**方法** 将大鼠肝细胞随机分为正常组、HG组(100 mmol/L D-葡萄糖)、OA组(0.2 mmol/L OA)、HG+OA组(100 mmol/L D-葡萄糖+0.2 mmol/L OA)。干预24 h后, 油红O染色观察各组肝细胞内脂滴, CCK-8法检测肝细胞的增殖情况, 常规生化法检测肝细胞上清液生化指标, 酶联免疫法测定肝细胞上清液NLRP-3、Caspase-1、IL-1 β 含量, Western blot法检测肝细胞CK8、CK18蛋白表达。**结果** 与正常组比较, 模型组脂滴蓄积明显增加; 肝细胞生化指标含量均升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 肝细胞上清液中NLRP-3、Caspase-1、IL-1 β 含量均升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 肝细胞内CK8、CK18蛋白表达水平显著上调($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** HG联合OA诱导肝细胞损伤建立T2DM合并NAFLD体外模型符合“毒损肝络”病机特点。

[关键词] 2型糖尿病; 非酒精性脂肪性肝病; 肝细胞; CK8; CK18; NLRP3

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.01.008

Model establishment of hepatocyte injury in type 2 diabetes mellitus complicated with nonalcoholic fatty liver disease

GOU Yangyang¹, ZENG Guangxian², YU Rong^{3*}, CHEN Cong^{1*}

1. Guizhou University of Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou 550025, China; 2. Qianxinan Autonomous Prefecture Hospital of Chinese Medicine, Xingyi, Guizhou 562400, China; 3. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

[Abstract] **Objective** To explore the feasibility of establishing the hepatocyte injury model of type 2 diabetes mellitus (T2DM) complicated with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Methods** Rat hepatocytes were randomly divided into normal group, HG group (100 mmol/L D-glucose), OA group (0.2 mmol/L OA) and HG + OA group (100 mmol/L D-glucose + 0.2 mmol/L OA). After 24 h of intervention, lipid droplets in hepatocytes of each group were observed by oil-red O staining. The proliferation of hepatocytes was detected by CCK-8. The biochemical indexes of hepatocyte supernatant were detected by conventional biochemical method, and the levels of NLRP-3, Caspase-1 and IL-1 β in it were determined by ELISA. The protein expression levels of CK8 and CK18 in hepatocytes were detected by Western blot. **Results** Compared with the normal group, the accumulation of lipid droplets in the model group was significantly higher. The levels of hepatocyte biochemical indexes increased ($P<0.05$ or $P<0.01$), so

[收稿日期] 2022-07-28

[基金项目] 国家自然科学基金地区科学基金项目(81860818); 贵州省科学技术厅科技基金项目(黔科合基础-ZK[2021]一般501); 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究专项课题(QZYY-2022-010); 2021年贵州省卫生健康委科学技术基金项目; 贵州中医药大学糖脂代谢病研究中心资助项目。

[第一作者] 勾阳阳, 女, 硕士研究生, 研究方向: 内分泌疾病的中医辨证规律及其防治研究。

[通信作者] * 陈 聪, 女, 副教授, 硕士研究生导师, E-mail: 781972863@qq.com; 喻 嵘, 女, 教授, 博士研究生导师, E-mail: yurong8072@qq.com。

were those of NLRP-3, Caspase-1 and IL-1 β in hepatocyte supernatant ($P<0.05$ or $P<0.01$). The protein expression levels of CK8 and CK18 in hepatocytes were significantly up-regulated ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** The establishment of an in vitro model of T2DM complicated with NAFLD induced by HG and OA is consistent with the pathogenesis of "liver-collaterals impaired by toxin".

