



(21) 申请号 202310099104.1

A61K 35/618 (2015.01)

(22) 申请日 2023.02.11

A61K 35/24 (2015.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 115998831 A

(56) 对比文件

CN 1078905 A, 1993.12.01

CN 1113779 A, 1995.12.27

(43) 申请公布日 2023.04.25

CN 106729432 A, 2017.05.31

(73) 专利权人 甘肃中医药大学

地址 730000 甘肃省兰州市城关区定西路35号

胡燕等. 丹参及其复方治疗非酒精性脂肪性肝炎研究进展. 中医药信息. 2012, 第29卷(第4期), 162-165.

(72) 发明人 姚凝 王昕

邵金阶, 邵迎新. 芍药甘草汤治痛证举隅. 江西中医药. 1900, -(S1), 40-41.

(74) 专利代理机构 兰州嘉诺知识产权代理事务所(普通合伙) 62202

敬小华. 中西医结合治疗瘀胆型肝炎疗效观察. 四川中医. 2005, -(05), 55-56.

专利代理师 吴迪

审查员 张贵峰

(51) Int. Cl.

A61K 36/9066 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

权利要求书1页 说明书12页 附图14页

(54) 发明名称

一种用于治疗非酒精性脂肪性肝炎的中药组合物

(57) 摘要

本发明公开了一种用于治疗非酒精性脂肪性肝炎的中药组合物, 由黄连、法半夏、苍术、桃仁、麸炒薏苡仁、佛手、郁金、川芎等21味中药组成。本发明能够疏肝健脾, 化痰祛瘀、除湿化痰, 活血祛瘀、健脾解郁行气、利湿活血消痰、理气通经活络、柔肝健脾清热补益脾气。

1. 一种用于治疗非酒精性脂肪性肝炎的中药组合物,其特征在于,由下列重量份配比的原料制成:黄连20-30份、法半夏12-24份、苍术15-25份、桃仁18-30份、麸炒薏苡仁20-30份、佛手15-30份、郁金15-30份、川芎9-18份、茵陈18-30份、丹参20-30份、赤芍18-30份、莪术12-30份、瓦楞子12-30份、五灵脂10-24份、鸡血藤10-26份、红花10-18份、白芍15-30份、白扁豆15-30份、荷叶9-18份、大枣9-15份和生甘草9-12份。

2. 如权利要求1所述用于治疗非酒精性脂肪性肝炎的中药组合物,其特征在于,由下列重量份配比的原料制成:黄连24份、法半夏18份、苍术18份、桃仁24份、麸炒薏苡仁25份、佛手20份、郁金20份、川芎18份、茵陈25份、丹参27份、赤芍24份、莪术24份、瓦楞子30份、五灵脂18份、鸡血藤18份、红花12份、白芍30份、白扁豆24份、荷叶15份、大枣9份和生甘草9份。

3. 如权利要求1或2所述用于治疗非酒精性脂肪性肝炎的中药组合物,其特征在于:由其制成水煎剂、丸剂、茶剂、口服液、片剂、胶囊剂、颗粒剂、膏剂或散剂剂型。

一种用于治疗非酒精性脂肪性肝炎的中药组合物

技术领域

[0001] 本发明属于中药领域,具体涉及一种用于治疗非酒精性脂肪性肝炎的中药组合物。

背景技术

[0002] 2015年《中国非酒精性脂肪肝病诊疗指南》指出我国成人非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)患病率已达12.5-35.4%,其中非酒精性脂肪性肝炎(NASH)约占10-30%,是疾病进展过程中的关键阶段。如果不加以控制与阻抑NASH,任其不断进展,患者将历经轻度肝纤维化、中度肝纤维化,进而发展为重度肝纤维化及肝硬化。NASH患者10年内肝硬化发生率高达15-25%,是NAFLD主要的致死性原因之一。

[0003] NASH一旦疾病进展到肝硬化阶段,就意味着疾病发生与进展出现重大转折。肝硬化将以一种全新的模式继续自我恶化,即使去除NASH原发病因,也难以阻断肝硬化疾病进程,最终结局不良。至今全球公认唯一有效治疗肝硬化的方案仅仅为肝脏移植。受到肝源限制,绝大多数患者将面临严重致死性不良结局。

[0004] 对NAFLD整个病程发展阶段而言,NASH阶段是阻断疾病进展恶化的关键时刻,有助于提高患者生命质量,减轻社会、家庭及个人负担与痛苦。开发针对NASH治疗药物,通过保护肝脏并逆转肝脏损伤,积极阻断NASH相关肝纤维化发生,投入临床应用将具有积极的科学价值、社会价值、经济价值及现实性与紧迫性。

[0005] 现代医学中,全球至今无批准药物用于NASH治疗。

[0006] 考虑到NASH的发病机制,现阶段全球建议:早期鼓励患者进行体育锻炼,并以改善饮食结构,积极生活方式干预为主要措施;没有从运动及生活方式干预中获益的患者,或已经出现疾病进展的患者,只能需要通过专门针对肝脏炎症,纤维化的药物来治疗,但是至今尚无批准上市药物。

[0007] 现阶段全球有几种药物正处于后期开发阶段,分别为:①针对肝脏脂肪堆积:艾拉非布林;②针对氧化应激、炎症和细胞凋亡:细胞凋亡信号激酶1(ASK1)抑制剂;③针对肠道微生物组和代谢性内毒素血症:TLR4拮抗剂、索利霉素;④针对抗纤维化药物:头孢利罗、CVC。至今均尚无研究结果公布。

[0008] 中医药特点在于多层次、多靶点、多角度、整体性调节机体功能紊乱与病态,从而达到并维持机体健康状态。在中医理论指导下,各医家在临床上依据患者症状对其进行中医辨证分型论治,其中有以下几类:

[0009] (1)清热化湿类

[0010] 湿热内蕴证是NASH的常见中医证型,多因饮食不节,脾失健运,胃失和降而湿浊之邪积于中焦,盘桓日久,郁而化热。热邪掺杂、湿邪粗滞不化而成湿热蕴结之证,致使病情反复。采用清热化湿类中药,化湿而不助热,除热而不生湿,可达到湿热两清。郭一等运用葛根芩连汤干预高脂饮食NASH大鼠模型,结果发现模型组的NLRP3炎症小体表达升高,药物干预后NLRP3炎症小体的表达显著降低,表明葛根芩连汤对NLRP3炎症小体具有抑制作用。细胞

实验发现大黄素可抑制LPS诱导的NLRP3炎症小体信号通路的激活。

[0011] (2)化痰祛瘀类

[0012] 痰瘀互结证常因过食肥甘厚腻,致使脾气受损,运化不利而生湿,聚湿成痰,痰阻于络,血行不畅而瘀血由生。痰瘀互为因果而成痰瘀互结之证,致使病情反复。吴柳等用MCD饮食诱导小鼠NASH,发现NASH小鼠的NLRP6蛋白表达明显降低;下瘀血汤的干预可提高NLRP6的表达,并使肝功能明显改善,肝脏炎症明显减轻,表明下瘀血汤改善NASH的可能作用机制是下调NLRP6的表达。在半夏厚朴汤干预实验中,发现该方对血清IL-1 β 水平无明显影响,但可下调肝脏中NLRP3炎症小体的激活。

[0013] (3)补益肝肾类

[0014] 中医学认为肾阳是人体阳气的根本,肾阳亏虚,诸阳不足,精微运化输布不利,脂聚为浊,郁结于肝。研究发现高脂饮食诱导的NASH小鼠肝脏中NLRP3表达增加,肝细胞中有显著的脂质沉积,而用复方贞术调脂颗粒(FTZ)干预后不仅显著降低了NLRP3炎症小体的形成且减轻了肝脏脂肪变性及纤维化。同时在FTZ处理的细胞中,炎症小体形成和活化也显著减弱。

[0015] 传统医学精髓在于“上医治未病,中医治欲病,下医治已病”,针对NASH慢性病程之特点,更要求传统医学在治疗策略与方法上聚焦于病证之传变,而不是病证之现状。

[0016] 现有中医药治疗方案,从其治疗角度而言均有所欠缺,未能深入分析当前社会人们生活特征与疾病的内在相关性,未能针对NASH发病机制之本进行治疗,也未能针对疾病传变发展进行阻断,而更多是针对临床常见症候进行干预。“治病求本”,基于诱因、病因及传变特征等因素全面分析,“痰瘀互结”贯穿于NASH始终,是其病机之本。

发明内容

[0017] 本发明的目的是提供一种用于治疗非酒精性脂肪性肝炎的中药组合物。

[0018] 为了达到上述目的,本发明采用的技术方案为:

[0019] 一种用于治疗非酒精性脂肪性肝炎的中药组合物,由下列重量份配比的原料制成:黄连20-30份、法半夏12-24份、苍术15-25份、桃仁18-30份、麸炒薏苡仁20-30份、佛手15-30份、郁金15-30份、川芎9-18份、茵陈18-30份、丹参20-30份、赤芍18-30份、莪术12-30份、瓦楞子12-30份、五灵脂10-24份、鸡血藤10-26份、红花10-18份、白芍15-30份、白扁豆15-30份、荷叶9-18份、大枣9-15份和生甘草9-12份。

[0020] 作为优选方案,中药组合物由下列重量份配比的原料制成:黄连24份、法半夏18份、苍术18份、桃仁24份、麸炒薏苡仁25份、佛手20份、郁金20份、川芎18份、茵陈25份、丹参27份、赤芍24份、莪术24份、瓦楞子30份、五灵脂18份、鸡血藤18份、红花12份、白芍30份、白扁豆24份、荷叶15份、大枣9份和生甘草9份。

[0021] 作为优选方案,中药组合物可以制成水煎剂、丸剂、茶剂、口服液、片剂、胶囊剂、颗粒剂、膏剂或散剂剂型。

[0022] 本发明对于非酒精性脂肪性肝炎的病因病机分析和治疗原则:

[0023] 依据“病证结合、态靶结合”理论指导下的“态靶辨证”思想,NASH主要“态”是“痰”与“瘀”,而核心“靶”为非酒精性单纯性脂肪性肝病基础上的丙氨酸氨基转移酶(ALT)、影像学、肝脏活组织检查;在外表现为血清ALT升高,胃脘痞满,两胁作痛,口苦便溏等,影像学符

合弥漫性脂肪肝诊断,肝脏组织学表现符合脂肪性肝炎诊断,在内实质为肝脏的炎症损伤。

[0024] 根据“态靶辨证”理论,本方中针对“痰”态,以燥湿化痰为法,配伍“法半夏、苍术、黄连、麸炒薏苡仁、莪术、瓦楞子”;针对“瘀”态,以活血化瘀为法,配伍“桃仁、丹参、赤芍、鸡血藤、红花、川芎、郁金”;本方针对“胃脘痞满、两胁作痛”之“靶”,配伍“白芍、五灵脂、佛手”,针对“口苦便溏”之“靶”,配伍“茵陈、白扁豆、荷叶、大枣”,针对“ALT升高”之“靶”,配伍“生甘草”。

[0025] 本发明提供的用于治疗非酒精性脂肪性肝炎的组方原理和配伍规律:

