

化痰方、疏肝方对大鼠脂肪肝模型病理形态的影响

赵文霞¹, 张永艳¹, 李建国², 叶放³, 王伟¹

(1 河南中医学院第一附属医院, 河南 郑州 450000;

2 河南中医学院, 河南 郑州 450003; 3 南京中医药大学, 江苏 南京 210029)

摘要:目的: 探讨和比较化痰方、疏肝方不同剂量对大鼠脂肪肝模型病理形态的影响。方法: 用高脂饮食联合四环素腹腔注射致大鼠脂肪肝模型, 于光镜和电镜下观察肝组织病理变化, 并与正常组、东宝肝泰组对照。结果: 用药组肝脂变程度均明显轻于模型组, 并显示抗脂肪肝的作用强弱依次为: 疏肝组优于化痰组优于东宝组($P < 0.05$)。结论: 化痰方、疏肝方对大鼠脂肪肝模型病理改变有明显的恢复作用。

关键词: 化痰方; 疏肝方; 脂肪肝; 病理形态

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** B **文章编号:** 1005-9903(2004)06-0060-04

随着人们生活水平的提高, 近几十年来, 脂肪肝的发病率也逐渐升高, 目前西医尚无专用治疗药物, 而中医药防治脂肪肝的临床及实验研究报道日益增多, 普遍认为痰湿、肝郁、脾虚在本病的中早期属于主要矛盾, 化痰祛浊、疏肝健脾是治疗的关键, 因此, 深入研究化痰祛浊法、疏肝健脾法抗脂肪肝的作用机制具有重要意义。本研究进行了化痰方、疏肝方

不同剂量对大鼠脂肪肝模型病理形态学的影响, 以探讨两种方药抗脂肪肝的部分作用机制并比较其异同。

1 材料

1.1 实验动物 SD 大鼠 80 只, 雄性, 体重 $150 \pm 10\text{g}$, 由河南医科大学动物实验中心提供。实验室室温 $20 \pm 3^\circ\text{C}$, 分笼喂养, 自由饮水和进食。

1.2 实验药物与试剂

1.2.1 化痰祛浊方浓缩液、疏肝健脾方浓缩液由河南中医学院第一附属医院制剂室提供, 每 mL 含生

收稿日期: 2004-01-15

基金项目: 河南省科技攻关项目(0224630002)

药 2g, 批号: 20020415。东宝肝泰片: 中国通化东宝药业股份有限公司生产, 批号: 011106; 四环素针剂: 购自江苏常州动物保健品有限公司, 批号 010903。ALT、AST 试剂盒购自四川迈克科技有限责任公司, 批号: 20020612。TG 试剂盒购自温州东欧生物工程有限公司, 批号: 020316。胆固醇: 上海化学试剂站分装厂, 分析纯, 批号 20000625。

1.2.2 处方组成及制备工艺 化痰祛浊方处方: 泽泻 400g、莱菔子 300g、大黄 200g、荷叶 100g, 共 1000g。制法: 以上四味, 加水煎煮提取三次, 第一次加 8 倍量水, 煎煮提取 2h, 第二次、第三次分别加 6 倍量水, 分别煎煮提取 1.5h、1h, 合并三次提取液; 滤过, 浓缩至相对密度为 1.25 的浸膏(80℃热测), 加乙醇至含醇量达 60%, 静置 48h, 取上清液滤过, 滤液回收乙醇, 加水至 800mL; 冷藏 48h, 滤过, 加水至 1000mL, 滤过, 灌装, 100℃流通蒸汽灭菌, 即得。

