

# 丹苘软胶囊对非酒精性脂肪肝模型大鼠胰岛素抵抗及瘦素抵抗的影响

刘锐<sup>1</sup>, 李劲平<sup>2</sup>, 伍娟娟<sup>1</sup>, 甘国兴<sup>3</sup>, 莫新民<sup>3\*</sup>

(1. 广西中医学院附属瑞康医院, 南宁 530011; 2. 中南大学药学院, 长沙 410013;  
3. 湖南中医药大学, 长沙 410007)

**[摘要]** 目的: 观察丹苘软胶囊对非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 模型大鼠胰岛素抵抗及瘦素抵抗的影响。方法: 将大鼠随机分为正常组, 模型组, 丹苘软胶囊高、中、低剂量组, 易善复组, 采用高脂饲料建立 SD 大鼠非酒精性脂肪肝模型, 丹苘软胶囊各组分别予相当于丹参石油醚浸膏 0.456, 0.228, 0.114 g·kg<sup>-1</sup> ig, 易善复组每天予易善复 0.159 g·kg<sup>-1</sup> ig, 正常对照组、模型组给药相同体积 (1.2 mL·kg<sup>-1</sup>) 的蒸馏水 ig。给药 4 周后测血糖, ELISA 法检测血清空腹胰岛素 (FINS)、瘦素水平, 免疫组化染色法检测肝脏瘦素受体 (ob-R) 蛋白表达, 计算胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR)。结果: 空白组、中药各剂量组及西药组血清空腹血糖 (FGB), FINS 浓度及 HOMA-IR, 明显低于模型组 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ); 空白组、中药各剂量组及西药组血清瘦素水平、肝脏 ob-R 蛋白表达, 明显低于模型组 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。结论: 丹苘软胶囊具有改善 NAFLD 大鼠 IR 及瘦素抵抗的作用。

**[关键词]** 非酒精性脂肪肝; 丹苘软胶囊; 胰岛素抵抗; 瘦素; 瘦素抵抗

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)01-0188-04

## Effects of Danqing Soft Capsule on Insulin Resistance and Leptin Resistance in Rats with Non-alcoholic Fatty Liver Disease

LIU Rui<sup>1</sup>, LI Jin-ping<sup>2</sup>, WU Juan-juan<sup>1</sup>, GAN Guo-xing<sup>3</sup>, MO Xin-min<sup>3\*</sup>

(1. Ruikang Hospital of Guangxi Traditional Chinese Medicine (TCM) University, Nanning 530011, China;  
2. Medicine College of Centerl South University, Changsha 410013, China;

**[收稿日期]** 20110413(022)

**[第一作者]** 刘锐, 医学博士, 主治医师, 从事中医内科老年代谢性疾病研究, E-mail: rjrui@126.com

**[通讯作者]** \* 莫新民, 医学硕士, 教授, 博士研究生导师, 从事中医内科老年病学研究, E-mail: moxinmin52@hotmail.com

### 4 讨论

蟾砂胶囊为中药复方制剂, 由人参、蟾皮、砂仁、灰树花等中药组成, 采用补气培本、理气行水、益气养阴之品, 祛邪而不伤正, 扶正而不留邪。方中人参固本, 佐以灰树花, 具有益气养阴之功能, 又能解毒利尿, 鼓舞正气以托毒, 温运阳气以护气, 且助蟾皮化痰利水、消肿、解毒。砂仁健胃理气, 改善蟾皮对胃气的损伤。迄今未见有与本品处方相同的报道。蟾砂胶囊对于肝癌、肝硬化腹水、肺癌等有良好的效果, 能纠正多种癌症导致的机体一系列病理变化, 控制病情进一步发展, 对手术前、后具有良好的治疗作用和预防复发作用, 对于化疗中患者有增效减毒作用。本研究通过药效学实验证实蟾砂胶囊具有抑制肿瘤生长、提高荷瘤小鼠的免疫力和存活率的功效,

为其临床应用提供了理论依据。蟾砂胶囊是一种良好的抗肿瘤辅助治疗和免疫调节药物, 其作用机理有待于进一步实验研究。

### [参考文献]

- [1] 裴正学. 新编中医方剂学 [M]. 兰州: 甘肃科技出版社, 2008: 131.
- [2] 林丽珠, 周岱翰, 陈瑶, 等. 复方苦参注射液对肺癌和肝癌细胞抑瘤作用研究 [J]. 2009, 20(1): 21.
- [3] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 3 版, 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1426.
- [4] 吴勉华, 许惠琴, 周红光. 癌痛平胶囊免疫增强作用的研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2005, 21(3): 39.

