

肝脂康胶囊对大鼠非酒精性脂肪肝超微结构变化的影响

夏瑾瑜¹ 贾学平² 程良斌¹

摘要 目的:观察肝脂康胶囊对非酒精性脂肪肝动物模型超微结构变化的影响,为临床提供形态学依据。方法:采用高脂饮食造成脂肪肝动物模型,以东宝肝泰作对照,观察模型大鼠肝组织超微结构的变化。结果:高脂饲料模型组大鼠肝细胞脂变严重,出现炎症浸润、变性、坏死,电镜可见线粒体变形、肿胀,内质网扩张等超微结构变化。治疗后,肝脂康治疗组肝细胞超微结构有显著恢复,脂变程度明显减轻。同时病理观察结果显示,在使大鼠脂肪变性恢复正常方面,肝脂康胶囊优于东宝肝泰($P < 0.05$)。结论:形态学观察证实肝脂康胶囊对非酒精性脂肪肝有效。

主题词 脂肪肝,酒精性/中医药疗法 肝/超微结构 @ 肝脂康胶囊

肝脂康胶囊是湖北省中医院名老中医程丽芳主任医师根据长期治疗脂肪肝的临床经验,以中医理论为指导,结合现代中药药理学研究成果而创制的,具有化痰祛湿、健脾疏肝、化瘀消导等功效,经用于临床,对多种原因引起的脂肪肝疗效显著。为探讨其作用机理,笔者从形态学角度观察了肝脂康胶囊对大鼠脂肪肝超微结构变化的影响,以期临床提供形态学依据。

1 材料和方法

1.1 动物:雄性SD大鼠40只,体重 120 ± 20 g,由湖北省医学科学院实验动物中心提供。

1.2 药品:肝脂康胶囊由泽泻30g、决明子20g、生山楂30g、五味子10g、枯矾3g等组成,按处方加水煎煮两次,混合药液,沉淀过滤,水浴浓缩为生药3g/ml;东宝肝泰为吉林通化东宝药业股份有限公司出品,批号430110,使用时研末,用0.2%羟甲基纤维素(CMC)配成0.09g/ml混悬液;胆固醇购自武汉亚法生物技术有限公司。

1.3 模型的建立及给药方法:参考文献[1]方法配成高脂饲料,即在普通饲料基础上加10%猪油、2%胆固醇。SD大鼠普通饲料正常喂养1周后,随机分为4组,即正常对照组、高脂饲料模型组、肝脂康组及东宝肝泰对照组。正常对照组用普通饲料喂养,其他3组均为高脂饲料喂养。2周后在用高脂饲料喂养同时,肝脂康组

予肝脂康胶囊每日1次1ml/100g灌胃;东宝肝泰对照组予东宝肝泰混悬液每日1次1ml/100g灌胃。所有动物自由饮水和进食,分笼(每笼5只)饲养于 $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$,明暗各12小时的动物实验室内。给药10周,实验周期共12周。

1.4 标本制作及观察指标:实验12周后处死所有动物,迅速取肝组织,4℃生理盐水冲洗,在肝脏最大叶距边缘5mm处取小块肝组织,中性甲醛固定,石蜡包埋,切片,HE染色,光镜下观察,并评估脂肪变性和炎症坏死程度。肝细胞脂肪变性程度作以下分级^[2]:重度:脂变肝细胞超过肝小叶2/3;中度:脂变肝细胞占肝小叶1/3~2/3;轻度:脂变肝细胞呈散在小灶分布;无:肝小叶结构完好,基本无脂变。炎症活动度计分标准参考1981年Knodell提出的慢性肝炎组织学活动指数(HAI),并结合王泰龄等提出的慢性肝炎炎症活动计分方案,分为4项,每项依病变程度分别计为1、2、3、4分,因为桥接及多小叶坏死(BN)、碎屑坏死(PN)的严重度与预后直接有关,故其计分2倍于其他病变,计分公式为 $P+L+2(PN+BN)$ ^[3],P为汇管区炎症计分,L为小叶内炎症计分,具体计分标准见表

表1 炎症活动度计分标准

计分	汇管区炎症(P)	小叶内炎症(L)	碎屑坏死(PN)	桥接及多小叶坏死(BN)
0	无	无	无	无
1	部分汇管区少量炎症细胞浸润	变性及少数点状坏死	局限PN	偶见PN,主要为P-P
2	1~3之间	1~3之间	1~3之间	1~3之间
3	多数汇管区较多炎症细胞浸润	多数坏死灶	多数汇管区PN达周长50%	少数BN,出现C-P
4	汇管区扩大,炎症细胞聚集,淋巴滤泡形成	坏死灶融合成片	PN广泛,大于周长50%,达小叶中带	BN范围广,小叶结构失常或多小叶坏死