[**Keywords**] type 2 diabetes mellitus; nonalcoholic fatty liver disease; hepatocytes; CK8; CK18; NLRP3

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是2型糖尿病(type 2 diabetes, T2DM)的常见并发症之一,二者相互影响,呈恶性促进^[1-3]。高糖、高脂的过度摄入,使人体的碳水化合物、脂质等物质发生代谢紊乱,是导致T2DM合并NAFLD发病的主要原因。中医学认为“毒损肝络”病机在T2DM合并NAFLD发展过程中贯穿始终。前期研究也发现,T2DM合并NAFLD的中医病机为气阴两虚、痰瘀互结、毒损肝络^[1-2]。现代医家普遍认为,“毒邪”泛指所有较甚的致病邪气,其中包括六淫之邪较盛或较久的外毒、体内代谢产物蓄积蕴结而生的内毒^[4-5]。“肝络”是中医络病理论运用于内伤杂病辨治的体现,“毒损肝络”是指毒邪久伤肝络,引起肝脏出现痰凝津滞、气血瘀滞,以致气机升降失调,营卫不和,肝络失养的病变过程。在T2DM合并NAFLD的发病中,“肥甘之味”被认为是损伤“肝络”的主要因素^[6-8]。根据病机,采用滋阴益气、活血解毒法治疗,发现可有效改善糖尿病MKR鼠的血糖、血脂、肝功能^[1-2]。本课题组通过建立T2DM合并NAFLD的体外肝细胞损伤模型,改变肝细胞培养的微环境,模拟机体高糖、高脂环境下,肝细胞之间营养物质和代谢产物交换的过程,使其形成“毒损肝络”的状态,进一步探讨肝细胞损伤的机制,以期为中医药的治疗提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞

正常大鼠肝细胞系,购于上海中乔新舟生物科技有限公司(NO.ZQ0078),培养基:10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、90% DMEM培养基培养(1 mL抗生素,含100 U/mL青霉素及100 μ g/mL链霉素);培养箱环境:5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C。培养液2~3 d更换1次,显微镜下观察细胞生长密度达85%~95%传代。实验场地由贵州中医药大学基础医学院教学实验中心提供。

1.2 主要试剂

DMEM高糖培养基(美国Hyclone公司,批号319005121)、胎牛血清(浙江天杭生物科技有限公司,批号18050302)。

1.3 主要仪器

CO₂培养箱(赛默飞世尔科技,thermo scientific midi40);超净工作台(苏州智净,SW-CJ-2G型)。

2 方法

2.1 肝细胞形态学观察

制备密度为 1×10^5 /mL的细胞悬液,在6孔板孔中,每孔加入1 mL细胞悬液,放入37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱。培养24 h后取出培养板,弃培养液,加入4%多聚甲醛固定约30 min,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗3次。加入苏木素染色液染核,1 min后弃染色液PBS洗5次,于倒置光学显微镜下观察。

2.2 肝细胞鉴定

调细胞密度为 1×10^5 /mL的细胞悬液,6孔板(放入爬片)加入1 mL细胞悬液,放入37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱。培养24 h后取出培养板,弃原培养液,PBS洗2次,加入4%多聚甲醛固定约30 min,PBS洗3次,每次5 min。滴加100 μ L 1% Triton至爬片孵育2 min,PBS洗3次,每次5 min;加入100 μ L 5%牛血清白蛋白,室温孵育30 min。弃牛血清白蛋白,加入CK18一抗(1:100用PBS稀释),放置4 $^{\circ}$ C过夜。加入PBS洗3次,每次5 min。避光加入配置好的荧光二抗工作液,37 $^{\circ}$ C孵育40 min,PBS洗3次,每次5 min。滴加100 μ L 4',6-二脒基-2-苯基吲哚工作液复染细胞核,室温孵育4 min,PBS洗3次,每次5 min。滴加一滴防淬灭荧光封片剂封片。激光共聚焦荧光显微镜下观察、拍片。

2.3 肝细胞损伤模型建立

调 5×10^4 /mL的细胞悬液,接种于96孔板,每孔100 μ L,放入37 $^{\circ}$ C、5% CO₂细胞培养箱中培养24 h。用不含FBS的DMEM基础培养液撤血清培养6 h后进行分组,正常组通过完全培养基培养,高糖(high glucose, HG)组通过在完全培养基基础上加入葡萄糖注射液,调D-葡萄糖终浓度为30、50、100、150、200 mmol/L;油酸(oleic acid, OA)组通过在完全培养基基础上加入油酸溶液,终浓度为0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mmol/L;再通过HG 5个浓度组与OA 5个浓度组排列组合,分设25个联合刺激组。每个浓度设6个复孔、5

