

活血祛湿方对纯化高脂饲料诱导大鼠 非酒精性脂肪性肝炎模型的影响

郑佳连¹, 卢秉久^{2*}, 黄松¹, 任鹏¹

(1. 辽宁中医药大学, 沈阳 110847; 2. 辽宁中医药大学附属医院, 沈阳 110032)

【摘要】 目的: 观察不同剂量活血祛湿方对纯化高脂饲料诱导的大鼠非酒精性脂肪性肝炎(NASH)模型的治疗作用, 探讨活血祛湿方治疗 NASH 的作用机制。方法: 纯化高脂饲料制备 Wistar 大鼠 NASH 模型 8 周, 随机分为罗格列酮组(3 mg·kg⁻¹·d⁻¹), 活血祛湿方组高、中、低剂量组(32, 16, 8 g·kg⁻¹·d⁻¹)及模型组, 另设正常组。第 9 周开始 ig 给药; 正常组及模型组均给予等量生理盐水 ig。药物干预 4 周后行血清生化指标, 采用比色法检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT), 天门冬氨酸氨基转移酶(AST), 甘油三酯(TG), 总胆固醇(TC)及高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)含量, 放射免疫法检测血清空腹血糖(FBG), 空腹胰岛素(FINS), 酶联免疫吸附法(ELISA)法检测炎症因子肿瘤坏死因子-α(TNF-α), 白细胞介素-10(IL-10)及 IL-6; 检测肝组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)含量; 苏木素-伊红(HE)染色观察肝脏组织病理学变化; 卵白素-生物素-酶复合物染色(ABC)法检测肝组织细胞色素 P450_{2E1}(CYP_{2E1})含量及分布; 逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)法检测过氧化物酶体增殖剂活化受体α(PPARα) mRNA 表达。结果: 与正常组比较, 模型组大鼠血清 ALT, AST, TG, TC 水平及 FBG, FINS, TNF-α 及 IL-6 含量明显升高, HDL-C, IL-10 含量明显降低, 肝组织 SOD 活性明显降低, MDA 及 CYP_{2E1} 含量明显升高, 肝脏 PPARα mRNA 表达明显降低, 均具有明显的统计学差异(P < 0.05); 与模型组比较, 活血祛湿方各剂量组均能够改善大鼠 NASH 模型各项血清生化指标, 降低 FBG, FINS 水平, 明显提高肝脏 PPARα mRNA 表达, 明显增加肝脏中 SOD 活性及 IL-10 的含量, 明显减少肝脏 MDA, CYP_{2E1}, TNF-α 及 IL-6 含量, 与模型组比较, 差异有统计学意义(P < 0.05)。病理结果显示, 肝脏组织病理损伤明显改善。结论: 活血祛湿方能够有效多途径治疗 NASH, 改善胰岛素抵抗, 减少脂质过氧化反应, 抑制炎症反应可能是其治疗 NASH 的机制。

【关键词】 活血祛湿方; 纯化高脂饲料; 非酒精性脂肪性肝炎; 胰岛素抵抗; 脂质过氧化反应; 炎症反应

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2016)07-0144-06

【doi】 10.13422/j.cnki.syfjx.2016070144

Effects of Huoxue Qushi Formula on NASH Rats Model Induced by Purified High Fat Diet

ZHENG Jia-lian¹, LU Bing-jiu^{2*}, HUANG Song¹, REN Peng¹

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shenyang 110847, China;

2. Affiliated Hospital of Liaoning University of TCM, Shenyang 110032, China)

【Abstract】 **Objective:** To observe the effect of Huoxue Qushi formula on the non-alcoholic steatohepatitis (NASH) model rat and explore its possible mechanism. **Method:** All Wistar rats of NASH model were induced by feeding high fat diet for 8 weeks, and they were randomly divided into the rogridone group (3 mg·kg⁻¹·d⁻¹), the low, middle, high dose Huoxue Qushi formula groups (8, 16, 32 g·kg⁻¹·d⁻¹), the model and the normal group. After 4-week intervention, the levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate amino transferase (AST), triglyceride (TG), total cholesterol (TC), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) were determined by a colorimetric method. The levels of fasting blood-glucose (FBG) and fasting insulin (FINS) were determined by radioimmunoassay. The levels of tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin (IL)-10 and IL-6

