

大鼠脂肪肝肝郁脾虚证的模型

孙晓倩^{1,2}, 孙蓉^{1*}

(1. 山东省中医药研究院, 济南 250014; 2. 山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] **目的:**建立适宜于抗脂肪肝肝郁脾虚证中药复方活性发现、药效评价、新药研发及中医方-证对应的病证结合动物模型。**方法:**根据中医病因病机的演变规律和现代临床病理机制的研究,建立适宜于脂肪肝肝郁脾虚证模型评价的证候积分表,并选择联苯双酯滴丸和三七脂肝丸作为模型反证药物,模型组大鼠每天按分组给予不同配比的高脂低蛋白饲料和不同浓度的乙醇,每周2次腹腔注射猪血清,联苯双酯滴丸组按 $8.1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 给药,三七脂肝丸组按 $2.7\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 给药,连续给药14 d。实验期间,观察大鼠的一般情况、体重、日食量、日水量,并进行中医证候积分,实验结束后,检测大鼠血清丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST), γ -谷氨酰转肽酶(γ -GT),总胆固醇(TC),甘油三酯(TG),低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C),高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)的含量,并对肝组织进行病理学检查。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠的体重、日食量、日饮水量增加缓慢,指标ALT,AST, γ -GT,TC,TG,LDL-C水平显著升高,HDL-C水平降低,病理学检查可见脂肪肝大鼠肝脏脂肪变性、脂肪粒,且行为学观察发现,大鼠出现的主证、次证均符合肝郁脾虚证的证候表现,表明3个模型组均造模成功,其中,模型1组有3只大鼠死亡,模型2组有1只大鼠死亡。反证药物组可不同程度改善上述病变表现。**结论:**脂肪肝肝郁脾虚证动物模型具有死亡率低、耗时短,可用于抗脂肪肝(肝郁脾虚证)中药复方活性发现、药效评价和临床方证相关性研究与机制探讨。

[关键词] 脂肪肝; 肝郁脾虚证; 动物模型; 毒性

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)10-0092-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017100092

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170308.0944.026.html>

[网络出版时间] 2017-03-08 9:44

Rat Models of Fatty Liver Due to Liver Depression and Spleen Deficiency

SUN Xiao-qian^{1,2}, SUN Rong^{1*}

(1. Shandong Academy of Chinese Medicine, Ji'nan 250014, China;

2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To establish animal models of fatty liver due to liver depression and spleen deficiency that were suitable for activity discovery of traditional Chinese medicine (TCM) compounds, efficacy evaluation, new drug research and development and correspondence between formula and syndrome of TCM. **Method:** A syndrome scoring table that was suitable for evaluating the rat models was established according to the evolution laws of etiology and pathogenesis of TCM and the modern clinical pathological mechanism. At the same time, bifendate pills and Sanqi Zhigan pills were selected as drug counterevidence for the models. Rats in model groups were given different proportions of high-fat and low-protein fodder and different concentrations of alcohol every day, and intraperitoneally injected with pig serum twice a week. Drug groups were given with respectively bifendate pills and Sanqi Zhigan pills ($8.1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $2.7\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) for 14 consecutive days. General status,

[收稿日期] 20161229(011)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09502-015);国家自然科学基金面上项目(81374059);山东省自主创新和成果转化项目(2014ZZCX02104);泰山学者工程专项经费项目(ts201511107)

[第一作者] 孙晓倩,在读硕士,从事中药药理与毒理研究,Tel:0531-82949843,E-mail:sunxiaolian1992@126.com

[通讯作者] *孙蓉,博士,研究员,从事中药药理与毒理研究,Tel:0531-82949843,E-mail:sunrong107@163.com

weight, daily appetite and water quantity of the animals were observed during the experiment, and TCM syndromes were scored. The levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), γ -glutamine transpeptidase (γ -GT), total cholesterol (TC), triglycerides (TG), low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C), and high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) in serum were detected. And the pathological changes of liver tissue were observed after the experiment. **Result:** Compared with normal group, body weight, daily food and water intake of rats increased slowly in model group, and the contents of ALT, AST, γ -GT, TC, TG and LDL-C increased significantly, while the level of HDL-C decreased. Pathological examination showed that fatty degeneration and fat granule were observed in hepatocytes of rats in model group. Behavioral observation found that main syndromes and minor symptoms of rats in model group conformed to the syndrome manifestation of liver depression and spleen deficiency, which suggested that the three model groups were established successfully. Among them, three rats died in model group 1, and one rat died in model group 2. All the above lesions manifestation can be alleviated by drug counterevidence. **Conclusion:** The animal model of fatty liver due to liver depression and spleen deficiency shows an obviously lower mortality and shorter duration, and can be used for research of correlation between prescription and syndrome and its mechanism.

