

疏肝健脾方药对 NAFLD 大鼠肝组织 PPAR α mRNA 和 TNF- α 蛋白表达的影响

冯高飞¹, 杨钦河^{1*}, 纪桂元², 王文晶¹, 何秀敏¹, 张玉佩¹, 李树成¹, 闫海震¹, 黄进¹

(1. 暨南大学医学院, 广州 510632; 2. 中山大学公共管理学院, 广州 510080)

[摘要] 目的: 观察疏肝健脾方药对非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)大鼠肝组织过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator activated receptor alpha, PPAR α) mRNA 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)蛋白表达的影响及作用机制。方法: 高脂饲料喂养大鼠 12 周建立 NAFLD 模型后, 造模组大鼠随机分为模型组、疏肝组、健脾组、综合组、三七脂肝丸组和自然恢复组。除模型组继续高脂饮食外, 其余各组均以基础饲料喂养, 治疗组分别给予相应药物 ig, 其他各组给予相应蒸馏水 ig。治疗 8 周后, 腹主动脉采血, 全自动生化仪检测血脂、肝功能及肝脂; 常规 HE 染色观察肝组织病理变化; RT-PCR 法检测肝组织 PPAR α mRNA 表达; 免疫组化法检测肝组织 TNF- α 蛋白表达。结果: 与模型组比较, 药物治疗各组及自然恢复组肝脂含量明显减轻; 血脂、肝脂、肝功能指数明显降低($P < 0.01$); 肝组织 PPAR α mRNA 表达均有不同程度的上调($P < 0.05$), 以疏肝组、健脾组、综合组上调尤为明显($P < 0.01$); TNF- α 阳性细胞表达明显减少($P < 0.01$), 而以疏肝组、健脾组趋势最为显著。结论: 疏肝健脾方药对高脂饮食诱导的 NAFLD 大鼠有较好的治疗作用, 其机制可能与其上调 PPAR α mRNA 和下调 TNF- α 蛋白表达水平有关。

[关键词] 非酒精性脂肪性肝病; 疏肝健脾方药; 过氧化物酶体增殖物激活受体 α ; 肿瘤坏死因子- α

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)20-0195-05

Effects of Soothing Liver and Invigorating Spleen Recipes on PPAR α mRNA and TNF- α Protein Expression in Non-alcoholic Fatty Liver Disease Model of Rats

FENG Gao-fei¹, YANG Qin-he^{1*}, JI Gui-yuan², WANG Wen-jing¹, HE Xiu-min¹,

ZHANG Yu-pei¹, LI Shu-cheng¹, YAN Hai-zhen¹, HUANG Jin¹

(1. Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. School of Public Health, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Soothing liver and Invigorating spleen recipes on PPAR α mRNA and TNF- α protein expression in hepatic tissue of rats with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and to explore the molecular mechanism. **Method:** NAFLD model was established by feeding high fat diet for 12 weeks. Then rats were randomly divided into 6 groups: model group, Soothing liver group, Invigorating spleen group, integrated group, Sanqi Zhigan Pill group and natural recovery group. Rats in model group were continuously given high fat diet while all other rats were given normal diet. Meanwhile, rats in medication groups were administrated i. g. with corresponding herbs. Eight weeks after the treatment, all rats were anesthetized by 3% pentobarbital

[收稿日期] 20110504(002)

[基金项目] 广东省中医药强省科研课题(2010122)和中央高校基本科研业务费专项基金(21609415)

[第一作者] 冯高飞, 在读博士生, 从事中西医结合防治慢性肝病研究, E-mail: fgfily_19810913@163.com

[通讯作者] * 杨钦河, 医学博士、博士后, 教授, 博士生导师, 从事中西医结合防治慢性肝病研究, Tel: 020-85226197, E-mail: tyangqh@jnu.edu.cn