【收稿日期】 20150424(012)

【基金项目】 辽宁省自然科学基金项目(201102142)

【第一作者】 郑佳连, 在读博士, 主治医师, 从事中西医结合治疗肝病研究, Tel: 024-31961637, E-mail: zhengjialian841025@163.com

【通讯作者】 * 卢秉久, 教授, 主任医师, 从事中西医结合治疗肝病研究, Tel: 024-31961637, E-mail: lubingjiu@163.com

were determined by ELISA. The activity of superoxide dismutase (SOD) and the content of malonaldehyde (MDA) were determined. The liver pathology was observed by HE staining and peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) mRNA expression of liver homogenate was tested by RT-PCR. The content and distribution of CYP₂E₁ were tested by the ABC method. **Result:** Compared to the normal group, the levels of ALT, AST, TG, TC, FBG, FINS, TNF- α and IL-6 increased, the levels of HDL-C and IL-10 decreased, the SOD activity reduced, the contents of MDA and CYP₂E₁ increased and the PPAR α mRNA expression reduced in the model group ($P < 0.05$). Compared with model group, all the above indexes and the liver pathology were improved in the Huoxue Qushi formula groups ($P < 0.05$). Pathological results showed that the liver tissue injury obviously improved. **Conclusion:** The Huoxue Qushi formula has certain effect in effectively treating NASH through many ways involved in improving insulin resistance, reducing lipid peroxidation and inhibiting the inflammatory reaction.

[**Key words**] Huoxue Qushi formula; high fat purification diet; nonalcoholic fatty liver disease; insulin resistance; lipid peroxidation; inflammation reaction

非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是指无过量饮酒史, 或每日酒精摄入量 < 20 g, 以肝脏实质细胞脂肪变性及脂肪蓄积为主要特征的临床病理综合征, 疾病谱包括单纯性脂肪肝 (NAFL), 脂肪性肝炎 (NASH) 及其相关肝硬化和肝细胞癌。其已经成为我国愈来愈重视的慢性肝病问题。迄今, 对其治疗并没有特效药物, 且任何药物都不能取代生活方式的干预。活血祛湿方是已故国家级名老中医王文彦的经验方, 由山楂 30 g, 白术 20 g, 茯苓 20 g, 桂枝 10 g, 泽泻 20 g, 草决明 15 g, 红曲 15 g, 具有活血化瘀、利水渗湿的功效, 临床用于治疗 NASH, 获效者良多。前期的研究表明, 其加节食法对大鼠非酒精性脂肪肝模型有一定的治疗作用^[1], 对肝内胆汁淤积型大鼠有一定的治疗作用^[2]; 因此, 笔者以纯化高脂饲料喂养大鼠复制非酒精性脂肪性肝炎模型, 初步观察了不同剂量活血祛湿方的药效作用和机制。

1 材料

1.1 动物 健康雄性 Wistar 大鼠 60 只, 体重 130 ~ 150 g, 购自辽宁长生生物技术有限公司, 合格证号 SCXK (辽) 2010-0001, 饲养于辽宁中医药大学实验动物中心。

1.2 药物及试剂 活血祛湿方由山楂 30 g, 白术 20 g, 茯苓 20 g, 桂枝 10 g, 泽泻 20 g, 草决明 15 g, 红曲 6 g 组成, 购自辽宁中医药大学附属医院中药局, 所有药材经辽宁中医药大学附属医院李亚秋教授、主任药师鉴定, 所有药材均符合《中国药典》2010 年版规范要求。将各药物混合浸泡 1 h, 第 1 次加 8 倍量水煎煮 1 h, 第 2 次加 6 倍量水煎煮 1 h, 合并 2 次煎煮液, 质量浓度浓缩至 $2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 及 $0.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存备用。马来酸罗格列酮片