个干预时间点,每组均设调零孔加入培养基及干预药物,不加细胞。在培养 12、24、36、48、60 h,分别取出培养板,每孔避光条件下加入 CCK8 液 10 μ L,放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱继续避光孵育 2 h,酶标仪 450 nm 波长测各孔的 OD 值,重复实验 3 次,取均值。计算抑制率:抑制率=[(正常组 OD 值-调零孔)-(实验组 OD 值-调零孔)]/(正常组 OD 值-调零孔)。

2.4 油红 O 染色法

调细胞密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的细胞悬液,接种于 6 孔板,每孔 1 mL,培养 24 h 后取出培养板,撤血清同步化处理 6 h,弃培养液,PBS 洗涤 2 次,分为:正常组、HG 组(100 mmol/L D-葡萄糖)、OA 组(0.2 mmol/L OA)、HG+OA 组(100 mmol/L D-葡萄糖+0.2 mmol/L OA),每孔分别加入 1 mL 对应造模浓度的培养基,放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱培养 24 h。取出培养板,弃培养基,PBS 洗涤 2 次,加入细胞样品固定液 25 min,弃固定液,PBS 洗 3 次。加入油红 O 染色液,密闭染色 15 min,弃染色液,PBS 洗 5 次。加入 Mayer 苏木素染色液复染核 1 min,弃染色液,PBS 洗 5 次。加入 oro buffer 1 min,弃去后晾干。于倒置光学显微镜下观察、拍片。

2.5 生化指标测定

分组及干预同“2.4”。每孔分别加入 1 mL 对应造模浓度的培养基,放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱培养 24 h。取出培养板,收集培养液离心(3000 r/min, 20 min)。收集细胞,加入 PBS 分别调整每组细胞密度为 $1.5 \times 10^6/\text{mL}$,超声粉碎细胞,离心(3000 r/min, 20 min)收集上清。在全自动生化分析仪上设置相应参数,分别检测细胞上清液中谷丙转氨酶(alanine transaminase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)含量;细胞沉淀裂解后上清液中甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)含量。

2.6 肝细胞 CK8、CK18 蛋白检测

分组及干预同“2.4”。每孔分别加入 1 mL 对应造模浓度的培养基,放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱培养 24 h。收集细胞后提总蛋白,蛋白定量,加入上样缓冲液后变性。取 10 μ g 蛋白,SDS-PAGE 凝胶电泳后转膜,采用 5% 脱脂牛奶,封闭 1 h;去封闭液后,稀释一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗 3 次,5 min/次。稀释二抗(按照说明书),用二抗稀释液室温孵育膜 1 h,用 TBST 洗 3 次,5 min/次。采用增强化学发光液(enhanced chemiluminescence, ECL)化学法显影,在全自动化学发光分析仪中拍照,读取数据,采用

β -actin 作为内参校正。

2.7 肝细胞培养上清中炎症因子含量测定

分组及干预同“2.4”。每孔分别加入 1 mL 对应造模浓度的培养基,放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱培养 24 h。收集上清液,离心(3000 r/min, 5 min)后取上清,避光条件下取出试剂盒中酶标板,按照酶联免疫试剂盒说明书检测肝细胞上清液中炎症因子含量。重复实验 3 次,取均值,根据每个指标标准品浓度绘制标准曲线,依据样本 OD 值及稀释倍数,对照标准曲线,计算每孔样本的实际浓度。

2.8 统计学处理

采用 SPSS 26.0 统计软件,数据满足正态性和方差齐性检验,采用单因素方差分析(One-way ANOVA),结果以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 肝细胞的鉴定

细胞形态:生长状态良好的肝细胞直径约 20 μm ,为多边形,细胞核大而圆,位于细胞正中,部分细胞可以见到双核;分化较好的细胞体伸出明显的树枝样突起连接相邻细胞,生长到融合状态时,呈铺路石样外观。免疫荧光染色:细胞核呈蓝色荧光,CK18 蛋白阳性表达呈红色荧光。详见图 1。