[责任编辑 聂淑琴]

## 3. Hunan University of TCM, Changcha 410007, China)

**[Abstract] Objective:** To observe the effects of Danqing soft capsule (DSC) on insulin resistance and leptin resistance in rats with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Method:** SD rats were randomly divided into control group, model group, DSC high dose group, medium dose group, low dose group, and polyene phosphatidyl choline (PPC) group. rat non-alcoholic fatty liver model was established with high fat diet. DSC high dose group, medium dose group and low dose group were administrated with different concentrations, which are respectively equivalent to petroleum ether extract of salvia 0.456, 0.228, 0.114 g·kg<sup>-1</sup>. PPC group was treated with PPC by 0.159 g·kg<sup>-1</sup> ig. Control group and model group were given the same volume (1.2 mL·kg<sup>-1</sup>) of distilled water ig. After treatment for 4 weeks, blood glucose was measured; levels of serum insulin and leptin were assayed by ELISA assay; expression of leptin receptor in the liver was observed by immunohistochemical staining; the index of insulin resistance was calculated. **Result:** Concentrations of FGB, FINS and HOMA-IR in control group, TCM groups and western medicine group were significantly lower than those of model group ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ); the levels of leptin in serum and expression of ob-R protein in liver of control group, TCM groups and western medicine group were significantly lower than those of model group ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ). **Conclusion:** DSC can improve IR and leptin resistance in rats with NAFLD.

**[Key words]** non-alcoholic fatty liver; Danqing soft capsule; insulin resistance; leptin; leptin resistance

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease NAFLD)是一组无过量饮酒史,肝组织学改变与酒精性肝病相类似,以肝实质细胞脂肪变性和脂肪贮积为特征的临床病理综合征<sup>[1]</sup>。随着社会经济的发展,NAFLD的患病率迅猛增高,现已成为危害人类健康的三大肝病之一,并与失代偿期肝硬化、肝功能衰竭、原发性肝癌的发生密切相关<sup>[2-3]</sup>。目前西方国家NAFLD患病率约20%~30%,亚太地区约12%~24%<sup>[4]</sup>。

近年来研究发现,NAFLD常伴有胰岛素抵抗(IR)和高胰岛素血症,并与机体对瘦素的敏感性降低有关<sup>[5]</sup>。本研究通过建立实验性NAFLD大鼠模型,以中药制剂丹苘软胶囊进行干预,观察该中药对NAFLD模型大鼠胰岛素抵抗及瘦素抵抗的影响,探讨丹苘软胶囊改善NAFLD的可能作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** SD大鼠63只,清洁级,雄性,体重180~200 g购于上海斯莱克实验动物有限责任公司,合格证号SCXK(沪)2002-0010,饲养于湖南中医药大学实验动物中心。

## 1.2 药物

**1.2.1 丹苘软胶囊** 由中南大学药学院制备提供,由丹参、苘麻子2味药物组成,丹参药材粉碎成粗粉(20目筛),置40℃烤箱中干燥,然后用8倍量无水乙醇于50℃回流提取1 h,过滤,滤渣中续加5倍量无水乙醇回流提取45 min,合并滤液,50℃减