sodium through intraperitoneal injection. TC, TG, AST, ALT content in the serum and TC, TG content in liver tissue was detected by automatic biochemical analyzer. The pathological changes of hepatic tissue were observed by HE staining. The peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR α) mRNA expression in liver tissue was examined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). tumor necrosis factor- α (TNF- α) protein expression in the liver tissue was detected by immunohistochemistry. **Result:** Compared with the model group, the hepatic steatosis degree was alleviated obviously in all treatment groups and natural recovery group. TC, TG, AST, ALT content in serum, and TC, TG content in liver tissue were dramatically declined ($P < 0.01$). PPAR α mRNA expression in treatment groups and natural recovery group was up-regulated ($P < 0.05$), especially in the soothing liver and invigorating spleen group, whose expression was much higher compared with model group ($P < 0.01$); Compared with that in model group, TNF- α positive cell numbers were significantly decreased in treatment groups and natural recovery group ($P < 0.01$). **Conclusions:** Soothing liver and invigorating spleen methods and recipes showed certain therapeutic effect on NAFLD, which might be linked to up-regulating PPAR α mRNA and down-regulating TNF- α protein expression.

[**Key words**] non-alcoholic fatty liver disease; Soothing liver and Invigorating spleen methods and recipes; peroxisome proliferator activated receptor alpha; tumor necrosis factor- α

非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是一种遗传-环境-代谢应激相关性肝病, 其发病率日益增高, 并呈现低龄化趋势, 在我国已成为仅次于病毒性肝炎的第二大肝病^[1]。前期课题组运用多种治法方药进行临床和实验研究, 提出肝郁脾虚是脂肪肝的基本病机, 疏肝、健脾治法在 NAFLD 的防治中应贯穿始终^[2-4], 并在此基础上初步阐明了疏肝健脾方药抗 NAFLD 的作用机制^[5-7]。本实验在前期研究基础上, 试从疏肝健脾方药对 NAFLD 大鼠过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator activated receptor alpha, PPAR α) mRNA 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 蛋白表达的影响入手, 进一步探讨其治疗 NAFLD 的分子机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 76 只, 由广州中医药大学实验动物中心提供, 许可证号 SCXK (粤) 2005-2004, 体重 (200 \pm 20) g。

1.2 药物 ①疏肝方 (柴胡疏肝散): 柴胡 6 g, 川芎 5 g, 枳壳 5 g, 陈皮 6 g, 白芍 5 g, 香附 5 g, 制甘草 3 g; ②健脾方 (参苓白术散): 人参 15 g, 白术 15 g, 茯苓 15 g, 薏苡仁 9 g, 砂仁 6 g, 山药 15 g, 桔梗 6 g, 白扁豆 12 g, 莲子 9 g, 制甘草 9 g; ③综合方 (柴胡疏肝散与参苓白术散合方); ④三七脂肝丸: 适用于肝郁脾虚的脂肪肝患者, 作为本研究的对照组。上述疏肝健脾方药均为深圳华润三九医药股份有限公司中

药配方颗粒剂 (批号 1002241S), 剂量组成参考第六版《方剂学》教材^[8]; 三七脂肝丸 (国药准字 Z20025353), 由云南玉溪望子隆生物制药有限公司提供。

1.3 饲料 基础饲料由广东省实验动物中心提供, 高脂饲料 (基础饲料 83% + 猪油 10% + 胆固醇 1.5% + 胆盐 0.5% + 蔗糖 5%) 由暨南大学实验动物中心加工。

1.4 试剂 RT-PCR 试剂盒 (TaKaRa Code: DRR063A), TNF- α 单克隆抗体 (武汉博士德生物科技有限公司, 克隆号 BA0996), TRIZOL 试剂盒 (Invitrogen 公司 15596-026), 免疫组化染色 SABC 试剂盒 (武汉博士德生物科技有限公司, 批号 SA1022), 浓缩型 DAB 试剂盒 (武汉博士德生物科技有限公司, 批号 AR1022), AST (批号 CH0101202), ALT (批号 CH0101201), TC (批号 CH0101152), TG (批号 CH0101151 (四川迈克生物科技股份有限公司))。

2 方法

2.1 动物分组及模型建立 大鼠适应性喂养 1 周后随机分为正常组 (10 只), 造模组 (66 只)。正常组给予基础饲料喂养, 造模组给予高脂饲料喂养。12 周后随机抽取造模组 6 只, 取肝组织病理检测。鉴定造模成功后, 将造模组随机分为模型组、自然恢复组、疏肝组、健脾组、综合组、三七脂肝丸组 (简称三七组), 每组 10 只。