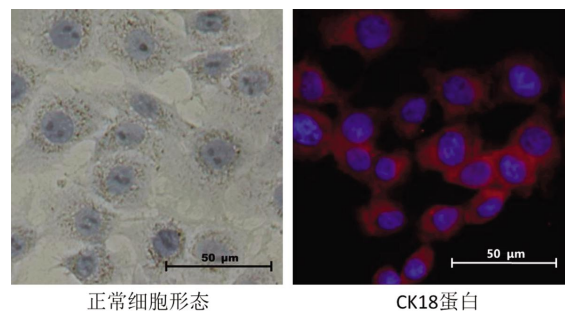


图 1 肝细胞形态及 CK18 蛋白表达(免疫荧光, $\times 400$)

3.2 各组肝细胞增殖抑制率的比较

与正常组相比,当 D-葡萄糖终浓度为 150 mmol/L 时,肝细胞增殖开始出现抑制($P < 0.01$);当 D-葡萄糖终浓度为 200 mmol/L 时,各时间点肝细胞增殖受到显著抑制($P < 0.01$)。0.1 mmol/L OA 刺激肝细胞 36、48、60 h 与 0.2 mmol/L OA 刺激肝细胞 24、36、48、60 h 同 0.3、0.4、0.5 mmol/L 各时间点刺激肝细胞 OD 值与正常组对比明显下降($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),且肝细胞增殖抑制率随 OA 浓度增加及刺激时间延长呈上升趋势。肝细胞经 HG 联合 OA 刺激,30 mmol/L HG+0.1 mmol/L OA 刺激 12 h,50 mmol/L HG+0.1 mmol/L OA 刺激 12 h、24 h、36 h,50 mmol/L HG+0.2 mmol/L

OA 刺激 12 h 均未出现抑制作用,其余各组联合浓度刺激均表现出明显抑制作用($P<0.01$),经 100 mmol/L

HG 联合 0.2 mmol/L OA 刺激肝细胞 24 h 后,细胞增殖抑制率接近半数抑制浓度。见表 1~3。

表 1 不同浓度 HG 对细胞增殖 OD 值的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

分组	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h
正常组	0.81±0.01	1.07±0.05	1.19±0.01	1.34±0.03	1.56±0.03
30 mmol/L HG 组	0.92±0.03**	1.49±0.02**	1.92±0.02**	1.74±0.04**	2.44±0.04**
50 mmol/L HG 组	1.03±0.06**	1.64±0.05**	1.96±0.05**	2.02±0.06**	2.48±0.02**
100 mmol/L HG 组	0.99±0.08**	1.43±0.03**	2.19±0.03**	2.23±0.01**	2.77±0.02**
150 mmol/L HG 组	0.77±0.02**	0.87±0.03**	0.95±0.02**	1.05±0.04**	1.25±0.02**
200 mmol/L HG 组	0.31±0.01**	0.24±0.01**	0.40±0.02**	0.22±0.02**	0.61±0.02**

注:与正常组比较,** $P<0.01$ 。

表 2 不同浓度 OA 对细胞增殖 OD 值的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

分组	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h
正常组	0.81±0.01	1.07±0.05	1.19±0.01	1.34±0.03	1.56±0.03
0.1 mmol/L OA 组	1.04±0.06**	1.08±0.03	1.14±0.02*	1.17±0.07**	1.32±0.07**
0.2 mmol/L OA 组	1.05±0.05**	1.00±0.06**	1.02±0.05**	1.05±0.03**	1.22±0.01**
0.3 mmol/L OA 组	0.62±0.02**	0.36±0.03**	0.35±0.03**	0.18±0.001**	0.25±0.04**
0.4 mmol/L OA 组	0.42±0.02**	0.32±0.02**	0.21±0.04**	0.17±0.004**	0.18±0.02**
0.5 mmol/L OA 组	0.22±0.02**	0.21±0.01**	0.20±0.02**	0.19±0.01**	0.2±0.01**

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

表 3 HG 联合 OA 对肝细胞增殖抑制率的影响($n=6$)