[**Key words**] fatty liver; liver depression and spleen deficiency; animal model; toxicity

肝细胞中脂肪蓄积量超过肝湿重 5% 或者组织学上肝实质脂肪变 >30% 时称为脂肪肝^[1]。随着生活水平提高,饮食结构改变,脂肪肝的发病率迅速增加且发病年龄日趋年轻化,成为我国仅次于病毒性肝炎的第 2 大肝病^[2],严重危害了人类的健康发展。目前医学尚未有治疗脂肪肝的特效药物,而中药因其多成分、多靶点、多途径的特色,在防治脂肪肝方面取得了显著的疗效^[3]。脂肪肝应属中医“胁痛”、“积聚”、“胀满”、“痰浊”、“肥气”、“黄疸”、“癥瘕”等病的范畴^[4],肝郁脾虚证是脂肪肝的基本病机^[5],也是其主要的证型,在中医证候群中占 46.79%^[6]。目前国内外多采用高脂高糖饮食,四氯化碳(CCl₄) + 高脂饲料、乙醇刺激、乙醇 + 高脂等^[7-15]方法制备脂肪肝模型,其制备的模型均为单一的病理模型,无法与传统中医上的辨证论治相结合^[16],而病证结合动物模型作为中医理论和中药研究的基础一直倍受关注。实验室前期预实验采用高脂饮食加乙醇刺激制备脂肪肝肝郁脾虚证结合动物模型,结果发现乙醇体积分数、油脂比例过高会抑制动物的食量,进而导致动物死亡,成膜率低。基于上述结果,本研究对“乙醇体积分数”、“油脂比例”,“是否猪血清攻击”3 个造模因素进行优化,联苯双酯滴丸、三七脂肝丸作为反证药物,制备大鼠脂肪肝肝郁脾虚证结合动物模型,为中药复方抗脂肪肝活性发现、药效评价、新药研发和中医方-证对应研究提供实验模型。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 Wistar 大鼠 100 只,雄性,体重

160~200 g, 适龄、健康。购自山东大学实验动物中心,动物许可证号 SYXK(鲁)2014-0001。所有实验研究均符合中国伦理委员会有关动物研究指导原则。

1.2 药物及试剂 丙氨酸氨基转移酶(ALT)试剂盒,天冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂盒, γ -谷氨酰转肽酶(γ -GT)试剂盒,总胆固醇(TC)试剂盒,甘油三酯(TG)试剂盒,低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)试剂盒,高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20140526, 20140526, 20140331, 2014060017, 2014070022, 20140021, 20140016);三七脂肝丸(云南玉药生物制药有限公司,批号 20150101,成人每日口服 15 g,按等效剂量系数折算法计算,大鼠以等效剂量的 2 倍量作为给药剂量,即 2.7 g·kg⁻¹);联苯双酯滴丸(北京协和药厂,批号 13040101,成人每日口服最高量为 45 mg,按等效剂量系数折算法计算,大鼠以等效剂量的 2 倍量作为给药剂量,即 8.1 g·kg⁻¹);胆固醇(上海源聚生物科技有限公司);猪血清(上海亿欣生物科技有限公司,批号 20131214);食用乙醇为市售红星二锅头。

1.3 仪器 Multiskan Go-1510 型全波长酶标仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司],AL104 型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司],TDZ5-WS 型台式低速离心机[湘仪(湖南)离心机仪器有限公司],DZKM-S-6 型电热恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器厂)。

2 方法

2.1 实验分组及给药 将 100 只实验大鼠适应性

喂养 3 d 后随机分为 10 组,分别为正常组、模型 1 ~ 3 组、联苯双酯滴丸 1 ~ 3 组、三七脂肝丸 1 ~ 3 组,每组 10 只。造模开始,阳性药组分别灌胃(*ig*)联苯双酯滴丸 8.1 mg·kg⁻¹,三七脂肝丸组 2.7 g·kg⁻¹,正常组 *ig* 等体积的蒸馏水,各组均按 10 mL·kg⁻¹ 给药,连续 2 周。

2.2 造模方法 常规造模方法参照文献[17],模型 1 组及阳性药 1 组饲以由 79.5% 单纯玉米粉 + 20% 猪油 + 0.5% 胆固醇制成的高脂低蛋白饲料 + 30% 乙醇。改良造模方法 1:模型 2 组及阳性药 2 组饲以由 79.5% 单纯玉米粉 + 20% 猪油 + 0.5% 胆固醇制成的高脂低蛋白饲料,第 1,2 周分别 *ig* 10%,5% 乙醇。改良造模方法 2:模型 3 组及阳性药 3 组饲以由 89.5% 单纯玉米粉 + 10% 猪油 + 0.5% 胆固醇制成的高脂低蛋白饲料,并 *ig* 乙醇,浓度同模型 2 组,各组大鼠腹腔注射(*ip*)新鲜猪血清 0.5 mL,每周 2 次,连续 2 周。

2.3 适宜于动物模型评价的脂肪肝肝郁脾虚证诊疗指标抽提 脂肪肝的临床症状表现为乏力、食欲不振,恶心口苦,腹泻,体征表现为右上腹不适,肝区隐痛,并伴有肝脏肿大,少数患者有脾脏肿大,血 ALT,AST 水平升高,肝细胞出现脂肪变性、脂肪粒等现象^[18]。脂肪肝对应的肝郁脾虚证证候诊断标准分为主证和次证^[19],主证为胁肋胀痛、腹胀、食少纳呆、便溏、舌淡红或舌淡。次证为脘腹痞闷、乏力、情绪抑郁或急躁易怒,脉弦或细。而目前尚无公认的中医脂肪肝肝郁脾虚证动物模型的诊断标准。

