

清肝调脂饮抗非酒精性脂肪性肝炎 大鼠脂质过氧化反应的研究

王伟芹*, 尹常健, 孙建光, 张永

(山东中医药大学附属医院肝病科, 济南 250011)

[摘要] **目的:**探讨清肝调脂饮对非酒精性脂肪性肝炎(NASH)大鼠脂质过氧化反应的干预机制。**方法:**Wistar 大鼠 70 只,除 10 只作为正常对照组外,余 60 只建立以高脂饲料(基础饲料 88%,猪油 10%,胆固醇 1.5%,胆盐 0.5%)诱导的非酒精性脂肪性肝炎大鼠模型并随机分为 5 组,除模型组外,造模同时 ig 清肝调脂饮低、中、高剂量组(4.59,9.18,18.39 g·kg⁻¹)和西利宾胺组(27 mg·kg⁻¹,ig)分别按临床等效剂量的 0.5,1,2 和 1 倍剂量药物治疗。实验 12 周,大鼠全部处死。检测各组大鼠血清丙氨酸转氨酶(ALT),天冬氨酸转氨酶(AST),甘油三酯(TG)含量,肝组织匀浆肿瘤坏死因子(TNF-α),丙二醛(MDA)含量以及超氧化物歧化酶(SOD)活性;肝组织行 CD14,细胞色素 P450 2E1(CYP2E1)免疫组化染色,阳性结果作定量分析。**结果:**与空白对照组比较,模型组 ALT(62.57 ± 17.08) U·L⁻¹,TNF-α(902.00 ± 22.66) pg·mg⁻¹,CYP2E1 阳性率(0.88 ± 0.07),SOD(81.78 ± 2.24) U·mg⁻¹各指标均显示异常(P < 0.05, P < 0.01);与模型组比较,各用药组均能不同程度的改善以上各指标(P < 0.05, P < 0.01)。在降低 TG, TNF-α 方面,清肝调脂饮高剂量组明显优于西药对照组(P < 0.01);而对其他各指标的改善,清肝调脂饮各剂量组与西药对照组疗效无显著差异。**结论:**清肝调脂饮具有降低脂质过氧化反应、提高抗氧化能力的作用,从而减轻 NASH 肝细胞变性坏死程度。

[关键词] 清肝调脂饮; 非酒精性脂肪性肝炎; 脂质过氧化; 细胞色素 P450 2E1

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)12-0229-04

Effect of Qinggan Tiaozhi Decoction on Lipid Peroxidatic in Rat Nonalcoholic Steatohepatitis

WANG Wei-qin*, YIN Chang-jian, SUN Jian-guang, ZHANG Yong

(Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250011, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Qinggan Tiaozhi decoction on lipid peroxidatic reaction in rat nonalcoholic steatohepatitis (NASH). **Method:** The NASH model was induced by high fat diet, and the modeling rats were randomly divided into five groups: the model group, the low dose, middle dose and high dose group of Qinggan Tiaozhi decoction and the group of silybin, each group were treated with corresponding 4.59, 9.18, 18.39 g·kg⁻¹ and 27 mg·kg⁻¹, ig. The indexes of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and triglyceride (TG) in serum were detected, the levels of tumor necrosis factor alpha (TNF-α), malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) in liver tissue homogenate were measured, CD14 and cytochromes P450 2E1 (CYP2E1) in liver tissue for quantitative analysis were assayed by immunohistochemical stain. **Result:** The indexes of ALT, TNF-α, CYP2E1 and SOD in model group were changed compared with those in normal group (P < 0.05, P < 0.01), otherwise they were all improved in treated groups than those in model group (P < 0.05, P < 0.01). The indexes of TG and TNF-α were improved in high dose group of Qinggan Tiaozhi decoction than that in silybin group (P < 0.01), and for other indexes, there were similar effects between Qinggan Tiaozhi decoction and silybin group. **Conclusion:** Compared with silybin, Qinggan Tiaozhi

[收稿日期] 20110808(005)

[通讯作者] * 王伟芹, 博士研究生, 主治医师, 主要从事中西医结合肝胆病研究, Tel:0531-68617961, E-mail:wangweiqin@163.com.

decoction has better effects on NASH.

