

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

赵海霞*, 李 勇, 孙建光

(山东中医药大学附属医院, 山东 济南 250011)

[摘要] **目的:** 通过观察非酒精性脂肪肝大鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的变化, 探讨肝脂清颗粒剂治疗脂肪肝的机理。**方法:** 采用高脂饲料复制脂肪肝模型, 分为 8 组, 前 3 组造模同时给予中药肝脂清干预, 12 周后处死, 后 5 组进入治疗性实验研究, 分为肝脂清高、低剂量治疗组、东宝肝泰对照组及模型自然恢复组, 治疗 12 周后, 处死动物, 计算各组大鼠肝指数、以免疫组化方法测定血清及肝匀浆中的肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 水平。**结果:** 与正常对照组相比, 造模组肝指数、血液及肝组织中的 TNF- α 水平显著升高($P < 0.01$), 经肝脂清颗粒剂防治与治疗, 肝指数、肝与血中 TNF- α 水平明显下降, 其差异具显著性。**结论:** 肝脂清可有效地降低 TNF- α 水平, 该作用可能是其治疗非酒精性脂肪肝的作用机理之一。

[关键词] 肝脂清颗粒剂; 非酒精性脂肪肝; 大鼠; 肿瘤坏死因子- α

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2008)04-0033-03

肝脂清颗粒剂由黄连、黄芩、陈皮、云苓等十五

味中药组成, 具有健脾行气、化痰通络、软坚散结的功效, 临床用于治疗 and 预防各种类型的脂肪肝。本研究通过观察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 (TNF- α) 表达的干预作用, 探讨其治疗脂肪肝的机理。

[收稿日期] 2007-08-27

[基金项目] 山东省中医管理局资助项目(2003-42)

[通讯作者] * 赵海霞, Tel: (0531) 82950414-6208; E-mail: zhaohx1115@126.com

1 材料

1.1 动物与饲料 健康雄性 Wistar 大鼠 80 只, 体重(130±10)g, 购于山东大学实验动物中心, 鲁动质字 D20021024, SPF 级。大鼠普通饲料及高脂饲料(普通饲料+15%猪油、2%胆固醇、5%蛋黄粉、0.5%胆酸钠)均由山东中医药大学实验动物中心提供。

1.2 药物与试剂 肝脂清颗粒剂: 由黄连、黄芩、陈皮、云苓、冬瓜仁、海蛤粉、炒枳实、半夏、白蔻、丹参、茵陈、赤芍、竹茹、薏苡仁、甘草等 15 味中药组成, 方中白蔻、陈皮用 CO₂ 超临界法提取挥发油, 黄连、枳实、半夏以定量 70% 乙醇回流提取 2 次, 每次 1.5 h, 提油及醇提后药渣与竹茹等加定量水煎煮 2 次, 每次 2 h, 合并各提取液, 减压浓缩, 喷雾干燥, 得干膏, 粉碎后喷入挥发油(用 β-环糊精包合), 制成颗粒, 对方中小檗碱、芍药苷、丹参酮 IIA 进行 TLC 鉴别, 对黄芩苷进行 HPLC 含量测定, 每克肝脂清颗粒含生药 5.6 g。由山东中医药大学附属医院制剂室提供。东宝肝泰片: 通化东宝药业股份有限公司生产, 国药准字: H22024764, 批号: 040302。TNF-α 免疫组化染色试剂盒, 购自解放军总医院科技开发中心放免所。

1.3 主要仪器 TG328B 电子分析天平, 上海天平仪器厂; GMJ 型全自动放射免疫 γ 计数器, 江苏省电子医疗研究所; 放射免疫仪, 北京东恒仪器厂。

2 方法

2.1 动物模型的建立 采用高脂饲料喂养法建立大鼠脂肪肝模型。空白组喂以普通饲料, 正常饮水; 非酒精性脂肪肝组喂以高脂饲料, 正常饮水, 造模 12 周。

2.2 动物分组及处理方法 Wistar 大鼠 80 只常规饲养 1 周后分组处理, 分组采用随机方法: 将大鼠分别按体重标号(1~80 号), 查随机排列表, 将动物编号与表中的随机数字相对应, 分为 8 组: 前 3 组为防治试验, 后 5 组为治疗试验。即正常空白组: 采用普通饲料饲养, 正常饮水, 12 周后处死; 脂肪肝模型组: 采用高脂饲料饲养, 正常饮水, 12 周后处死; 脂肪肝防治组: 在给予高脂饲料的同时, 给予肝脂清 75 g 生药·kg⁻¹ 体重灌胃, 每日 1 次, 连续 12 周后处死; 正常保留组: 处理方法同正常空白组, 连续 22 周后处死; 脂肪肝模型自然恢复组: 前 12 周同模型组, 后 10 周普通饲料饲养, 正常饮水; 肝脂清治疗高剂