压回收乙醇,得干浸膏,置50℃真空干燥器中干燥,然后加8倍量石油醚(60~90℃)浸提4 h,过滤,滤液回收石油醚得红褐色液体,经高效液相测定其中丹参酮II<sub>A</sub>含量为1.21 g·mL<sup>-1</sup>。苘麻子药材置50℃烤箱中烤干,粉碎,取10倍量石油醚(60~90℃)浸提12 h,2次,合并浸提液,50℃减压回收石油醚,于真空干燥箱内继续干燥3 h,得亮黄色油状液体,得率为16%。按以下配比进行混合。高剂量组:19 g丹参石油醚浸膏溶于50 mL苘麻子油,即2 550 g丹参生药材,312 g苘麻子生药材。中剂量组:9.5 g丹参石油醚浸膏溶于50 mL苘麻子油,即1 275 g丹参生药材,312 g苘麻子生药材。低剂量组:4.25 g丹参石油醚浸膏溶于50 mL苘麻子油,即637.5 g丹参生药材,312 g苘麻子生药材。

**1.2.2 易善复胶囊(多烯磷脂酰胆碱胶囊)** 228 mg/粒,赛诺菲安万特(北京)制药有限公司生产(批号D9073),使用前用蒸馏水超声乳化,配制成1 L含多烯磷脂酰胆碱132.4 g。

**1.3 试剂** 胰岛素(FINS)ELISA试剂盒(美国ADL生物公司,CY10011);瘦素ELISA试剂盒(批号EK0438);免疫组化试剂盒(批号SA1022);瘦素受体多克隆抗体(一抗,批号BA1234)均由武汉博士德生物工程有限公司提供;辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(二抗)(北京中杉金桥生物技术有限公司,ZDR-5306)。

**1.4 仪器** LEICA DM LB2型双目显微镜(德国

LEICA 公司);TG16-WS 台式高速离心机(湖南湘仪实验仪器开发有限公司);MIAS 医学图像分析系统(北航公司);Shandon325 型石蜡切片机(英国 Shandon 公司);DNP-9162 型电热恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司);Motic B5 显微摄像系统(麦克奥迪实业集团公司)。

## 2 方法

**2.1 非酒精性脂肪肝大鼠模型的建立** 以高脂饲料<sup>[6]</sup>(胆固醇 2%,胆酸钠 0.5%,丙硫氧嘧啶 0.2%,蔗糖 5%,猪油 10%,基础饲料 82.3%)连续喂养 8 周,造成 NAFLD 模型。

**2.2 分组及给药** 63 只大鼠随机选取 10 只为正常对照组,普通饲料喂养;剩余 53 只给予高脂饲料喂养 8 周,于 8 周末随机选取 3 只处死,验证造模成功后改普通饲料喂养,并随机分为模型组,丹苘软胶囊高、中、低剂量组,易善复组。丹苘软胶囊各剂量组每天分别按相当于丹参石油醚浸膏 0.456, 0.228, 0.114 g·kg<sup>-1</sup>, ig, 易善复组每天予易善复 0.159 g·kg<sup>-1</sup>, ig, 正常对照组、模型组给药相同体积(1.2 mL·kg<sup>-1</sup>)的蒸馏水 ig。

**2.3 取材** 给药 4 周后处死各组大鼠,处死前禁食禁水 12 h,予 3% 戊巴比妥钠麻醉后,腹主动脉取血,分离血清,置 -20 °C 冰箱保存待测;取同一部位肝组织,浸入 4% 多聚甲醛溶液中,固定 48 h,取块石蜡包埋。

## 2.4 观察指标及方法

**2.4.1 空腹血糖** 全自动生化分析仪测定空腹血糖(FBG)。

**2.4.2 血清胰岛素、瘦素水平** ELISA 法检测血清

胰岛素、瘦素水平,按 ELISA 试剂盒说明书操作。

**2.4.3 计算胰岛素抵抗指数(IR)** 通过空腹血糖 FBG 和空腹胰岛素 FINS,用稳态模型 HOMA,计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR),以评价 IR 程度。HOMA-IR = FBG × FINS/22.5