[Key words] Qinggan Tiaozhi decoction; nonalcoholic steatohepatitis; lipid peroxidatic reaction; cytochromes P450 2E1

根据 Day^[1]提出的“二次打击”学说,非酒精性脂肪性肝炎(NASH)发生的二次打击主要为细胞色素 P450 酶系活性增强等导致细胞内活性氧(ROS)的产生超过超氧化物歧化酶(SOD)、还原型谷胱甘肽(GSH)、维生素 E 等组成的抗氧化系统的清除能力,产生氧应激导致脂质过氧化损伤,使 Kupffer 细胞激活并释放肿瘤坏死因子等炎性细胞因子和递质,引起脂肪变性的肝细胞发生气球样变和点状坏死,同时吸引中性粒细胞和淋巴细胞趋化至肝小叶,形成脂肪性肝炎。因此,氧应激导致脂质过氧化损伤在 NASH 的发生中起重要作用^[2-3]。本研究以非酒精性脂肪性肝炎大鼠模型为研究对象,探讨清肝调脂饮对其氧应激和脂质过氧化的影响。

1 材料

1.1 动物与饲料 SPF 级近交系 Wistar 大鼠 70 只,雌雄各半,体重 160 ~ 180 g,购自山东大学实验动物中心,许可证号 SCXK(鲁)L20030004。标准普通饲料购自山东大学实验动物中心,高脂饲料(基础饲料 88%,猪油 10%,胆固醇 1.5%,胆盐 0.5%)由山东中医药大学实验动物中心制作。

1.2 药物及试剂 西利宾胺^[4]:江苏中兴药业有限公司生产,国药准字 H32026145;清肝调脂饮:生甘草、栀子、田基黄、青皮、赤芍、枸杞、决明子等均购自山东中医药大学附属医院门诊中药房,以 2:3:5:3:5:5:5 比例配制,动物给药容积 10 mL·kg⁻¹。胆固醇(cholesterol),批号 F20050815,猪胆盐[bile salt(pig)],批号 F20050622,均购自国药集团化学试剂有限公司。即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒,CD14,细胞色素 P450 2E1(CYP2E1)一抗来源于兔的多克隆抗体,均购自武汉博士德生物工程有限公司;肿瘤坏死因子- α (TNF- α)放免试剂盒,解放军总医院科技开发中心放免研究所;超氧化物歧化酶(SOD)测试盒(批号 20060610)、丙二醛(MDA)测试盒(批号 20060615)、蛋白定量(双缩脲法)测试盒(批号 20060620),均购自南京建成生物工程研究所。

1.3 仪器 AU 2700 全自动生化分析仪(日本 Olympus 公司生产),GMJ 型全自动放射免疫 γ 计数器(江苏医疗电子研究所),721 分光光度计(上海第三分析仪器厂),HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图

文分析系统(武汉同济医科大学千屏影像工程公司设计生产)。

2 方法

2.1 模型建立及分组处理 大鼠给予高脂饮食(基础饲料 88%,猪油 10%,胆固醇 1.5%,胆盐 0.5%),自由饮水,共 12 周,建立 NASH 大鼠模型。70 只 Wistar 大鼠适应性喂养 1 周后,按随机原则分为 6 组。除 10 只作为正常对照组外,余 60 只建立以高脂饮食诱导的 NASH 大鼠模型并随机分组,除空白对照组及模型组 ig 生理盐水外,中药组(清肝调脂饮低、中、高剂量组分别为临床等效剂量的 0.5,1 和 2 倍,即 4.59,9.18,18.39 g·kg⁻¹)和西药组(西利宾胺按临床等效剂量,即 27 mg·kg⁻¹)分别 ig 相应剂量药物治疗。实验 12 周处死动物,取血剖肝。