表2 肝脂变结果比较

组别	鼠数	肝细胞脂变程度(只)				脂变数(只)	脂变率(%)
		无	轻度	中度	重度		
高脂饲料模型组	10	0	4	4	2	10	100*
正常对照组	10	9	1	0	0	1	10
肝脂康组	10	6	4	0	0	4	40△#
东宝肝泰对照组	10	2	6	2	0	8	80*

与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与高脂饲料模型组比较,△ $P < 0.05$;与东宝肝泰对照组比较,# $P < 0.05$

1 湖北省中医院脏象肝病研究所,武汉市武昌区花园山4号(430061)

2 湖北中医学院2000级研究生

收稿日期:2002-11-13;修回日期:2003-01-20

表 3 肝脏炎症活动度计分比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	鼠数	炎症活动度计分
高脂饲料模型组	10	3.6±2.5
正常对照组	10	0.9±0.9**
肝脂康组	10	1.6±1.4*
东宝肝泰对照组	10	1.8±1.7

与高脂饲料模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

1. 另取 1mm³ 肝组织, 2.5% 戊二醛及 1% 锇酸双固定, 梯度酒精脱水, 环氧树脂包埋, 超薄切片, 透射电镜下观察。

1.5 统计学方法: 计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$), 组间比较采用两样本均数的 t 检验; 等级资料采用 $Ridit$ 分析。

2 结果

2.1 病理切片观察: 正常对照组肝细胞形态排列正常, 肝小叶规则, 细胞质均匀。高脂饲料模型组所有动物均出现程度不等的弥漫性肝细胞脂肪变性, 脂变肝细胞体积增大, 胞浆内可见数量不等、大小不一的脂肪空泡, 胞核被推向周边。肝组织 100% 存在小叶内炎症, 大部分组织可见汇管区炎症, 且出现肝细胞点、片状坏死。组织炎症细胞浸润以单核细胞、淋巴细胞为主, 未见纤维组织增生。肝脂康组脂变肝细胞较模型组明显减少, 偶可见少量脂肪空泡, 小叶内和(或)汇管区炎症显著减轻。东宝肝泰对照组介于高脂饲料模型组与肝脂康治疗组之间。结果见表 2。统计结果表明, 肝脂康组脂变率与高脂饲料模型组、东宝肝泰对照组相比差异均有显著性($P < 0.05$), 而与正常对照组相比无显著性差异, 提示肝脂康胶囊对改善大鼠脂肪变性有较显著的作用。

肝脏炎症活动度计分比较: 与高脂饲料模型组比较, 肝脂康组与东宝肝泰对照组肝脏炎症活动度均有改善, 但肝脂康组与模型组差异有显著性($P < 0.05$), 而与正常对照组相比差异均无显著性。提示肝脂康胶囊可明显恢复肝脏炎症活动, 保护肝细胞, 见表 3。

2.2 电镜结果: 正常对照组细胞核呈圆形或卵圆形, 单核, 胞浆中粗面内质网发达, 滑面内质网较少。线粒体丰富, 内嵴显示清楚, 偶见少数线粒体内嵴模糊。胞浆中极少见脂滴分布, 其直径小于 1 μ m; 高脂饲料模型组可见胞浆内大量大小不一的圆形脂滴, 脂滴聚集严重, 常 3~5 个成群, 单个脂滴直径可达 5 μ m。细胞核内异染色质增多, 线粒体明显扭曲变形, 出现浓缩、肿胀、淡化, 外膜破损, 内嵴模糊或空泛, 糖原颗粒较正常细胞稍增多。部分内质网扩张、断裂。肝脂康肝细胞超微结构基本恢复正常。细胞核形状规则, 核周隙正常,

