

丹苘软胶囊对非酒精性脂肪肝模型大鼠的药效学研究

刘锐¹, 李劲平², 范娟娟³, 甘国兴³, 莫新民^{3*}

(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) 模型大鼠的药效学。方法: 将实验动物随机分为正常组、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⁻¹ ig, 易善复组每天予易善复 0.159 g·kg⁻¹ ig, 正常对照组、模型组给药相同体积 (1.2 mL·kg⁻¹) 的蒸馏水 ig。ig 4 周后, 观察药物对大鼠血脂、肝脏脂肪含量及肝脏病理形态变化。结果: 丹苘软胶囊各剂量组及易善复组血清 TC, TG, LDL-C 水平及肝脏 TG, TC 含量明显低于模型组 ($P < 0.01$, $P < 0.05$); 丹苘软胶囊各剂量组、易善复组肝细胞脂肪变性程度较模型组明显改善 ($P < 0.01$)。结论: 丹苘软胶囊可以明显降低 NAFLD 模型大鼠血清 TG, TC, LDL 水平及肝脏 TG, TC 含量, 改善肝组织病理形态。

[关键词] 非酒精性脂肪肝; 丹苘软胶囊; 药效学

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)11-0175-04

Effects of Danqing Soft Capsule on Rats with Non-alcoholic Fatty Liver Disease

LIU Rui¹, LI Jin-ping², FAN Juan-juan³, GAN Guo-xing³, MO Xin-min^{3*}

(1. Ruikang Hospital of Guangxi Traditional Chinese Medicine University, Nanning 530011, China;
2. Medicine College of Centerl South University, Changsha 410013, China;
3. Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Danqing Soft Capsule (DSC) on rat with non-alcoholic fatty liver (NAFLD). **Method:** The 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. Non-alcoholic fatty liver disease model in SD rats was established with high fat diet. DSC high dose group, medium dose group and low dose group were intervened with different concentrations of DSC, which are respectively equivalent to petroleum ether extract of salvia 0.456, 0.228, 0.114 g·kg⁻¹. PPC group was intervened with PPC of 0.159 g·kg⁻¹ ig. Control group and model group were administered the same volume (1.2 mL·kg⁻¹, ig) of distilled water. After treatment for 4 weeks, rat liver pathological changes, TG, TC level, and blood lipids levels were observed. **Result:** The levels of TC, TG, LDL-C in serum and the levels of TG and TC in liver of control group, traditional Chinese medicine (TCM) groups and western medicine (WM) group were significantly lower than those of model group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Compared with those in model group, the degrees of fatty degeneration of liver cells in TCM groups and WM group were significantly improved ($P < 0.01$). **Conclusion:** DSC can reduce the level of TG, TC, LDL in serum as well as the level of TG and TC in liver. It can improve the steatosis of liver in rats with NAFLD.

[Key words] non-alcoholic fatty liver; Danqing Soft Capsule; pharmacodynamics

[收稿日期] 20101121(007)

[第一作者] 刘锐, 医学博士, 主治医师, 从事中医内科老年病学研究, E-mail: rjui@126.com

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

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^[1]。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^[2-3]。目前西方国家 NAFLD 患病率约 20% ~ 30%, 亚太地区约 12% ~ 24%^[4]。中医学无脂肪肝的病名, 但根据其临床表现一般认为归属于中医的肝癖、胁痛、积聚、痰浊、肥气、臌胀等范畴。近年来, 中医药在防治脂肪肝病方面取得了不少进展, 实验及临床研究发现, 一些单味中药和中药复方对于脂肪肝具有明显的治疗效果, 而且具有作用广泛、效果稳定、使用安全、毒副作用小的特点, 展现出良好的发展前景。本研究通过建立实验性非酒精性脂肪肝模型大鼠, 以中药制剂丹苘软胶囊进行干预, 从血脂、肝脏脂肪含量及肝脏病理形态等方面验证该中药的药物疗效。

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 号, 饲养于湖南中医药大学实验动物中心。

1.2 药物 丹苘软胶囊由中南大学药学院制备提供, 丹苘软胶囊药物剂量为: 丹苘软胶囊高剂量组以 19 g 丹参石油醚浸膏溶于 50 mL 苘麻子油制成 (含 2 550 g 丹参生药材, 312 g 苘麻子生药材)。丹苘软胶囊中剂量组 9.5 g 丹参石油醚浸膏溶于 50 mL 苘麻子油制成 (含 1 275 g 丹参生药材, 312 g 苘麻子生药材)。丹苘软胶囊低剂量组 4.25 g 丹参石油醚浸膏溶于 50 mL 苘麻子油制成 (含 637.5 g 丹参生药材, 312 g 苘麻子生药材)。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, 配制成每毫升含多烯磷脂酰胆碱 132.4 mg。

1.3 试剂 胆固醇中国医药 (集团) 上海化学试剂公司, 批号 20081028, 胆酸钠, 上海蓝季科特发展有限公司, 批号 090820, 丙硫氧嘧啶, 上海朝晖药业有限公司, 批号 090503, 猪油、蔗糖购自农贸市场。

