

# 地锦草提取物通过 miR-106-5p/TLR4 信号通路改善非酒精性脂肪性肝炎

刘明靓<sup>1,2</sup>, 陈叶梓<sup>1,2</sup>, 张磊<sup>1,2</sup>,  
刘朝奇<sup>1,2</sup>, 周永芹<sup>1,2</sup>, 袁成福<sup>1,2</sup>, 何毓敏<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>三峡大学医学院; <sup>2</sup>三峡大学肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室, 宜昌 443002

**摘要:** 研究地锦草 (*Euphorbia humifusa* Willd.) 提取物对高脂饲料联合葡聚糖硫酸钠 (dextran sodium sulfate, DSS) 诱导的非酒精性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH) 的改善作用及其干预的分子机制。将 SPF 级别 C57BL/6 小鼠雌雄对半随机分为正常对照组, NASH 模型组, 地锦草提取物低、高剂量组 ( $n = 10$ )。对照组给予正常饮水和食物。模型组和药物组在实验全程的 14 d 中均给予高脂饲料喂养, 在此期间药物组进行灌胃给药, 从第 8 d 开始给予持续饮用 2% DSS 水 7 d。实验结束后杀小鼠, 检测小鼠血清中甘油三酯 (TG), 谷丙转氨酶 (ALT) 含量; H&E 染色法观察小鼠肝组织病理学变化; 根据生物信息学及前期研究预测靶向调节 TLR4 的 miRNA; 采用 RT-qPCR 法检测小鼠肝组织中 miR-106-5p、Toll 样受体 4 (TLR4)、IL-6 及 TNF- $\alpha$  基因的相对表达情况; Western blot 法分析小鼠肝脏中 TLR4、IL-1 $\beta$  蛋白水平表达变化。与正常组相比, 模型组小鼠 TG、ALT 均有升高。H&E 染色结果显示肝脏出现明显脂肪变性和炎症反应。RT-qPCR 结果显示 TLR4 和炎症因子 (IL-6、TNF- $\alpha$ ) 表达明显升高, 而靶向调节 TLR4 的 miR-106-5p 表达降低 ( $P < 0.05$ )。Western blot 结果显示模型组肝脏中 TLR4、IL-1 $\beta$  蛋白表达水平升高 ( $P < 0.05$ )。经药物干预后, 小鼠 TG、ALT 均有所下降; 肝组织中 TLR4 和炎症因子 mRNA 相对表达水平下降, miR-106-5p 表达上升; TLR4、IL-1 $\beta$  蛋白表达水平下降 ( $P < 0.05$ )。地锦草提取物可有效改善高脂饲料联合 DSS 诱导的 NASH 的炎症情况及脂肪沉积, 其机制可能与调控 miR-106-5p/TLR4 信号通路有关。

**关键词:** 地锦草提取物; 非酒精性脂肪性肝炎; Toll 样受体 4; miR-106-5p

中图分类号: R285; R364.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022)12-2026-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.12.005

## *Euphorbia humifusa* extract ameliorates nonalcoholic steatohepatitis through regulating miR-106-5p/TLR4 pathway in mice

LIU Ming-jing<sup>1,2</sup>, CHEN Ye-zi<sup>1,2</sup>, ZHANG Lei<sup>1,2</sup>,  
LIU Chao-qi<sup>1,2</sup>, ZHOU Yong-qin<sup>1,2</sup>, YUAN Cheng-fu<sup>1,2</sup>, HE Yu-min<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Medical College, China Three Gorges University; <sup>2</sup>Hubei Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Immunotherapy, China Three Gorges University, Yichang 443002, China

**Abstract:** To explore the effect of *Euphorbia humifusa* Willd. on nonalcoholic steatohepatitis (NASH) induced by high fat diet and dextran sulfate sodium (DSS), and the molecular mechanism of its intervention. Male and female SPF grade C57BL/6 mice were randomly divided into a normal control group, a model group, and low and high dose groups of *E. humifusa*, 10 mice in each group. The normal control group was not given any intervention, while both the model and treatment groups were fed high fat diet throughout the 14 days of the experiment, during which time the *E. humifusa* were orally administered by gavage daily to the mice of treatment groups. Starting from the 8th day, the model and treatment groups were given 2% DSS water for 5-7 days. Mice were executed at the end of the experiment, the serum triglyceride (TG) and alanine aminotransferase (ALT) contents were detected for all the mice. The pathological changes of mouse liver tissue were observed by H&E staining. The