2.2 观察项目

2.2.1 血清指标测定 丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、甘油三酯(TG)采用全自动生化分析仪测定。

2.2.2 肝匀浆指标测定 将制备好的 20% 肝匀浆用低温低速离心机 3 000 r·min⁻¹离心 10 ~ 15 min,取上清液,比色法测定 SOD,MDA,放射免疫法测定 TNF- α 。

2.2.3 肝组织免疫组化染色 肝组织行 CD14, CYP2E1 免疫组织化学染色。切片脱蜡至水化,用 SABC 法染色,DAB 显色,苏木素轻度复染,常规脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察。上述染色均设阳性对照和阴性对照组(切片),阳性对照切片为已知切片。阳性细胞为在胞浆、胞核、胞膜为棕黄色颗粒。

2.2.4 染色切片计算机定量分析 每一切片于物镜为 20 倍的光学显微镜下选择阳性细胞较多的区域(集中)采集 3 ~ 5 个光镜视野,输入到 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文分析系统内,在相同的背底倍体条件下选择相应的参数进行计算机完全定量分析,测得数据作 *t* 检验和卡方检验(软包为武汉同济医科大学千屏影像工程公司商业提供),所得均数作为该片测得数据。

2.3 统计学分析 所有数据以 SPSS 17.0 进行统计分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料多样本均数比

较采用方差分析(ANOVA)。P < 0.05 有统计学意义。

3 结果

3.1 血清指标测定 血清 ALT,AST,TG 水平模型组均明显高于空白组(P < 0.05, P < 0.01),而各治疗药物组均降低,除清肝调脂饮中剂量组 AST 血清水平外,余组与模型组比较均有统计学意义(P < 0.05, P < 0.01)。各治疗药物组间比较,在降低 AST 方面,西利宾胺组疗效优于清肝调脂饮低、中剂量组(P < 0.05, P < 0.01);在降低 TG 方面,清肝调脂饮高剂量组疗效优于低剂量组和西利宾胺组(P < 0.01)。见表 1。

表 1 各组大鼠血清 ALT,AST,TG 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	TG/mmol·L ⁻¹
空白对照	-	8	51.88 ± 11.36 ¹⁾	133.88 ± 52.89 ¹⁾	0.551 ± 0.262 ²⁾
模型	-	7	62.57 ± 17.08	169.00 ± 41.92	1.446 ± 0.272
清肝调脂饮	4.59	9	45.56 ± 6.31 ²⁾	120.56 ± 14.61 ^{2,3)}	0.991 ± 0.157 ²⁾
	9.18	9	46.89 ± 7.24 ²⁾	132.56 ± 26.74 ^{1,4)}	0.949 ± 0.366 ²⁾
	18.39	8	40.63 ± 6.99 ²⁾	113.13 ± 14.69 ²⁾	0.570 ± 0.142 ^{2,4,6)}
西利宾胺	0.027	10	40.10 ± 4.07 ²⁾	90.00 ± 15.65 ²⁾	1.001 ± 0.429 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾P < 0.05,²⁾P < 0.01;与西利宾胺组比较³⁾P < 0.05,⁴⁾P < 0.01;与清肝调脂饮 4.59 g·kg⁻¹组比较⁵⁾P < 0.05,⁶⁾P < 0.01,与清肝调脂饮 9.18 g·kg⁻¹组比较⁷⁾P < 0.01(表 2~3 同)。

表 2 各组大鼠肝组织匀浆 TNF-α,MDA 含量及 SOD 活性的测定($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	TNF-α/pg·mg ⁻¹	MDA/nmol·mg ⁻¹	SOD/U·mg ⁻¹
空白对照	-	9	425.56 ± 26.37 ²⁾	7.29 ± 1.06 ²⁾	86.71 ± 3.84 ¹⁾
模型	-	8	902.00 ± 22.66	11.19 ± 0.88	81.78 ± 2.24
清肝调脂饮	4.59	10	733.80 ± 23.13 ²⁾	7.51 ± 0.38 ²⁾	86.16 ± 4.43 ¹⁾
	9.18	10	634.80 ± 27.54 ^{2,4,6)}	8.16 ± 0.76 ^{2,5)}	85.51 ± 4.21
	18.39	8	543.63 ± 32.68 ^{2,4,6,7)}	7.57 ± 0.51 ²⁾	86.35 ± 4.83 ¹⁾
西利宾胺	0.027	10	719.80 ± 37.82 ²⁾	7.60 ± 0.45 ²⁾	86.06 ± 3.81 ¹⁾