(文迪雅, 英国葛兰素史克公司, 批号 03080005)。肝功能、血脂、空腹血糖 (FBG) 以及空腹胰岛素 (FINS) 试剂盒 (南京建成生物制品研究所公司, 批号 20141104), 超氧化物歧化酶 (SOD) 和丙二醛 (MDA) 酶联免疫吸附检测 (ELISA) 试剂盒 (南京建成生物制品研究所公司, 批号 20141025), Trizol (美国 Invitrogen 公司, 批号 1382739), 过氧化物酶体增殖剂活化受体 α (PPAR α) mRNA 的扩增引物 (北京三博远志生物科技有限公司, 批号 20140916), 兔抗鼠细胞色素 P450₂E₁ (CYP₂E₁) 多克隆抗体和 DAB 显色试剂 (美国 Sigma 公司, 批号 20141013)。高脂纯化饲料 (MD45% 添加 0.5% 胆固醇) 购自江苏美迪森公司, 见表 1。

表 1 不同种类饲料主要成分及能量构成

类别	蛋白	碳水化合物	脂肪	胆固醇	微量元素
高脂纯化饲料	24/20	41/35	24/45	0.5/0	11/0
普通纯化饲料	19.2/20	67.3/70	4.3/10	0.2/0	1/0

1.3 仪器 7150 型全自动生化仪 (日本日立公司), GeneAmp5700Taq 型 PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司), ImageMaster VDS 凝胶图像分析仪 (美国 Pharmacia Biotech 公司)。

2 方法

2.1 模型制备 大鼠标准饲料饲养 1 周后随机分正常组 10 只和造模组 50 只, 造模参照文献 [3] 给予高脂纯化饲料 (MD45% 添加 0.5% 胆固醇) 8 周, 正常组给予普通饲料。

2.2 动物分组及给药方法 造模组大鼠随机分为活血祛湿方组高、中、低 3 个剂量组, 模型组和罗格

列酮组, 每组各 10 只。第 9 周开始, 按每公斤体重大鼠的给药量为人的 6.3 倍计算, 低剂量组给予活血祛湿方浓缩液按照 $8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 质量浓度 $0.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1} \text{ig}$; 中剂量组给予活血祛湿方浓缩液按照 $16 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 质量浓度 $1.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1} \text{ig}$; 高剂量组给予活血祛湿方浓缩液按照 $32 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 质量浓度 $2.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1} \text{ig}$; 罗格列酮组给予罗格列酮混悬液(按照 $0.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 药量给予 $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \text{ig}$; 正常组及模型组均给予等量生理盐水 ig 。

2.3 取材 给药 4 周后处死各组大鼠, 禁食、禁水 24 h 后 5% 水合氯醛 *ip* 麻醉后, 取腹主动脉血, 分离血清; 取出肝脏, 同一部位处取组织, 一部分浸入 4% 甲醛溶液中, 固定; 剩余部分放入磷酸盐缓冲液 (PBS) 缓冲液中, 迅速于低温下匀浆, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 吸取上清, $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰冻保存待测。

2.4 检测指标

2.4.1 一般情况 观察各组大鼠食欲行为、状态毛发及死亡情况。

2.4.2 血清学检测 采用比色法检测血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT), 天门冬氨酸氨基转移酶 (AST), 甘油三酯 (TG), 总胆固醇 (TC) 及高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C); 放射免疫法检测 FBG, FINS; ELISA 法检测炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 白细胞介素-10 (IL-10) 及 IL-6。