miRNA targeting to TLR4 was predicted based on bioinformatics and pre-experiments. The relative expressions of miR-106-5p, Toll-like receptor 4 (TLR4), IL-6 and TNF- $\alpha$  in the liver tissue of mice were detected by RT-qPCR. The expression levels of TLR4 and IL-1 $\beta$  proteins in the liver of mice were analyzed by Western blot. Compared with the normal group, the serum TG and ALT of the model group were increased. H&E staining results showed significant hepatocyte steatosis and inflammatory reaction in the model liver tissues. RT-qPCR results showed that the expressions of TLR4 and inflammatory factors (IL-6, and TNF- $\alpha$ ) were significantly increased, while miR-106-5p which targets the TLR4, was reduced in the liver tissues of model mouse ( $P < 0.05$ ). Western blot results further confirmed that the expression levels of TLR4 and IL-1 $\beta$  proteins were increased in the liver of the model group. After the intervention with *E. humifusa*, the serum TG and ALT were decreased ( $P < 0.05$ ), the relative mRNA expression levels of TLR4 and inflammatory factors (IL-6 and TNF- $\alpha$ ) in liver tissues were decreased, while the expression of miR-106-5p was increased compared with model group. Similarly, the expression levels of TLR4 and IL-1 $\beta$  proteins were decreased ( $P < 0.05$ ). The *E. humifusa* can effectively alleviate the inflammatory condition and fat deposition in NASH induced by high-fat diet combined with DSS, and its mechanism may be related to the regulation of the miR-106-5p/TLR4 signaling pathway.

**Key words:** *Euphorbia humifusa* extract; nonalcoholic steatohepatitis; Toll-like receptor 4; miR-106-5p

非酒精性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH) 是非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 发生发展的一个阶段的病理变化,其特征为肝脏脂质代谢紊乱介导的炎症、内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ER)、线粒体功能障碍和纤维化,被认为是临床病变发展的关键环节,与肝硬化及肝癌的发展密切相关<sup>[1]</sup>。在 NASH 进展中机体的“肠-肝轴”调节功能紊乱介导的炎症反应具有重要作用<sup>[2,3]</sup>。肠道屏障受损导致代谢性内毒素通过“肠-肝轴”转运至肝脏,引起肝脏炎症反应。其中,miRNA 在肝脏炎症反应的发生发展中发挥着重要调控作用<sup>[4]</sup>。非编码微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类不编码蛋白质的核苷酸序列,但可通过靶向目的基因 mRNA 的 3'UTR,抑制基因的表达。miRNA 几乎参与所有生理病理过程,miRNA 可以通过靶向炎症相关基因,如 miR-106 低表达而活化 MAPK 信号通路,介导妊娠期高血压小鼠肝脏氧化应激损伤和炎性浸润<sup>[5]</sup>。通过荧光素酶报告基因分析发现 miR-106a 对 Th17 转录因子 Ror 和活化 T 细胞 (Nfat) 核因子 5 的靶位特异性调节<sup>[6]</sup>。这些结果提示 miR-106 的低表达可介导相关的炎症因子表达产生炎症反应。

地锦草 (*Euphorbia humifusa* Willd.) 系大戟科大戟属植物。常用于治疗细菌性痢疾、肠胃炎、咳血、便血等病症。现代药理学证明,地锦草中含有多种有效成分,如多酚类、黄酮类、生物碱和三萜类化合物等具有抗炎<sup>[7]</sup>、抗氧化、降血脂、降血糖和降压、抑菌等多种作用<sup>[8-10]</sup>。因此本实验在动物水平使用短期高脂饮食 (high fat diet, HFD) 联合葡聚糖硫酸

钠盐 (dextran sulfate sodium, DSS) 喂养建立 NASH 小鼠动物模型 (HFD + DSS), DSS 是一种可对小鼠肠道屏障造成损伤,常用于诱导结肠炎动物模型<sup>[11]</sup>,在此模型上研究地锦草提取物干预 NASH 及其可能机制,为防治 NASH 提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

40 只 SPF 级 6 ~ 8 周龄健康的 C57BL/6 小鼠 (雌、雄小鼠各半,体重 18 ~ 20 g), 动物生产许可证号 ((SCXK) (鄂)2017-0012), 购自于三峡大学实验动物中心。在恒温 (20 ± 2) °C 以及湿度 (50 ± 2) % 的环境条件下喂养。所有动物实验已由动物伦理委员会的批准,审批号为 42010200005879。