[0026] 依据传统中医“辨证论治、性味归经”理论指导下的“君臣佐使”思想,本方以黄连,法半夏,苍术,桃仁,麸炒薏苡仁,佛手,郁金,川芎,茵陈,丹参,赤芍,莪术,瓦楞子,五灵脂,鸡血藤,红花,白芍,白扁豆、荷叶,大枣,生甘草为配伍,共奏“疏肝健脾,化痰祛瘀”之功。方中“法半夏,黄连,苍术,桃仁”为君剂,行“除湿化痰,活血祛瘀”之功;“麸炒薏苡仁,佛手,郁金,川芎”健脾解郁行气,“茵陈,丹参,赤芍,莪术,瓦楞子”利湿活血消痰,共为臣剂;“五灵脂,鸡血藤,红花”理气通经活络,“白芍,白扁豆、荷叶”柔肝健脾清热,共为佐剂,“大枣,生甘草”补益脾气,调和诸药,共为使剂。

[0027] 君剂中,“法半夏”性味辛温沉降,温化寒湿,善清化痰浊燥脾湿,降逆止呕消痞结;与“黄连”配伍,后者性味苦寒降泄,清热燥湿,善去中焦湿热火毒,散中焦气分热结;二者配伍,一寒一热,寒热互用和阴阳;一苦一辛,辛开苦降调气机;清热且不妨祛湿,燥湿但无碍清热;其除湿化痰、消痞止呕之功相辅相成。“法半夏”与“苍术”配伍,后者辛温发散,走而不守,善燥湿健脾,除痞散积;二者配伍,共奏燥湿化痰散积、消痞降逆止呕之功。“苍术”与“黄连”配伍,一温一寒,一苦一辛,强清热燥湿之力而不伤阳气,调升降浮沉之性且相得益彰。“法半夏”、“黄连”及“苍术”三药配伍,可燥湿化痰、疏肝健脾、调畅气机、消痞散积。中医理论认为,气血津液同源,谓之“痰瘀同源”、“痰瘀同病”。痰可生瘀,瘀可生痰,痰瘀互生,痰是瘀的初始,瘀是痰的深化,痰瘀同源相生而互结。君剂中,“桃仁”性甘平苦味,苦以泄滞血,甘以生新血,体润滋肠燥,善通经而行瘀涩,破血而化癥瘕;与“法半夏”、“黄连”、“苍术”配伍,痰瘀并治,燥湿与活血互助,化痰与祛瘀共促,共奏“疏肝健脾,化痰祛瘀”之功。

[0028] 臣剂中,“麸炒薏苡仁”配“茵陈”,健脾化湿、清热散结,辅助君剂发挥燥湿健脾之功;“莪术”配“瓦楞子”,消积散结、行气化痰,辅助君剂发挥消痞化痰之功;“丹参”配“赤芍”,活血散瘀、通经止痛,辅助君剂发挥活血祛瘀之功;“佛手”配“郁金”、“川芎”,解郁行血、燥湿化痰,辅助君剂发挥疏肝理气之功。臣剂配伍应用,相辅相成,多层次多维度协同,加强君剂“痰瘀并治”之根本。

[0029] 佐剂中,“五灵脂”配“白芍”、“鸡血藤”、“红花”,通经散瘀,柔肝养血,佐治血瘀胁痛、肝阴肝血不足之兼证;“白扁豆”配“荷叶”,健脾和中,升发清阳,升清以助阳,升阳以散火,升阳以除湿,升阳以解郁,佐治心下痞满,脾虚湿阻中焦之兼证。佐剂协同作用,多角度强化君剂与臣剂之“健脾除湿,通经散瘀”治疗功效,解除肝阴血虚、疏泄失司之兼证。

[0030] 使剂中,“大枣”配“生甘草”,发挥引药入经、益气养血、补脾和中、调和诸药之效。

附图说明

[0031] 图1为本发明组方对NASH患者PBMCs中TLR4与TLR9信号通路关键分子基因表达的影响;

- [0032] 图2为本发明组方对NASH患者PBMCs中TLR4信号通路效应分子分泌的影响；
- [0033] 图3为本发明组方对NASH患者PBMCs中TLR9信号通路效应分子分泌的影响；
- [0034] 图4为中药组方对NASH小鼠肝脏损伤的保护作用；
- [0035] 图5为中药组方对NASH小鼠Th17细胞分化免疫诱导分子的影响；
- [0036] 图6为中药组方对NASH小鼠Th17细胞分化免疫抑制分子的影响；
- [0037] 图7为中药组方对NASH小鼠Th17细胞分化转录因子的影响；
- [0038] 图8为中药组方对NASH小鼠Th17细胞功能分子表达的影响，其中A图为中药组方对NASH小鼠Th17细胞功能分子基因表达的影响，B图为中药组方对NASH小鼠Th17细胞功能分子分泌的影响；
- [0039] 图9为中药组方对NASH小鼠肝细胞IL-17R信号通路分子表达的影响，其中A图为中药组方对NASH小鼠肝细胞IL-17R信号通路表达的影响，B图为中药组方对NASH小鼠肝细胞IL-17R信号通路下游趋化因子基因表达的影响，C图为中药组方对NASH小鼠趋化因子分泌水平的影响，D图为中药组方对IL-17R体外诱导NASH小鼠肝细胞趋化因子的影响；
- [0040] 图10为中药组方对NASH小鼠肝脏枯否细胞TLR2、TLR4、TLR7及TLR9信号通路关键组成分子表达的影响，其中A图为中药组方对NASH小鼠肝脏枯否细胞TLR_s受体表达的影响，B图为中药组方对NASH小鼠肝脏枯否细胞TLR_s信号通路接头分子表达的影响，C图为中药组方对NASH小鼠肝脏枯否细胞TLR_s信号通路转录因子表达的影响；
- [0041] 图11为中药组方对NASH小鼠肝脏枯否细胞TLR2信号通路影响，其中A图为中药组方对NASH小鼠肝脏枯否细胞TLR2信号通路介导白细胞介素类效应分子表达的影响，B图为中药组方对NASH小鼠肝脏枯否细胞TLR2信号通路介导白细胞介素类效应分子分泌水平的影响，C图为中药组方对NASH小鼠肝脏枯否细胞TLR2信号通路介导TNF- α 、TGF- β 1及干扰素类效应分子表达的影响，D图为中药组方对NASH小鼠肝脏枯否细胞TLR2信号通路介导TNF- α 、TGF- β 1及干扰素类效应分子分泌水平的影响，E图为中药组方对NASH小鼠肝脏枯否细胞TLR2信号通路介导基质金属蛋白酶类效应分子表达的影响，F图为中药组方对NASH小鼠肝脏枯否细胞TLR2信号通路介导基质金属蛋白酶类效应分子分泌水平的影响；
- [0042] 图12为中药组方对NASH小鼠肝脏枯否细胞TLR4信号通路影响，其中A图为中药组方对NASH小鼠肝脏枯否细胞TLR4信号通路介导白细胞介素类效应分子表达的影响，B图为中药组方对NASH小鼠肝脏枯否细胞TLR4信号通路介导白细胞介素类效应分子分泌水平的影响，C图为中药组方对NASH小鼠肝脏枯否细胞TLR4信号通路介导TNF- α 、TGF- β 1及干扰素类效应分子表达的影响，D图为中药组方对NASH小鼠肝脏枯否细胞TLR4信号通路介导TNF- α 、TGF- β 1及干扰素类效应分子分泌水平的影响，E图为中药组方对NASH小鼠肝脏枯否细胞TLR4信号通路介导基质金属蛋白酶类效应分子表达的影响，F图为中药组方对NASH小鼠肝脏枯否细胞TLR4信号通路介导基质金属蛋白酶类效应分子分泌水平的影响，G图为中药组方对NASH小鼠肝脏枯否细胞TLR4信号通路介导趋化因子类效应分子表达的影响，H图为中药组方对NASH小鼠肝脏枯否细胞TLR4信号通路介导趋化因子类效应分子分泌水平的影响；
- [0043] 图13为为中药组方对NASH小鼠肝脏枯否细胞HGF表达的影响，其中A图为中药组方对NASH小鼠肝脏枯否细胞HGF基因表达的影响，B图为中药组方对NASH小鼠HGF蛋白水平的影响；
- [0044] 图14为为中药组方对NASH小鼠肝脏细胞ALR表达的影响，其中A图为中药组方对

NASH小鼠肝脏细胞ALR基因表达的影响,B图为中药组方对NASH小鼠ALR蛋白水平的影响。

具体实施方式

[0045] 下面结合附图和具体实施方式对本发明做进一步说明。

[0046] 一、实施例:

[0047] 实施例1:

[0048] 黄连20g、法半夏12g、苍术15g、桃仁18g、麸炒薏苡仁20g、佛手15g、郁金15g、川芎9g、茵陈18g、丹参20g、赤芍18g、莪术12g、瓦楞子12g、五灵脂10g、鸡血藤10g、红花10g、白芍15g、白扁豆15g、荷叶9g、大枣9g和生甘草9g。

[0049] 实施例2:

[0050] 黄连24g、法半夏18g、苍术18g、桃仁24g、麸炒薏苡仁25g、佛手20g、郁金20g、川芎18g、茵陈25g、丹参27g、赤芍24g、莪术24g、瓦楞子30g、五灵脂18g、鸡血藤18g、红花12g、白芍30g、白扁豆24g、荷叶15g、大枣9g和生甘草9g。

[0051] 实施例3:

[0052] 黄连30g、法半夏24g、苍术25g、桃仁30g、麸炒薏苡仁30g、佛手30g、郁金30g、川芎18g、茵陈30g、丹参30g、赤芍18-30g、莪术30g、瓦楞子30g、五灵脂24g、鸡血藤26g、红花18g、白芍30g、白扁豆30g、荷叶18g、大枣15g和生甘草12g。

[0053] 实施例4:

[0054] 黄连20g、法半夏18g、苍术20g、桃仁24g、麸炒薏苡仁20g、佛手20g、郁金20g、川芎12g、茵陈18g、丹参20g、赤芍18g、莪术18g、瓦楞子20g、五灵脂20g、鸡血藤18g、红花12g、白芍30g、白扁豆20g、荷叶18g、大枣9g和生甘草9g。

[0055] 该中药组合物可以制成水煎剂、丸剂、茶剂、口服液、片剂、胶囊剂、颗粒剂、膏剂或散剂剂型。

[0056] 二、临床实验:

[0057] 1、一般资料与研究设计:

[0058] 根据美国肝病研究学会、美国胃肠病学会、美国胃肠病学协会、欧洲肝病学会、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制定相关非酒精性脂肪肝临床指南标准,临床研究采用平行随机对照研究实验设计,本发明组方治疗组与对照组按照1:1进行纳入,共收集NASH患者104例,其中消脂化纤汤组52例,对照组52例。患者均来自于甘肃中医药大学附属医院,本研究获得甘肃中医药大学附属医院伦理委员会批准,患者知情同意。

[0059] 2、纳入标准与排除标准:

[0060] 患者纳入标准严格依据上述临床指南进行,通过彩色超声检查显示存在脂肪肝,并血液检测显示存在肝脏炎性损伤。排除标准包括糖尿病、孕妇和哺乳母亲、病毒性肝炎、自身免疫性肝病、酒精消耗、肝硬化、肝细胞癌或任何其他原因引起的肝脏疾病患者。