1.4 仪器 LEICA DM LB2 型双目显微镜 (麦克奥迪实业集团公司); Motic B_s 显微摄像系统 (麦克奥迪实业集团公司); CL-7200 全自动生化分析仪 (日

本岛津)。

2 方法

2.1 非酒精性脂肪肝大鼠模型的建立 以高脂饲料^[5] (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 只为空白组, 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⁻¹ig, 易善复组每天予易善复 0.159 g·kg⁻¹ig, 正常对照组、模型组给药相同体积 (1.2 mL·kg⁻¹) 的蒸馏水 ig。

2.3 取材 ig 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 2 块, 1 块浸入 4% 多聚甲醛溶液中, 固定 48 h, 取块石蜡包埋, 切片观察病理改变; 另 1 块匀浆测肝组织 TC, TG。

2.4 观察指标及方法

2.4.1 大体观察 观察各组新鲜肝脏色泽、形态, 称肝脏湿重, 测算肝脏指数。

2.4.2 显微观察 HE 染色镜下观察肝脏组织病理改变。依据肝细胞脂肪变性占据所获取肝组织标本量的范围, 分为 4 度 (0 ~ III): 0 为 <5% 肝细胞脂肪变; + 为 5% ~ 30% 肝细胞脂肪变; ++ 为 31% ~ 50% 肝细胞脂肪变; +++ 为 51% ~ 75% 肝细胞脂肪变; ++++ 为 75% 以上肝细胞脂肪变^[6]。

2.4.3 肝脏 TC, TG 测定 称取 500 mg 新鲜肝组织匀浆, 参照文献介绍^[7] 脂质抽提法, 按 1:9 与氯仿-甲醇混合液 (1:1) 充分混匀, 静置过夜。3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清液于全自动生化仪检测 TC, TG。

2.4.4 血清生化测定 全自动生化分析仪测定血清 AST, ALT, TC, TG, HDL-C, LDL-C。

2.5 统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较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; 有序分类资料采用 Ridit 分析; 所有数据均用 SPSS 16.0 统计软件包进行处理。P < 0.05 有统计

学意义。

3 结果

3.1 肝脏组织病理学观察

3.1.1 肉眼观 正常组肝表面颜色普遍暗红,色泽鲜亮,中等硬度,切面略有颗粒感,无油腻感。模型组多数肝脏表面颜色发黄,肝脏体积明显增大,包膜紧张,部分肝脏呈奶黄色,切面油腻有油滴,无颗粒感。其余各用药组颜色、质地介于两者之间。但各用药组与模型组在肝湿重及肝指数方面比较无显著性差异。肝湿重及肝指数(肝湿重/体重 $\times 100\%$)变化见表1。

表1 各组肝脏湿重及肝指数($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	体重/g	肝脏湿重及肝指数	
			肝脏湿质量 /g	肝脏指数 /%
正常对照	-	467.5 \pm 52.3	13.11 \pm 1.91	2.81 \pm 0.17
模型	-	393.0 \pm 31.4 ¹⁾	13.81 \pm 2.02	3.48 \pm 0.29 ¹⁾
丹苘软胶囊	0.456	399.9 \pm 28.8 ¹⁾	14.0 \pm 1.47	3.51 \pm 0.19 ¹⁾
	0.228	397.2 \pm 36.3 ¹⁾	13.82 \pm 1.68	3.47 \pm 0.19 ¹⁾
	0.144	389.3 \pm 36.0 ¹⁾	13.58 \pm 1.24	3.50 \pm 0.21 ¹⁾
易善复	0.159	386.6 \pm 36.1 ¹⁾	12.88 \pm 1.27	3.21 \pm 0.22 ¹⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

3.1.2 HE染色光镜下观察 正常组肝组织形态结果正常;模型组肝小叶内肝细胞,弥漫性脂肪变,大泡形与小泡形均存在,部分肝细胞肿胀,胞质疏松呈气球样改变。丹苘软胶囊各组及西药组病理改变介于正常组与模型组之间。见表2。

表2 各组肝细胞脂肪变性程度

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	肝细胞脂肪变性程度				
		0	+	++	+++	++++
正常对照	-	10	0	0	0	0 ¹⁾
模型	-	0	0	1	7	2
丹苘软胶囊	0.456	1	8	1	0	0 ¹⁾
	0.228	0	8	2	0	0 ¹⁾
	0.144	1	6	3	0	0 ¹⁾
易善复	0.159	1	8	1	0	0 ^Δ

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 肝脏组织 TC, TG 含量 正常组、丹苘软胶囊各剂量组及易善复组肝脏 TC, TG 含量比模型组均明显降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);正常组、丹苘软胶囊各剂量组、易善复组之间比较肝脏 TC 含量无明显差异;丹苘软胶囊高、中剂量组、西药组之间比较肝脏 TG 含量无明显差异,丹苘软胶囊低剂量组肝脏 TG 含量高于空白组、中药高剂量组($P < 0.05$)。见表3。

