

祛痰活血汤对非酒精性脂肪肝大鼠细胞凋亡的影响

肖剑¹, 汪静^{2*}, 米绍平², 张光海², 高翔²

(1. 四川泸州医学院, 四川 泸州 646000;

2. 泸州医学院附属中医医院, 四川 泸州 646000)

[摘要] **目的:**建立非酒精性脂肪肝(NAFL)大鼠模型,观察非酒精性脂肪肝大鼠肝组织细胞凋亡程度,探讨祛痰活血汤治疗NAFL的作用机制。**方法:**取SD雄性大鼠60只,在实验条件下饲养1周后,随机分为2组:正常对照组(10只),给予普通饲料;造模组(50只),给予高脂饮食。在给予高脂饮食后的第2周开始,将造模组50只大鼠又分为模型对照组、祛痰活血汤低、中、高剂量治疗组(ig, 4.5, 9, 13 g·kg⁻¹)、凯西莱治疗组(ig, 0.03 g·kg⁻¹)。模型对照组、正常对照组不用任何药物,代之以同等剂量的生理盐水。实验动物自由进水和进食,每2周称重1次,并相应调整用药剂量。按照以上分组给药方案,第8, 9, 10周末,从造模组随机各抽取1~2只大鼠处死,观察肝组织病理变化以及血液生化指标[丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)等]。第10周末处死所有大鼠,测定肝功能、血脂,取肝脏组织用10%甲醛溶液固定,石蜡包埋,连续切片,切片厚度为5 μm,进行HE染色和TUNEL法检测细胞凋亡。**结果:**与正常对照组比较,模型对照组大鼠血清肝功能和血脂指标,肝组织病理炎症活动度、肝细胞凋亡表达指数均有明显的升高、加重($P < 0.01$);祛痰活血汤低、中、高剂量组、凯西莱组与模型对照组比,各项指标均能降低或减轻($P < 0.05$)。**结论:**祛痰活血汤可显著减轻NAFL大鼠肝组织脂肪变性程度,调节脂质代谢紊乱,一定程度上改善肝功能,降低组织细胞凋亡指数,这可能是其防治非酒精性脂肪肝病(NAFLD)的作用机制之一。

[关键词] 非酒精性脂肪肝; 祛痰活血汤; 细胞凋亡;

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)17-0183-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120704.1736.011.html>

[网络出版时间] 2012-07-04 17:36

Study on Non Alcoholic Fatty Liver by Qutan Huoxue Decoction

XIAO Jian¹, WANG Jing^{2*}, MI Shao-ping², ZHANG Guang-hai², GAO Xiang²

(1. Luzhou Medical College of Sichuan Province, Luzhou 646000, China;

2. Hospital Affiliated to Luzhou Medical College of Sichuan Province, Luzhou 646000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe apoptosis of nonalcoholic fatty liver in rat liver tissue and discuss mechanism of Qutan Huoxue decoction using non-alcoholic fatty liver rat model. **Method:** Sixty SD male rats were randomly divided into 2 groups: normal control group with 10 rats, which was given normal diet; model group with 50 rats, which was given high fat diet. The model group. After second week, 50 rats were divided into model control group, low dose group (Qutan Huoxue decoction 4.5 g·kg⁻¹), middle dose group (Qutan Huoxue decoction 9 g·kg⁻¹), high dose group (Qutan Huoxue decoction 13 g·kg⁻¹) and Kaixilai drug group (30 mg·kg⁻¹). Model control group and normal control group were given the same dose of NS. According to above drug plan, at the end of 8, 9, 10th week, 1-2 rats were dissected from the model group to observe pathological

[收稿日期] 20110923(007)

[基金项目] “十一五”国家中医药管理局“名老中医传承工作室建设项目”[(国中医药人教发[2010]59号);四川省泸州市科技局重点科技项目[2010-s-15(1/8)(泸市财企[2010]41号)];四川省教育厅重点项目[10ZA154(川教函[2010]621号)]