3.3 肝组织免疫组化染色结果分析 模型组 CYP2E1 胞浆阳性表达明显增多增强,且多在中央静脉周围,与脂肪肝变趋于一致,阳性表达较空白组明显增多(P < 0.01)。各治疗药物组 CYP2E1 阳性表达较模型组有不同程度的减少(P < 0.05, P < 0.01),其中以清肝调脂饮中剂量组最为明显,且优于低剂量组(P < 0.05)。模型组 CD14 阳性表达明显增多增强,主要集中在肝细胞脂肪变性区域周围,较空白对照组明显增加(P < 0.01)。在各治疗药物组中,CD14 阳性率均较模型组有降低趋势,但差异无统计学意义。见表 3。

4 讨论

NASH 的二次打击主要为氧应激和脂质过氧化

3.2 肝组织匀浆测定指标结果分析 肝组织匀浆 TNF-α 及 MDA 含量模型组均明显高于空白组(P < 0.01),而各治疗药物组均较模型组降低(P < 0.01);SOD 活性模型组低于空白组(P < 0.05),除中药中剂量组 SOD 外,余治疗药物组 SOD 活性均较模型组提高(P < 0.05)。各治疗组间比较,在降低 TNF-α 方面,清肝调脂饮中、高剂量组疗效均优于西利宾胺组(P < 0.01),且高剂量组优于中剂量组(P < 0.01);在降低 MDA 方面,清肝调脂饮低剂量组优于中剂量组(P < 0.05);在提高 SOD 活性方面,各治疗组间疗效无统计学差别,但清肝调脂饮高剂量组有优于其他各组的趋势。见表 2。

对脂变肝细胞的进一步损伤。氧应激和脂质过氧化的发生与细胞色素 P450 酶系(主要为 CYP2E1)的活性增强,以及伴发的肿瘤坏死因子等促炎细胞因子水平升高有关。既往研究以证实,内毒素在脂肪性肝炎中发挥了重要的作用。CD14 在肝库普弗细胞的表面,是单核巨噬细胞分化成熟的标志之一,内毒素通过 CD14 激活库普弗细胞,进而促进其分泌一系列炎性细胞因子,如 TNF-α^[5],并引起 CYP2E1 活性增强及肝细胞的损伤。Western blot 免疫印迹检测脂肪肝大鼠 CYP 2E1 蛋白表达,与正常对照组相比明显增加,且随脂肪肝程度的加重,表达逐渐增强^[6],肝组织 CYP2E1 基因的表达与 MDA 含量呈明显正相关,与 SOD 和 GSH-Px 活性则呈明显负相关^[7]。本研

表 3 肝组织 CYP2E1, CD14 免疫组化染色定量分析(阳性率)($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	例数	CYP2E1	例数	CD14
空白对照	-	5	0.629 ± 0.123 ²⁾	5	0.341 ± 0.150 ²⁾
模型	-	5	0.880 ± 0.070	5	0.721 ± 0.034
清肝调脂饮	4.59	5	0.685 ± 0.238 ¹⁾	6	0.718 ± 0.039
	9.18	5	0.478 ± 0.076 ^{2,5)}	5	0.684 ± 0.103
	18.39	5	0.641 ± 0.152 ¹⁾	6	0.668 ± 0.077
西利宾胺	0.027	6	0.625 ± 0.096 ²⁾	6	0.610 ± 0.196