2.2 给药方法 造模成功后,除模型组继续给以高脂饲料喂养外,其余各组均改为基础饲料喂养。同时各用药组按 $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 给予相应的药物 ig, 给药剂量按人和动物体表面积折算^[9]。疏肝组:柴胡疏肝散 $3.2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$;健脾组:参苓白术散 $10 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$;综合组:柴胡疏肝散合参苓白术散 $11.9 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$;三七组:三七脂肝丸 $4.9 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,正常组、模型组及自然恢复组给予相应剂量的蒸馏水,每天上午 1 次,连续 8 周。

2.3 指标检测 各组大鼠于末次给药后,禁食不禁水,以 3% 戊巴比妥钠腹腔麻醉 ($1 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$),腹主动脉采血,距离肝边缘 0.5 cm 处取相同部位肝左叶组织进行病理、RT-PCR 及免疫组化检测。

2.3.1 生化指标 全自动生化检测仪检测血清 TC, TG, AST, ALT 及肝组织 TC, TG 含量。

2.3.2 病理学检查 4% 多聚甲醛溶液固定肝组织,大小约 $2 \text{ cm}\times 2 \text{ cm}\times 0.3 \text{ cm}$,常规石蜡包埋、切片,HE 染色,光镜下观察肝脏组织学变化。

2.3.3 肝组织 PPAR α mRNA 表达检测 ① RNA 提取和逆转录反应:Trizol 提取肝组织总 RNA,测定含量及纯度,逆转录为 cDNA。② 引物设计:GeneBank 中查找大鼠 PPAR α , β -actin 基因序列,用 Primer 5.0 软件处理系统对引物进行设计和评价,上海英骏生物技术有限公司合成引物序列:PPAR α 上游 $5'$ -GCCCGGGTCATACTCGCAGGA- $3'$,下游 $5'$ -AGCCATTGCCGTACGCGATCA- $3'$,产物长度 415 bp; β -actin 内参照:上游 $5'$ -GCCGGGACCTGACA GACTAC- $3'$,下游 $5'$ -CCGCTCATTGCCGATAGTG - $3'$,产物长度 228 bp,反应体系中使用各引物浓度为 $10 \text{ pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。③ PCR 扩增:采用 $20 \mu\text{L}$ 反应体系,

反应条件:预变性 $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 2 min,变性 $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s,退火 $54 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s,延伸 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 2 min,36 个循环,延伸 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 终止反应。④ PCR 产物分析:采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,将各组 PCR 产物和上样缓冲液以 5:1 比例上样,100 V 30 min 电泳,显示 DNA 条带;应用 Image-Master VDS 图像扫描分析系统测定目的条带与内参条带的吸光度 A 。

2.3.4 肝组织 TNF- α 蛋白表达 4% 多聚甲醛溶液固定肝组织,常规石蜡包埋,作 $5 \mu\text{m}$ 切片,免疫组化 SABC 法染色,DAB 显色。以组织细胞胞浆中出现棕黄色沉淀,染色强度高于背景非特异性染色者为阳性表达,用磷酸盐缓冲液作为阴性对照,每个标本高倍镜下取 20 个不同视野,报告各自着色面积区域百分比。切片经暨南大学医学院中心实验室图像分析中心 Leica Qwin V3 软件分析处理。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 16.0 进行统计学处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示;组间均数比较采用单因素方差分析;TNF- α 两两阳性率比较用 χ^2 检验及 Fisher 确切概率检验; $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠血脂、肝脂、及肝功能变化 与正常组比较,模型组大鼠 TG, TC, ALT, AST 含量显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,各用药组及自然恢复组大鼠 TG, TC, ALT, AST 含量明显降低 ($P < 0.01$),以疏肝组下降趋势最为明显;各用药组及自然恢复组之间 TG, TC 含量比较无统计学差异。提示饮食控制与药物治疗均能改善大鼠血清及肝组织脂肪沉积,以饮食控制加用疏肝方药效果最为明显,同时饮食控制与药物治疗有抗肝细胞损坏及减轻肝细胞炎症的作用,以疏肝方药和健脾方药效果最好。表 1~2。