基于上述标准,本研究从 3 个方面来验证脂肪肝肝郁脾虚证模型的建立,①通过症状和体征,主证为精神状态、舌质、腹胀、饮食、饮水、大便;次证为眼睛、毛色、尾部等建立大鼠证候积分评价量表(表 1)。②血清 ALT,AST, γ -GT,TG,TC,HDL-C,LDL-C 水平变化。③肝脏病理组织脂肪特殊染色观察。

2.4 观测指标 于造模的第 0,1,5,9,14 天,观察动物的一般情况、体重、日食量、日水量,对大鼠症状积分,第 14 天处死大鼠,取血,室温放置,3 500 r·min⁻¹ 离心 10 min,取血清,冰箱 - 20 ℃ 保存,待测 ALT,AST,TG,TC,LDL-C,HDL-C,按试剂盒说明书进行操作;取肝、脾、胸腺,称质量,并计算脏器系数。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 11.5 统计软件处理,各组指标数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据用计量资料先进行正态检验,正态分布资料采用单因素方差分析,非正态分布资料先转换成正态分布再用单因素方差分析。进行组间比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 脂肪肝肝郁脾虚证中医证候积分评价量表

Table 1 Fatty liver (liver depression with spleen insufficiency) of traditional Chinese medicine (TCM) syndrome scores rating scales

证候项目	评分标准	评分
精神状态	正常:活动迅速,眼光有神	0
	轻度异常:怠动,自发活动减少	1
	中度异常:精神倦怠	2
	明显异常:腹卧,攻击行为明显减少	3
眼睛	红亮有神	0
	淡红	1
	深红	2
	暗红	3
舌质	淡红	0
	暗红	1
	暗红偏紫	2
	青紫有瘀斑、舌淡	3
尾部瘀斑	无瘀斑	0
	出现轻度瘀斑	1
	出现中度瘀斑	2
	出现重度瘀斑	3
腹部	无变化	0
	稍肿胀	1
	中度肿胀	2
	明显肿胀	3
毛	白色,均匀细密,柔顺	0
	白中稍有黄色,稍乱,稍干燥	1
	白中伴大部分黄色,乱,干燥	2
	满目皆有黄色,毛躁	3
食水	无变化	0
	略有减少	1
	减少	2
	不进食水	3
粪便	正常:大便成形,粪质柔软	0
	轻度异常:粪便稀溏,少部分不成形	1
	中度异常:粪便稀溏,部分不成形	2
	明显异常:粪便稀溏,完全不成形	3

3 结果

3.1 一般情况观察 实验过程中,正常组大鼠未见明显异常;模型组大鼠出现活动减少,食欲减退,急躁易怒,舌淡,腹部肿胀,毛色发黄,尾部有少许瘀斑,便溏等症状。造模结束后,模型 1,2 组分别有 3,1 只大鼠死亡。与正常组比较,第 5 天,模型 1 ~ 3 组大鼠的证候积分显著升高 ($P < 0.01$);第 9,14

天,模型 1~3 组大鼠的证候积分显著升高 ($P < 0.01$)。与模型 1 组比较,第 5 天,联苯双酯滴丸 3 组,三七脂肝丸 3 组大鼠的证候积分降低 ($P < 0.05$);第 9 天,模型 3 组,联苯双酯滴丸 1~3 组,三七脂肝丸 1~2 组大鼠的证候积分降低 ($P < 0.05$),三七脂肝丸 3 组大鼠的证候积分降低 ($P < 0.01$);

第 14 天,模型 3 组,联苯双酯滴丸 1~2 组,三七脂肝丸 1~2 组大鼠的证候积分降低 ($P < 0.05$),联苯双酯滴丸 3 组,三七脂肝丸 3 组大鼠的证候积分降低 ($P < 0.01$)。见表 2。证候积分变化及阳性对照药的结果,提示造模 14 d 动物出现脂肪肝(肝郁脾虚证)的症状表现。

表 2 复合因素对脂肪肝肝郁脾虚证大鼠证候积分的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	第 1 天	第 5 天	第 9 天	第 14 天
正常	-	10	0	0.1 ± 0.3	0.1 ± 0.3	0.1 ± 0.3
模型 1	-	7	0.4 ± 0.5	4.0 ± 1.2 ²⁾	5.5 ± 1.3 ²⁾	7.1 ± 1.4 ²⁾
联苯双酯滴丸 1	8.1 × 10 ⁻³	10	0.3 ± 0.4	3.1 ± 1.2	3.6 ± 1.2 ³⁾	4.6 ± 1.6 ^{2,3)}
三七脂肝丸 1	2.7	10	0.3 ± 0.4	2.6 ± 0.6	3.5 ± 1.0 ³⁾	4.1 ± 1.0 ^{2,3)}
模型 2	-	9	0.4 ± 0.5	3.4 ± 0.6 ²⁾	5.0 ± 1.3 ²⁾	6.0 ± 0.9 ²⁾
联苯双酯滴丸 2	8.1 × 10 ⁻³	10	0.3 ± 0.4	2.5 ± 0.8	3.5 ± 0.8 ³⁾	4.2 ± 1.2 ³⁾
三七脂肝丸 2	2.7	10	0.3 ± 0.4	2.3 ± 0.9	3.4 ± 0.7 ³⁾	4.0 ± 1.1 ³⁾
模型 3	-	10	0.3 ± 0.4	2.7 ± 1.1 ²⁾	3.9 ± 1.1 ^{2,3)}	4.7 ± 1.1 ^{2,3)}
联苯双酯滴丸 3	8.1 × 10 ⁻³	10	0.3 ± 0.4	2.2 ± 1.0 ³⁾	3.0 ± 0.8 ³⁾	3.8 ± 0.7 ⁴⁾
三七脂肝丸 3	2.7	10	0.2 ± 0.3	2.0 ± 1.0 ³⁾	2.7 ± 0.6 ⁴⁾	3.4 ± 0.6 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型 1 组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 3~7 同)。0 d 均为 0 分。