组别	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h
正常组	-	-	-	-	-
HG 30 mmol/L+OA 0.1 mmol/L 组	-	5.13%	36.31%	51.38%	19.41%
HG 30 mmol/L+OA 0.2 mmol/L 组	29.67%	72.23%	80.37%	86.60%	88.92%
HG 30 mmol/L+OA 0.3 mmol/L 组	34.61%	67.38%	80.88%	87.34%	88.98%
HG 30 mmol/L+OA 0.4 mmol/L 组	71.94%	74.37%	80.29%	86.37%	88.34%
HG 30 mmol/L+OA 0.5 mmol/L 组	76.39%	64.68%	80.12%	86.52%	88.85%
HG 50 mmol/L+OA 0.1 mmol/L 组	-	-	-	28.89%	2.95%
HG 50 mmol/L+OA 0.2 mmol/L 组	-	11.84%	11.46%	37.90%	22.61%
HG 50 mmol/L+OA 0.3 mmol/L 组	41.90%	70.74%	78.18%	87.04%	88.73%
HG 50 mmol/L+OA 0.4 mmol/L 组	45.12%	69.15%	78.77%	86.60%	88.15%
HG 50 mmol/L+OA 0.5 mmol/L 组	77.01%	70.92%	79.87%	84.59%	88.47%
HG 100 mmol/L+OA 0.1 mmol/L 组	16.81%	45.01%	66.64%	58.75%	69.76%
HG 100 mmol/L+OA 0.2 mmol/L 组	30.53%	49.21%	72.37%	78.33%	83.47%
HG 100 mmol/L+OA 0.3 mmol/L 组	64.03%	73.72%	77.00%	82.73%	86.48%
HG 100 mmol/L+OA 0.4 mmol/L 组	65.88%	72.79%	77.00%	83.40%	86.61%
HG 100 mmol/L+OA 0.5 mmol/L 组	72.31%	73.72%	77.34%	82.28%	86.61%
HG 150 mmol/L+OA 0.1 mmol/L 组	55.75%	71.02%	71.86%	73.86%	77.51%
HG 150 mmol/L+OA 0.2 mmol/L 组	67.49%	73.07%	76.75%	82.06%	85.59%
HG 150 mmol/L+OA 0.3 mmol/L 组	67.74%	72.97%	76.41%	81.53%	85.78%
HG 150 mmol/L+OA 0.4 mmol/L 组	67.37%	71.85%	74.64%	82.13%	84.95%
HG 150 mmol/L+OA 0.5 mmol/L 组	65.88%	71.11%	73.72%	83.62%	85.46%
HG 200 mmol/L+OA 0.1 mmol/L 组	57.48%	70.64%	75.15%	82.43%	86.29%
HG 200 mmol/L+OA 0.2 mmol/L 组	67.00%	70.08%	73.63%	80.57%	84.69%
HG 200 mmol/L+OA 0.3 mmol/L 组	67.24%	71.02%	74.47%	80.64%	84.75%
HG 200 mmol/L+OA 0.4 mmol/L 组	64.28%	72.60%	77.00%	83.40%	86.35%
HG 200 mmol/L+OA 0.5 mmol/L 组	67.74%	70.27%	74.98%	81.61%	85.27%

3.3 各组肝细胞内脂滴的比较

与正常组相比,油红 O 染色显示,肝细胞经 100 mmol/L HG 组刺激 24 h 后,细胞质内开始出现少量脂滴;经 0.2 mmol/L OA 组刺激 24 h 后,细胞内脂滴明显多于正常组和 HG 组;经 100 mmol/L HG 联合 0.2 mmol/L OA 刺激 24 h 后,HG+OA 组细胞内脂滴出现大量蓄积,均多于正常组、HG 组及 OA 组。详见图 2。

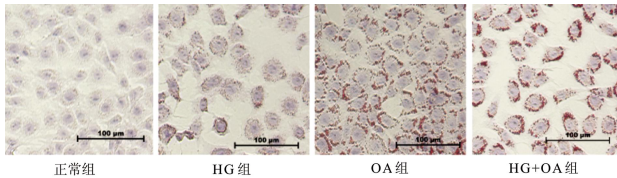


图 2 肝细胞脂肪变性(油红 O 染色,×400)