### 1.2 药物及试剂

地锦草 (购买于湖北省宜昌市中医医院), 由天然产物研究与利用湖北省重点实验室 (三峡大学) 汪鋆植教授进行鉴定, 药材基源鉴定合格; 高脂饲料参照课题组前期方法制备<sup>[12]</sup>; 葡聚糖硫酸钠 (DSS) (上海翊圣生物科技公司, 货号: 60316ES76); 甘油三酯测定 (GPO-PAP 法) 试剂盒, 丙氨酸氨基转移酶测定试剂盒 (丙氨酸底物法) (中生北控生物科技股份有限公司); TLR4 抗体 (Santa Cruz 公司, 货号: SC-293072); IL-1 $\beta$  抗体 (Abcam 公司, 货号: ab9722);  $\beta$ -actin 抗体 (Cell Signaling 公司, 货号: 4970L); 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 引物 (生工生物工程股份有限公司); 高效 cDNA 链合成试剂盒 (南京 Vazyme 生物科技有限公司, 货号: R312-01); 通用型高灵敏度染料法定量 PCR 检测试剂盒 (南京 Vazyme 生物科技有限公司, 货号: Q311-02)。

### 1.3 主要仪器

电泳仪(美国 Bio-Rad 伯乐公司);实时荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems 公司);ChemiScope 化学发光凝胶成像显影设备(上海勤翔科学仪器有限公司);TS100 显微镜(日本 Nikon 尼康公司)。

### 1.4 实验方法

#### 1.4.1 地锦草提取物的制备

传统中草药一般用煎煮法,所以水提法通常采用热水浸出法,利用“相似相溶”的原理进行提取,能够比较完整地保留成分<sup>[10]</sup>。将总重量为 200 g 的地锦草进行粉碎,加入相当于药物 8 倍量的蒸馏水并浸泡 30 min,加热至沸腾,再继续煮 20 min,过滤;将获得的药渣按照上面方法再重复 2 次,提取滤液。然后将 3 次的滤液合并在一起进行浓缩,浓缩完后将其冻干成粉末状,最后获得 50.5 g 提取物。地锦草药物的提取率为 25.3%,每克提取物相当于 4.0 g 的生药量<sup>[13]</sup>。应用 HPLC 指纹图谱分析地锦草提取物,获得多个峰。根据文献<sup>[7]</sup>提示没食子酸具有抗炎及调节 miRNA 作用,且地锦草提取物中有丰富没食子酸,因此选取没食子酸作为参照品。通过标准品对照法对特征性峰进行指认,确定地锦草提取物含量最高的特征性成分为没食子酸。

#### 1.4.2 动物分组、造模及给药

SPF 级别 C57BL/6 小鼠雌雄对半随机分为 4 组,每组 10 只,分别为正常对照组(control, Con),利用 HFD 和 DSS 建立的小鼠 NASH 模型组(model, Mod),地锦草提取物低剂量给药组(EHW-L, 2.5 g/kg),地锦草提取物高剂量给药组(EHW-H, 7.5 g/kg)<sup>[14]</sup>。在总共为期 14 d 的试验周期内,对 NC 组喂食普通无添加饲料。模型组和药物组均给予高脂饲料 2 周。在该时期对正常对照组和模型组进行无

菌生理盐水灌胃,而有关药物组根据相应剂量进行地锦草提取液灌胃给药。从第 8 d 开始,模型组和药物组均将正常饮水换为浓度为 2% 的 DSS 饮水,持续饮用 DSS 水 7 d。

#### 1.4.3 小鼠血清生化标志物检测

留取小鼠眼球血,并分离出上清开展后续生化指标检测。使用相应的试剂盒检测血清中甘油三酯(triglyceride, TG)和谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)含量,根据反应产物的吸光度大小计算出目标底物的含量。

#### 1.4.4 小鼠肝脏组织 H&E 染色

新鲜肝脏组织用低温磷酸盐缓冲液冲洗干净,切取肝大叶中长度和厚度均适中的一部分放入包埋夹内,用 4% 多聚甲醛固定 24 h,后常规脱水处理,石蜡包埋,切成 5  $\mu\text{m}$  厚的切片。然后将切片进行苏木精伊红染色(hematoxylin-eosin staining),普通光学显微镜下观察肝组织形态情况。

#### 1.4.5 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应

取小鼠部分肝组织约 30 ~ 50 mg,利用 Trizol 试剂提取总 RNA。测量 RNA 样品的浓度和纯度。根据第一链合成 cDNA 合成试剂盒来合成其 cDNA 用于 RT-PCR 扩增。其中 miR-106-5p GGTGGTTCA-CAAAGCCCATACCAGTGCAGGTTCCGAGGT-为茎环引物,通过逆转录获取 cDNA, U6 作为内参,经 qPCR 反应扩增目的基因。相应的所有引物序列如表 1 所示。qPCR 反应条件为:两步法变性 95  $^{\circ}\text{C}$  20 s、退火 60  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 40 个循环。溶解曲线检测从 60  $^{\circ}\text{C}$  到 95  $^{\circ}\text{C}$ , 每 0.5  $^{\circ}\text{C}$  读取 1 次,若为单峰时说明引物特异性良好。利用软件 qPCRsoft (RealTime PCR Application)分析,计算  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  分析相关基因的表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列  
Table 1 Primer sequences