3.2 复合因素对脂肪肝肝郁脾虚证大鼠体重的影响 与正常组比较,第 9 天,模型 1~3 组大鼠体重均明显降低 ($P < 0.01$);第 14 天,模型 1~3 组大鼠体重显著降低 ($P < 0.01$)。与模型 1 组比较,第 9 天,联苯双酯滴丸 1~3 组,三七脂肝丸 1~2 组大

鼠体重升高 ($P < 0.05$),三七脂肝丸 3 大鼠体重升高 ($P < 0.01$);第 14 天,模型 3 组,联苯双酯滴丸 1~2 组和三七脂肝丸 1~2 组大鼠体重升高 ($P < 0.05$),联苯双酯滴丸 3 组,三七脂肝丸 3 组大鼠体重升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 3。

表 3 复合因素对脂肪肝肝郁脾虚证大鼠体重的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	0 d	第 1 天	第 5 天	第 9 天	第 14 天
正常	-	10	186.6 ± 18.7	195.4 ± 14.8	214.6 ± 15.0	251.4 ± 21.5	292.6 ± 17.6
模型 1	-	7	186.3 ± 8.4	191.2 ± 8.4	195.2 ± 8.6	212.4 ± 10.7 ²⁾	217.9 ± 12.3 ²⁾
联苯双酯滴丸 1	8.1 × 10 ⁻³	10	186.4 ± 9.5	193.4 ± 10.3	197.6 ± 10.3	228.7 ± 8.5 ³⁾	242.9 ± 12.0 ³⁾
三七脂肝丸 1	2.7	10	186.9 ± 9.3	193.5 ± 11.0	198.9 ± 10.7	230.7 ± 13.7 ³⁾	244.3 ± 11.8 ³⁾
模型 2	-	9	186.5 ± 8.9	192.5 ± 14.9	200.8 ± 17.1	216.9 ± 16.0 ²⁾	226.3 ± 24.2 ²⁾
联苯双酯滴丸 2	8.1 × 10 ⁻³	10	186.8 ± 18.2	193.7 ± 15.2	207.7 ± 14.2	230.7 ± 20.6 ³⁾	252.7 ± 24.0 ³⁾
三七脂肝丸 2	2.7	10	186.6 ± 17.4	194.3 ± 14.1	209.5 ± 15.4	233.7 ± 22.1 ³⁾	254.2 ± 24.7 ³⁾
模型 3	-	10	186.8 ± 12.1	193.5 ± 11.0	205.6 ± 15.4	222.0 ± 18.6 ²⁾	235.4 ± 20.2 ^{2,3)}
联苯双酯滴丸 3	8.1 × 10 ⁻³	10	186.2 ± 14.5	194.3 ± 15.5	212.6 ± 15.0	240.8 ± 23.8 ³⁾	269.9 ± 25.2 ⁴⁾
三七脂肝丸 3	2.7	10	186.4 ± 13.5	194.7 ± 15.6	214.7 ± 15.3	242.7 ± 20.2 ⁴⁾	270.6 ± 26.1 ⁴⁾

3.3 复合因素对脂肪肝肝郁脾虚证大鼠日食量、饮水量的影响 与正常组比较,第 5 天,模型 1~3 组大鼠日食、水量明显降低 ($P < 0.05$);第 9 天,模型 1~3 组大鼠日食、水量明显降低 ($P < 0.05$);第 14 天,模型 1~3 组大鼠日食、水量明显降低 ($P < 0.01$)。与模型 1 组比较,第 5 天,联苯双酯滴丸

3 组,三七脂肝丸 3 组大鼠日食、水量明显降低 ($P < 0.05$);第 9 天,联苯双酯滴丸 1~3 组,三七脂肝丸 1~3 组大鼠日食、水量明显降低 ($P < 0.05$);第 14 天,联苯双酯滴丸 2~3 组,三七脂肝丸 2~3 组大鼠日食、水量明显降低 ($P < 0.05$)。见表 4,5。