染色质分布均匀, 胞浆内脂滴显著减少。线粒体肿胀、内质网扩张均不明显。东宝肝泰对照组肝细胞结构介于高脂饲料模型组与肝脂康组之间。

3 讨论

脂肪肝的形成与脂肪代谢障碍密切相关。肝细胞中的甘油三酯(TG)、极低密度脂蛋白(VLDL)的合成和排出不平衡是形成脂肪肝的主要原因。本实验采用高脂饮食诱发肥胖性高脂血症性脂肪肝动物模型, 动物长期进食高脂饲料, 致体内脂肪分解释放游离脂肪酸(FFA)增加。肝脏主要参与内源性脂肪的合成与转运。肝细胞摄入过多的 FFA, 超过线粒体对 FFA 的氧化能力, 促使肝脏合成大量 TG。VLDL 是内源性脂肪的转运载体, 肝细胞内 TG 合成速度超过肝脏合成 VLDL 速度, 肝内 TG 蓄积到一定程度则形成脂肪肝^[4]。组织病理示大鼠肝细胞中至重度变性, 肝脂变复制率达 100%, 且大部分高脂饮食大鼠均出现了小叶炎症和(或)汇管区炎症、肝细胞变性及点状坏死, 严重者甚至出现碎屑样坏死, 所以亦可将此模型作为肥胖性高脂血症性脂肪性肝炎的动物模型。

关于脂肪肝的发病机制, 目前学术界较为流行的是 1998 年提出的“二次打击”学说^[5]。第一次打击是指脂肪代谢失衡、胰岛素抵抗、瘦素(leptin)功能失常等不同原因通过氧应激为发病基础机制, 促使来自分子的游离基或反应性氧(ROS)生成增多, 脂肪氧化障碍, 导致肝细胞脂肪堆积。第二次打击是导致脂肪肝发生炎症、坏死和纤维化。线粒体是肝脏脂肪酸 β 氧化、ATP 形成及 ROS 形成的主要部位。目前发现 FFA 有很强的细胞毒性, 它可损害细胞膜、线粒体和溶酶体膜等, 导致线粒体肿胀、变性及通透性增加, 使线粒体氧化功能降低, 肝脏脂肪氧化减少。FFA 且能明显加强肿瘤坏死因子(TNF)等细胞因子毒性, 导致肝实质细胞变性、坏死和炎性细胞浸润^[6]。FFA 还具有轻度的氧化磷酸化解偶联作用, 致线粒体能量储备降低^[7]。电镜下观察到肝细胞线粒体浓缩、淡化、肿胀、外膜破损、内嵴模糊等超微结构改变, 从形态学上证实了肝脏脂肪氧化磷酸化和脂肪酸的 β 氧化功能受损在脂肪肝形成过程中的作用。

脂肪肝中医无相应病名, 可归属于“痰浊”、“肥气”、“胁痛”、“症瘕”、“积聚”、“黄疸”等范畴, 发病机理与痰、湿、瘀、积有关, 病位主要责之于肝、脾两脏, 因此化痰祛湿、疏肝健脾、活血化瘀、消食导滞为脂肪肝治疗要则。肝脂康胶囊经应用于临床, 对脂肪肝有显著的治疗作用。现代中药药理实验证实, 泽泻可抑制胆固醇

(下转第 223 页)

30 例(65.22%),多汗 31 例(67.39%),与未出现症状的阴性例数百分率比较差异具有显著性。

2.2.2 植物神经功能检查结果:眼心反射心率每分钟减少 12 次者(提示副交感神经功能亢进)1 例(2.17%),出现倒错反射(提示交感神经功能亢进)20 例(43.48%);卧立位试验由卧位到立位心率每分钟增加 12 次者(提示交感神经功能亢进)30 例(65.22%),由立位到卧位心率每分钟减少 12 次者(提示副交感神经功能亢进)0 例;竖毛反射(提示交感神经功能亢进)头颈、四肢、躯干全部出现者 28 例(60.87%),局部出现者 14 例(30.43%)。表现有交感神经功能亢进的总人数 40 例,占全部受试人数的 86.96%。

2.3 E、NE 等检测结果:NE 增高 28 例(60.87%),E 增高 4 例(8.70%),两项均增高 2 例(4.34%),COR 全部正常, T_4 增高 2 例(4.34%), T_3 增高 8 例(17.39%), T_3 、 T_4 增高 2 例(4.34%);TSH 全部正常,FSH、LH 全部正常,T 增高 1 例(2.17%), E_2 增高 25 例(54.35%)。

2.4 T 、 E_2 水平及其比值比较:表 1 示,试验组与正常对照组 T 水平接近,差异无显著性($P>0.05$), E_2 水平显著高于正常人, T/E_2 比值显著低于正常人,两组比较差异均有显著性(P 均 <0.01)。

2.5 患者 E_2 与中医辨证关系:表 2 示,肝阳亢盛证型 E_2 正常组与 E_2 增高组差异有显著性,两组在肝气郁结、肝肾阴虚、痰热内扰证型发病例数比例差异虽无显著性,但 E_2 升高组高于 E_2 正常组。