[0061] 3、治疗方案:本发明组方治疗组:给予健康生活方式改变;同时本发明组方实施例2的水煎剂,3/日,连续服用8周;研究期间禁止应用任何其它肝脏疾病相关药物;对照组:给予健康生活方式改变,连续8周;研究期间禁止应用任何其它肝脏疾病相关药物。治疗前后空腹采血,分离血清,检测血清相关酶学指标及炎性细胞因子指标;分离外周血PBMCs,提取

细胞mRNA,应用实时定量聚合酶链式反应(real-time PCR)检测关键分子基因表达水平。

[0062] 4、研究观察指标:

[0063] (1)临床疗效研究:

[0064] 检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT),天冬氨酸氨基转移酶(AST),谷氨酰转肽酶(GGT),碱性磷酸酶(ALP),甘油三酯(TG),总胆固醇(CHOL),白蛋白(ALB),总胆红素(T-Bil),血糖(Glu);计算体质指数(BMI)评估患者胖瘦程度;FibroScan检测控制衰减指数(Cap)评估患者肝脏脂肪含量,计算稳态模型胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)评估患者胰岛素抵抗水平。

[0065] (2)炎性机制研究:

[0066] ①外周血炎性细胞因子水平:检测血清白细胞介素6(IL-6),IL-1 β ,IL-12,肿瘤坏死因子 α (TNF- α),干扰素 γ (IFN- γ),C-X-C基序趋化因子10(CXCL10),MMP9

[0067] ②TLR4与TLR9信号通路表达:

[0068] 检测外周血单个核细胞(PBMCs)中TLR4与TLR9信号通路关键分子TLR4,TLR9,髓样分化因子88(MyD88),肿瘤坏死因子受体相关因子6(TRAF6)及核因子 κ B(NF- κ B),干扰素调节因子7(IRF7)mRNA表达水平。

[0069] ③TLR4与TLR9信号通路功能:

[0070] 提取PBMCs,分别给予TLR4特异性配体脂多糖(LPS)及TLR9特异性配体(CpG OND 2216)刺激,酶联免疫吸附实验(ELISA)检测炎性细胞因子IL-6,IL-1 β ,IL-12,TNF- α ,IFN- γ ,CXCL10,MMP9分泌水平。

[0071] 5、统计学分析:

[0072] 统计学采用SPSS16.0分析软件进行。计量数据采用均数 \pm 标准差,或采用中位数(25%四分位数,75%四分位数)表示。组间变化分析正态分布性,如符合正态分布,则采用独立样本t检验进行分;如不符合正态分布,则采用非参数检验。采用双侧检验标准,以P<0.05为统计学差异。

[0073] 6、研究结果

[0074] (1)本发明组方对NASH患者肝脏保护及胰岛素抵抗的临床研究

[0075] ①患者基线资料:

参数	研究参与者 (n=104)
年龄 (年)	52.9±7.95
性别 男 (%)	54 (51.9)
BMI (kg/m ²)	22.4±2.53
HOMA-IR	1.89±0.15
ALT (IU/L) *	114 (99.0, 138)
AST (IU/L) *	73.0 (66.0, 84.0)
[0076] GGT (IU/L) *	22.0 (14.0, 29.0)
ALP (IU/L) *	92.0 (74.0, 112)
ALB (g/L)	43.0±4.43
CHOL (mmol/L)	3.96±0.82
TG (mmol/L)	2.02±0.80
T-BIL (μmol/L)	11.2±3.93
GLU (mmol/L)	5.21±0.58
Cap (db/m)	295±22.7

[0077] 注：数据采用均数±标准差表示，或*采用中位数（25%四分位数，75%四分位数）表示

[0078] ②患者分组基线资料：

参数	对照组 (n=52)	药物组(n=52)	P
年龄 (年)	54.2±7.08	51.7±8.71	0.141
性别 男 (%)	28 (53.8)	26 (50.0)	0.845
BMI (kg/m ²)	22.2±2.69	22.4±2.37	0.842
HOMA-IR	1.88±0.14	1.90±0.16	0.441
ALT (IU/L) *	120 (108, 138)	110 (96.0, 138)	0.111
AST (IU/L) *	80.5 (72.0, 84.3)	80.5 (69.0, 87.3)	0.835
GGT (IU/L) *	22.2 (14.8, 31.3)	21.0 (14.0, 27.3)	0.714
ALP (IU/L) *	96.5 (74.8, 115)	84.5 (72.8, 99.0)	0.151
ALB (g/L)	42.6±4.66	43.3±4.17	0.411
CHOL (mmol/L)	3.97±0.89	3.95±0.75	0.876
TG (mmol/L)	1.96±0.57	2.06±0.97	0.548
T-BIL (μmol/L)	11.7±3.61	10.7±4.23	0.186
GLU (mmol/L)	5.16±0.60	5.28±0.56	0.301
Cap (db/m)	294±23.2	295±22.3	0.740

注：数据采用均数±标准差表示，或*采用中位数（25%四分位数，75%四分位数）表示

[0080] ③治疗后患者肝脏功能、血脂、HOMA-IR及Cap:

参数	对照组治疗后	P	药物组治疗后	P
ALT (IU/L) *	98.0 (81.0, 115)	0.000	38.0 (32.8, 40.5)	0.000
AST (IU/L) *	69.0 (62.0, 74.5)	0.000	23.0 (20.0, 30.1)	0.000
TG (mmol/L)	1.94±0.56	0.375	1.90±0.83	0.000
HOMA-IR	1.87±0.17	0.814	1.66±0.99	0.000
Cap (db/m)	295±26.7	0.829	239±25.8	0.000

注：数据采用均数±标准差表示，或*采用中位数（25%四分位数，75%四分位数）表示

[0082] ④治疗后患者血清ALT及AST治疗前后变化程度对比:

参数	对照组治疗前后	药物组治疗前后	P
	变化程度	变化程度	
ALT (IU/L) *	20.4±23.6	86.2±25.6	0.000
AST (IU/L) *	11.8±10.7	56.0±12.9	0.000

*采用中位数（25%四分位数，75%四分位数）表示

[0084] 数据显示，本发明组方对NASH患者肝脏保护作用显著，并有效改善患者胰岛素抵抗水平、肝脏脂肪沉积程度及血脂水平，表现为治疗前后患者ALT、AST、TG、HOMA-IR及Cap均

显著降低,与对照组相比有统计学差异($P<0.01$)。对照组在健康生活方式改变后,血清ALT与AST与改变前相比,有统计学差异($P<0.01$);分析对照组与药物组患者ALT与AST治疗前后变化程度,数据显示药物组促进肝脏功能恢复的强度明显高于对照组,并有统计学差异($P<0.01$)。

[0085] (2) 本发明组方对NASH患者炎性细胞因子释放水平的临床研究

[0086] ①一般资料

[0087] 患者基线资料相关数据如上。

[0088] ②实验方法

[0089] 对照组及本发明组方药物组患者在基线及干预8周,静脉采血,提取血浆,ELISA分析血浆中IL-6,IL-1 β ,IL-12,TNF- α ,IFN- γ ,CXCL10,MMP9含量,分析两组干预前后炎性细胞因子的变化水平。

[0090] ③实验结果

参数	Δ 对照组	Δ 药物组	P
IL-6 (ng/L)	1.24 \pm 1.17	11.7 \pm 1.75	0.000
IL-1 β (ng/L)	5.37 \pm 1.01	16.3 \pm 0.83	0.000
IL-12 (ng/L)	3.85 \pm 2.50	7.66 \pm 1.95	0.000
[0091] TNF- α (ng/L)	3.81 \pm 1.03	6.95 \pm 0.84	0.000
IFN- γ (ng/L)	2.79 \pm 0.89	7.46 \pm 1.65	0.000
CXCL10 (ng/L)	18.8 \pm 5.62	69.1 \pm 6.45	0.000
MMP9 (ng/L)	32.40 \pm 3.98	44.67 \pm 4.81	0.000

注:数据采用均数 \pm 标准差表示; Δ 干预前后差值

[0092] 数据显示,本发明组方对下调NASH患者机体炎性细胞因子作用显著,表现为治疗前后患者血清IL-6,IL-1 β ,IL-12,TNF- α ,IFN- γ ,CXCL10及MMP9均明显降低;同时,对本发明组方药物组与对照组干预前后炎性细胞因子指标降低幅度相比,有统计学差异($P<0.01$)。

[0093] 提示本发明组方通过下调机体炎性细胞因子释放,减轻NASH患者肝脏炎性损伤,从而发挥其肝脏保护效应,可能是其作用机制之一。

[0094] (3) 消脂化纤汤对NASH患者外周血PBMCs中TLR4与TLR9信号通路影响的临床研究

[0095] ①一般资料:患者基线资料相关数据如上。

[0096] ②实验方法

[0097] 对照组及药物组患者在基线及干预8周,静脉采血,提取PBMCs,实时定量聚合酶链式反应(real-time PCR)技术检测TLR4与TLR9信号通路关键分子表达,包括髓样分化因子88(MyD88),肿瘤坏死因子受体相关因子6(TRAF6),核因子 κ B(NF- κ B),干扰素调节因子7(IRF7)基因表达水平;

[0098] 对照组及药物组患者在基线及干预8周,静脉采血,提取PBMCs进行体外细胞培养,分别加入TLR4特异性配体LPS(*Escherichia coli*055:B5)与TLR9特异配体CpG ODN2216,刺

激24h,ELISA分析检测细胞培养上清液中IL-6,IL-1 β ,IL-12p40,TNF- α ,IFN- γ 及CXCL10含量。

[0099] ③实验结果

[0100] 如图1的数据显示,本发明组方药物组8w与基线0w相比,明显下调TLR4与TLR9信号通路关键分子的基因表达,有统计学差异($P<0.01$);对照组8w与基线0w相比,TLR4与TLR9信号通路关键分子的基因表达未显示明显变化。

[0101] 如图2的数据显示,本发明组方药物组8w与基线0w相比,明显下调TLR4信号通路炎性细胞因子分泌,有统计学差异($P<0.01$);对照组8w与基线0w相比,TLR4信号通路炎性细胞因子分泌未显示明显变化。

[0102] 如图3的数据显示,本发明组方药物组8w与基线0w相比,明显下调TLR9信号通路炎性细胞因子分泌,有统计学差异($P<0.01$);对照组8w与基线0w相比,TLR9信号通路炎性细胞因子分泌未显示明显变化。

[0103] 研究显示,本发明组方能够下调机体TLR4及TLR9信号通路表达及功能,能够有效改善NASH肝脏损伤。

[0104] 三、动物实验:

[0105] (一)研究方法

[0106] 1、实验动物及实验场所

[0107] SPF级C57BL/6小鼠,雄性,6-8周龄,18-22 g,由兰州大学实验动物中心提供(许可证编号:SCXK(甘)2018-0002;质量检测单位:国家实验动物质量检测中心);所有实验均在兰州大学GLP医学实验中心完成。

[0108] 2、动物模型制备:

[0109] 依据动物模型制备诱导痰瘀互结型非酒精性脂肪性肝炎小鼠模型:取健康C57BL/6小鼠,高脂饲料喂养,自由饮水;鼠笼铺设潮湿碎刨花,置于造模箱内,箱底部盛满水,箱顶部有通气孔,箱内置温湿度计,造模箱温度保持在 $(33\pm 1)^{\circ}\text{C}$,相对湿度保持在 $(95\pm 3)\%$;每周采用不可预知随机噪声刺激、闪烁强光刺激、光照与黑暗刺激各1次。造模持续8w。

[0110] 3、动物分组及干预:

[0111] (1)空白对照组(KBDZZ):健康C57BL/6小鼠标准化正常喂养;12w末处死小鼠,检测相关指标。(2)动物模型组(DWMXZ):严格进行动物模型制备;8w末处死小鼠,检测相关指标。(3)动物模型对照组(MXDZZ):严格进行动物模型制备;8w后小鼠恢复标准化正常喂养;灌胃生理盐水,2次/d,持续4w;12w末处死小鼠,检测相关指标。(4)药物干预组(YWGYZ)严格进行动物模型制备;8w后小鼠恢复标准化正常喂养;灌胃实验药物浓缩液,2次/d,持续4w;12w末处死小鼠,检测相关指标。

[0112] 4、药物组方、制备及换算:

[0113] 本实验采用实施例2的中药组方,使用水煎方法,其中瓦楞子先煎30min,得到药物标准水煎剂。

[0114] 依据动物与人体的每公斤体重剂量折算系数表以及计算公式:B种动物的剂量(mg/kg)= $W\times A$ 种动物的剂量(mg/kg),计算得出小鼠灌胃药物剂量为:0.90g / 20g小鼠。

[0115] 5、标本采集:

[0116] 于第12w末,小鼠禁食12h,自由饮水,腹腔注射10%水合氯醛行全身麻醉。小鼠麻醉后,行眼眶静脉丛采血,制备血清。无菌低温条件下充分暴露小鼠肝脏,取肝右叶组织,制备肝脏组织匀浆;取肝脏左叶置于冰PBS冲洗,低温机械碾磨后Percoll密度梯度离心,分离肝脏淋巴细胞;取小鼠肝脏中叶,置于冰PBS冲洗,消化液完全消化,过筛收集纯化,制备肝脏原代细胞。

[0117] 6、统计学分析:

[0118] 采用SPSS.22统计软件进行分析,实验数据正态分布的资料以 $\bar{x} \pm s$ 来表示,组间比较采用单因素方差分析,并用LSD进行组间比较,非正态分布的数据以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,组间以独立样本非参数检验,以 $P < 0.05$ 差异具有统计学意义。

[0119] (二)实验项目:

[0120] 实验一、中药组方对NASH小鼠肝脏损伤的保护作用

[0121] 1、检测试剂、样本、方法及仪器

[0122] ALT、AST、ALP、GGT、T-BIL、ALB、CHOL、TG、BS;试剂盒产于南京建成生物工程研究所;检测样本为小鼠血清;检测方法为比色分析法;检测仪器为奥林巴斯全自动生化分析仪(AU640,日本)。所有检测严格按照试剂盒说明书进行。

[0123] 2、实验结论

[0124] 本实验研究显示(见图4),本发明中药组方可有效保护肝脏实质细胞及胆道系统损伤,同时促进肝脏生物转化功能,促进肝脏物质代谢功能的恢复与平衡,多靶点、多角度、多层面促进NASH肝脏组织细胞损伤修复,促进肝脏功能损伤复常。

[0125] 实验二、基于Th17细胞分化与功能揭示中药组方对NASH小鼠肝脏的保护作用机制

[0126] 1、检测试剂、样本、方法及仪器

[0127] ROR γ t、IL-17、IL-21、IL-22、TNF- α 、IL-17RA、Act1、TRAF6、NF- κ B、CXCL9、CXCL10、CXCL11 mRNA,采用real-time PCR技术检测,试剂盒源自日本TaKaRa Bio Inc;检测仪器为PCR仪(Bio-Rad cycler IQ5,美国);检测样本为小鼠肝脏淋巴细胞;引物合成于北京博迈德生物科技有限公司。

[0128] TGF- β 1、IL-6、IL-23、IL-1 β 、IL-2、IFN- γ 、IL-4、ROR γ t、IL-22、IL-17、IL-21、TNF- α 、CXCL9、CXCL10及CXCL11蛋白,采用ELISA检测方法进行检测。所有检测严格按照试剂盒说明书进行。

[0129] 2、实验结论

[0130] Th17细胞浸润是NASH肝脏病理学特征之一。Th17细胞浸润肝脏并且分泌特殊的功能性细胞因子IL-17,通过IL-17R介导的细胞信号通路,引起肝脏炎症因子级联分泌效应放大,并招募外周炎症细胞浸润,诱导及促进肝脏复杂炎症损害的发生与发展。根据图5-9的实验数据显示,本发明中药组方可有效调节Th17细胞分化诱导因子与Th17细胞分化抑制因子分泌,下调核转录因子ROR γ t表达,抑制Th17细胞分化,并减少其功能效应分子释放;同时,本发明中药组方可下调IL-17R介导的细胞信号通路关键分子表达,抑制细胞信号通路功能,通过多靶点、多角度、多层面揭示了中药组方发挥NASH肝脏保护作用的机制。

[0131] 实验三、中药组方抑制NASH小鼠肝脏枯否细胞Toll样受体(TLRs)信号通路表达及功能的研究

[0132] 1、检测试剂、样本、方法及仪器

[0133] TLR2、TLR4、TLR7、TLR9、MyD88、TRAF6、NF- κ B、c-Jun、IRF3、IRF7 mRNA,采用real-time PCR检测方法进行检测。

[0134] IL-6、IL-1 β 、IL-12p40、TNF- α 、TGF- β 1、IFN- β 、IFN- γ 、MMP2、MMP3、MMP9 mRNA,采用real-time PCR检测方法进行检测。

[0135] IL-6、IL-1 β 、IL-12p40、TNF- α 、TGF- β 1、IFN- β 、IFN- γ 、MMP2、MMP3、MMP9、CXCL9、CXCL10、CXCL11蛋白,采用ELISA检测方法进行检测。

[0136] 2、实验结论

[0137] NASH与肠道微生物紊乱及肝脏细胞损伤刺激密切相关,可激活肝脏枯否细胞TLRs介导的细胞信号通路而促进NASH进展与恶化。根据图10-12的实验数据显示本发明中药组方可有效改善TLR2、TLR4、TLR7、TLR9介导的细胞信号通路表达及功能异常分泌,有效改善IL-6、IL-1 β 、IL-12p40、TNF- α 、TGF- β 1、IFN- β 、IFN- γ 、MMP2、MMP3、MMP9及CXCL9、CXCL10、CXCL11的异常分泌,通过多靶点、多角度、多层面抑制NASH肝脏炎症损伤,保护肝脏细胞,促进肝脏功能复常,揭示了本发明中药组方以TLRs信号通路为中心,发挥其肝脏保护作用的机制(由于TLR7与TLR9数据结果统计学特征与TLR2和TLR4相似,数据图表未列出)

[0138] 实验四、中药组方改善NASH小鼠肝脏细胞再生能力的影响研究

[0139] 1、检测试剂、样本、方法及仪器

[0140] HGF、ALR mRNA表达,采用real-time PCR检测方法进行检测。

[0141] HGF、ALR蛋白表达,采用ELISA检测方法进行检测。所有检测严格按照试剂盒说明书进行。

[0142] 2、实验结论

[0143] 慢性肝脏炎症损害肝脏细胞正常再生能力,诱导肝脏纤维化过程发生并累积,最终引起肝硬化等不良结局。根据图13-14的实验数据显示本发明中药组方通过改善NASH小鼠肝脏枯否细胞HGF分子、以及肝脏细胞ALR分子异常表达及分泌,从而通过多靶点、多角度、多层面发挥其肝脏细胞再生修复功能,促进肝脏功能复常,揭示了本发明中药组方发挥其肝脏保护作用的机制之一。