**2.4.4 瘦素受体(ob-R)** 免疫组化链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(SABC)法检测瘦素受体(ob-R)在肝脏组织的表达。按试剂盒说明书操作。

ob-R 蛋白表达免疫组化阳性信号为细胞胞浆为棕黄。信号强弱用平均灰度值表示,灰度值越小,说明其阳性反应的程度越高,表达越强。每个标本间断连续切片随机选取 4 张切片,先在显微镜低倍镜下(10 × 10 倍)准确定位,再在高倍镜下(10 × 40 倍)观察阳性细胞的形态和分布,然后用联有三目光学显微镜的 Optimas 数字彩色图像显微系统,进行图像分析,分析各区域平均灰度。

**2.5 统计学分析** 所有数据均用 SPSS 16.0 统计软件包进行处理,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,资料进行正态性检验;多组计量资料采用单因素方差分析,方差齐时采用 LSD 和 SNK 法,方差不齐时采用 Tamhane's T2 或 Dunnett's T3 法。 $P < 0.05$  有统计学意义。

## 3 结果与分析

**3.1 各组血清 FGB, FINS 浓度及 HOMA-IR** 正常组、中药各剂量组及西药组血清 FGB, FINS 浓度及 HOMA-IR,明显低于模型组( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ),中药各治疗组及西药组之间比较无明显差异;中药低剂量组 HOMA-IR 高于空白组,且具有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 各组血清空腹血糖、胰岛素浓度及 HOMA-IR ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	FBG /mmol·L <sup>-1</sup>	FINS /mU·L <sup>-1</sup>	HOMA-IR
正常对照	-	8.70 ± 1.05 <sup>2)</sup>	26.81 ± 3.26 <sup>2)</sup>	10.30 ± 1.29 <sup>2)</sup>
模型	-	11.6 ± 0.97	31.72 ± 3.04	16.42 ± 1.97
丹苘软胶囊	0.456	9.49 ± 1.09 <sup>2)</sup>	28.19 ± 2.77 <sup>1)</sup>	11.88 ± 1.81 <sup>2)</sup>
	0.228	9.37 ± 1.44 <sup>2)</sup>	28.68 ± 3.39 <sup>1)</sup>	11.85 ± 1.64 <sup>2)</sup>
	0.144	9.87 ± 1.94 <sup>2)</sup>	28.43 ± 3.40 <sup>1)</sup>	12.43 ± 2.66 <sup>2,3)</sup>
易善复	0.159	9.39 ± 1.25 <sup>2)</sup>	27.42 ± 2.67 <sup>2)</sup>	11.39 ± 1.43 <sup>2)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与空白组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ (表 2 同)。

**3.2 各组血清瘦素水平及肝脏瘦素受体(ob-R)免疫组化染色图像分析** 空白组、中药各剂量组及西药组血清瘦素水平、肝脏 ob-R 蛋白表达,明显低于模型组( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ),中药各治疗组及西药

组之间无明显差异。见表 2。

## 4 讨论

研究表明,几乎所有的 NAFLD 患者都存在周围组织和肝脏的胰岛素抵抗,IR 是 NAFLD 发生发展

的基础,其严重程度与 NAFLD 的病情进展相关<sup>[7]</sup>。瘦素是一种由脂肪来源的激素,是肥胖基因(Ob 基因)的表达产物,通过中枢性及周围性受体发挥生理效应,增加能量消耗,抑制脂肪合成<sup>[8]</sup>,血清中高瘦素水平可引起 IR,这种现象叫做瘦素抵抗,胰岛素抵抗和瘦素抵抗共同促进了 NAFLD 的发生<sup>[9]</sup>。瘦素一方面可逆转 IR 和改善严重肝脏脂肪变性,降低血清甘油三酯水平,降低肝脏和肌肉组织内甘油三酯的比例,提高机体对胰岛素的敏感,另一方面瘦素或其受体自身变异引起瘦素抵抗,形成高瘦素水平,又可诱发 IR。由瘦素或其受体变异引起的高瘦素水平通过 IR 和高胰岛素血症,产生与胰岛素相关的肝内脂肪蓄积,又可通过改变胰岛素信号传递,提高肝细胞内脂肪酸的浓度,使甘油三酯的合成增加,形成脂肪肝。