2.4.3 肝脏匀浆检测 按照试剂盒说明书进行检测 SOD 活性以及 MDA 含量。

2.4.4 病理学检查 肝组织甲醛中 48 h 以后梯度酒精脱水, 透明、包埋、切片。苏木素-伊红 (HE) 染色后二甲苯透明, 封固后 400 倍光镜下观察。非酒精性脂肪性肝病的病理组织学诊断参考 2011 年中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组修订的“非酒精性脂肪性肝病诊疗指南”, 其中脂肪变程度分 4 度 (F1 ~ F4); 炎症程度分为 4 级: G_0 (-),

G_1 (+), G_2 (++), G_3 (+++)。

2.4.5 采用 RT-PCR 法检测肝组织 PPAR α mRNA 表达 按试剂盒说明书操作, β -肌动蛋白 (β -actin) 作为内参, 引物序列见表 2。

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequences

引物	序列	长度/bp
PPAR α	上游 5' - AGCATCTGCAAAGCATGACTGTTGGCA -3'	174
	下游 5' - CCGCTCGAGGGCAGGGGAGGGGAATGGGAG -3'	
β -actin	上游 5' - TCAGGCTCATCACTATCGGCAAT -3'	132
	下游 5' - AAAGAAAGGCTGTA AACGCA -3'	

2.4.6 采用卵白素-生物素-酶复合物染色 (ABC) 法检测肝组织 CYP $_2E_1$ 含量及分布 按试剂盒说明书操作, 结果判定: 细胞中有棕黄色颗粒者为阳性细胞表达。

2.5 统计学分析 采用统计软件 SPSS 16.0 进行统计分析, 计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 同批次多组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况观察 正常组小鼠在实验过程中均活跃, 进食、生长正常, 皮毛整洁、光亮, 无死亡。模型组、活血祛湿方低剂量组小鼠则反应迟钝, 毛色晦暗, 体重明显增加。罗格列酮组以及活血祛湿方中、高剂量组小鼠活动度较好, 毛色逐渐改善。

3.2 对大鼠血清学的影响

3.2.1 对血清学生化指标的影响 与正常组比较, 模型组大鼠血清 ALT, AST, TC, TG, FBG, FINS 水平均明显升高, HDL-C 含量明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 活血祛湿方高、中剂量均能明显降低 ALT, AST, TC, TG, FBG, FINS 水平, 升高 HDL-C 含量 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 活血祛湿方对非酒精脂肪性肝炎大鼠血清学指标比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of Huoxue Qushi formula on serum biochemical indicators of NASH rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	ALT $/\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	AST $/\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	TC $/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	TG $/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	HDL-C $/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	FBG $/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	FINS $/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	32.33 ± 6.91	83.22 ± 12.40	0.97 ± 0.07	0.59 ± 0.14	1.57 ± 0.37	4.19 ± 1.37	7.35 ± 0.77
模型	-	$55.17 \pm 10.26^{1)}$	$120.83 \pm 24.60^{1)}$	$1.65 \pm 0.35^{1)}$	$1.23 \pm 0.17^{1)}$	$1.17 \pm 0.10^{1)}$	$11.98 \pm 1.52^{1)}$	$14.19 \pm 0.63^{1)}$
活血祛湿方	32	$36.63 \pm 14.77^{2)}$	$97.87 \pm 13.14^{2)}$	$1.07 \pm 0.24^{2)}$	$0.70 \pm 0.06^{2)}$	$1.39 \pm 0.44^{2)}$	$5.13 \pm 1.07^{2)}$	$7.22 \pm 1.53^{2)}$
	16	$42.12 \pm 10.59^{2)}$	$105.87 \pm 12.94^{2)}$	$1.22 \pm 0.54^{2)}$	$0.82 \pm 0.12^{2)}$	$1.28 \pm 0.39^{2)}$	$5.45 \pm 1.33^{2)}$	$7.56 \pm 1.29^{2)}$
	8	53.27 ± 9.32	125.79 ± 9.71	1.70 ± 0.21	1.19 ± 0.21	0.93 ± 0.21	10.97 ± 0.99	15.05 ± 0.71
罗格列酮	3×10^{-3}	$44.90 \pm 9.31^{2)}$	$110.10 \pm 14.65^{2)}$	$1.36 \pm 0.16^{2)}$	$0.90 \pm 0.05^{2)}$	1.05 ± 0.61	$5.37 \pm 0.88^{2)}$	$7.83 \pm 1.01^{2)}$