量组: 前 12 周同模型组、后 10 周在正常饲养的同时给予肝脂清 375 g·kg⁻¹ 体重灌胃, 每日 1 次; 肝脂清治疗低剂量组: 前 12 周同模型组、后 10 周在正常饲养的同时给予肝脂清 188 g·kg⁻¹ 体重灌胃, 每日 1 次; 东宝肝泰组: 前 12 周同模型组、后 10 周在正常饲养的同时给予东宝肝泰 100 g·kg⁻¹ 体重灌胃, 每日 1 次。

2.3 观测指标 所有动物每隔 2 周称重记录, 观察并记录动物的饮食活动、毛色、死亡等情况。分别于 12 周末及 22 周末处死动物, 全部称重后腹腔注射 2% 戊巴比妥钠(按 45 mg·kg⁻¹) 麻醉后腹腔静脉取血处死, 称取全肝湿重并记录, 取相同部位肝组织, 用匀浆器匀浆, 按照试剂盒要求采用放射免疫法测定肝组织及血清中的肿瘤坏死因子。

2.4 统计学处理方法 所有结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计量资料采取 *q* 检验。

3 结果

3.1 动物一般情况和肝指数 12 周时空白对照组一般情况良好; 模型组动物形体肥胖, 精神不振, 毛色无光泽易脱落, 不喜活动; 肝脂清防治组大鼠活动正常, 精神较好, 肝指数(大鼠肝湿重与体重之比)结果见表 1。22 周时经治疗后大鼠一般情况较模型自然恢复组明显转好, 肝指数结果见表 2, 可见肝脂清治疗组肝指数小于模型自然恢复组, 且肝脂清组低于东宝肝泰组。

表 1 防治组对肝指数的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g·kg ⁻¹)	n	肝指数(g/100g)
正常组	—	9	2.40±0.12 ²⁾
模型组	—	8	3.85±0.30
肝脂清防治组	75	8	2.57±0.24 ²⁾

注: 与模型组比较¹⁾ P<0.05, ²⁾ P<0.01(表 3 同)

表 2 治疗各组对肝指数的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g·kg ⁻¹)	n	肝指数(g/100g)
正常保留组	—	8	2.44±0.15 ¹⁾
模型自然恢复组	—	7	2.67±0.19
肝脂清组	375	9	2.42±0.20 ^{1,3)}
肝脂清组	188	8	2.29±0.15 ^{2,4)}
东宝肝泰组	100	7	2.63±0.14

注: 与自然恢复组比较¹⁾ P<0.05, ²⁾ P<0.01; 与东宝肝泰组比较³⁾ P<0.05, ⁴⁾ P<0.01(表 4 同)

3.2 血清及肝组织 TNF-α 变化 结果见表 3 和表 4。

表 3 防治组对肝匀浆 TNF- α 血清 TNF- α 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	n	肝匀浆 TNF- α (ng·mL ⁻¹)	血清 TNF- α (ng·mL ⁻¹)
正常组	—	9	0.86 ± 0.282 ²⁾	2.1 ± 0.60 ²⁾
模型组	—	8	1.79 ± 0.67	3.13 ± 0.54
肝脂清防治组	25	8	1.16 ± 0.48 ¹⁾	2.37 ± 0.65 ¹⁾

从表 3 可以看出: 模型组血清及肝组织内 TNF- α 均有显著升高, 与正常组比较差异显著($P < 0.01$); 肝脂清防治组则能有效地降低血清及肝组织内 TNF- α , 与模型组比较差异显著($P < 0.01$)。

表 4 治疗各组对肝匀浆 TNF- α 血清 TNF- α 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	n	肝匀浆 TNF- α (ng·mL ⁻¹)	血清 TNF- α (ng·mL ⁻¹)
正常保留组	—	8	0.72 ± 0.29 ²⁾	1.39 ± 0.34 ²⁾
模型自然恢复组	—	7	2.18 ± 0.58	2.80 ± 0.68
肝脂清组	375	9	0.84 ± 0.35 ^{2,4)}	1.59 ± 0.32 ^{2,4)}
肝脂清组	188	8	1.24 ± 0.27 ^{2,3)}	1.65 ± 0.49 ^{2,4)}
东宝肝泰组	100	7	1.79 ± 0.42	2.29 ± 0.33 ¹⁾