3.4 各组肝细胞 ALT、AST、TG、TC 含量的比较

与正常组相比,HG 组、OA 组及 HG+OA 组 ALT、AST、TG、TC 指标均升高($P<0.01$ 及 $P<0.05$)。与 HG 组、OA 组比较,HG+OA 组 ALT、AST、TC 指标均显著高于 HG 组($P<0.01$ 及 $P<0.05$)。详见表 4。

表 4 各组肝细胞生化指标($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	ALT/(U/L)	AST/(U/L)	TG/(mmol/L)	TC/(mmol/L)
正常组	25.11±0.92	22.24±1.46	0.39±0.02	0.59±0.04
HG 组	29.42±2.64*	29.28±1.24**	0.44±0.01**	0.75±0.08**
OA 组	34.97±0.62**	30.04±1.57**	0.43±0.03*	0.70±0.05*
HG+OA 组	41.54±1.50**▲▲▲	38.18±1.53**▲▲▲	0.48±0.01**△	0.86±0.02**▲▲▲

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 HG 组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$;与 OA 组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$ 。

3.5 各组肝细胞内 CK8、CK18 蛋白的比较

与正常组相比,HG 组、OA 组及 HG+OA 组细胞内 CK8、CK18 蛋白表达均增加($P<0.01$);与 HG 组比较,HG+OA 组细胞内 CK8、CK18 蛋白表达均显著高于 HG 组($P<0.01$);与 OA 组比较,HG+OA 组细胞内 CK8、CK18 蛋白表达均显著高于 OA 组($P<0.01$ 及 $P<0.05$)。详见表 5、图 3。

表 5 各组肝细胞内 CK8、CK18 蛋白相对表达量($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	CK8/ β -Actin	CK18/ β -Actin
正常组	0.06±0.04	0.06±0.02
HG 组	0.53±0.08**	0.09±0.01
OA 组	0.70±0.04**	0.13±0.03**
HG+OA 组	0.80±0.03**▲▲▲	0.20±0.01**▲▲▲

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与 HG 组比较,▲▲ $P<0.01$;与 OA 组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$ 。

3.6 各组肝细胞上清中 NLRP-3、Caspase-1、IL-1 β 含量的比较

与正常组相比,HG 组和 HG+OA 组细胞培养上

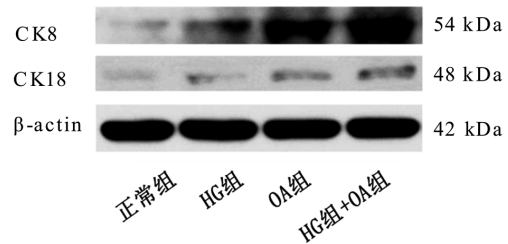


图 3 各组肝细胞内 CK8、CK18 蛋白相对表达量

清中炎症因子 NLRP-3、Caspase-1、IL-1 β 含量均增加($P<0.01$ 及 $P<0.05$)。与 HG 组比较,HG+OA 组细胞培养上清中炎症因子 NLRP-3、Caspase-1、IL-1 β 含量均显著升高($P<0.01$)。与 OA 组比较,HG+OA 组细胞培养上清中炎症因子 NLRP-3、Caspase-1、IL-1 β 含量均显著升高($P<0.01$)。详见表 6。

表 6 各模型组肝细胞培养上清 NLRP-3、Caspase-1、IL-1 β 含量($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	NLRP-3/(ng/mL)	Caspase-1/(pmol/L)	IL-1 β /(pg/mL)
正常组	18.42±0.91	29.83±0.23	36.10±0.33
HG 组	19.78±0.26*	34.59±0.42**	39.77±1.37**
OA 组	19.40±0.13	35.82±0.84**	41.87±0.07**
HG+OA 组	21.65±0.52**▲▲▲	41.02±1.75**▲▲▲	47.86±0.56**▲▲▲

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 HG 组比较,▲▲ $P<0.01$;与 OA 组比较,△△ $P<0.01$ 。