基因 Gene	引物序列 Primer sequence (5'→3')	基因库序号 GenBank
$\beta$ -actin	F: TGCTGTCCTGTATGCCTCT R: TTTGATGTCACGCACGATTT	NM_007393.5
TNF- $\alpha$	F: TCAACCTCCTCTCTGCCGTC R: GAGCAATGACTCCAAAGTAGACCT	NM_013693.3
IL-6	F: CAAAGCCAGATCCTTCAGAGAGA R: TTGGATGCTCTTGGTCTTACG	NM_001314054.1
TLR4	F: GAGGAAGAACAAGAAACGGCAAC	NM_021297.3

续表 1 (Continued Tab. 1)

基因 Gene	引物序列 Primer sequence (5'→3')	基因库序号 GenBank
miR-106-5p	R: TGGGCTCTCGGTCCATAGC	NR_029775.1
	F: GGTGGTTCACAAAGCCCATAC	
U6	R: CAGTGCAGGGTCCGAGGT	X06980.1
	F: CTCGCTTCGGCAGCAC	
	R: AACGCTTACGAATTTGCGT	

#### 1.4.6 Western blot

冷冻的肝脏组织在冰冷 RIPA 蛋白裂解液中均质化。4 °C 条件下静置 30 min, 12 000 r/10 min 后取上清液用于蛋白印迹分析。将提取的总蛋白经 BCA 试剂盒测定浓度, 每个蛋白样品上样量为 30 μg。加入 loading buffer, 100 °C 水浴 10 min 变性。等量的样品经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 采用湿法转膜法将蛋白条带转移至聚偏二氟乙烯 PVDF 膜上。使用丽春红染料检验蛋白是否转移至膜上。后续用 5% 脱脂牛奶于脱色摇床封闭 90 min, 4 °C 一抗孵育过夜、室温孵育二抗。试验期间每敷完抗体后需用 TBST 洗膜。最后在膜上均匀覆盖显影液, 进行化学发光成像观察蛋白条带。用 Image J 软件分析目的蛋白的相对表达含量。

#### 1.4.7 miRNA 预测

TargetScan (网址: [http://www.targetscan.org/vert\\_71/](http://www.targetscan.org/vert_71/)) 预测以 TLR4 为靶基因的 miRNA。哺乳动物中的 miRNA 通过结合转录本序列的 3' UTR 区, 从而发挥转录后调控作用。而 TargetScan 是一个专门分析哺乳动物 miRNA 靶基因的软件, 并且根据已有的分析结果整理成了数据库。本实验查找 TLR4 相关 miRNA, 然后与棕榈酸诱导肝细胞损伤细胞模

型的 miRNA 芯片数据进行交集, 获得靶向 TLR4 的 miR-106-5p。

#### 1.4.8 数据统计分析

所有实验数据均使用 SPSS 21.0 软件进行统计分析, 数据均用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 来表示; 同时用单因素方差分析比较多组间差异, 而两两比较用 LSD 检验进行验证, 当统计量  $P < 0.05$  时认为其差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 地锦草提取物改善 NASH 病理损伤

2.1.1 地锦草提取物显著改善 NASH 的脂质代谢  
通过给予小鼠葡聚糖硫酸钠 DSS-高脂饮食从而在短期内迅速建立 NASH 动物模型并收集小鼠血清, 采用肝功能生化试剂盒检测小鼠血清中谷丙转氨酶 (ALT) 与甘油三酯 (TG) 的含量变化。统计分析结果显示, 与正常对照组相比, 模型组血清中的 ALT 与 TG 含量均显著上升, 且差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。表明模型组小鼠肝脏功能具有一定的损害。然而药物组通过低剂量和高剂量地锦草提取物干预后, 与模型组比较, 给药组小鼠血清中的 TG 和 ALT 的含量均有所下降 ( $P < 0.05$ ) (见图 1)。

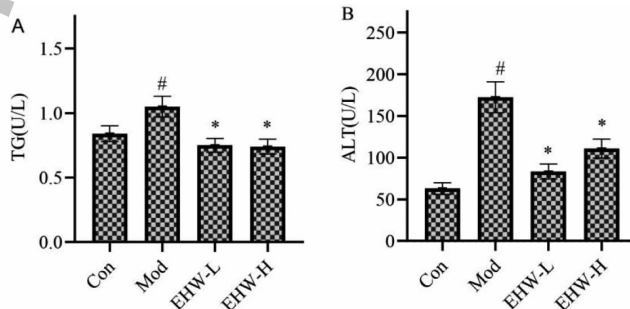


图 1 地锦草提取物对 HFD + DSS 致 NASH 脂质代谢的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 1 Effects of *E. humifusa* extract on lipid metabolism of HFD + DSS induced NASH ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

注: 与正常组比较,  $\#P < 0.05$ ; 与模型组比较,  $*P < 0.05$ , 下同。Note: Compared with Con,  $\#P < 0.05$ ; Compared with Mod,  $*P < 0.05$ , the same below.