表 2 各组血清瘦素水平及肝脏 ob-R 免疫组化染色图像分析( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	瘦素 /μg·L <sup>-1</sup>	ob-R
正常对照	-	11.94 ± 2.83 <sup>2)</sup>	171.4 ± 33.0 <sup>2)</sup>
模型	-	16.66 ± 4.91	130.1 ± 21.91
丹苘软胶囊	0.456	12.70 ± 3.48 <sup>1)</sup>	154.0 ± 36.09 <sup>1)</sup>
	0.228	12.58 ± 2.44 <sup>1)</sup>	157.3 ± 17.30 <sup>1)</sup>
	0.144	13.09 ± 3.57 <sup>1)</sup>	171.3 ± 25.95 <sup>2)</sup>
易善复	0.159	12.16 ± 3.07 <sup>2)</sup>	161.0 ± 18.66 <sup>1)</sup>

中医学认为该病病因与嗜食肥甘厚味,多逸少劳有关,其病位在肝,与脾、肾等脏腑密切相关,由脾肾肝三脏功能失调,痰瘀互结、湿热内蕴,停积于肝所致。丹苘软胶囊针对痰瘀互结、湿热内蕴这一主要病机,并结合现代药理研究成果,精选丹参、苘麻子二味中药,提取其有效作用部位物质加工而成。具有活血化瘀、清热利湿之功效,切合非酒精性脂肪肝的中医发病病机。经气相色谱质谱联用仪检测后,丹苘软胶囊中苘麻子油总不饱和脂肪酸相对含量约占脂肪酸总量的 73.18%,其中亚油酸含量为 60.73%。丹参石油醚浸膏中主要成分为:丹参酮 II<sub>A</sub>、丹参酮 I、隐丹参酮和二氢丹参酮 I,其中丹参酮 II<sub>A</sub> 约为 0.2%。亚油酸属于多不饱和脂肪酸

(polyunsaturated fatty acids, PUFA) 的一种,是公认的必需脂肪酸,具有降低血液胆固醇,预防动脉粥样硬化的作用。丹参酮 II<sub>A</sub> 具有天然抗氧化作用,在抗肿瘤、心脑血管疾病、抗菌消炎等方面均有良好的治疗作用。

在本研究中,模型组大鼠均出现了 IR、高瘦素血症以及肝脏瘦素受体表达异常增多,与相关文献报道一致。经丹苘软胶囊干预后,中药组各剂量组 IR 明显改善,血清瘦素水平及肝脏瘦素受体表达明显降低,提示丹苘软胶囊具有改善 NDFLD 模型大鼠 IR 及瘦素抵抗的作用。

### [参考文献]

- [1] 陈席,范建高. 非酒精性脂肪肝:代谢综合征的另一个特征[J]. 实用肝脏病杂志,2004,7(1):19.
- [2] Alba L M, Lindor K, Rewview article: Nonalcoholic fatty liver disease [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2003, 17(8):977.
- [3] 范建高,曾民德. 非酒精性脂肪性肝病的分类及其诊断策略[J]. 中华肝脏病杂志,2003,11(2):127.
- [4] Farrell G C, Chitturi S, Lau G K, et al. Guidelines for the assessment and management of non-alcoholic fatty liver disease in the Asia-Pacific region; executive summary [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2007, 22(6):775.
- [5] Chitturi S, Abeygunadekera S, Farrell G C, et al. NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrom [J]. Hepatol, 2002, 35(2):373.
- [6] 王倩,管小琴. 大鼠非酒精性脂肪肝造模方法的改进[J]. 世界华人消化杂志,2007,15(11):1219.
- [7] Marchesini G, Marzocchi R, Agostini F, et al. Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome [J]. Curr Opin Lipidol, 2005, 16(4):421.
- [8] Ahima R S, Flier J S. Leptin [J]. Annu Rev Physiol, 2000, 62(1):413.
- [9] Shimomura I, Hammer R E, Lkamoto S, et al. Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy [J]. Nature, 1999, 401(6748):73.

[责任编辑 聂淑琴]