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 4 ~ 7 同)。

3.2.2 对血清 TNF- α , IL-10, IL-6 的影响 与正常组比较,模型组血清 TNF- α , IL-6 明显升高,IL-10 含量降低 ($P < 0.05$);与模型组比较,活血祛湿方高、中剂量组以及罗格列酮组明显降低大鼠血清 TNF- α , IL-6 含量,明显升高 IL-10 含量 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 活血祛湿方对非酒精脂肪性肝炎大鼠血清 TNF- α , IL-10, IL-6 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effects of Huoxue Qushi formula on serum TNF- α , IL-10, IL-6 of NASH rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	TNF- α	IL-10	IL-6
正常	-	76.53 \pm 15.43	75.88 \pm 10.37	106.09 \pm 25.70
模型	-	147.76 \pm 25.70 ¹⁾	28.74 \pm 6.55 ¹⁾	168.43 \pm 19.77 ¹⁾
活血祛湿方	32	91.77 \pm 20.01 ²⁾	59.31 \pm 15.09 ²⁾	129.25 \pm 21.30 ²⁾
	16	108.32 \pm 19.41 ²⁾	47.95 \pm 12.21 ²⁾	135.69 \pm 15.77 ²⁾
	8	143.67 \pm 33.81	30.97 \pm 7.02	173.02 \pm 19.83
罗格列酮	3 \times 10 ³	110.28 \pm 35.26 ²⁾	49.70 \pm 10.92 ²⁾	139.09 \pm 18.45 ²⁾

3.3 对大鼠肝脏匀浆 SOD, MDA 的影响 与正常组比较,模型组肝脏 SOD 活性明显降低,MDA 含量明显升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,活血祛湿方高、中剂量组明显升高肝脏 SOD 活性,降低 MDA 含量 ($P < 0.05$)。见表 5。

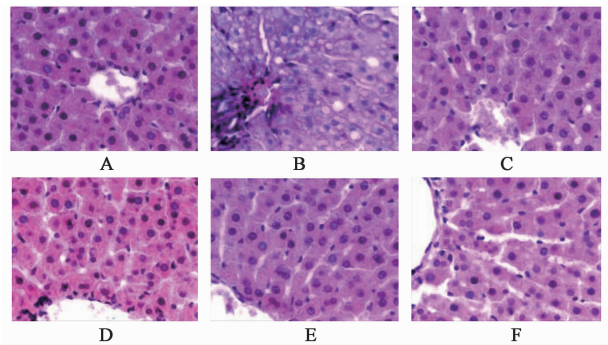
表 5 活血祛湿方对非酒精脂肪性肝炎大鼠肝脏 SOD 活性,MDA 含量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effects of Huoxue Qushi formula on SOD activity, MDA quantity of liver tissue in NASH rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	SOD /U·mg ⁻¹	MDA / μ mol·g ⁻¹
正常	-	42.76 \pm 7.55	0.44 \pm 0.19
模型	-	20.03 \pm 4.19 ¹⁾	2.17 \pm 0.31 ¹⁾
活血祛湿方	32	39.66 \pm 8.30 ²⁾	1.23 \pm 0.07 ²⁾
	16	30.27 \pm 6.60 ²⁾	1.99 \pm 0.27
	8	22.37 \pm 4.56	2.09 \pm 0.38
罗格列酮	3 \times 10 ⁻³	21.25 \pm 5.33	1.96 \pm 0.41