表 1 各组大鼠血脂、肝脂比较 ($\bar{x} \pm s$)

mmol·L⁻¹

组别	剂量 / $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	n	血清 TC	血清 TG	肝组织 TC	肝组织 TG
正常	-	10	1.39 ± 1.55	0.71 ± 0.14	1.43 ± 0.60	0.96 ± 0.23
模型	-	10	4.36 ± 1.70 ¹⁾	1.17 ± 0.25 ¹⁾	3.23 ± 0.61 ¹⁾	6.56 ± 2.02 ¹⁾
疏肝	3.2	9	1.34 ± 0.11 ²⁾	0.72 ± 0.26 ²⁾	2.10 ± 0.81 ²⁾	3.23 ± 0.92 ²⁾
健脾	10	9	1.45 ± 0.23 ²⁾	0.84 ± 0.19 ²⁾	2.27 ± 0.82 ²⁾	3.50 ± 0.72 ²⁾
综合	11.9	8	1.45 ± 0.20 ²⁾	0.73 ± 0.29 ²⁾	2.15 ± 0.70 ²⁾	3.46 ± 0.79 ²⁾
自然	-	10	1.43 ± 0.24 ²⁾	0.94 ± 0.30 ²⁾	2.29 ± 0.95 ²⁾	4.64 ± 1.30 ²⁾
三七	4.9	8	1.24 ± 0.42 ²⁾	0.82 ± 0.41 ²⁾	2.23 ± 0.48 ²⁾	4.17 ± 1.17 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ (表 2,4 同)。

表 2 各组大鼠肝功能比较 ($\bar{x} \pm s$) U·L⁻¹

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	ALT	AST
正常	-	10	31.06 ± 6.82	70.40 ± 9.73
模型	-	10	76.30 ± 20.16 ¹⁾	133.6 ± 27.47 ¹⁾
疏肝	3.2	9	35.00 ± 3.42 ²⁾	76.13 ± 4.64 ²⁾
健脾	10	9	40.30 ± 7.50 ²⁾	72.10 ± 7.30 ²⁾
综合	11.9	8	37.33 ± 7.33 ²⁾	73.67 ± 12.40 ²⁾
自然	-	10	41.09 ± 13.20 ²⁾	78.45 ± 12.90 ²⁾
三七	4.9	8	41.13 ± 21.80 ²⁾	86.38 ± 35.65 ²⁾

3.2 光镜观察 正常组大鼠肝小叶结构清晰,细胞索排列整齐,肝窦正常,肝细胞无明显病变,核结构清晰;模型组大鼠肝细胞增大,胞浆内脂滴大小不一,呈中度肝细胞脂肪变性,小叶内炎症较重,炎症细胞主要以淋巴细胞为主;各药物组及自然恢复组脂滴均有不同程度减少,疏肝组效果最佳,健脾组及综合组其次,其余各组大鼠肝组织仍可见轻到中度的脂肪变。提示几种治疗方法及饮食控制均能在一定程度上调节脂质代谢的作用,但以疏肝法、健脾法治疗效果较佳。

3.3 大鼠肝组织 PPAR α mRNA 表达水平 各组 PPAR α mRNA 均有不同程度的表达,模型组表达水平最低,与正常组比较有显著性差异 ($P < 0.01$);与模型组比较,各治疗组及自然恢复组表达量显著升高 ($P < 0.05$),疏肝组、健脾组、综合组 PPAR α mRNA 升高尤为明显 ($P < 0.01$)。表明控制高脂饮食能够调节 NAFLD 大鼠肝组织 PPAR α mRNA 的表达,而控制高脂饮食同时运用疏肝健脾方药能够显著上调 PPAR α mRNA 的表达水平(见表 3)。

表 3 各组大鼠肝组织 PPAR α mRNA 相对表达量的比较

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	PPAR α / β -actin
正常	-	10	0.72 ± 0.14
模型	-	10	0.13 ± 0.09 ¹⁾
疏肝	3.2	9	0.68 ± 0.35 ²⁾
健脾	10	9	0.62 ± 0.21 ²⁾
综合	11.9	8	0.55 ± 0.14 ²⁾
自然	-	10	0.49 ± 0.08 ³⁾
三七	4.9	8	0.36 ± 0.10 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$,³⁾ $P < 0.05$ 。