究发现,NASH 模型大鼠肝组织 CD14 及 CYP2E1 阳性表达明显增强,且肝组织 TNF- α ,MDA 含量显著增多,而 SOD 活性明显降低,提示 NASH 模型大鼠存在明显的氧应激和脂质过氧化。

本研究发现,清肝调脂饮具有抗 NASH 脂质过氧化,减轻肝组织炎症的作用,能降低 ALT,AST,TG 血清水平,以高剂量疗效最为明显,在降低 TG 方面,明显优于西利宾胺。清肝调脂饮的抗脂质过氧化作用可能表现在:①抑制 NASH 模型大鼠炎症细胞因子的释放:清肝调脂饮能明显降低模型组大鼠肝组织 TNF- α 含量,以高剂量疗效最为明显,明显优于西利宾胺,并一定程度地抑制 CD14 的表达。②清肝调脂饮能降低 NASH 模型大鼠 CYP2E1 的阳性表达:清肝调脂饮各剂量能不同程度的降低肝组织 CYP2E1 的过度阳性表达,其中以中剂量疗效最为明显,有优于西利宾胺^[4]的疗效趋势。

根据中医辨证理论,结合我们多年的临床治疗经验,参考现代药理学研究成果,组成清肝调脂饮。该方具有清热活血,健脾利湿之功效。方中田基黄,白术为君药,清热利湿祛瘀,健脾益气;赤芍,栀子,青皮,枸杞共为臣药,加强君药清热,活血,健脾之功效,并以青皮疏肝理气;决明子,熟大黄为佐药,在佐助君臣药清热活血的同时,又通过泻下作用,导邪而出;生甘草为佐使药,在加强该方清热扶正功效的同时,调和诸药。综观全方,补中兼泄,体现了养阴不忘调气,治肝不忘实脾,扶正不忘去邪的原则,共达肝体得养,肝用得畅,邪去正安的目的。清肝调脂饮组方具有较强的针对性,既参考了脂肪肝的阶段性病机特点,即本虚标实,以脾虚为本,兼有肝肾亏虚,以湿,热,瘀为标,兼有气滞,痰阻,选择清热,活血,健脾,利湿为主的药物,又针对非酒精性脂肪性肝炎的主要病理改变特点,即肝细胞脂肪变性和炎症细胞浸润,参考中药药理学研究结果选择具有调节脂肪代谢,抑制肝脏炎症反应,阻抑肝纤维化等的药物,从而达到辨病论治的目的。

病机特点,即本虚标实,以脾虚为本,兼有肝肾亏虚,以湿,热,瘀为标,兼有气滞,痰阻,选择清热,活血,健脾,利湿为主的药物,又针对非酒精性脂肪性肝炎的主要病理改变特点,即肝细胞脂肪变性和炎症细胞浸润,参考中药药理学研究结果选择具有调节脂肪代谢,抑制肝脏炎症反应,阻抑肝纤维化等的药物,从而达到辨病论治的目的。

[参考文献]

[1] Day C P, James O F. Steatohepatitis: a tale of two hits? [J]. Gastroenterology, 1998, 114(4):842.

[2] 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.

[3] 王君明,崔瑛,王峰涛,等.超氧化物歧化酶参与肝损伤的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(7):265.

[4] 万华,席宏丽,陶迎红,等.水飞蓟宾葡甲胺片治疗非酒精性脂肪性肝炎[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(12):157.

[5] 赵海霞,李勇,孙建光.肝脂清颗粒剂对非酒精性脂肪肝大鼠血液及肝组织肿瘤坏死因子- α 水平的干预作用[J].中国实验方剂学杂志,2008,14(4):33.

[6] 史洪涛,陈东风,李陶,等.非酒精性脂肪肝大鼠肝细胞色素 CYP 2E1 基因及表达变化的意义[J].中华肝脏病杂志,2005,13(2):154.

[7] 陈芝芸,刘红,严茂祥,等.山楂叶总黄酮对非酒精性脂肪性肝炎大鼠肝组织 CYP2E1 表达的影响[J].中华中医药杂志,2010,25(1):141.

[责任编辑 聂淑琴]