[第一作者] 肖剑,医学硕士,从事中西医结合肝病防治临床、科研工作,E-mail:26305582@qq.com

[通讯作者] *汪静,硕士生导师,主任医师,从事肝胆内科疾病医疗工作以及中医内科学的科研、教学工作,Tel:13882726162,E-mail:lywj68@126.com

changes in liver tissue and blood biochemical parameters alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), triglycerides (TG), total cholesterol (TC) and so on. All rats were dissected at the end of 10th week to observe hepatic function, blood lipid and apoptosis. **Result:** In model control group compared with normal control group, serum ALT, AST, TC, TG level, range of hepatic pathological inflammation, index in hepatic apoptosis showed significantly increased ($P < 0.01$); low, middle, high dose treatment groups of Qutan Huoxue decoction, Kaixilai treatment group compared with model group, their indexes were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Qutan Huoxue decoction can significantly reduce NAFL liver fatty degeneration, regulate lipid metabolism, improve liver function and decrease the apoptosis in liver.

[**Key words**] non alcoholic fatty liver; Qutan Huoxue decoction; apoptosis

非酒精性脂肪肝病 (NAFLD) 是一种无过量饮酒史 (酒精摄入量 $< 20 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$), 以肝细胞脂肪变性和脂质贮积为特征临床病理综合征^[1]。临床上有关中药对非酒精性脂肪肝 (NAFL) 大鼠肝细胞凋亡影响的研究报道较少^[2]。本研究旨在通过观察祛痰活血方对 NAFL 大鼠的干预作用, 并且通过细胞凋亡途径来探讨其可能的作用机制。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠 60 只, 雄性, 体重 150 ~ 200 g, 上述动物由泸州医学院实验动物房提供, 清洁级别 (合格证号川医动字第 20090915)。

1.2 高脂饲料配方 82% 基础饲料 + 10% 猪油 + 5% 蔗糖 + 2.5% 胆固醇 + 0.5% 胆酸盐, 全部饲料充分混匀, 制成成形饲料, 60 °C 烘干。

1.3 药物 祛痰活血汤 (陈皮 10 g, 茯苓 15 g, 姜半夏 10 g, 苍术 15 g, 白术 15 g, 薏苡仁 30 g, 泽泻 30 g, 郁金 15 g, 丹参 15 g, 山楂 30 g, 香附 10 g, 佛手 10 g, 甘草 6 g) 由泸州医学院附属中医医院中药制剂室提供。清水漂洗 2 次, 加双蒸水 2 000 mL 浸泡 30 min 后煎煮 30 min, 收集煎煮液, 药渣再加水 1 500 mL 煎煮 20 min, 合并两次滤液, 浓缩至每 1 mL 含生药 1.5 g, 分装备用, 置 4 °C 冰箱贮存备用。凯西莱 (疏普罗宁肠溶片): 河南新谊药业股份有限公司。

1.4 试剂 丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST) 试剂盒 (四川迈克科技有限责任公司, 批号 2009081), 甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (TC) 试剂盒 (温州东欧生物工程有限公司, 批号 090815), TUNEL 凋亡试剂盒 (福州贝尔曼生物技术有限公司, 批号 2009012), 胆固醇 (上海伯奥生物有限公司, 批号 09051); 猪胆酸钠 (北京奥博星生物技术公司, 批号 20090320)。

1.5 仪器 S70 型荧光倒置显微镜 (深圳普利生科技有限公司), 全自动生化分析仪 (华东电子管厂生产), 全自动离心机 (上海精密科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 模型制备 将 60 只大鼠适应性喂养 1 周后, 除正常对照组外其余 SD 大鼠给予高脂饮食, 饮用自来水。正常对照组饲以普通饲料, 饮用自来水。于造模开始第 8, 9, 10 周末, 从造模组随机抽取 1 ~ 2 只大鼠处死, 观察肝组织病理变化以及肝功能和血脂指标 (ALT, AST, TG, TC 等), 根据肝组织病理切片和血液生化指标结果判别是否达到模型标准和药物治疗情况。

2.2 分组和给药方法 给予高脂饮食后的第 2 周开始, 将除正常对照组以外的 50 只大鼠分为模型对照组、祛痰活血汤低、中、高剂量组, 凯西莱治疗组, 分别按 4.5, 9, 13, 0.03 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{ig}$ 给药, 每日 2 次, 连续 8 周。正常对照组和模型对照组均 ig 等体积的生理盐水。药物干预期间, 除正常组外, 均饲以高脂饲料, 正常组饲以普通饲料, ig 生理盐水。按照以上分组给药方案, 10 周后处死动物。