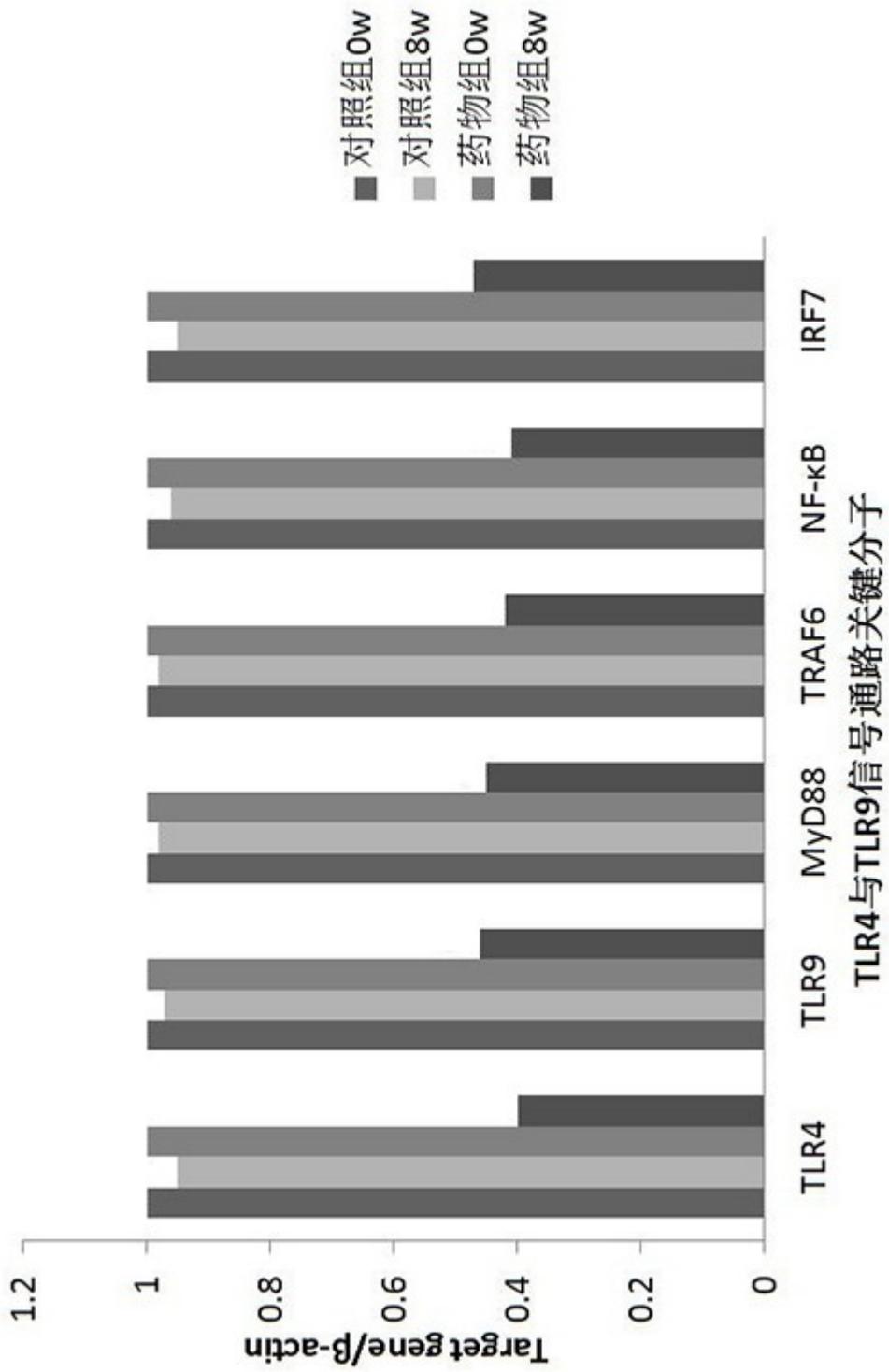


图1

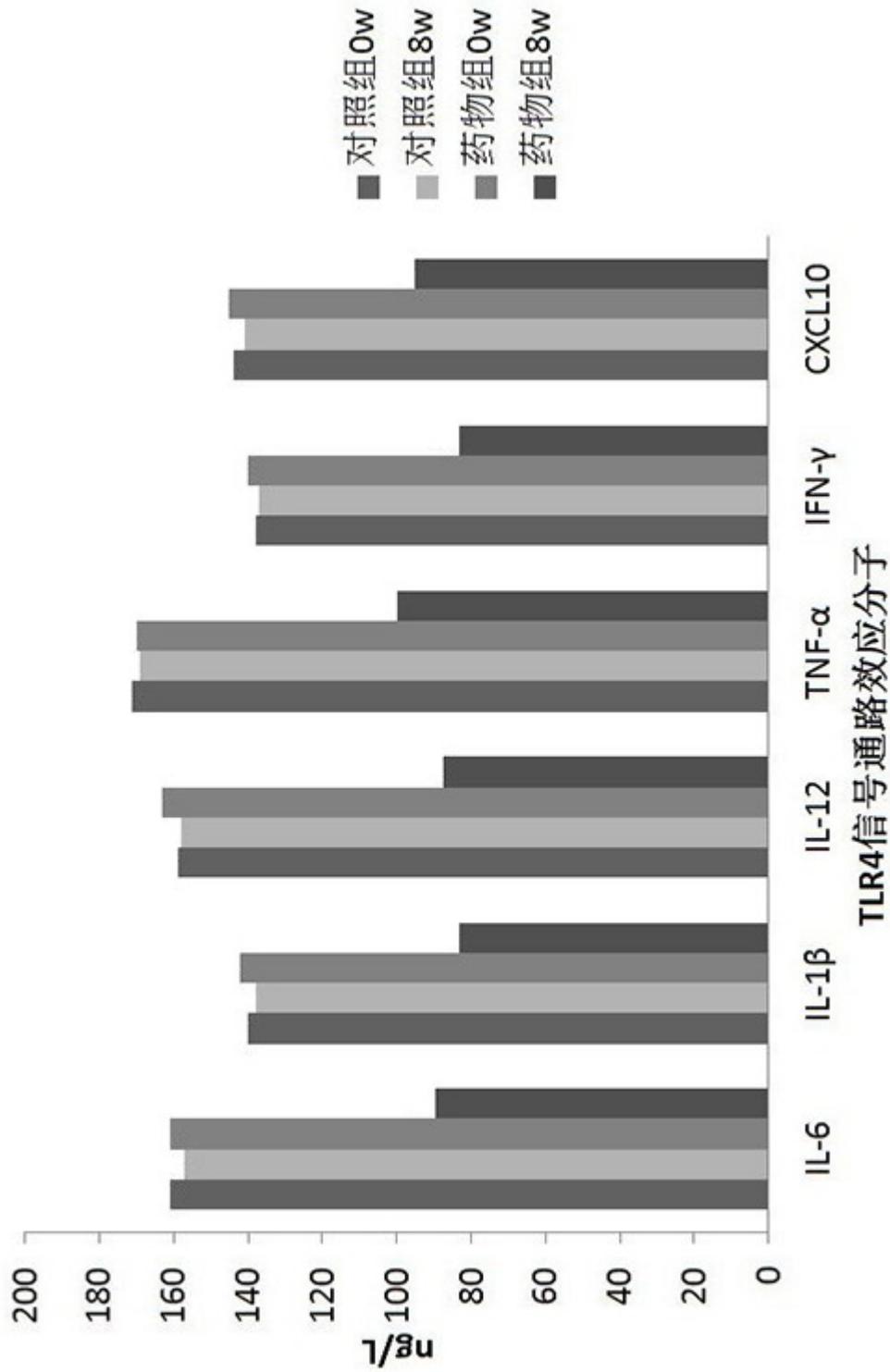


图2

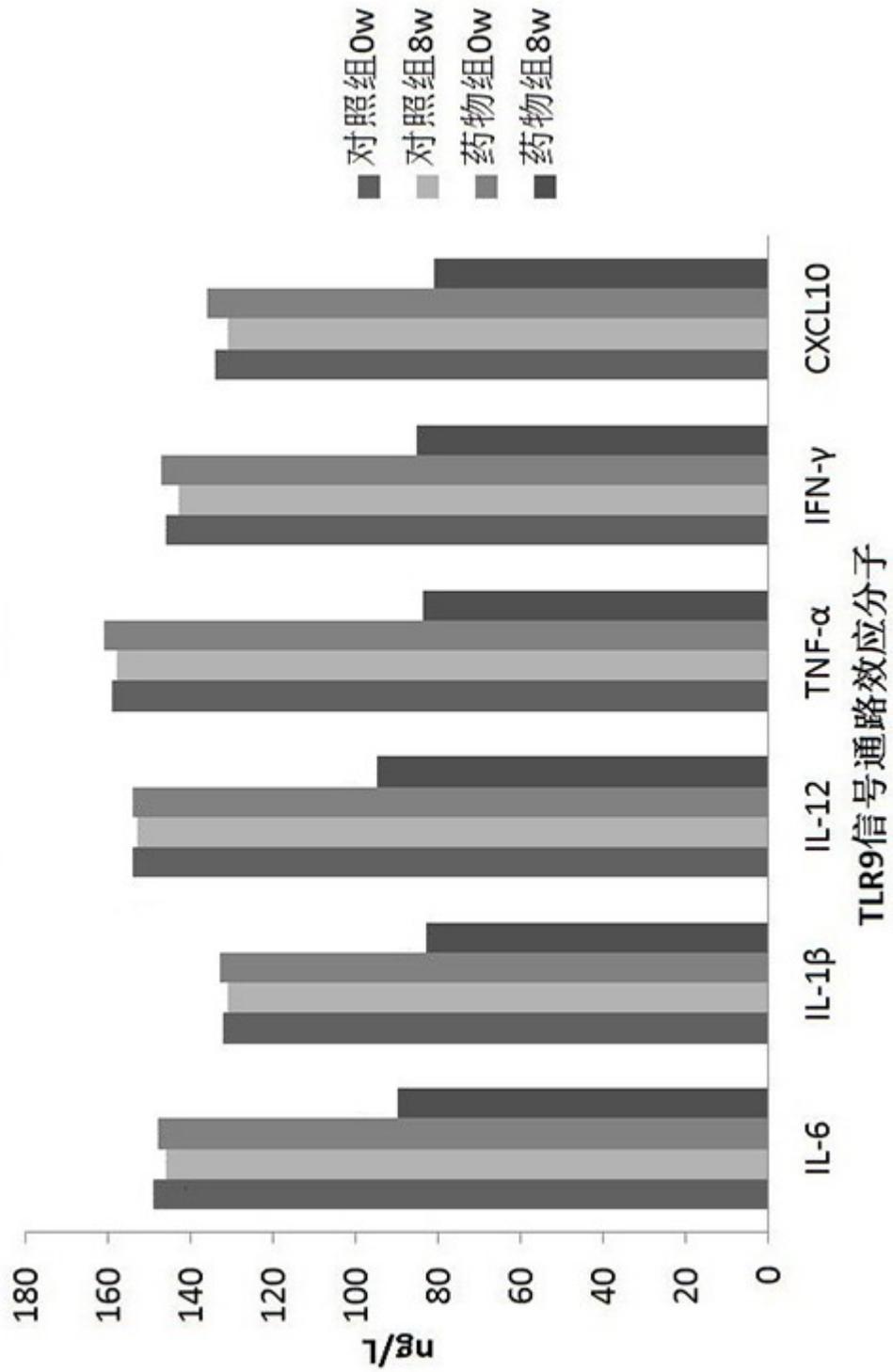


图3

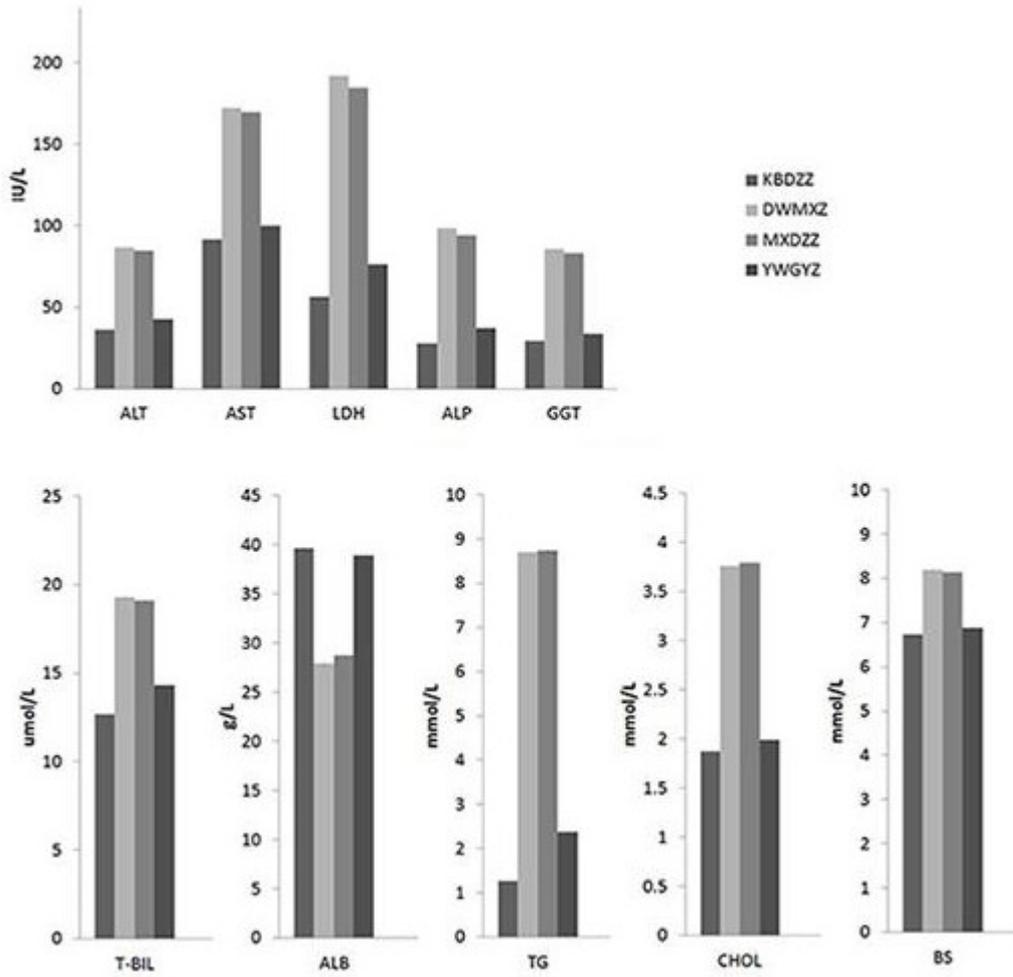