表 4 复合因素对脂肪肝肝郁脾虚证大鼠日食量的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of multi-factors on daily appetite in fatty liver with liver Depression and spleen deficiency model rats($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	0 d	第 1 天	第 5 天	第 9 天	第 14 天
正常	-	10	19.7 ± 0.7	20.1 ± 0.4	20.5 ± 0.6	21.6 ± 0.9	22.2 ± 0.8
模型 1	-	7	19.9 ± 0.2	18.7 ± 0.8	15.0 ± 0.1 ¹⁾	15.0 ± 0.1 ²⁾	15.6 ± 0.5 ²⁾
联苯双酯滴丸 1	8.1 × 10 ⁻³	10	19.9 ± 1.3	19.2 ± 0.1	16.2 ± 0.2	16.5 ± 0.2 ³⁾	17.3 ± 0.2
三七脂肝丸 1	2.7	10	19.8 ± 1.0	19.3 ± 0.2	16.4 ± 0.4	16.9 ± 0.3 ³⁾	18.0 ± 0.4
模型 2	-	9	19.6 ± 0.6	18.9 ± 0.2	15.5 ± 0.5 ¹⁾	15.3 ± 0.6 ²⁾	15.7 ± 0.4 ²⁾
联苯双酯滴丸 2	8.1 × 10 ⁻³	10	19.7 ± 0.5	19.4 ± 0.4	16.6 ± 0.4	17.0 ± 0.4 ³⁾	18.3 ± 0.5 ³⁾
三七脂肝丸 2	2.7	10	19.7 ± 0.6	19.5 ± 0.5	16.9 ± 0.4	17.4 ± 0.5 ³⁾	19.0 ± 0.6 ³⁾
模型 3	-	10	19.9 ± 0.6	19.4 ± 0.2	16.0 ± 0.3 ¹⁾	15.8 ± 0.4 ²⁾	16.5 ± 0.6 ²⁾
联苯双酯滴丸 3	8.1 × 10 ⁻³	10	19.3 ± 1.3	19.5 ± 0.2	17.1 ± 0.2 ³⁾	17.3 ± 0.3 ³⁾	18.9 ± 0.2 ³⁾
三七脂肝丸 3	2.7	10	19.5 ± 1.0	19.4 ± 0.3	17.5 ± 0.4 ³⁾	17.8 ± 0.5 ³⁾	19.3 ± 0.5 ³⁾

表 5 复合因素对脂肪肝肝郁脾虚证大鼠日水量的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Effect of multi-factors on daily water intake in fatty liver with liver depression and spleen deficiency model rats($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	0 d	第 1 天	第 5 天	第 9 天	第 14 天
正常	-	10	29.7 ± 0.7	30.1 ± 1.6	30.7 ± 1.1	31.6 ± 0.9	32.9 ± 1.4
模型 1	-	7	29.9 ± 0.3	29.2 ± 0.1	24.4 ± 0.1 ¹⁾	24.3 ± 0.0 ²⁾	23.8 ± 0.5 ²⁾
联苯双酯滴丸 1	8.1 × 10 ⁻³	10	30.0 ± 1.4	29.3 ± 0.8	25.5 ± 0.4	26.0 ± 0.7 ³⁾	26.9 ± 1.0
三七脂肝丸 1	2.7	10	29.6 ± 1.1	29.3 ± 0.7	25.9 ± 0.9	26.5 ± 0.8 ³⁾	27.4 ± 1.1
模型 2	-	9	30.0 ± 0.5	29.3 ± 0.5	24.9 ± 0.7 ¹⁾	24.6 ± 1.3 ²⁾	25.0 ± 0.9 ²⁾
联苯双酯滴丸 2	8.1 × 10 ⁻³	10	29.9 ± 1.5	29.6 ± 0.8	26.2 ± 0.7	26.3 ± 0.8 ³⁾	27.1 ± 1.2 ³⁾
三七脂肝丸 2	2.7	10	29.7 ± 0.9	29.7 ± 0.9	26.9 ± 0.8	27.4 ± 1.0 ³⁾	28.3 ± 1.1 ³⁾
模型 3	-	10	30.1 ± 1.0	29.5 ± 0.5	25.5 ± 0.7 ¹⁾	25.2 ± 1.4 ²⁾	25.8 ± 1.2 ²⁾
联苯双酯滴丸 3	8.1 × 10 ⁻³	10	30.1 ± 0.8	29.9 ± 0.2	26.9 ± 0.8 ³⁾	27.3 ± 0.9 ³⁾	28.4 ± 1.3 ³⁾
三七脂肝丸 3	2.7	10	29.7 ± 1.1	29.9 ± 0.5	27.5 ± 1.1 ³⁾	27.9 ± 0.5 ³⁾	29.3 ± 1.5 ³⁾

3.4 复合因素对脂肪肝肝郁脾虚证大鼠血生化指标的影响 与正常组比较,模型 1~3 组 ALT, AST, TC, TG, γ -GT 水平显著升高($P < 0.01$),模型 1,2 组,模型 3 组 LDL-C 水平明显升高($P < 0.01$),模型 1 组,模型 2~3 组 HDL-C 水平明显降低($P < 0.01$)。与模型 1 组比较,模型 3 组 ALT, TC, TG, LDL-C 水平降低($P < 0.05$);联苯双酯滴丸 1 组,三七脂肝丸 1 组 ALT, AST, γ -GT 水平降低($P < 0.05$),联苯双酯滴丸 2~3 组,三七脂肝丸 2 组各指标水平明显改变($P < 0.01$),三七脂肝丸 3 组各指标水平显著改变($P < 0.01$)。见表 6。结果表明脂肪肝模型造模成功,模型组大鼠血液生化指标变化明显,阳性药组能显著改善大鼠的生化指标水平,且三七脂肝丸效果优于联苯双酯滴丸。