### 2.1.2 地锦草提取物改善小鼠肝脏组织病理损伤

肝脏活检是检验非酒精性脂肪性肝炎的金标准,利用苏木精伊红染色检测 HFD 和 DSS 对小鼠肝脏组织形态的影响。H&E 染色结果显示正常对照组的肝切片中肝小叶结构完整,汇管区边界清晰,肝细胞呈放射状分布于中央静脉周围,肝窦清晰可见。图中黑色方框所指为脂质变性和炎性浸润。模型组小鼠肝细胞肿胀变大,肝索结构混乱无规则,出现脂肪空泡的数量多。此外还可以观察到炎性细胞聚集

成片并伴有明显的炎性浸润,肝小叶内伴有炎症细胞浸润(达到 NASH 诊断标准)。而在通过地锦草提取物处理后,镜下观察可见肝细胞形态逐渐清晰,排列更为紧密,脂肪空泡显著减少、气球样变和炎性细胞浸润严重程度下降。总之,药物组肝细胞与模型组相比形态有所恢复,脂肪变性和炎性程度也同样降低。并且在高剂量的药物组中肝索结构愈发清晰有序(见图 2)。提示地锦草提取物对小鼠肝组织脂质沉积和炎症反应有一定的改善作用。

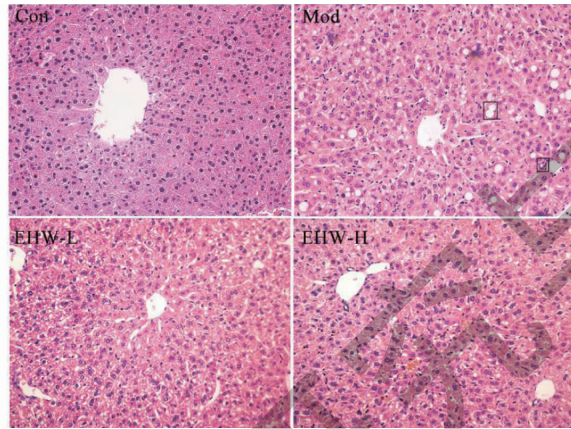


图 2 地锦草提取物对 HFD + DSS 致 NASH 的肝组织病理学的影响(H&E 染色,  $\times 400$ )

Fig. 2 Effects of *E. humifusa* on liver histopathology of HFD + DSS induced NASH (H&E staining,  $\times 400$ )

## 2.2 地锦草提取物调节 miR-106-5p/TLR4 信号通路的表达

### 2.2.1 小鼠肝组织中 miR-106-5p 和 TLR4 的表达情况

有文献报道称非酒精性脂肪性肝病与肝脏代谢的彻底重编程有关。表观遗传机制,特别是与 microRNA 表达和活性失调相关的机制,在与 NAFLD 相关的代谢紊乱及向着疾病更严重阶段的进展中起重要作用<sup>[15]</sup>。结合课题前期获取的棕榈酸处理的肝细胞 miRNA 芯片数据库。在本研究中为了探索 NASH 中靶向调节 TLR4 的 miRNA,使用生物信息学软件 Targetscan 预测。将前期芯片数据库同预测结果进行交集,筛选到在细胞模型中明显低表达的 miR-106-5p 确定为本文的研究对象。miR-106-5p 与 TLR4 的 3'-UTR 区结合如图 3A 所示。基于 TLR4 和 miR-106-5p 在肝炎中的作用,推测 TLR4 和 miR-106-5p 具有相关性。为了进一步验证该假设,随后通过检测小鼠肝组织中 miR-106-5p 及 TLR4 的表达情况。根据实时荧光定量 PCR 和蛋白印迹试验结果可看出,在高脂饮食和 DSS 双重诱导下小鼠

肝组织中 miR-106-5p 表达受到抑制,而 TLR4 mRNA 和蛋白的表达含量均增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )(见图 3B ~ 3D),这一现象提示在脂肪性肝炎发病发展中,肝组织内 miR-106-5p 和 TLR4 可能具有调控关系。进一步分析药物对 miR-106-5p 和 TLR4 的影响,结果发现与模型组比较,地锦草提取物低、高剂量组 miR-106-5p 的表达明显上升,而 miR-106-5p 靶向的基因 TLR4 无论是转录水平还是翻译水平的表达均明显下降(见图 3B ~ 3D),差异有统计学意义( $P < 0.05$ )(见图 3D)。根据以上在各个实验组中检测到的 TLR4 表达水平的变化趋势,提示地锦草提取物可能具有调节 miR-106-5p/TLR4 活性的作用。