疏肝健脾方处方: 柴胡 300g、茯苓 400g、决明子 200g、姜黄 100g, 共 1000g。制法: 以上四味, 取柴胡、姜黄, 以水蒸汽蒸馏法提取挥发油; 提油后的药渣与处方中茯苓等药物混合, 加水煎煮提取三次, 第一次加 8 倍量水, 煎煮提取 2h, 第二次、第三次分别加 6 倍量水, 分别煎煮提取 1.5h、1h, 合并三次提取液; 滤过, 浓缩至相对密度为 1.25 的浸膏(80℃热测), 加乙醇至含醇量达 60%, 静置 48h, 取上清液滤过, 滤液回收乙醇, 加水至 800mL; 冷藏 48h, 滤过, 加入上述挥发油及水至 1000mL, 滤过, 灌装, 100℃流通蒸汽灭菌, 即得。

1.3 实验仪器 光学显微镜 PM-10AD: Olympus optical Co. LTD, Japan 生产; 透射电子显微镜: 日本日立 H-7500, 由河北医科大学电镜实验室协助。

2 方法

2.1 分组与模型制备 SD 大鼠 80 只, 按体重随机分为 7 组, 即空白对照组 8 只, 模型对照组、东宝肝泰对照组、化痰高、低剂量组、疏肝高、低剂量组各 12 只。常规饲养一周后, 除空白对照组予基础饲料外, 模型组等 6 组均饲以高脂饲料(84% 基础饲料+10% 猪油+5% 蛋黄粉+1% 胆固醇), 并于造模第 1 天腹腔注射四环素 15mg/100g·鼠重, 其后每 6 天一次腹腔注射四环素 10mg/100g·鼠重, 计 6 次。每周称一次体重, 并相应调整给药量。空白组饲料消耗药为 16g/100g·d, 模型对照组及各用药组饲料消耗量约为 13g/100g·d。

2.2 给药方法 自造模第 1 天起, 除空白组外, 各

组分别灌服生理盐水及相应药物, 高剂量组按 20g/kg·d 灌胃, 相当于成人用药剂量 20 倍, 低剂量组按 10g/kg·d 灌胃, 相当于成人用药剂量 10 倍。东宝肝泰溶于蒸馏水中, 制成浓度为 0.06g/mL 的混悬液, 灌服剂量为 0.225g/kg·d, 相当于成人用药量的 10 倍。

2.3 标本采取 于实验造模第 7 周结束时处死各组动物, 方法: 隔夜禁食, 次日以 2% 戊巴妥钠溶液 1mL/kg 体重腹腔内注射麻醉后, 从腔静脉采血, 然后迅速取出肝脏称肝湿重, 并取肝左叶 0.1cm*0.1cm*0.6cm 标本 2~4 块经戊二醛锇酸固定, 环氧树脂包埋, 做超薄切片, 透射电镜观察肝组织超微结构变化。然后取同部位肝左叶 1 块 0.5cm*1cm*0.3cm 组织置于 10% 磷酸缓冲甲醛液固定, 常规 HE 染色。最后取其肝组织 -70℃保存, 待做肝匀浆检测。所采血在半小时内离心取血清待检。

2.4 指标测定 将所取血 5mL 静置 30min, 3000rpm 离心 10min, 取血清用奥林巴斯 640 型全自动生化分析仪测血清中 TG(甘油三酯)、ALT(丙氨酸氨基转移酶)、AST(天门冬氨酸氨基转移酶) 指标。

取肝左叶 0.2g, 4℃下制成 10% 肝匀浆, 用氯仿: 甲醇(2:1v/v) 液抽提脂质, 即上清可溶部分, 用酶法测定 TG 代表肝内脂肪含量, 单位以 mmol/L 表示。

肝脏病理: 光镜: 取肝左叶, 中性甲醛固定肝标本, 肝组织石蜡切片 HE 染色观察肝脏病理学改变。电镜: 标本经戊二醛锇酸固定, 环氧树脂包埋, 超薄切片透射电镜观察肝组织超微结构变化。