3.5 复合因素对脂肪肝肝郁脾虚证大鼠脏器系数的影响 与正常组比较,模型 1~3 组大鼠的肝系数、胸腺系数、脾系数显著升高($P < 0.01$)。与模型 1 组比较,联苯双酯滴丸 1~3 组,三七脂肝丸 1,2 组大鼠的肝系数、胸腺系数、脾系数降低($P < 0.05$),三七脂肝丸 3 组大鼠的肝系数、胸腺系数、脾系数明显降低($P < 0.01$)。见表 7。

3.6 复合因素对脂肪肝肝郁脾虚证大鼠肝脏病理组织脂肪特殊染色观察的影响 正常组大鼠肝脏颜色褐红、鲜艳,包膜完整、光滑,边缘锐利,肝细胞内无脂肪粒,无变性、坏死;模型组大鼠肝脏肿大,颜色略黄、饱满,包膜紧张、有油腻感觉,边缘圆钝,质地正常或稍硬,肝内有大量橘红色的脂肪粒;联苯双酯滴丸组,三七脂肝丸组大鼠肝脏有明显改善,肝内脂肪粒数明显减少。见图 1。

表 6 复合因素对脂肪肝肝郁脾虚证大鼠血清生化指标的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Effect of multi-factors on serum biochemical indicators in fatty liver with liver depression and spleen deficiency model rats($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	ALT /U·L ⁻¹	AST /U·L ⁻¹	TC /mol·L ⁻¹	TG /mol·L ⁻¹	HDL-C /mmol·L ⁻¹	LDL-C /mmol·L ⁻¹	γ-GT /U·L ⁻¹
正常	-	10	42.8 ± 5.2	112.8 ± 5.9	1.5 ± 0.22	0.9 ± 0.07	1.9 ± 0.05	1.2 ± 0.20	36.0 ± 4.5
模型	-	7	104.2 ± 9.1 ²⁾	197.1 ± 18.4 ²⁾	3.3 ± 0.37 ²⁾	2.0 ± 0.10 ²⁾	1.2 ± 0.05 ²⁾	2.2 ± 0.20 ²⁾	86.1 ± 7.9 ²⁾
联苯双酯滴丸 1	8.1 × 10 ⁻³	10	69.5 ± 7.6 ³⁾	151.1 ± 14.9 ³⁾	2.7 ± 0.18	1.5 ± 0.20	1.6 ± 0.10	1.8 ± 0.13	56.4 ± 3.7 ³⁾
三七脂肝丸 1	2.7	10	67.7 ± 6.9 ³⁾	147.7 ± 13.8 ³⁾	2.6 ± 0.15	1.4 ± 0.18	1.6 ± 0.09	1.7 ± 0.12	55.4 ± 3.4 ³⁾
模型 2 组	-	9	98.5 ± 6.2 ²⁾	185.3 ± 20.0 ²⁾	2.9 ± 0.21 ²⁾	1.8 ± 0.17 ²⁾	1.4 ± 0.06 ²⁾	1.9 ± 0.22 ²⁾	83.7 ± 9.5 ²⁾
联苯双酯滴丸 2	8.1 × 10 ⁻³	10	58.9 ± 4.2 ³⁾	144.1 ± 15.4 ³⁾	2.4 ± 0.68 ³⁾	1.4 ± 0.17 ³⁾	1.6 ± 0.10	1.5 ± 0.16 ³⁾	48.8 ± 5.7 ³⁾
三七脂肝丸 2	2.7	10	56.4 ± 4.6 ³⁾	141.9 ± 12.9 ³⁾	2.3 ± 0.59 ³⁾	1.3 ± 0.14 ³⁾	1.7 ± 0.08 ³⁾	1.4 ± 0.14 ³⁾	47.1 ± 4.6 ³⁾
模型 3	-	10	91.1 ± 4.8 ^{2,3)}	181.1 ± 14.0 ²⁾	2.6 ± 0.29 ^{2,3)}	1.6 ± 0.24 ^{2,3)}	1.4 ± 0.06 ²⁾	1.7 ± 0.20 ^{2,3)}	74.8 ± 7.0 ²⁾
联苯双酯滴丸 3	8.1 × 10 ⁻³	10	55.3 ± 5.0 ³⁾	122.3 ± 12.7 ³⁾	2.2 ± 0.28 ³⁾	1.3 ± 0.19 ³⁾	1.7 ± 0.04 ³⁾	1.3 ± 0.13 ⁴⁾	45.7 ± 3.4 ³⁾
三七脂肝丸 3	2.7	10	53.8 ± 4.7 ⁵⁾	120.5 ± 11.6 ⁴⁾	2.0 ± 0.23 ⁴⁾	1.1 ± 0.13 ⁴⁾	1.8 ± 0.04 ⁴⁾	1.2 ± 0.10 ⁴⁾	44.0 ± 2.8 ⁴⁾