3.4 对非酒精脂肪性肝炎大鼠肝组织病理形态学的影响 正常组镜下可见肝脏组织结构正常,肝细胞排列规整,肝细胞大小均匀,中央静脉大小正常,肝细胞形态结构清晰,核膜完整,核仁清晰可见;模型组大鼠肝组织可见弥漫性肝细胞脂肪变 (F4),中央静脉和肝细胞形态、结构变形明显,肝细胞排列层次紊乱,肝细胞肿胀,胞浆内可见大小不等的脂肪空泡,肝细胞界限不清,有的部位核仁消失肝血窦变

小、有充血,可见大量成团的炎性细胞浸润 G₃ (卅),证明 NASH 造模成功;罗格列酮组可见肝细胞组织形态、结构有所恢复,肝细胞大小与模型组比较接近正常,肝细胞水肿现象减轻,小叶间仍有浸润的炎性细胞;活血祛湿方高剂量组可见肝细胞组织形态、结构,与模型组比较基本恢复,肝细胞排列层次较规则,肝细胞大小基本正常,形态、结构较清晰,肝细胞水肿明显改善,未见炎性细胞;活血祛湿方中、低剂量组可见肝细胞排列层次较规则,肝细胞大小基本正常,仍有肝细胞水肿,炎性细胞浸润。见图 1。



A. 正常组;B. 模型组;C. 罗格列酮 3 g·kg⁻¹组;D. 活血祛湿 8 g·kg⁻¹组;E. 活血祛湿 16 g·kg⁻¹组;F. 活血祛湿 32 g·kg⁻¹组 (图 2 ~ 3 同)

图 1 活血祛湿方对非酒精脂肪性肝炎大鼠肝组织病理形态学的影响 (HE, $\times 400$)

Fig.1 Effects of Huoxue Qushi formula on pathological structures of NASH rats liver tissues (HE, $\times 400$)

3.5 对肝脏 PPAR α mRNA 表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠肝脏 PPAR α mRNA 表达明显降低 ($P < 0.05$);罗格列酮组和活血祛湿方中、低剂量组明显增高大鼠肝脏 PPAR α mRNA 的表达 ($P < 0.05$)。见图 2,表 6。

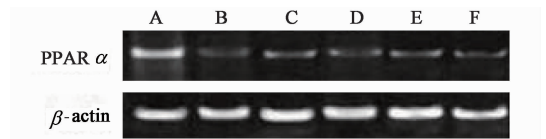


图 2 活血祛湿方对非酒精脂肪性肝炎大鼠肝组织 PPAR α mRNA 表达的影响

Fig. 2 Effects of Huoxue Qushi formula on PPAR α mRNA expression of liver tissue in NASH rats

3.6 对非酒精脂肪性肝炎大鼠肝脏 CYP₂E₁ 阳性表达区域面积的影响 正常组肝组织中央静脉边缘偶见少量淡黄色颗粒;模型组肝组织中央静脉边缘可见明显增多的棕黄色颗粒,并向周围弥散;药物干预各组肝组织内棕黄色颗粒与模型组比较减少,表

表 6 活血祛湿方对非酒精脂肪性肝炎大鼠肝脏 PPAR α mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 6 Effects of Huoxue Qushi formula on PPAR α mRNA expression of liver tissue in NASH rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	PPAR α mRNA
正常	-	0.54 ± 0.03
模型	-	0.15 ± 0.02 ¹⁾
活血祛湿方	32	0.16 ± 0.02
	16	0.30 ± 0.04 ²⁾
	8	0.35 ± 0.03 ²⁾
罗格列酮	3 × 10 ⁻³	0.32 ± 0.03 ²⁾