3.4 各组大鼠肝组织 TNF- α 免疫组化结果 根据阳性细胞的百分比与染色强度,参照相关文献^[10]的判断标准,正常组大鼠肝组织 TNF- α 阳性表达细胞数低,阳性表达率为 10%;模型组大鼠肝组织细胞 TNF- α 表达最强,阳性表达率最高,为 80%,主要分

布在 Kupffer 细胞浆内,同时可见 Kupffer 细胞大小不一,形态多样,呈星形、多角形、梭形、十字型等不规则形,以梭形最多。正常组与模型组比较有显著性差异 ($P < 0.01$)。与模型组比较,其余各用药组及自然恢复组阳性表达率显著降低 ($P < 0.01$),其中以疏肝组及健脾组的阳性表达降低效果最为明显(表 4)。

表 4 各组大鼠肝组织 TNF- α 的表达

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	阴性 阳性 强阳性			阳性率 /%
			(-)	(+)	(++)	
正常	-	10	9	1	0	10.0
模型	-	10	2	3	5	80.0 ¹⁾
疏肝	3.2	9	7	2	0	22.2 ²⁾
健脾	10	9	6	2	1	33.3 ²⁾
综合	11.9	8	5	2	1	37.5 ²⁾
自然	-	10	6	3	1	40.0 ²⁾
三七	4.9	8	5	1	2	37.5 ²⁾

4 讨论

中医无脂肪肝病名,将其归属于“积症”、“胁痛”、“痰证”、“瘀血”、“肥气病”等范畴,主要是由于饮食不节、劳逸失度、情志失畅等导致肝疏泄失职、脾运化失权、水湿内停、痰浊内生、气滞血瘀而成。以往研究发现^[2,4],高脂饮食是 NAFLD 发生的基本病因,由此形成的肝郁脾虚是其基本病机,这也符合现代人饮食习惯,过食肥甘厚腻,导致脾失健运,脾病及肝,即“土侮木”,肝失疏泄,水湿、痰浊、瘀血沉积于肝引发 NAFLD。疏肝健脾方药柴胡疏肝散、参苓白术散乃中医名方,具有疏肝解郁,行气止痛,益气健脾,渗湿止泻等功效,药物配伍合理,应验于临床疗效卓著。本实验用高脂饮食喂养大鼠 12 周成功复制 NAFLD 模型,符合本病形成的病因病机,药物治疗 8 周后,与正常组比较,模型组大鼠肝脂(TG,TC)含量显著升高 ($P < 0.01$),自然恢复组大鼠肝脂含量明显降低 ($P < 0.01$),进一步印证了高脂饮食是 NAFLD 形成的重要外在因素,饮食控制可以改善 NAFLD 的肝脂含量,而疏肝方药治疗组肝脂下降趋势最为明显,揭示饮食控制加用疏肝方药可以明显改善 NAFLD 大鼠肝脏脂肪沉积。

NAFLD 是一种病理综合征,其病理特点是脂肪在肝脏蓄积以及炎症因子等多种因素参与的肝细胞脂肪变性、脂质过氧化损伤,最终导致脂肪性肝炎、肝纤维化甚或肝硬化的发生,而 PPAR α 和 TNF- α 在其病理演变过程中发挥重要作用。PPAR α 主要在肝脏表达,与脂质代谢调节密切相关。目前,普遍的