4 讨论

《非酒精性脂肪性肝病防治指南(2018 更新版)》中指出,NAFLD 的诊断除病理学影像学发现肝组织脂肪变性外,肝脏生物化学指标异常是主要诊断依据,其中包括血清氨基酸转移酶和(或)TG 的持续增高。该指南中还指出,当 NAFLD 合并 T2DM 时,血清氨基酸转移酶和(或)CK-18 的持续增高的患者是诊断 NASH 的高危人群^[9]。本实验通过油红 O 染色及细胞生化检测发现,HG 联合 OA 诱导的肝细胞脂滴蓄积以及 TG、TC 指标均显著高于正常培养的肝细胞,同时 HG 联合 OA 诱导肝细胞后,细胞培养上清中的 ALT、AST 含量显著高于正常组。提示肝细胞出现脂肪变性,肝细胞功能受损。通过检测细胞培养上清中的 NLRP-3、Caspase-1、IL-1 β 炎症因子含量,发现 HG 联合 OA 诱导肝细胞后,细胞培养上清中的相关炎症因子含量显著高于正常组,提示诱导后的细胞中 NLRP-3 相关炎症信号通路被过度激活,肝细胞内产生炎症反应。有研究发现 CK8 以及 CK18 的异常,与癌症及肝脏的损伤程度呈正相关^[10-11]。通过检测肝细胞内的 CK8、CK18 蛋白的表达发现,HG 联合 OA 组的 CK8、CK18 蛋白表达较正常组均

显著升高,进一步说明 HG 联合 OA 可诱导肝细胞发生损伤。相比单纯 HG 或 OA 刺激,HG 联合 OA 诱导肝细胞损伤更显著,提示 T2DM 合并 NAFLD 体外细胞损伤模型成功建立。

研究认为肝脏中的微循环是“肝络”的基本构成^[12]。南征教授团队通过实验发现,“毒损肝络”的现代病理机制是肝内炎症反应^[13]。通过文献研究发现,“毒损肝络”病机在 T2DM 合并 NAFLD 发展过程贯穿始终,其中的“毒”既是病理产物,又是致病因素,这与细胞炎症因子的作用轨迹具有相似性^[14-16]。“毒”在机体代谢中均存在恶性循环。清代医家叶天士言:“经主气,络主血”,“初为气结在经,久则血伤入络”(《临证指南医案》),体现了邪毒致病从无形到有形的过程^[17-19]。基于吴以岭教授团队近年来总结前人经验提出的“络脉—微血管”论^[20],结合肝脏微循环的生理功能,本实验在建立 T2DM 合并 NAFLD 的体外细胞损伤模型时,通过改变肝细胞培养的微环境,模拟机体高糖、高脂环境下,肝脏微循环与肝细胞之间营养物质和代谢产物交换的过程,制备“毒损肝络”细胞损伤模型。当 100 mmol/L HG 联合 0.2 mmol/L OA 诱导肝细胞 24 h 培养条件下,肝细胞增殖出现半数抑制,肝功能出现明显改变,肝细胞脂肪变性、炎症反应和细胞损伤程度远高于 HG 组合 OA 组,提示高糖高脂环境改变肝脏微循环条件,相当于疾病久积“血伤入络”的状态。

中医学认为 T2DM 合并 NAFLD 的主要病因之一为过食“肥”“甘”,本实验基于中医理论及前期研究认识,运用 HG 联合 OA 模拟病因,制造“毒损肝络”的状态,再依据 T2DM 合并 NAFLD 病机演变,早期(脾气亏虚)、中期(湿热内蕴)、后期(肝肾阴虚、痰瘀互结),发现本实验模型组肝细胞内脂质大量蓄积,肝细胞功能受损,出现了形质和功能的同时改变。此时的肝细胞更接近于 T2DM 合并 NAFLD 中后期的改变,细胞内产生有形实邪的蓄积和相互搏结。同时,肝细胞内炎症因子 NLRP-3、Caspase-1、IL-1 β 含量均升高,提示“毒损肝络”状态下存在肝内炎症的发生,且其发生的物质基础可能与 NLRP-3 炎性小体及其下游炎性分子的过度活化有关。因此,针对脾气亏虚、湿热内蕴、肝肾阴虚、痰瘀互结导致“毒损肝络”病机,可采用滋阴益气活血解毒法,使得肝细胞内外炎性微环境得到改善,则肝络疏达;肝细胞功能得到改善,则肝体得养;同时肝细胞内脂质蓄积含量明显减少,则肝积得化;从而从根本上达到改善肝细胞损伤的目的。