达强度减弱,其中高剂量组肝脏组织内棕黄色颗粒相对较少,表达强度较弱;中剂量组与罗格列酮组肝组织内棕黄色颗粒表达强度均高于高剂量组;低剂量组肝脏组织内可见广泛黄色颗粒,表达强于其它药物干预组。见图 3。与正常组比较,模型组大鼠肝脏 CYP₂E₁ 明显增加 ($P < 0.05$);罗格列酮组和活血祛湿方中、低剂量组大鼠肝脏 CYP₂E₁ 显著降低 ($P < 0.05$),低剂量组增高更为明显。见表 7。

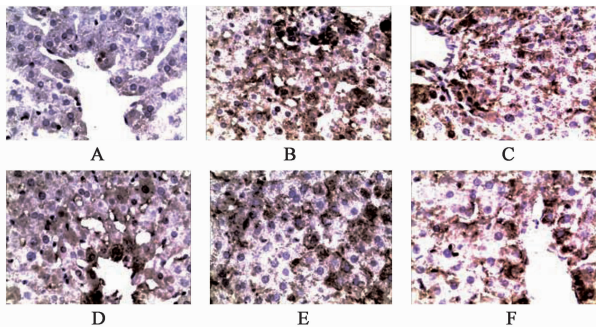


图 3 活血祛湿方对非酒精脂肪性肝炎大鼠肝脏 CYP₂E₁ 阳性表达区域面积的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 3 Effects of Huoxue Qushi formula on CYP₂E₁ positive expression of liver tissue in NASH rats (IHC, ×400)

表 7 活血祛湿方对非酒精脂肪性肝炎大鼠肝脏 CYP₂E₁ 阳性表达区域面积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 7 Effects of Huoxue Qushi formula on CYP₂E₁ positive expression of liver tissue in NASH rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	面积
正常	-	14.07 ± 6.90
模型	-	45.32 ± 11.79 ¹⁾
活血祛湿方	32	40.61 ± 9.37
	16	31.39 ± 8.54 ²⁾
	8	28.66 ± 7.13 ²⁾
罗格列酮	3 × 10 ⁻³	35.05 ± 10.02 ²⁾

4 讨论

1998 年, Day 等提出“二次打击”假设作为 NASH 发病机制予以解释。初次打击主要是胰岛素抵抗导致肝细胞脂肪变,形成单纯性脂肪肝。NASH 治疗的首要目标是改善胰岛素抵抗,罗格列酮可抑制外周脂肪组织分解,增加胰岛素敏感性,降低高胰岛素血症,临床上用于治疗 NASH。本实验以高脂纯化饲料诱导建立大鼠 NASH 模型,罗格列酮作为阳性药物对照,研究活血祛湿方的药效作用和机制。

王文彦临床 60 余年,将 NASH 归属于中医“肥气”、“痰浊”,王老认为其病机为肝失疏泄,脾失健运,精微不布,聚湿生痰,久则血行不畅,血脉瘀阻,湿瘀互结于肝脏,故独创活血祛湿方用于治疗 NASH,疗效颇佳。活血祛湿方中山楂、红曲活血化痰;白术、茯苓健脾祛湿;泽泻利水、草决明泄热通便,从二便分消水湿,诸药合用共奏活血祛湿功效。

PPARs 是一种较新的甾体激素类核转录因子,其中 PPAR α 在脂质代谢中占有重要地位—维持体内脂质代谢的动态平衡;促进肝脏对脂肪酸的摄取、转化及氧化利用^[4];减少机体脂肪含量及降低某些参与胰岛素抵抗(IR)的细胞因子合成,从而提高胰岛素敏感性、改善 IR^[5],如果缺失就会导致脂肪酸氧化减少或 IR 而导致 NASH^[6]。本实验中活血祛湿方可以降低大鼠空腹血糖以及空腹血清胰岛素,并增加大鼠肝脏中 PPAR α mRNA 表达。本实验提示,活血祛湿方改善胰岛素抵抗和增加 PPAR α mRNA 表达可能是其治疗 NASH 的机制之一。