### 2.2.2 小鼠肝脏组织中炎症因子的表达情况

IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  被认为是 NASH 进展的主要细胞因子。同时 TNF- $\alpha$  和 IL-6, IL-1 $\beta$  也是作为 TLR4 信号通路的下游。与正常对照组比较,模型组小鼠肝组织中 IL-6 和 TNF- $\alpha$  炎性因子的表达水平明显上升(见图 4A ~ 4C)。此外 Western blot 结果显示,模型组中 IL-1 $\beta$  蛋白表达水平增加( $P < 0.05$ )。但通过不同剂量的地锦草提取物进行治疗后,给药组中

炎症因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$  mRNA 表达水平显著下降, IL-1 $\beta$  蛋白表达水平也明显降低 ( $P < 0.05$ ) (见图 4A~4D)。以上结果提示了作为通路下游的炎症因

子 TNF- $\alpha$  和 IL-6、IL-1 $\beta$  与 miR-106-5p 可能在 NASH

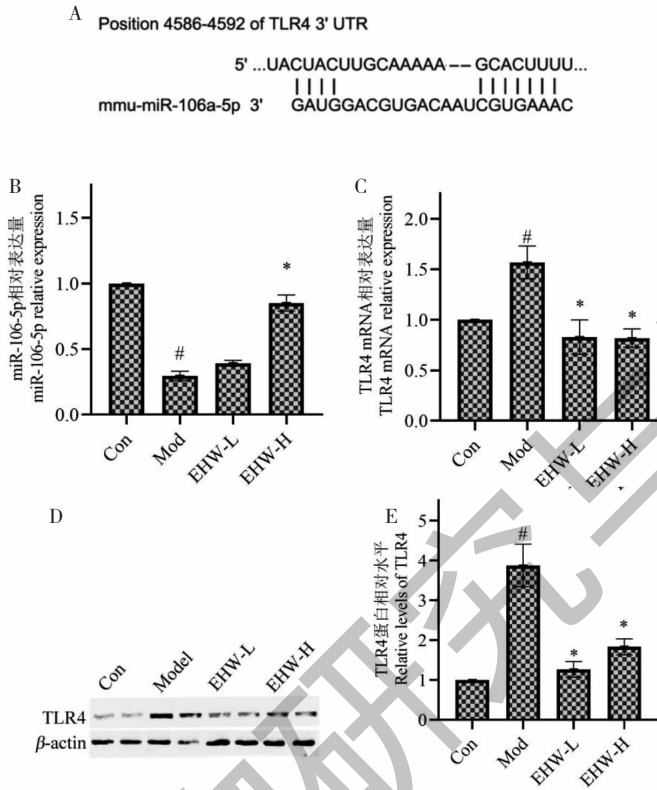


图 3 地锦草提取物调节 miR-106-5p/TLR4 表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 3 The extract of *E. humifusa* regulated the expression of miR-106-5p/TLR4 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

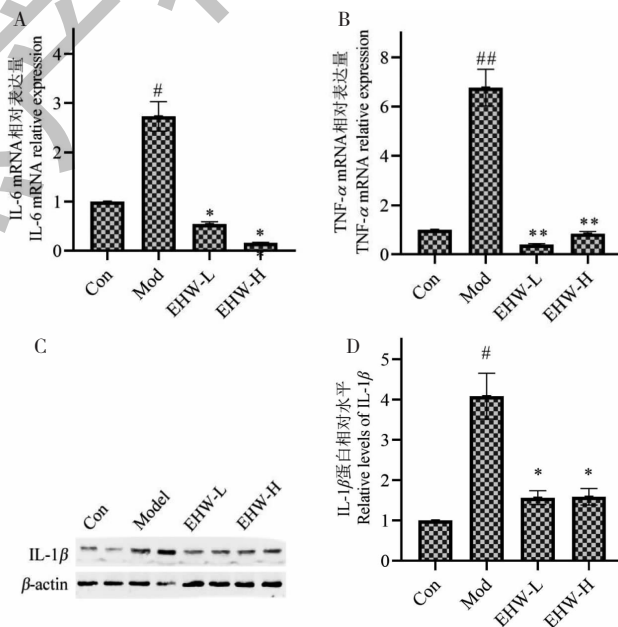


图 4 地锦草提取物调节 TLR4 信号通路 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 4 The extract of *E. humifusa* regulated TLR4 signaling pathway ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )



发生发展过程中有一定的作用,地锦草提取物可能通过调节 miR-106-5p/TLR4 信号通路改善 NASH。

### 3 讨论与结论

高脂饮食诱导的 NAFLD 动物模型被广泛应用,但单纯的饮食诱导需数月才能显示出明显的肝脏炎症表型,则较长的建模周期对药物筛选有诸多限制因素。在高脂饮食基础上加入葡聚糖硫酸钠(DSS)可通过肠道炎症会加剧高脂饮食诱导的 NASH 小鼠模型<sup>[16]</sup>。Kwon 等<sup>[17]</sup>发现接受 DSS 处理的小鼠表现出肠道屏障功能相关蛋白的表达降低和血浆 LPS 水平升高,表明在 DSS 诱导下的肠道屏障功能障碍。同时这些小鼠也表现出肝脏脂肪堆积和炎症表型,促进 NASH 的发生发展<sup>[18-20]</sup>。课题组前期实验<sup>[13]</sup>也发现应用 HFD 和 DSS 喂养小鼠,高脂饮食诱发的脂质沉积和葡聚糖硫酸钠导致的肠道屏障受损,可在短时间内发展为非酒精性脂肪性肝炎。总之,使用此方法可在短期内完全建立 NASH 体内模型,适合于有关药物的筛选工作及机制研究<sup>[21,22]</sup>。

有研究报道在急性肺损伤(ALI)小鼠模型中,LPS 刺激的巨噬细胞的肺组织中 miR-106a 的表达显著降低。miR-106a 可通过靶向 TLR4 表达来抑制 NF- $\kappa$ B 活化及其下游的炎症因子的产生<sup>[23]</sup>。高糖(25 mmol/L)可诱导人脐静脉内皮细胞(HUVECs)中 HMGB1 的表达增加及 miR-106 的表达降低,介导 HUVEC 凋亡和炎症因子的表达。总之,这些数据共同表明 miR-106 表达降低可活化炎症反应信号通路<sup>[24]</sup>。我们的研究结果也证明在 NASH 小鼠模型中,肝脏组织的 miR-106a 低表达以及 TLR4 高表达,从而介导 NASH 发生发展。给予地锦草提取物后,结果 ALT、TG 的水平降低;肝组织中 TNF- $\alpha$  的 mRNA 水平降低,病理损伤程度减轻。同时发现在模型组的肝组织 miR-106-5p 低表达,miR-106-5p 靶向的 TLR4 表达上调,继而观察到 TLR4 信号通路下游的 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 在肝组织中明显增高。药物干预后可导致 miR-106-5p 的表达升高,抑制 TLR4 信号通路。

综上所述,地锦草提取物可以改善高脂和葡聚糖硫酸钠饮食诱导的非酒精性脂肪性肝炎,其改善非酒精性脂肪性肝炎的作用机理可能是通过调节 miR-106-5p 的表达,来抑制靶向的 TLR4 信号通路所介导的炎症反应,从而改善炎症性肝损伤,为 NASH 治疗药物的开发提供实验依据。

### 参考文献

- 1 Sheka AC, Adeyi O, Thompson J, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: a review[J]. JAMA, 2020, 323: 1175-1183.
- 2 Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease[J]. Hepatology, 2005, 41: 1313-1321.
- 3 Gäbele E, Dostert K, Hofmann C, et al. DSS induced colitis increases portal LPS levels and enhances hepatic inflammation and fibrogenesis in experimental NASH[J]. J Hepatol, 2011, 55: 1391-1399.
- 4 Fang Z, Dou G, Wang L. MicroRNAs in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease[J]. Int J Biol Sci, 2021, 17: 1851-1863.
- 5 Wang Z, Bao X, Song L, et al. Role of miR-106-mediated mitogen-activated protein kinase signaling pathway in oxidative stress injury and inflammatory infiltration in the liver of the mouse with gestational hypertension [J]. J Cell Biochem, 2019. DOI:10.1002/jcb.29552.
- 6 Kästle M, Bartel S, Geillinger-Kästle K, et al. MicroRNA cluster 106a-363 is involved in T helper 17 cell differentiation[J]. Immunology, 2017, 152: 402-413.
- 7 Wang Yi. Mechanism of Qingchang Huashi method mediating MSCs regulating miR-21 in the treatment of ulcerative colitis [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine(南京中医药大学), 2019.
- 8 Zhang CQ. Studies on chemical constituents of *Euphorbia humifusa* [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology(华中科技大学), 2020.
- 9 Zhu Y. Research progress of *Euphorbia humifusa* [J]. Res Pract Chin Med(现代中药研究与实践), 2003, 17: 62-63.
- 10 Chang SQ. Extraction, isolation, *in vitro* fermentation of polysaccharides from *Euphorbia humifusa* and its protective effect on ulcerative colitis [D]. Guangzhou: Southern Medical University(南方医科大学), 2021.
- 11 Wu KN, Liang YN, Zhang DB, et al. Protective effects of cinnamaldehyde on DSS induced UC mice [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2021, 33: 1-7.
- 12 Li C, Xiong HR, Peng XM, et al. Protective effects of active components extracted from *Chaenomeles speciosa* on non-alcoholic fatty liver disease [J]. Mod Food Sci Technol(现代食品科技), 2018, 34: 28-34.
- 13 Wu NW. Intervention effect of *Euphorbia humifusa* on colitis-associated colon cancer and its possible mechanism [D]. Yichang: China Three Gorges University(三峡大学), 2021.
- 14 Zhou ZY, Xie B, Wang XM. Hypoglycemic effect of *Humifuse*