参考文献

- [1] 陈 聪,陈家旭,喻 嵘,等.左归降糖清脂方对 2 型糖尿病合并非酒精性脂肪性肝病 MKR 鼠肝组织 PI3K 信号通路的影响[J].中华中医药杂志,2021,36(1):106-111.
- [2] 陈 聪,陈家旭,喻 嵘,等.左归降糖益肾方对糖尿病肾病 MKR 鼠肾组织 VDR、CYP27B1 表达的影响[J].中华中医药杂志,2019,34(12):5665-5669.
- [3] 谭 艳,周 聪,黄 柔,等.茵陈蒿汤对 MKR 鼠 2 型糖尿病合并非酒精性脂肪性肝病的作用[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(21):105-113.
- [4] 尹思思.基于毒邪理论以化斑解毒汤治疗风毒证带状疱疹患者临床疗效观察[D].成都:成都中医药大学,2021:1-81.
- [5] 张辛欣,焦华琛,李运伦.毒邪实质刍议[J].陕西中医,2019,40(4):511-514.
- [6] 朱思宇.基于数据挖掘技术探究朴春丽教授治疗 2 型糖尿病的临床经验[D].长春:长春中医药大学,2021:1-51.
- [7] 徐慧琛,唐 程,朴春丽.朴春丽从肝论治消渴病[J].吉林中医药,2022,42(2):162-165.
- [8] 张若宣,吕文良,曹正民,等.姚乃礼以“肝络”理论辨治慢性乙型病毒性肝炎肝纤维化[J].中医学报,2020,35(2):304-307.
- [9] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组,中国医师协会脂肪性肝病专家委员会.非酒精性脂肪性肝病防治指南(2018 更新版)[J].中华肝脏病杂志,2018,26(3):195-203.
- [10] 韦拔雄,彭 婧,陈月禄,等.乳腺导管增生性病变中 CK5/6、P63、CK8/18、SMA、ER 的表达意义[J].当代医学,2020,26(34):106-108.
- [11] 刘京京,王会丰,刘家铭,等.ET、CK-18 M30 在大鼠非酒精性脂肪性肝炎组织中的表达及意义[J].延安大学学报(医学科学版),2019,17(2):11-16.
- [12] 徐慧琛,唐 程,朴春丽.朴春丽从肝论治消渴病[J].吉林中医药,2022,42(2):162-165.
- [13] 于 森,朴春丽,南 征,等.2 型糖尿病胰岛素抵抗的肝内炎症发病机制与毒损肝络病机理论的相关性探讨[J].中国中西医结合杂志,2006,26(11):1132-1134.
- [14] 聂 广,张赤志,唐智敏,等.拓展王伯祥教授“肝络瘀阻”学说构建中医肝病分期辨证体系[J].中西医结合肝病杂志,2022,32(9):773-779+786.
- [15] 张 鹏.解毒通络调肝降压方治疗 2 型糖尿病合并高血压病的临床观察[D].长春:长春中医药大学,2021:1-47.
- [16] 霍少凯,熊 壮,李 斌,等.“毒损肝络”说在乙型肝炎肝硬化治疗中的意义[J].临床医药文献电子杂志,2018,5(A3):28+30.
- [17] 刘向荣.基于 IRE1 α /JNK 通路研究解毒通络调肝方对内质网应激的影响[D].长春:长春中医药大学:1-94.
- [18] 刘扬扬,朴春丽,熊 壮.基于 JNK 传导通路探析解毒通络调肝方调控内质网应激治疗 2 型糖尿病的实验研究[J].北京中医药,2016,35(6):567-569,576.
- [19] 季巍巍,车念聪,法振鹏.非酒精性脂肪性肝炎的“攻毒扶正法”初探[J].北京中医药,2011,30(10):764-766.
- [20] 吴以岭.气络学说论:《气络论》序[J].疑难病杂志,2018,17(2):184-186.

(本文编辑 苏 维)