2.3 观察项目及方法

2.3.1 肝功能和血脂 检测血清 ALT, AST, TG, TC, 采用全自动生化分析仪测定。

2.3.2 肝脏组织病理学变化 脂肪性肝炎炎症活动度计分表^[3-4] (表 1): 炎症活动度分数为汇管区炎症 (P), 小叶内炎症 (L), 碎屑样坏死 (PN), 桥接样坏死 (BN) 4 项, 每项根据病变程度分别计 1 ~ 4 分, 因为碎屑样坏死、桥接样坏死严重度与预后关系密切, 故记分为其他病变的 2 倍, 计算公式为 $P + L + 2PN + 2BN$ ^[4]。

2.3.3 肝细胞凋亡程度分析 采用图像分析软件 Image-Pro Plus 6.0 (IPP6.0) 进行分析, 此软件用于免疫组化结果的半定量分析方法在病理学诊断中有广泛的应用价值, 非常方便于图像资料的统计学分析^[5]。每张切片选取 3 ~ 5 个视野, 利用 IPP 软件对图像中阳性反应部位进行平均吸光度 (A) 分析, 平均 A 为 A SUM 值与 area SUM 的比值, 此值才是有

表1 肝组织炎症活动度计分标准

计分	汇管区炎症/P	小叶内炎症/L	碎屑坏死/PN	桥接坏死/BN
0	无	无	无	无
1	部分汇管区少量炎性细胞浸润	变性及少数点状坏死	局限性	偶见,主要为汇管区
2	介于1与3之间	介于1与3之间	介于1与3之间	介于1与3之间
3	多数汇管区较多炎性细胞浸润	多数坏死灶	多数汇管区可见,占周长50%	少数BN出现汇管区-中央静脉区
4	汇管区扩大,炎性细胞聚集,淋巴滤泡形成	坏死灶融合成片	广泛,>周长50%,达小叶中带	范围广,小叶结构失常或多数小叶坏死

意义的测量值, A SUM 为图片中黄色区域的累积吸光度, area SUM 则是选中的黄色区域的面积。平均 A 越高,说明免疫组化信号越强即目标区域蛋白表达越强。

2.4 统计学处理 应用 SPSS 13.0 统计软件处理, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组比较采用单因素方差分析, 组间多重比较采用 SNK-*q* 检验(检验水准 $P < 0.05$)。

3 结果

3.1 各组大鼠血清 ALT, AST, TG, TC 水平 与正

常对照组比较, 模型组血清 ALT, AST, TG, TC 明显升高, 有极显著性差异 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 祛痰活血汤低、中、高剂量组与凯西莱组 ALT, AST 明显降低, 有显著性差异 ($P < 0.05$)。

3.2 各组大鼠血清 TG, TC 水平 与正常对照组比较, 模型对照组血清 TG, TC 含量明显增高, 有显著性差异 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 祛痰活血汤高、中剂量组及凯西莱组有降低大鼠血清 TG, TC 的作用 ($P < 0.05$), 其中以祛痰活血汤高剂量组效果最佳 ($P < 0.01$)。见表 2。

表2 祛痰活血汤对 NAFL 大鼠血清 ALT, AST, TG, TC 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	<i>n</i>	ALT/ $U \cdot L^{-1}$	AST/ $U \cdot L^{-1}$	TG/ $mmol \cdot L^{-1}$	TC/ $mmol \cdot L^{-1}$
正常对照	-	10	36.62 ± 3.78	126.24 ± 7.98	0.83 ± 0.23	1.45 ± 0.22
模型	-	8	80.87 ± 7.36 ¹⁾	243.38 ± 21.52 ¹⁾	1.19 ± 0.52 ¹⁾	2.68 ± 0.39 ¹⁾
祛痰活血汤	13	9	35.28 ± 5.20 ³⁾	123.46 ± 17.33 ³⁾	0.79 ± 0.32 ³⁾	1.83 ± 0.31 ^{1,3)}
	9	9	38.89 ± 3.97 ³⁾	139.32 ± 10.15 ^{2,3,4)}	0.88 ± 0.21 ³⁾	1.98 ± 0.20 ^{1,3)}
	4.5	8	39.11 ± 4.04 ³⁾	140.25 ± 9.95 ^{2,3,4)}	1.16 ± 0.11 ^{2,4)}	2.63 ± 0.13 ^{1,4,5)}
凯西莱	0.03	8	38.01 ± 6.08 ³⁾	127.65 ± 7.04 ³⁾	0.90 ± 0.17 ³⁾	1.87 ± 0.36 ^{1,3,6)}