图4

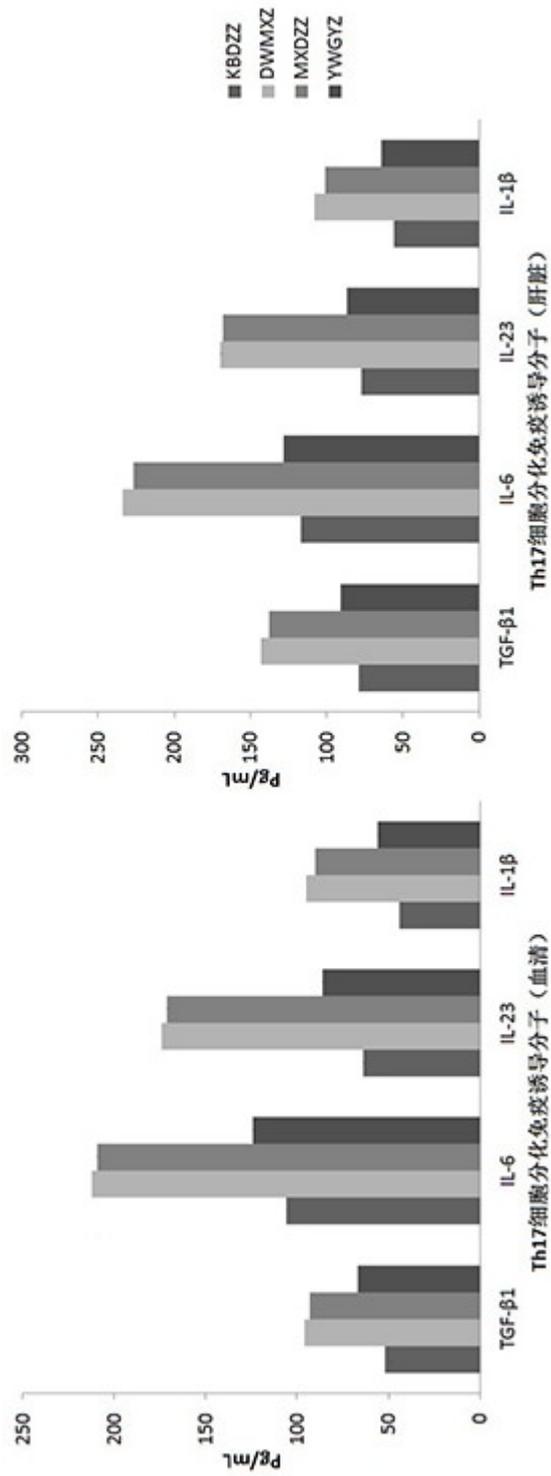


图5

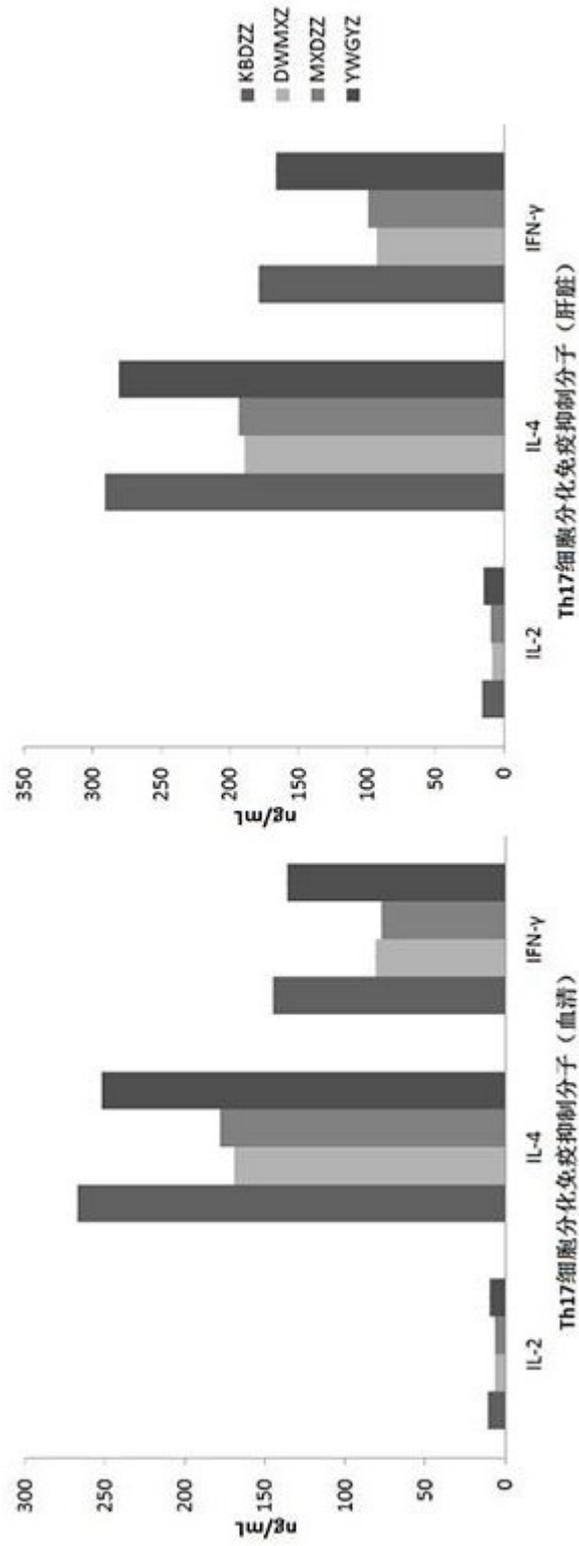


图6

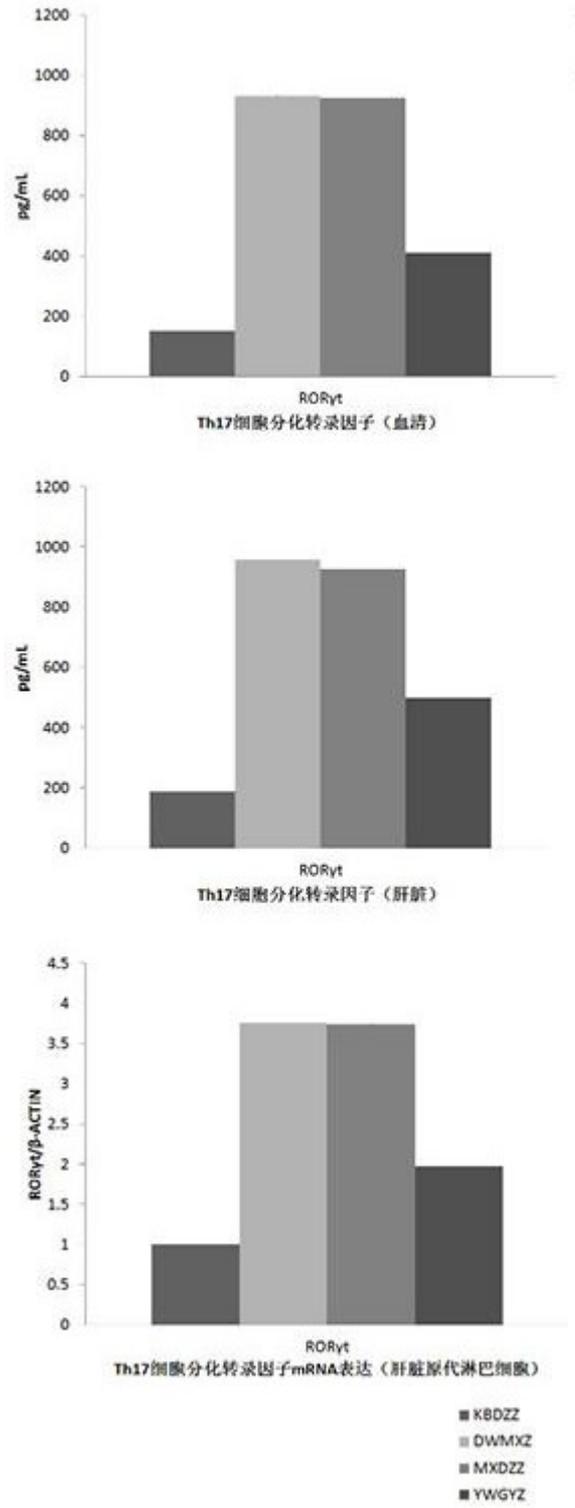


图7