光镜下评估肝脂肪变性程度, 判断标准按照脂变细胞占肝细胞的百分比进行脂变程度分级^[1]。

2.5 统计学方法 数据采用奔 III 计算机 SPSS10.0 for Windows 统计分析软件分析, 计量资料数据以均数(\bar{x}) ± 标准差(s) 表示, 各组间比较采用两样本均数的 t 检验, 等级资料采用秩和检验。

3 结果

3.1 各组大鼠腹腔解剖所见及肝湿重与肝脂数变化 模型组大鼠腹腔肥大, 脂肪组织丰富, 肝体积增大明显, 包膜紧张, 呈砖红色, 切面油腻感, 呈典型脂肪肝外观; 东宝、化痰、疏肝各治疗组大鼠腹腔脂肪组织较模型组含量少, 肝脏体积稍大, 偏黄色或暗红色, 部分大鼠肝脏切面有油腻感。各组大鼠体重与肝脂数的变化见表 1:

表 1 各组大鼠体重与肝脂数的变化

组 别	n	体重(g)	肝脂数(%)
空白组	8	275.8 ± 7.9	3.024 ± 0.17
模型组	8	333.6 ± 15.2	4.104 ± 0.244
东宝组	8	311 ± 10.7 ²⁾	3.801 ± 0.199 ¹⁾
化痰高	8	283.5 ± 11.1 ^{2,3)}	3.681 ± 0.1608 ²⁾
化痰低	9	300.6 ± 12.8 ²⁾	3.547 ± 0.174 ^{2,3)}
疏肝高	10	311.9 ± 15.2 ^{2,4)}	3.448 ± 0.147 ^{2,3,4)}
疏肝低	10	314.1 ± 13.6 ^{1,5)}	3.365 ± 0.127 ^{2,3,5)}

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与东宝组比较³⁾ $P < 0.05$;与同剂量化痰组比较⁴⁾ $P < 0.01$, ⁵⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 各组大鼠肝组织病理的变化

3.2.1 光镜观察 光镜下可见,正常组大鼠肝小叶结构清晰,肝细胞索排列整齐,呈放射状,肝窦正常,胞核结构清晰。模型组大鼠呈中至重度肝细胞脂肪变,病变以中央静脉周围最为明显,肝细胞明显肿胀呈圆形,细胞核被挤向一边,体积较正常明显增加,胞浆内充满大量脂肪空泡,脂滴大小不等,甚有融合为大脂滴,界限不清,肝窦狭窄,少数可见有肝细胞碎屑样坏死和炎细胞浸润,但未见有纤维化改变;各用药组大鼠的病理变化显示出肝细胞脂肪变均有不同程度的改善趋势,脂变肝细胞数目减少,胞浆内脂滴减少或消失,胞浆丰富,肝索排列整齐。尤以疏肝组最轻,化痰组次之,东宝组又次之,但与模型组比较也有所改善。结果见表 2。

表 2 各组大鼠肝组织病理变化

组 别	n	各组肝组织病理变化分级				
		正常	I	II	III	秩和
空白组	8	8	0	0	0	7.50
模型组	8	0	0	3	5	82.69
东宝组	8	0	3	4	1	61.63 ²⁾
化痰高	8	0	5	3	0	50.81 ¹⁾
化痰低	9	0	5	4	0	53.28 ¹⁾
疏肝高	10	2	7	1	0	35.05 ¹⁾
疏肝低	10	1	7	2	0	41.60 ¹⁾

3.2.2 电镜观察 透射电镜检查结果显示,正常组大鼠肝细胞形态结构正常,核仁明显,核膜清晰,胞浆内线粒体、高尔基体、粗面内质网等细胞器结构正常;模型组大鼠肝细胞胞浆内脂滴大量沉积,线粒体数目明显减少,嵴变短或消失,嵴间腔明显扩大,粗面内质网扩张、断裂。东宝组肝细胞胞浆内可见大小不等脂滴,线粒体肿胀、嵴间腔增宽、内质网部分