- euphorbia* herb extract in diabetic mice [J]. J Nanchang Univ:Med Sci(南昌大学学报:医学版),2014,54:5-7.
- 15 Gjorgjieva M, Sobolewski C, Dolicka D, et al. MiRNAs and NAFLD:from pathophysiology to therapy[J]. Gut,2019,68:2065-2079.
- 16 Cheng C, Tan J, Qian W, et al. Gut inflammation exacerbates hepatic injury in the high-fat diet induced NAFLD mouse: attention to the gut-vascular barrier dysfunction[J]. Life Sci, 2018,209:157-166.
- 17 Kwon J, Lee C, Heo S, et al. DSS-induced colitis is associated with adipose tissue dysfunction and disrupted hepatic lipid metabolism leading to hepatosteatosis and dyslipidemia in mice[J]. Sci Rep,2021,11:5283.
- 18 Ciesielska A, Matyjek M, Kwiatkowska K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling[J]. Cell Mol Life Sci,2021,78:1233-1261.
- 19 Płóciennikowska A, Hromada-Judycka A, Borzęcka K, et al. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling[J]. Cell Mol Life Sci,2015,72:557-581.
- 20 Shen C, Ma W, Ding L, et al. The TLR4-IRE1 $\alpha$  pathway activation contributes to palmitate-elicited lipotoxicity in hepatocytes[J]. J Cell Mol Med,2018,22:3572-3581.
- 21 Lau JK, Zhang X, Yu J. Animal models of non-alcoholic fatty liver disease:current perspectives and recent advances[J]. J Pathol,2017,241:36-44.
- 22 Eccleston HB, Andringa KK, Betancourt AM, et al. Chronic exposure to a high-fat diet induces hepatic steatosis, impairs nitric oxide bioavailability, and modifies the mitochondrial proteome in mice[J]. Antioxid Redox Signal,2011,15:447-459.
- 23 Yang J, Chen Y, Jiang K, et al. MicroRNA-106a provides negative feedback regulation in lipopolysaccharide-induced inflammation by targeting TLR4[J]. Int J Biol Sci,2019,15:2308-2319.
- 24 Liu R, Luo Q, You W, et al. MicroRNA-106 attenuates hyperglycemia-induced vascular endothelial cell dysfunction by targeting HMGB1[J]. Gene,2018,677:142-148.
- 
- (上接第 1998 页)
- 23 Wang X, Rogers KM, Li Y, et al. Untargeted and targeted discrimination of honey collected by *Apis cerana* and *Apis mellifera* based on volatiles using HS-GC-IMS and HS-SPME-GC-MS[J]. J Agric Food Chem,2019,67:12144-12152.
- 24 Liu YQ, Wang H, Huang JQ, et al. Application of GC-IMS in qualitative analysis of volatile compounds in green tea[J]. China Tea Process(中国茶叶加工),2020:55-59.
- 25 Li JJ, Xu YH, Chen MJ, et al. Analysis of changes in volatile components during processing of handmade Fuzhuan tea[J]. Food Sci(食品科学),2020,41:144-154.
- 26 Zhou Q, Dai YP, Guo W, et al. Analysis of volatile organic compounds(VOCs) fingerprint of raw and honey-fried licorice based on headspace-gas-chromatography ion-mobility spectrometry(HS-GC-IMS)[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志),2020,45:3857-3862.
- 27 Li J, Hua J, Dong C, et al. Real-time fingerprinting of the dynamics of green tea volatiles by ion mobility spectrometry for aroma assessment and discrimination[J]. LWT-Food Sci Technol,2020,131:109751.
- 28 Feng D, Wang J, He Y, et al. HS-GC-IMS detection of volatile organic compounds in Acacia honey powders under vacuum belt drying at different temperatures[J]. Food Sci Nutr, 2021,9:4085-4093.