CYP₂E₁ 为一类亚铁血红素蛋白的超家族酶系,对内、外源性物质的代谢失活或活化起关键作用,实验表明 CYP₂E₁ 的表达与羟自由基的生成有密切关系^[7]。羟自由基是脂质过氧化反应的启动剂,参与肝脏损害。高脂和 CYP₂E₁ 表达的增强,均可使脂质过氧化反应加剧,其终产物 MDA 的含量也升高。本实验中活血祛湿方可增加肝脏中 SOD 酶活性,减少肝脏 MDA 以及 CYP₂E₁ 含量,活血祛湿方能够提高肝组织抗氧化能力,缓解氧化应激,减少脂质过氧化反应的发生。本实验提示,该活血祛湿方减少脂质过氧化反应和减少肝 CYP₂E₁ 的含量可能是其治疗脂肪肝的机制之一。

TNF- α 是 NASH 发生发展过程中重要的促炎因子^[8]。其可活化 IL-6 和一些黏附分子,形成炎症瀑布反应,诱发肝脏炎症,加重脂肪变^[9]。IL-10 主要由 Th2 细胞和炎症部位的单核-巨噬细胞产生,其可

以抑制 NF- κ B 的活性间接抑制炎症反应、免疫反应等多种生物进程^[10]。本实验中,活血祛湿方能够降低血清中 TNF- α , IL-6 含量,增加肝脏中 IL-10 含量。本实验提示,活血祛湿方降低 TNF- α , IL-6 含量和增加肝脏中 IL-10 含量可能是其治疗脂肪肝的机制之一。

本实验通过多途径研究,明确了活血祛湿方的有效性,可将其广泛应用于临床,进一步发挥其作用。

[参考文献]

[1] 郑佳连,卢秉久,黄松. 活血祛湿方加节食法对大鼠非酒精性脂肪肝模型的影响[J]. 辽宁中医药大学学报,2015,17(10):29-32.

[2] 崔晶. 活血祛湿方对肝内胆汁淤积型大鼠的治疗作用研究[D]. 沈阳:辽宁中医药大学,2012.

[3] 周云枫,李沙,苏文,等. 不同脂肪含量的高脂纯化配方饲料对大、小鼠代谢综合征发生的影响[J]. 基础医学与临床,2012,32(3):274-277.

[4] Everett L, Galli A, Crabb D. The role of hepatic peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in health and disease[J]. Liver, 2000,20(3):191-199.

[5] McPherson R, Jones P H. The metabolic syndrome and

type 2 diabetes: role of the adipocyte [J]. Curr Opin Lipidol,2003,14(6):549-553.

[6] Rao M S, Reddy J K. Peroxisomal beta-oxidation and steatohepatitis [J]. Semin Liver Dis, 2001, 21 (1): 43-55.

[7] 邓利娟,李湛军,乐嘉静,等. 海狗油对非酒精性脂肪肝肝细胞色素 P4502E1 表达及与氧化抗氧化关系的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学,2004,9(7):755-758.

[8] Torre F, Rossol S, Pelli N, et al. Kinetics of soluble tumour necrosis factor (TNF)-alpha receptors and cytokines in the early phase of treatment for chronic hepatitis C: comparison between interferon (IFN)-alpha alone, IFN-alpha plus amantadine or plus ribavirin [J]. Clin Exp Immunol,2004,136(12):507-512.

[9] Ruan H, Lodish H F. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor-alpha [J]. Cytokine Growth Factor Rev,2003,22(14):447-455.

[10] Gonzalez-Quintela A, Dominguez-Santalla M J, Perez L F, et al. Influence of acute alcohol intake and alcohol withdrawal on circulating levels of IL-6, IL-8, IL-10 and IL-12 [J]. Cytokine,2000, 12(3):1437-1440.

[责任编辑 周冰冰]