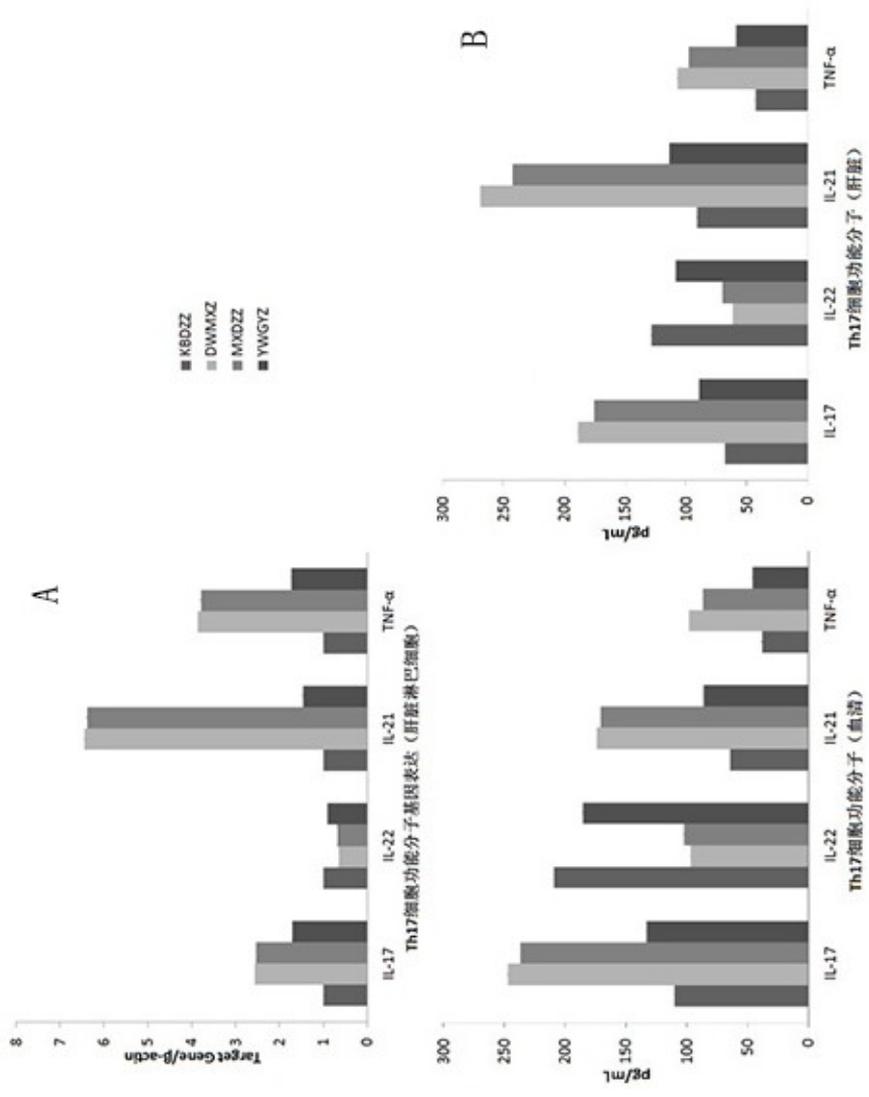


图8

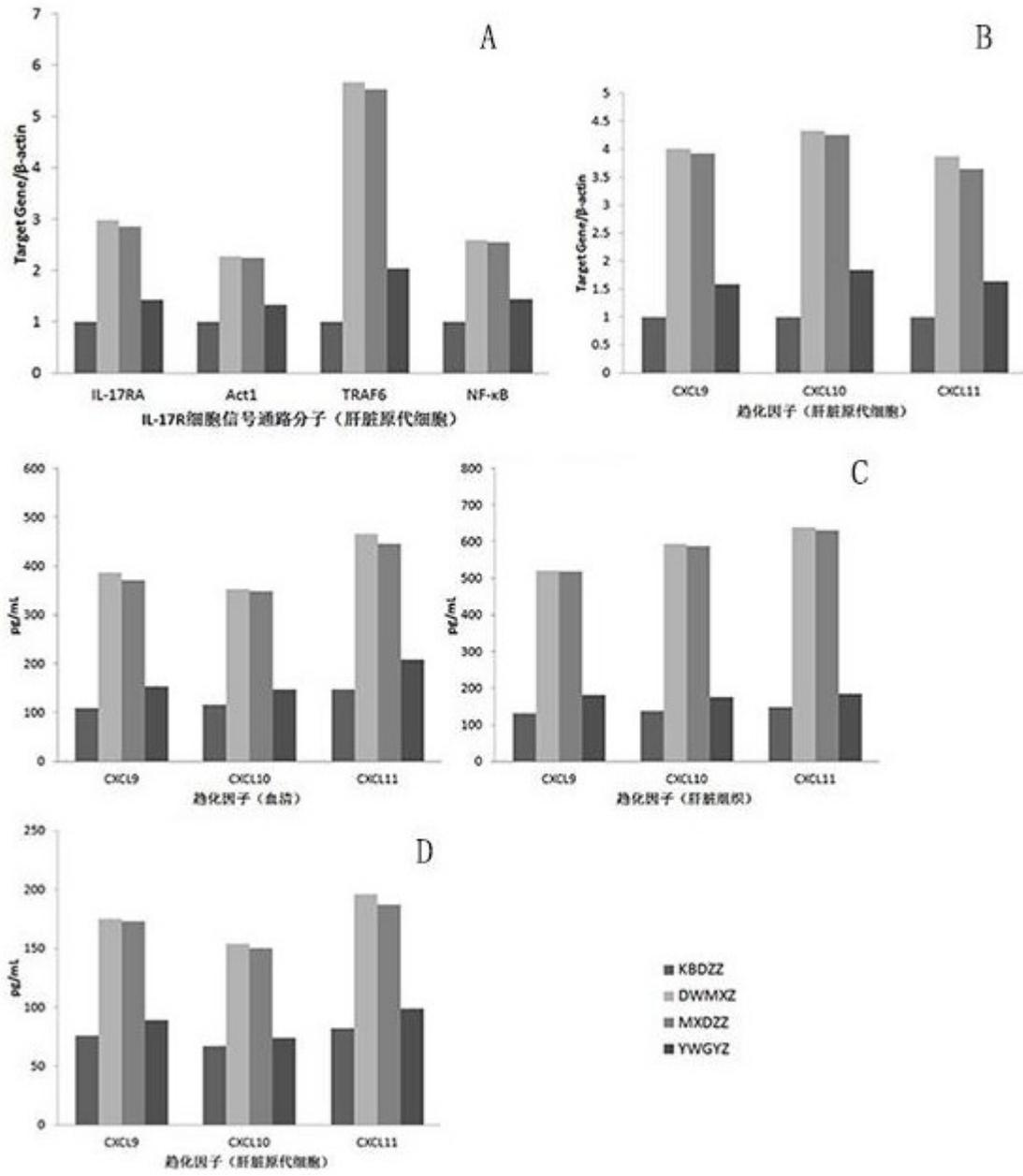


图9

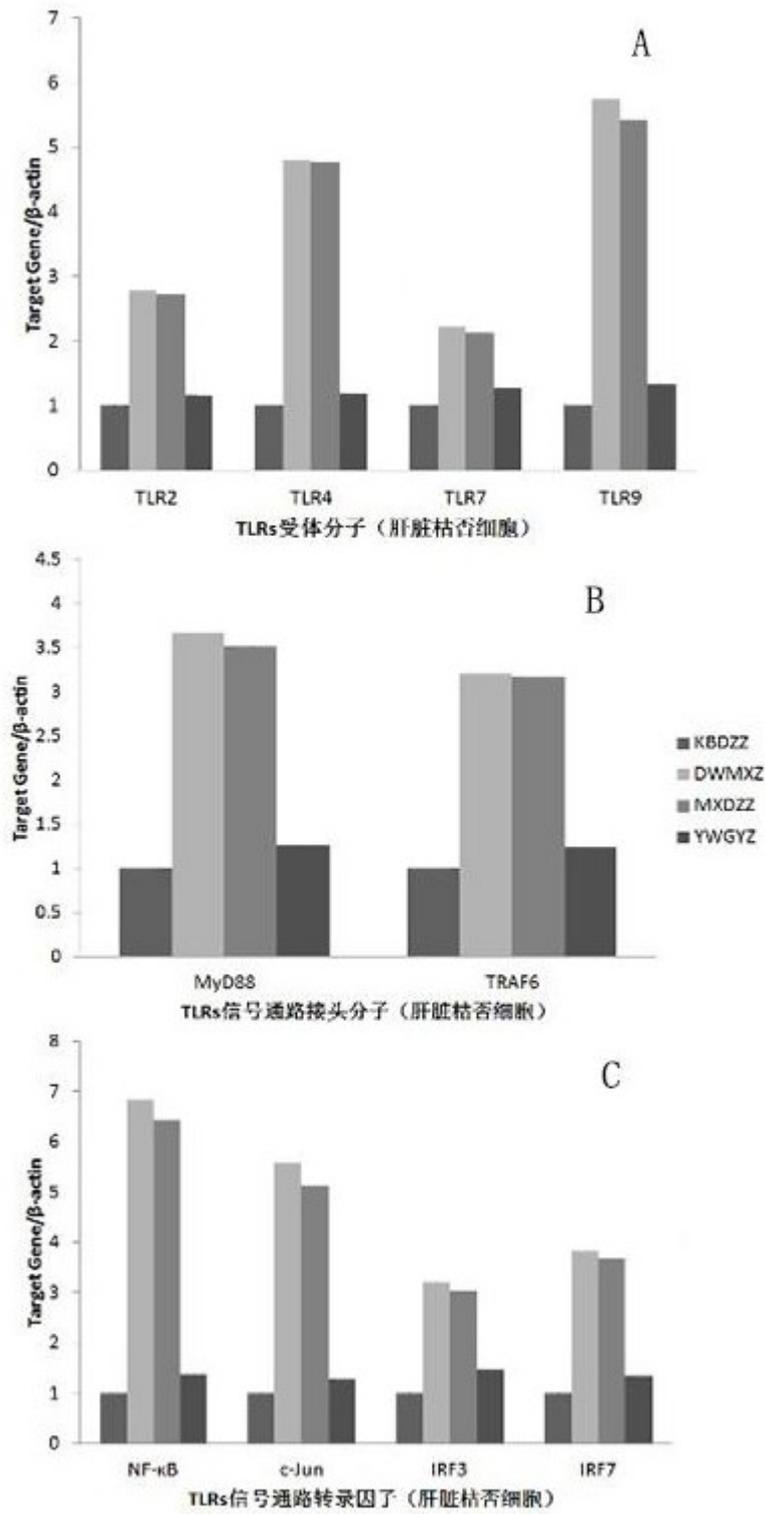


图10

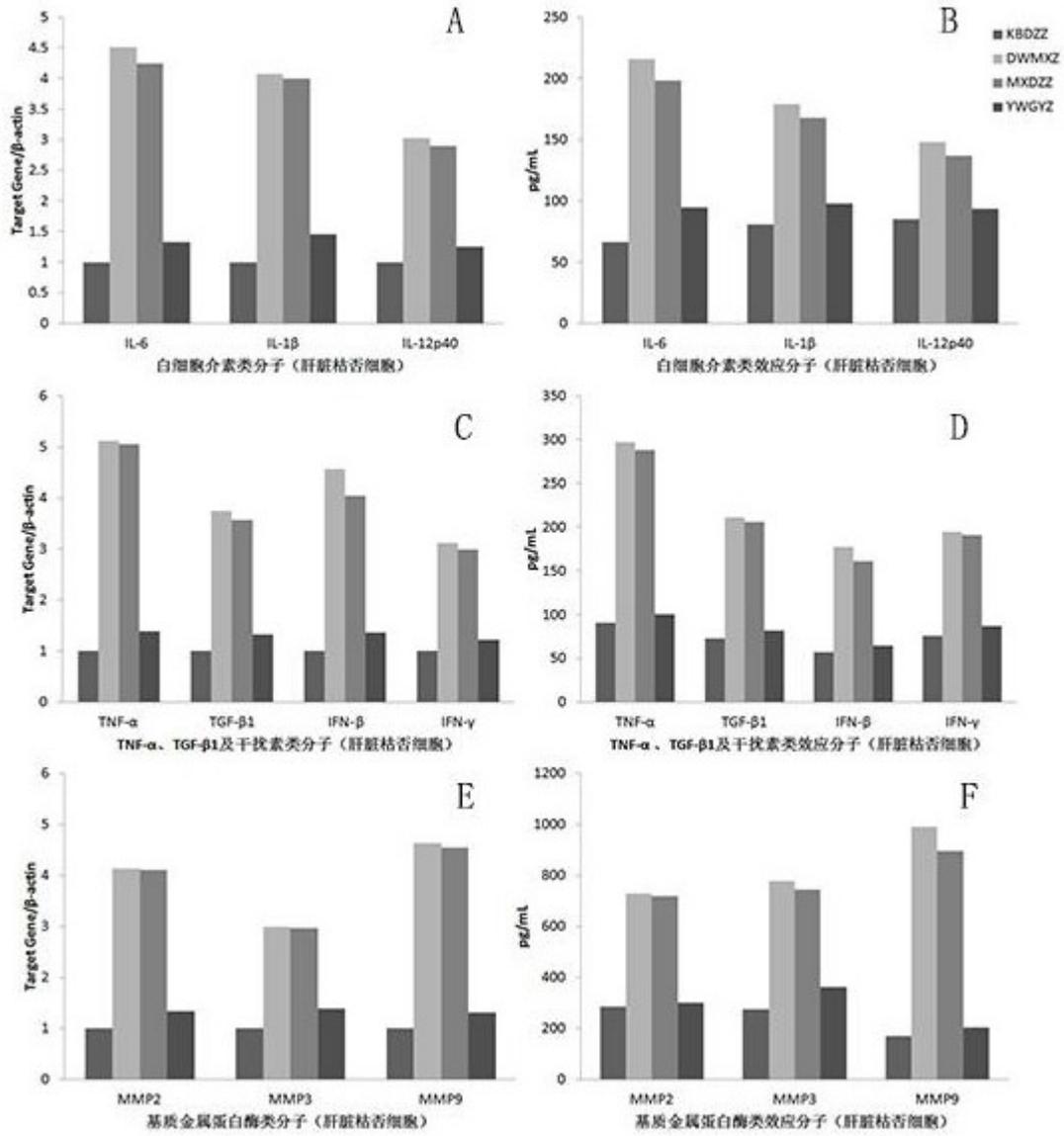