观点认为 PPAR α 活化对控制 NAFLD 的发生发展是有益的。肝脏脂肪酸水平的升高被 PPAR α 感知后引起 PPAR α 的活化,继而激活脂肪酸 β 氧化,启动一系列与脂质代谢有关的蛋白质和酶的基因转录,这对于减少肝脏中的脂肪堆积和肝外组织的能量储存是必要的。本研究显示,与正常组比较,模型组大鼠肝组织 PPAR α 表达量显著下降 ($P < 0.01$),肝脂和血脂显著升高 ($P < 0.01$),提示 PPAR α 的减少导致脂肪酸代谢失衡,引起脂质蓄积可能是 NAFLD 发生的原因之一;疏肝健脾方药组 PPAR α mRNA 表达水平显著升高,肝脂和血脂水平显著降低,与模型组比较有显著性差异 ($P < 0.01$);与三七组及自然恢复组比较,疏肝健脾方药组 PPAR α mRNA 表达仍具有显著性差异 ($P < 0.05$);因此,通过激活肝组织 PPAR α mRNA 的表达来调节脂质代谢可能是疏肝健脾方药治疗 NAFLD 的机制之一。TNF- α 是一种具有多种生物学功能的细胞因子,主要由单核-巨噬细胞系统分泌,是机体炎症反应和免疫应答反应的主要调节因子。在 NAFLD 的发病中,TNF- α 是介导肝损伤的主要因子,通过不同方式参与氧化应激和脂质过氧化,诱发肝脏炎症反应,在单纯性脂肪肝向脂肪性肝炎、肝纤维化过渡中扮演关键角色^[11-12]。本研究表明,与正常组比较,模型组肝组织中 TNF- α 表达量明显增高 ($P < 0.01$),肝细胞脂肪变明显,呈中度脂肪变性,提示 TNF- α 含量的升高可能与肝细胞脂肪变性程度存在一定的正相关,可能通过多种方式加重肝细胞脂肪变性,而脂肪变性程度的加剧进一步刺激 TNF- α 等炎症因子的释放;与模型组比较,各治疗组及恢复组 TNF- α 表达量均有不同程度的下降 ($P < 0.01$),肝细胞脂肪变也不同程度减轻,尤以疏肝组及健脾组趋势更明显,提示疏肝健脾方药协同控制高脂饮食能更好的减轻肝细胞脂肪变性及炎症反应,这在预防 NAFLD 向 NASH 及肝纤维化的转变过程中具有积极意义。

综上,疏肝健脾方药可能通过上调 PPAR α mRNA 和下调 TNF- α 蛋白表达来参与调节 NAFLD

脂质代谢、脂质过氧化及炎症反应,其详细作用机制有待进一步阐明。

[参考文献]

- [1] Fan J G, Farrell G C. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease in China[J]. J Hepatol, 2009, 50(1): 204.
- [2] 李玉权,杨钦河,谢维宁,等.疏肝健脾治法治疗非酒精性脂肪肝 35 例[J]. 中医杂志, 2007, 48(9): 824.
- [3] 孟民杰,杨钦河,王强,等.不同治法方药对脂肪肝大鼠肝 kupffer 细胞 ERK1/2 蛋白活性的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(8): 1551.
- [4] 杨钦河,谢芳,王凤珍,等.不同治法方药对脂肪肝大鼠肝组织 NF- κ Bp65 及 kupffer 细胞 p38MAPK 蛋白表达的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2009, 27(2): 141.
- [5] 杨钦河,欧健,孙升云,等.疏肝健脾方药对非酒精性脂肪性肝病大鼠肝细胞 PI3K p85 α 蛋白表达的影响[J]. 广东药学院学报, 2009, 25(1): 62.
- [6] 杨钦河,陈同炎,李娜,等.疏肝健脾方药对非酒精性脂肪性肝病大鼠肝组织 UCP₂ mRNA 及蛋白表达的影响[J]. 安徽中医学院学报, 2010, 29(2): 56.
- [7] 杨钦河,顾常霖,陈同炎,等.疏肝健脾方药对非酒精性脂肪性肝病大鼠肝组织脂肪酸合成酶 mRNA 及蛋白表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(4): 843.
- [8] 段富津. 方剂学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1995:178.
- [9] 施新猷. 现代医学实验动物学[M]. 北京:人民军医出版社, 2000:334.
- [10] 许中良,杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准[J]. 中国癌症杂志, 1996, 6(4): 299.
- [11] Fan Xiao-fen, Deng Yin-quan, Ye Lei, et al. Effect of Xuezhikang Capsule on serum tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in patients with nonalcoholic fatty liver disease and hyperlipidemia [J]. Chinese Journal of Integrative Medicine, 2010, 16(2): 119.
- [12] 杨林辉,陈东风. TNF-A 与非酒精性脂肪肝[J]. 现代医药卫生, 2007, 23(1): 55.

[责任编辑 聂淑琴]