有断裂现象。化痰组及疏肝组上述情况明显改善,肝细胞胞浆内有少量脂滴,线粒体形态基本正常,嵴数目明显增多,仅部分可见轻度肿胀变形,内质网基本正常。进一步对肝组织超微结构立体计量学进行统计分析,结果表明,肝细胞线粒体及内质网的损伤程度依次为空白组正常,疏肝低剂量组轻于化痰低剂量组轻于疏肝、化痰高剂量组轻于东宝组轻于模型组,见图 1~3。

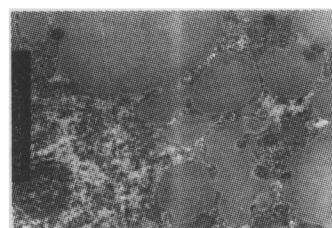


图 1 模型组:细胞核染色质分离 × 3500
线粒体大量减少并肿胀,嵴变短、间隙增大细胞质呈水肿状态

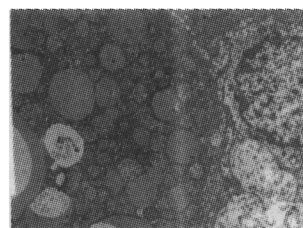


图 2 化痰高组:核染色质正常 × 3500
肝细胞内出现大小不一的脂滴,线粒体减少并肿大,内质网尚较排列密集丰富

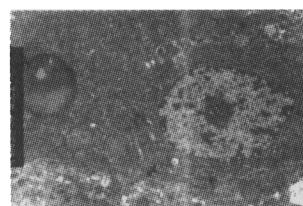


图 3 疏肝高组:核染色质正常 × 3500
肝细胞内出现大小不一的脂滴,线粒体较丰富,内质网基本正常

3.3 各组大鼠血清 ALT、AST、TG 的变化 表 3 显示:造模各组均出现不同程度的肝损伤,表现为 ALT、AST 活性较正常空白组显著升高,并以模型组最重;用药各组与模型组 ALT、AST 水平比较,有不同程度的降低,并有显著性统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。化痰、疏肝高低剂量组与东宝组 ALT、AST 水平比较也有显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);疏肝高低剂量组间 ALT、AST 水平比较差异有显著统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);但化痰高低剂量组间的 ALT、AST、TG 水平比较差异不显著

($P > 0.05$), 量效关系不明显。疏肝低剂量组与化痰低剂量组 ALT 水平比较差异有显著性意义($P < 0.01$)。造模各组大鼠血清 TG 均较空白组有增高趋势, 并且以模型组高于东宝组高于化痰、疏肝高剂量组高于化痰、疏肝低剂量组。

表 3 各组大鼠血清 ALT、AST、TG 的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	N	ALT(IU/L)	AST(IU/L)	血清TG(mmol/L)
空白组	8	48.88 ± 4.76 ^{1,3)}	149.75 ± 5.37 ^{1,3)}	0.853 ± 0.187 ^{1,3)}
模型组	8	425.89 ± 72.93	292.00 ± 31.00	1.489 ± 0.454
东宝组	8	212.13 ± 19.17 ¹⁾	278.88 ± 60.05 ^{1,3)}	1.471 ± 0.440
化痰高	8	150.88 ± 19.31 ^{1,4)}	204.50 ± 15.90 ^{1,3)}	1.428 ± 0.308
化痰低	9	167.11 ± 24.44 ^{1,3)}	188.44 ± 25.52 ^{1,3)}	1.26 ± 0.336
疏肝高	10	170.70 ± 30.95 ^{1,3)}	209.50 ± 21.10 ^{1,3)}	1.313 ± 0.288 ¹⁾
疏肝低	10	112.20 ± 22.21 ^{1,3,5,6)}	184.60 ± 29.69 ^{1,3,7)}	1.171 ± 0.329 ²⁾