注:与正常对照组比¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.05$;与模型组比较³⁾ $P < 0.01$;祛痰活血汤 13 $g \cdot kg^{-1}$ 组比较,⁴⁾ $P < 0.05$;与祛痰活血汤 9 $g \cdot kg^{-1}$ 组比较,⁵⁾ $P < 0.01$;与祛痰活血汤 4.5 $g \cdot kg^{-1}$ 组比较⁶⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 大鼠肝脏病理学检查

3.3.1 肝脏炎症活动评分 与正常对照组比较, 各治疗组和模型对照组肝脏炎症活动计分明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 祛痰活血汤低、中、高剂量组、凯西莱治疗组炎症活动计分均明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 3。

3.3.2 大鼠肝组织形态学 HE 染色观察(光镜) 正常对照组大鼠肝组织的肝小叶结构完整, 肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列, 肝细胞大小一致, 胞核居中, 呈放射状, 排列整齐; 肝细胞无变性、坏死, 无炎性细胞浸润。模型组对照组大鼠肝组织的肝小叶结构破坏, 肝组织呈弥漫性重度脂肪变性, 单个大脂滴将细胞核挤向一侧, 呈“气球样”改变, 以中央静脉附近显著; 汇管区、小叶内大量炎性细胞浸润, 可见凋亡小体。凯西莱治疗组、祛痰活血汤低、

中、高剂量组的肝组织脂肪变肝细胞数目均有不同程度减少, 肝小叶内细胞有再生现象, 肝细胞脂肪变性程度较模型对照组大鼠得到改善, 脂变的肝细胞数目明显减少, 胞质内脂滴减少或消失, 胞质丰富, 汇管区、小叶内炎性细胞浸润的数量减少。见图 1。

3.3.3 肝细胞凋亡情况 肝组织凋亡的阳性细胞主要表现为细胞胞浆或核呈棕黄色, 阴性细胞呈蓝色。正常肝组织中 TUNEL 染色阳性肝细胞少见或者偶见, 多散在分布于中央静脉周围。其他各组可见到数量不等的染色阳性细胞, 主要在脂肪病变比较多的地方或者炎症比较重的附近。

3.3.4 肝细胞凋亡的表达 模型组大鼠肝细胞凋亡更明显, 多于正常对照组 ($P < 0.01$); 祛痰活血汤 3 个剂量组、凯西莱组大鼠肝细胞凋亡明显少于模型对照组 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。见表 3。

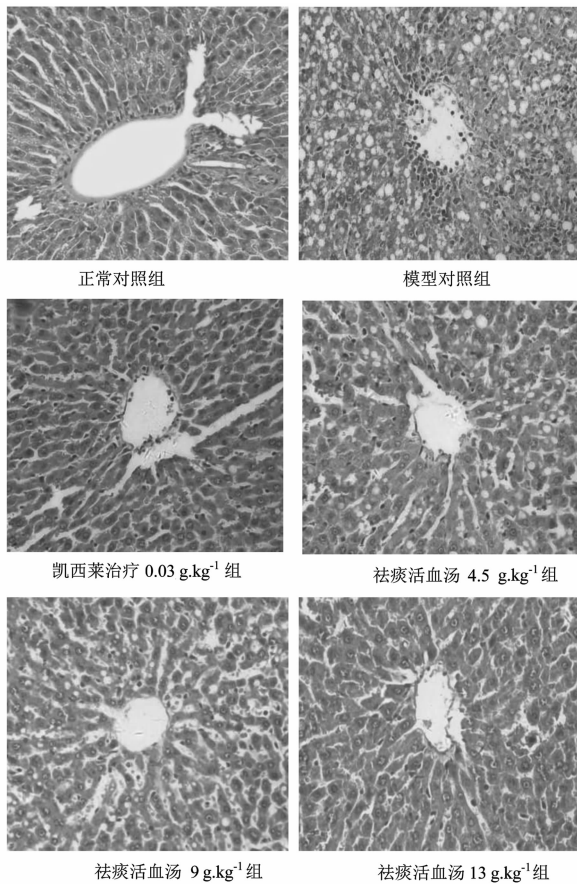


图 1 祛痰活血汤对非酒精性脂肪肝大鼠肝组织病理变化的影响 (HE × 200)