表 7 复合因素对脂肪肝肝郁脾虚证大鼠脏器比值的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 7 Effect of multi-factors on organ/weight ratio in fatty liver with liver depression and spleen deficiency model rats($\bar{x} \pm s$) %

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	肝系数	胸腺系数	脾系数
正常	-	10	2.69 ± 0.02	0.30 ± 0.02	0.12 ± 0.01
模型 1	-	7	5.30 ± 0.69 ³⁾	0.49 ± 0.04 ³⁾	0.21 ± 0.01 ³⁾
联苯双酯滴丸 1	8.1 × 10 ⁻³	10	3.98 ± 0.45 ⁴⁾	0.42 ± 0.07 ⁴⁾	0.17 ± 0.02 ⁴⁾
三七脂肝丸 1	2.7	10	3.86 ± 0.35 ⁴⁾	0.40 ± 0.06 ⁴⁾	0.16 ± 0.03 ⁴⁾
模型 2	-	9	4.96 ± 0.67 ³⁾	0.46 ± 0.04 ³⁾	0.20 ± 0.02 ³⁾
联苯双酯滴丸 2	8.1 × 10 ⁻³	10	3.60 ± 0.71 ⁴⁾	0.38 ± 0.06 ⁴⁾	0.16 ± 0.03 ⁴⁾
三七脂肝丸 2	2.7	10	3.52 ± 0.54 ⁴⁾	0.35 ± 0.05 ⁴⁾	0.15 ± 0.02 ⁴⁾
模型 3	-	10	4.51 ± 0.69 ^{3,4)}	0.43 ± 0.07 ^{3,4)}	0.18 ± 0.03 ^{3,4)}
联苯双酯滴丸 3	8.1 × 10 ⁻³	10	3.04 ± 0.32 ⁴⁾	0.34 ± 0.06 ⁴⁾	0.15 ± 0.03 ⁴⁾
三七脂肝丸 3	2.7	10	2.89 ± 0.29 ⁵⁾	0.32 ± 0.04 ⁵⁾	0.14 ± 0.02 ⁵⁾

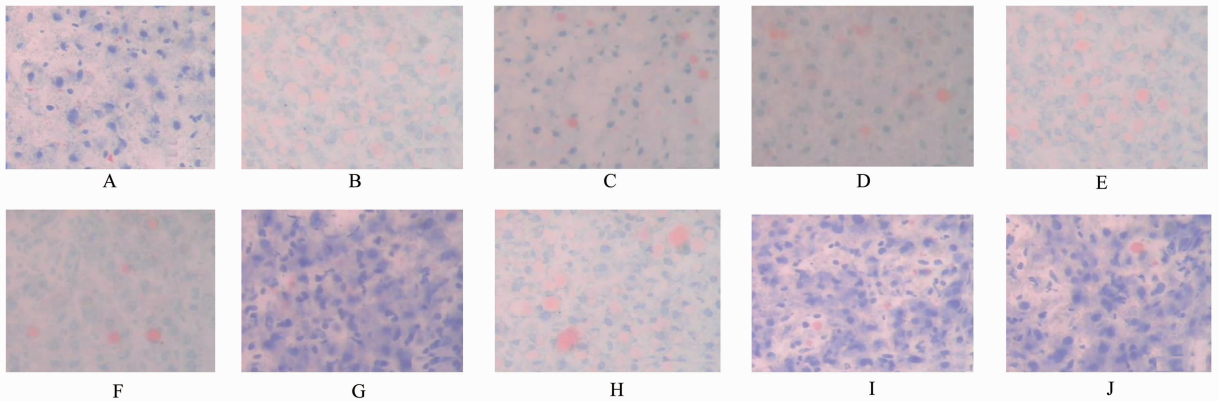


图 1 复合因素对脂肪肝肝郁脾虚证大鼠肝脏损伤程度的影响(脂肪特殊染色, ×400)

Fig.1 Effect of multi-factors on histopathologic photographs in fatty liver with liver depression and spleen deficiency model rats (special staining method of fat cell, ×400)

4 讨论

脂肪肝发生与饮食不节,或过食肥甘厚味,或饮酒过度,或感受湿热疫毒,或情志不畅,进而导致肝失疏泄,脾失健运,肾气失充,湿热内蕴,痰浊郁结,瘀血阻滞而最终形成湿痰瘀痹阻互结于肝脏络脉形

成脂肪肝^[15],肝郁脾虚证是其常见证型。因此,本研究采用高脂、乙醇、猪血清制备脂肪肝肝郁脾虚证。通过观察大鼠死亡情况、饮食饮水、证候变化情况、血清相关指标变化、肝组织病理情况,同时采用治疗肝郁脾虚证的三七脂肝丸及治疗脂肪肝的常用