图11

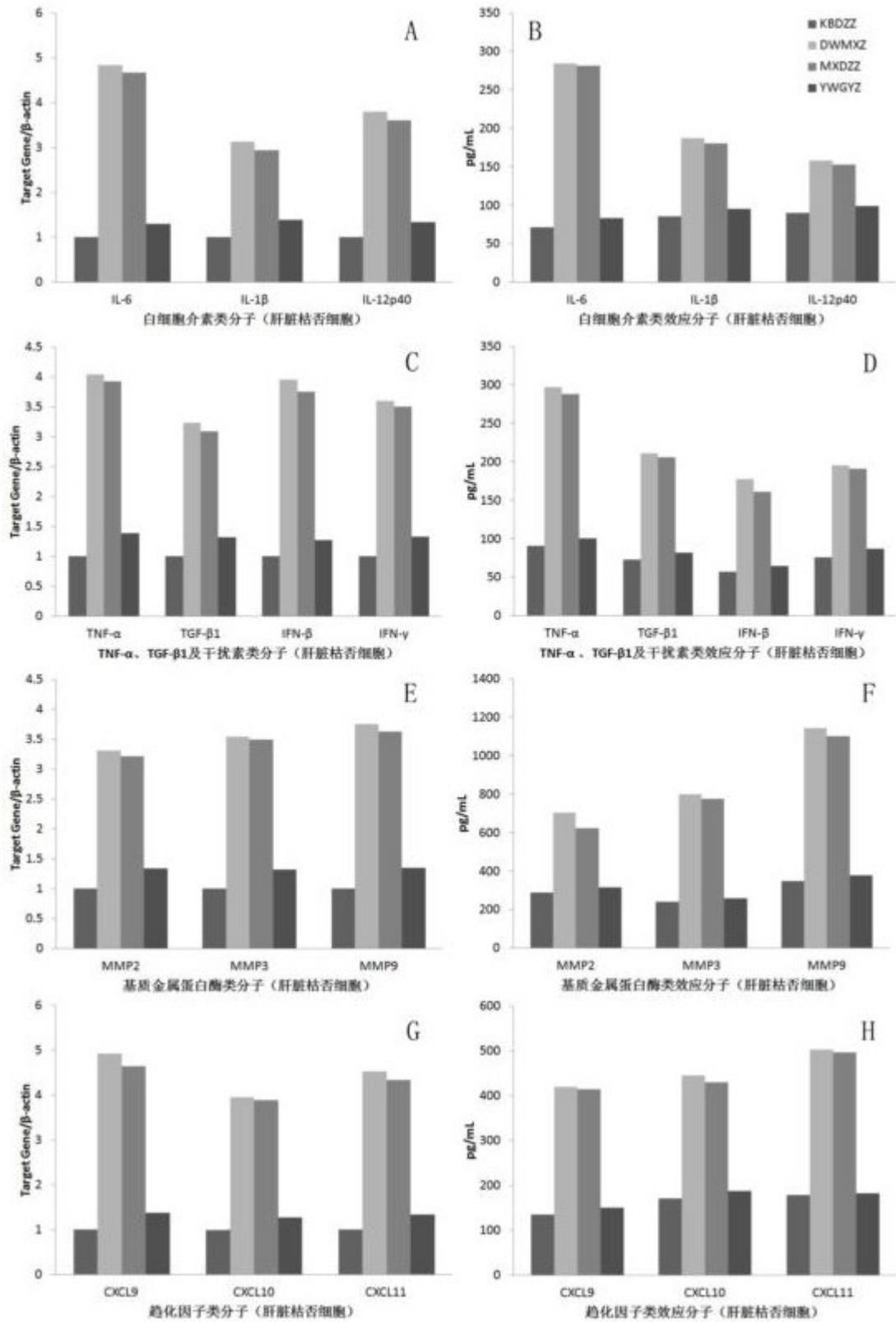


图12

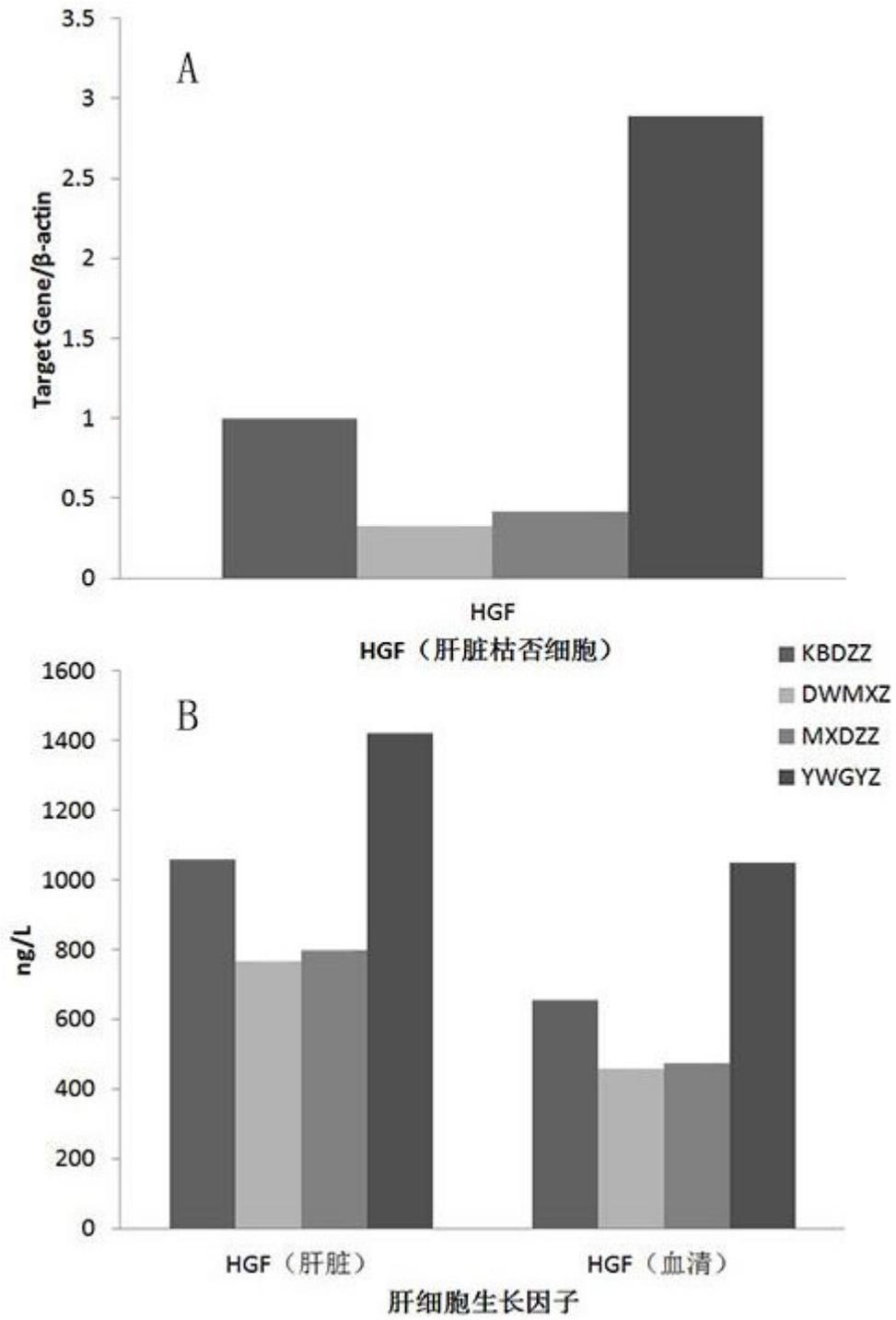


图13

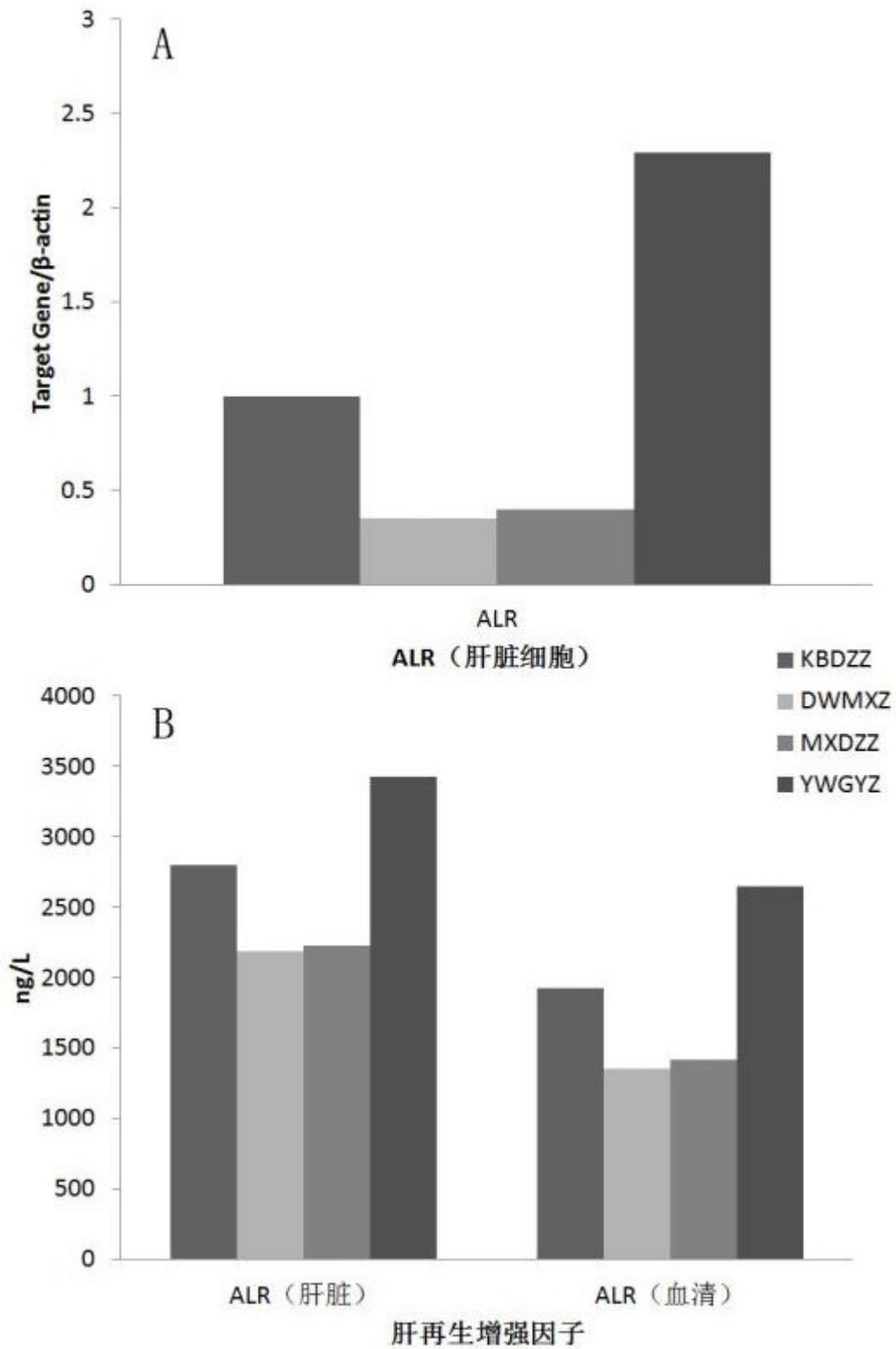


图14