从表 4 可以看出: 肝脂清治疗组则能有效地降低血清及肝组织内 TNF- α , 与模型恢复组比较有非常显著性差异($P < 0.01$); 与东宝肝泰组比较差异亦显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其中高剂量组疗效优于低剂量; 东宝肝泰在降低 TNF- α 方面亦有一定的作用, 其中对降低血清 TNF- α 作用明显($P < 0.05$)。

4 讨论

现代医学认为脂肪肝的发病机理相当复杂, 大致包括肝脏脂质代谢障碍、胰岛素抵抗、氧化应激和脂质过氧化反应、免疫反应与遗传因素等。其中重要环节为胰岛素抵抗、游离脂肪酸的增多、TNF- α 增加、丙二醛、内毒素等的蓄积, 它们进一步介导肝细胞的破坏及脂质代谢障碍。

脂肪肝时由于大量的脂质蓄积在肝细胞内, 必然引起肝脏湿重的增加, 以及肝指数增大。因此肝指数在一定程度上反映了肝内脂质蓄积的程度, 如同时结合肝组织 HE 染色、脂肪染色的肝脂质含量评定, 则能在总体上反映病变的程度和药物的疗效。

本实验结果表明, 肝脂清可有效地阻断脂肪肝的形成、消除病因对脂质代谢的影响, 从而起到对脂肪肝的防治作用。对已形成的脂肪肝, 可有效地对

肝内蓄积的脂质进行清除, 而东宝肝泰组对清除肝内脂质蓄积虽有较好的作用, 但不如肝脂清疗效显著, 二者存在显著差异。

本实验模型组的血清与肝组织的 TNF- α 均有显著提高, 肝脂清防治组则能阻断不同病因的 TNF- α 的升高, 有效地维持肝组织及血清 TNF- α 的正常水平, 从而达到预防脂肪肝的目的。肝脂清的高、低剂量治疗组对血清与肝组织的 TNF- α 均有显著地降低作用, 其中, 高剂量疗效优于低剂量。东宝肝泰对肝组织内的 TNF- α 有一定的降低作用。TNF- α 是一种由多种炎症细胞分泌的细胞因子, 与细胞凋亡、免疫调节有关^[1], 但近年来发现 TNF- α 也能由一些非免疫细胞分泌, 如脂肪细胞, 并与葡萄糖代谢、胰岛素抵抗、脂肪伴炎症和纤维化密切相关。TNF- α 主要通过细胞膜上的受体发挥生物效应, 造成肝损伤; 此外 TNF- α 还可以降低葡萄糖转运蛋白 4 (Glut4) mRNA 的水平 and 胰岛素的数目及对胰岛素的亲和力, 从而导致胰岛素抵抗、葡萄糖及脂肪代谢紊乱, 促进脂肪肝的形成。本研究结果显示, 模型组出现了 TNF- α 的高分泌, 肝脂清无论用于防治还是治疗, 均可明显降低肝组织及血清中的 TNF- α , 并且高剂量组效果明显优于低剂量组, 而东宝肝泰组的效果则不明显。TNF- α 主要由激活了的枯否细胞以及脂肪组织、脂肪细胞所分泌。在脂肪肝的形成中, TNF- α 除参与氧化应激外, 对肝细胞有直接毒性, 其增加与肝脏病理损伤的程度一致, 可触发其他细胞因子的产生^[2], 增强肝星状细胞活化, 以及介导胰岛素受体底物 (LRS-D) 的丝氨酸磷酸化, 并使之成为胰岛素受体酪氨酸激酶 (IRK) 的抑制物, 从而抑制了 LRS-I 的酪氨酸磷酸化, 促使胰岛素抵抗 (IR) 的发生, 因此降低 TNF- α 的表达对减轻肝脏病理损伤、清除 IR 缓解氧化应激等诸多方面均有重要意义。

[参考文献]

[1] Uysal KI, Wies Drock SM, Marino MU, et al. Protection from obesity induced insulin resistances in mice lacking TNF- α function[J]. Nature, 1997, 389: 610-614.

[2] 高玉洁, 杨志才, 王玉芳, 等. 转化生长因子和肿瘤坏死因子在肝纤维化中的表达[J]. 肝脏, 2004, 9(2): 111-112.