药物联苯双酯滴丸进行反证治疗,观察药物改善指标变化的灵敏度,以确定模型建立成功与否。

研究结果显示,大鼠症状体征变化情况与拟定诊断标准基本一致,与正常组比较,模型组大鼠体重增长缓慢,日食量、日水量也有所减少。肝脏肿大,边缘圆钝、质地正常或稍硬,有油腻感觉,血生化指标检测显示,ALT,AST, γ -GT,TC,TG,LDC-C 指标显著上升,HDL-C 水平降低,肝脏组织病理检查发现,肝内有大量橘红色的脂肪粒,说明造模成功。实验期间,模型 1 组大鼠死亡率达到 30%,模型 2 组大鼠死亡率达到 10%,大鼠死亡可能与高脂低蛋白饲料中猪油含量以及乙醇浓度过高,加之猪血清共同刺激,导致造模过度,引起大鼠死亡,因此,模型 3 组的造模方法是最佳造模方法,具有死亡率低,成模率高的优点。与模型组比较,阳性药组大鼠的体征明显改善,体重、日食量、日水量增加,ALT,AST, γ -GT,TC,TG,LDC-C 水平降低,HDL-C 水平升高,肝组织脂肪粒减少,具有统计学意义。2 个反证药物组相比较,三七脂肝丸组对大鼠的症状、体重、饮食饮水,血生化指标值、病理变化程度以及脏器系数的改善程度优于联苯双酯滴丸组,通过上述结果分析,优化有的模型 3 组具有成模周期短、成活率高,且与中医临床上脂肪肝肝郁脾虚证患者的病因,证候特点较为贴切的病证结合动物模型,适用于中药复方的后期研究。

因此,本研究在考察高脂、乙醇、猪血清 3 个因素对大鼠脂肪肝肝郁脾虚证模型影响的基础上,通过优化高脂饲料配比,降低乙醇浓度,是否给予猪血清攻击,建立一个成模周期短、成活率高,与中医临床脂肪肝肝郁脾虚证患者症状体征变化相适应的病证结合动物模型,为后期中药复方抗脂肪肝肝郁脾虚证活性发现、药效评价、新药研发和中医方-证研究奠定基础。

[参考文献]

[1] 胡克章,黄正明.脂肪肝的发病机制与防治[J].解放军药学报,2008,24(5):433-436.
[2] 李泽鹏,池晓玲,周晓玲,等.基于古籍整理的脂肪肝历代方药证治分析[J].中华中医药杂志,2016,31(10):4307-4308.
[3] 何佳,卢秉久.基于现代文献的中药复方防治脂肪肝用药规律探究[J].辽宁中医杂志,2016,43(7):1364-1367.
[4] 程华焱,曾斌芳.脂肪肝中医病名的文献研究[J].新

疆中医药,2008,26(6):12-14.

[5] 乔娜丽,杨钦河,纪桂元,等.论肝郁脾虚是脂肪肝的基本发病病机[J].时珍国医国药,2008,19(5):1238-1239.
[6] 吕英,吕建阳,王新月.156 例脂肪肝的中医证候学研究[J].北京中医药大学学报,2007,30(6):427-429,432.
[7] 常珊珊,周丹,孟国梁,等.灵芝多糖对高脂性脂肪肝大鼠氧化应激的影响[J].中国中药杂志,2012,37(20):3102-3106.
[8] 陈妍,缪娟,高宏.欧芹根对非乙醇性脂肪肝大鼠的有效成分及机制研究[J].陕西医学杂志,2016,45(9):1112-1113.
[9] 侯天禄,成扬,陈建杰.苍菊清肝降脂方对大鼠脂肪肝保护作用的研究[J].中国中西医结合消化杂志,2015,23(7):449-452.
[10] 黄强,吴春明,陈靓.加味四逆散对大鼠乙醇性脂肪肝的实验研究[J].中华中医药学刊,2016(11):2768-2770.
[11] Lieber C S,Decarli L M. The feeding of ethanol in liquid diets [J]. Alcohol Clin Exp Res, 1986, 10(5):550-553.
[12] Yokoyama H,Nagata S,Moriya S, et al. Hepatic fibrosis produced in guinea pigs by chronic ethanol administration and immunization with acetaldehyde adducts [J]. Hepatology,1995,21(5):1438-1442.
[13] Tsukamoto H,Horne W,Kamimura S, et al. Experimental liver cirrhosis induced by alcohol and iron [J]. Clin Inves,1995,96(1):620-630.
[14] 王建敏,李伟,刘江.西红花酸改善大鼠乙醇性脂肪肝作用机制研究[J].河北中医,2014,36(11):1703-1706.
[15] 王瑶,杨彪,李卓.蜂胶对大鼠实验性脂肪肝的疗效及其机制[J].山西医科大学学报,2016,47(8):693-697.
[16] 侯艺鑫,王宪波,杨玉英,等.中医药防治非乙醇性脂肪性肝病的作用机制[J].临床肝胆病杂志,2016,32(4):785-789.
[17] 魏伟,吴希美,李元建.药理实验方法学[M].4版.北京:人民卫生出版社,2010:1132-1134.
[18] 陆再英.内科学[M].7版.北京:人民卫生出版社,2010:350-351.
[19] 吕英.脂肪肝的中医证候学研究[D].北京:北京中医药大学,2006.

[责任编辑 周冰冰]