表3 各组肝脏组织 TC, TG 含量($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	肝 TC 肝 TG	
		/mmol·g ⁻¹	/mmol·g ⁻¹
正常对照	-	1.05 \pm 0.20 ²⁾	0.27 \pm 0.11 ²⁾
模型	-	1.57 \pm 0.26	0.51 \pm 0.12
丹苘软胶囊	0.456	1.16 \pm 0.23 ²⁾	0.31 \pm 0.08 ²⁾
	0.228	1.18 \pm 0.33 ²⁾	0.35 \pm 0.07 ²⁾
	0.144	1.21 \pm 0.24 ²⁾	0.41 \pm 0.12 ^{1,3)}
易善复	0.159	1.15 \pm 0.14 ²⁾	0.33 \pm 0.09 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与丹苘软胶囊高剂量组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

3.3 血清 AST, ALT, TC, TG, HDL-C, LDL-C 血清中 AST, ALT 各组之间比较无明显差异;正常组、丹苘软胶囊各剂量组及易善复组 TC 明显低于模型组($P < 0.01$),丹苘软胶囊各剂量组及易善复组之间 TC 无明显差异;正常组、丹苘软胶囊高剂量组及易善复组 TG 明显低于模型组($P < 0.05$),丹苘软胶囊各剂量组、易善复组之间比较无明显差异;模型组与正常组之间比较 HDL-C 无明显差异,丹苘软胶囊高、中剂量组及易善复组高于丹苘软胶囊低剂量组($P < 0.05, P < 0.01$);正常组、丹苘软胶囊各剂量组及易善复组 LDL-C 明显低于模型组($P < 0.01$),丹苘软胶囊低剂量组明显低于高剂量组及易善复组($P < 0.01$),见表4。

4 讨论

NAFLD 的治疗有饮食疗法、运动疗法和药物疗法等,其基本原则是及早治疗,防止并发症。目前,医学上尚无治疗非酒精性脂肪肝病的有效手段,药物治疗尚停留在探索性阶段。近年来,胰岛素增敏剂、调脂药物、抗氧化剂以及护肝药物正越来越受到人们的关注,但是动物实验以及临床研究表明,这些替代性药物治疗非酒精性脂肪肝病的效果差强人意,临床实验发现某些药物甚至可以引发明显而罕见的肝脏毒性,其治疗效果以及安全性均需要在今后的实验中进一步评价。因此,研发安全有效的治疗非酒精性脂肪肝病的药物是当前一项诱人而具有挑战性的任务。

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

表 4 各组血清 AST, ALT, TC, TG, HDL, LDL 比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	AST /U·L ⁻¹	ALT /U·L ⁻¹	TC /mmol·L ⁻¹	TG /mmol·L ⁻¹	HDL-C /mmol·L ⁻¹	LDL-C /mmol·L ⁻¹
正常对照	-	188.1 ± 69.5	46.78 ± 9.87	1.73 ± 0.56 ²⁾	0.60 ± 0.18 ¹⁾	0.44 ± 0.10	0.58 ± 0.12 ²⁾
模型	-	173.5 ± 50.8	68.74 ± 11.86	2.55 ± 0.68	1.06 ± 0.63	0.48 ± 0.06	1.33 ± 0.45
丹苘软胶囊	0.456	151.1 ± 55.5	57.56 ± 17.50	1.43 ± 0.54 ²⁾	0.70 ± 0.32 ¹⁾	0.54 ± 0.09 ³⁾	0.73 ± 0.11 ²⁾
	0.228	179.4 ± 57.1	66.97 ± 8.70	1.43 ± 0.44 ²⁾	0.75 ± 0.23	0.53 ± 0.16 ³⁾	0.64 ± 0.11 ²⁾
	0.144	183.3 ± 49.9	68.24 ± 38.25	1.54 ± 0.50 ²⁾	0.82 ± 0.61	0.39 ± 0.06	0.48 ± 0.13 ^{2,6)}
易善复	0.159	173.2 ± 64.0	46.62 ± 14.26	1.89 ± 0.61 ²⁾	0.70 ± 0.23 ¹⁾	0.57 ± 0.10 ^{4,5)}	0.76 ± 0.14 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与丹苘软胶囊低剂量组比较³⁾ $P < 0.05$ ⁴⁾ $P < 0.01$;与正常组比较⁵⁾ $P < 0.05$;与丹苘软胶囊高剂量组、易善复组比较⁶⁾ $P < 0.01$ 。

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_A、丹参酮 I、隐丹参酮和二氢丹参酮 I,其中丹参酮 II_A 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_A 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。经丹苘软胶囊干预后,中药各剂量组血清 TG, TC, LDL 水平及肝脏 TG, TC 含量明显降低,肝组织病理形态得到明显改善,说明该药物有确有改善 NAFLD 大鼠肝脏脂肪变性的作用。

[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].实用肝病杂志 2004,7(1):19.

[2] Alba LM, 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].中华肝病杂志,2003,11(2):127.

[4] Farrell GC, Chitturi S, Lau GK, 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] 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

[6] 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组.非酒精性脂肪性肝病诊疗指南 [J].中华肝病杂志, 2006,14(3):161

[7] 方厚华.医学实验模型动物[M].北京:军事医学科学出版社,2002,27

[责任编辑 聂淑琴]