表 3 祛痰活血汤对 NAFL 大鼠肝组织炎症程度、细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	炎症程度 /分	肝细胞凋亡 /IA·μm ⁻²
正常对照	-	10	0.61 ± 0.38	0.012 ± 0.008
模型	-	8	4.12 ± 1.25 ¹⁾	0.154 ± 0.013 ¹⁾
祛痰活血汤	13	9	3.32 ± 0.62 ^{1,2)}	0.075 ± 0.022 ^{1,3)}
	9	9	2.85 ± 0.71 ^{1,3)}	0.071 ± 0.033 ^{1,3)}
	4.5	8	2.20 ± 0.82 ^{1,3,4)}	0.035 ± 0.018 ^{1,3,5,6)}
凯西莱	0.03	8	2.13 ± 0.86 ^{1,3,4)}	0.032 ± 0.029 ^{1,3,5,6)}

注:与正常对照组比¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$;与祛痰活血汤 13 g·kg⁻¹组比较⁴⁾ $P < 0.05$,⁵⁾ $P < 0.01$;与祛痰活血汤 9 g·kg⁻¹组比较⁶⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

现代医学认为 NAFLD 发病机制主要为“二次打击”假说,胰岛素抵抗主要参与了第 1 次打击,引起脂质代谢发生紊乱,脂肪颗粒在肝细胞中沉积,但肝细胞组织没有出现炎症改变或者非常轻微的改变。第 2 次打击是由于氧化应激和细胞因子(白细

胞介素、前列腺素等)的介入,引起肝脏组织一系列炎症改变,出现肝细胞坏死、细胞间质纤维化等^[6]。细胞凋亡主要在“第二次打击”过程里表现出积极的作用,促进了单纯性脂肪肝到脂肪性肝炎的过渡性演变,最终形成肝脏的硬化^[7]。NAFLD 归属为中医的“胁痛”、“积聚”、“痰浊”、“肥气”、“肝着”等病的范畴^[8]。过食肥甘厚味,酒食碍胃,或久卧久坐,体丰痰盛,或七情内伤,或先天禀赋异常等,导致脾运化无权,肝疏泄失职,水湿内停,痰浊内生,气滞血瘀,湿痰瘀互结于肝而形成^[9]。

本课题从 NAFLD 发病机制中细胞凋亡角度来探讨祛痰活血汤对大鼠 NAFL 的影响,结果发现肝细胞凋亡在 NAFLD 中显著升高,凋亡程度与炎症呈正相关。凋亡在非酒精性脂肪性肝炎中肝损伤起着关键作用,并且肝细胞凋亡和肝纤维化之间的机制联系提示多种对此疾病的有益的治疗策略,阻碍凋亡可能对抗脂肪肝、纤维化起一定的作用。而祛痰活血汤治疗组的肝细胞凋亡程度均有不同程度减轻,说明用药后肝组织抗损伤及修复能力增强。

[参考文献]

- [1] 范建高,曾民德. 脂肪性肝病[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:137.
- [2] 郭延军,李静. 肝细胞凋亡的研究进展[J]. 临床肝胆病杂志,1998,14(3):13.
- [3] 钟岚,范建高,王国良,等. 肥胖、高脂血症性脂肪性肝炎模型的建立[J]. 实验动物科学与管理,2000,17(2):16.
- [4] 王泰龄,刘霞. 慢性肝炎炎症活动度及纤维化程度计分方案[J]. 中华肝脏病杂志,1998,6(4):195.
- [5] 刘明社,赵中夫,张国英,等. RNA 干扰 Fas 基因表达的免疫组化半定量分析[J]. 长治医学院学报,2007,21(6):404.
- [6] 翁小刚,朱晓新,杨庆,等. 非酒精性脂肪肝的实验研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(11):104.
- [7] Feldstein A E, Canbay A, Angulo P, et al. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis[J]. Gastroenterology, 2003,125(2):437.
- [8] 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.
- [9] 徐英敏,张大伟,蒋士卿,等. 祛痰化痰汤治疗痰瘀内阻型非酒精性脂肪肝 35 例[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(16):296.

[责任编辑 聂淑琴]