注: 同组低剂量与高剂量相比⁶⁾ $P < 0.01$, ⁷⁾ $P < 0.05$

4 讨论

非酒精性脂肪肝是一种无过量饮酒史、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, 按有无肝损伤分为单纯性脂肪肝和脂肪性肝炎, 后者可以进展为脂肪性肝纤维化和脂肪性肝硬化。人们已逐渐认识到其危害性和不良后果, 近年来, 大量的临床报道及实验研究普遍证实中药能改善肝脂质代谢、促进脂肪肝逆转, 我们通过总结临床经验及近年来的相关文献报道, 发现化痰祛浊、疏肝理气、健脾渗湿等是常用治法。因此, 自拟化痰祛浊方及疏肝健脾方, 比较不同剂量对大鼠脂肪肝模型病理形态的影响, 以探讨其抗脂肪肝的部分作用机制。

自拟化痰祛浊方由泽泻、莱菔子、大黄、荷叶等组成。方中泽泻利水、渗湿、泄浊, 故重用为君药; 莱菔子能消食化积、降气化痰; 大黄能导湿热、清瘀热、下瘀血, 二者合用, 助主药渗湿祛浊; 荷叶芳香轻宣、升清降浊, 具有化湿醒脾作用, 为佐使药。诸药合用, 共奏化痰祛浊之功。疏肝健脾方由柴胡、茯苓、决明子、姜黄等组成。柴胡疏肝解郁, 茯苓健脾、利水渗湿。二药合用, 共为君药; 姜黄能行气活血, 助柴胡疏肝, 为臣药; 决明子清肝以防肝郁化热, 质润

以防柴胡、姜黄辛散伤阴, 为佐药。诸药合用, 共奏疏肝健脾渗湿、理气活血之功。现代药理研究也证实方中药物泽泻、决明子等均有不同程度的改善脂质代谢、抗脂肪肝的药理作用。实验结果显示: 各用药组肝脂变程度明显轻于模型组, 肝细胞肿大、脂滴含量均轻于模型组, 炎细胞浸润轻, 偶见有肝细胞点状坏死。电镜显示线粒体结构大体轻度异常或正常, 线粒体嵴保持良好, 与模型组有明显的区别, 并通过肝功能 ALT、AST 及血清 TG 的检测, 提示化痰组、疏肝组和东宝组均有保护肝脏功能、减轻肝细胞炎症反应, 改善脂质代谢的作用。因此, 化痰组、疏肝组和东宝组可促进肝脏脂质代谢, 对脂肪肝都有不同程度的治疗作用, 其作用强弱依次为: 疏肝组优于化痰组优于东宝组。从此结果可以看出, 肝脏脂质沉积虽然结果是痰湿瘀积, 但与肝郁脾虚更有直接联系, 若肝气得疏、脾气得健, 则痰湿瘀积自除, 体现出中医“治病求本”的优势所在。此外, 在疏肝组高低剂量之间表现出低剂量组反而治疗效果显著, 从而说明并非剂量越大疗效越明显, 药物剂量过大可能会加重肝脏的负担, 反而不利于肝脏脂肪的清除。

我们的研究结果还表明, 用高脂饮食联合四环素腹腔注射致大鼠肝脂肪变性造模与既往单纯用高脂饮食或四氯化碳、乙硫氨酸等药物因素造模相比^[2,3], 存在着造模成功率高, 时间短, 费用低, 较接近临床实际的优点, 是一种较为成功可行的模型, 值得进一步推广。

参考文献:

- [1] 钟岚, 范建高, 王国良, 等. 肥胖、高脂血症性脂肪肝肝炎模型的建立[J]. 实验动物科学与管理, 2000, 17(2): 16.
- [2] 孙创斌. 去脂软肝丸对四环素致小鼠脂肪肝模型肝脂的影响[J]. 云南中医学院学报, 2002, 25(1): 8-10.
- [3] 何东仪, 胡义扬, 刘平. 肝脂消方对 CCL4 诱导大鼠肝脂肪变性时 SDHase、ATPase 的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2001, 9(3): 133-135.