3 讨论

男性体内的 E_2 主要是在末梢组织由睾酮或雄烯二酮在芳香化酶作用下转变而成,另外,肾上腺皮质的 T 也可转变为雌激素,睾丸内也形成少量的雌激素^[5]。

E_2/T 是反映体内芳香化酶活性的一个重要指标^[6],本研究对象中 E_2 增高组与 E_2 正常组的 E_2/T 差异有显著性,从而证明本研究对象的 E_2 增高是由于芳香化酶在周围组织中促进体内 T 向 E_2 转化的结果。本研究对象表现出的急躁、情绪不稳、易怒、好斗等符合人类行为特征的 A 型。A 型行为特征加上长期恐惧感使研究对象处于应激状态,故研究对象的症状体征主要表现为交感神经功能亢进,肾上腺髓质激素应激性增高,以 NE 增高为主。增高的 NE、E 作用于甲状腺腺泡细胞膜上的 α -和 β -肾上腺素能受体和 M-胆碱能受体,导致甲状腺激素水平增高^[7]。

以往报道中医辨证肝郁气滞及其相关证候的现代病理生理学基础是交感神经功能亢进^[8],本研究结果表明,在暴力型人群中肝气郁结、肝火(肝阳)亢盛、痰热内扰、肝肾阴虚的复杂病机与性激素异常的病理生理学关系为交感神经功能亢进—NE、E— T_3 、 T_4 — E_2 分泌增高的连锁反应。从原理上推导,长期存在的精神情绪、行为异常、内环境紊乱必然造成中医本虚标实为主的复杂病理改变。

参考文献

(上接第 221 页)

的吸收,升高高密度脂蛋白(HDL);山楂能显著降低血中 TG,并能提高卵磷脂胆固醇酰基转移酶(LCAT)活性;决明子有降低血及组织中 TG,升高 HDL 作用^[8,9]。肝脂康胶囊对非酒精性脂肪肝细胞超微结构的修复作用表明,该药对脂肪肝有明显的治疗作用,为临床治疗提供了科学的依据。其作用机制可能与下列因素有关:降低血中 TG 水平,加速 TG 排泄,减少肝脏 TG 合成;减少肝脏 FFA 含量,增强肝脏氧化脂肪酸功能,清除自由基及脂质过氧化产物,保护肝细胞膜,促进肝细胞的修复。

参考文献

1 钟岚,范建高.非酒精性脂肪肝动物模型.国外医学消化系统疾病分

- 1 王士清,谢斌,郑瞻培,等.反复暴力与单次暴力犯罪者的对照研究.临床精神医学杂志,1996,6(6):345-347.
- 2 朱文锋.中医诊断学.上海:上海科学技术出版社,1998,155-198.
- 3 戚仁铎.诊断学.北京:人民卫生出版社,1996,177-178.
- 4 陈灏珠.内科学.北京:人民卫生出版社,1996,662-673.
- 5 杨钢.内分泌生理与病理生理学.天津:天津科学技术出版社,1996,471-777.
- 6 窦京涛,潘长玉,马芳玲.男性 Grave's 病患者垂体促性腺激素和性激素分泌的变化.临床内科杂志,2002,19(1):32-34.
- 7 姚泰.生理学.北京:人民卫生出版社,2001,477.
- 8 黄柄山,范荣昌.440 例肝郁气滞及其相关证候的现代病理生理学基础探讨.黑龙江中医药,1985,(5):33-38.
- 9 钟岚,范建高.非酒精性脂肪肝动物模型.国外医学消化系统疾病分册,1999,19(3):175-178.
- 2 祁培宏,余莉芳,刘平.消脂保肝饮抗大鼠脂肪肝作用的研究.中西医结合肝病杂志,2000,10(5):33-35.
- 3 刘菲,钟岚.大黄廬虫丸防治非酒精性脂肪性肝炎的实验研究.中西医结合肝病杂志,2000,10(2):27-29.
- 4 李绍白.营养失调性脂肪肝.医师进修杂志,1998,21(3):124-126.
- 5 Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? Gastroenterology, 1998, 114(4):842-845.
- 6 范建高,曾民德,王国良.脂肪肝的发病机制,世界华人消化杂志,1999,7(1):75-76.
- 7 丁晓东.线粒体功能障碍与肥胖性脂肪肝.国外医学消化系统疾病分册,2002,22(1):42-44.
- 8 翁维民.降血脂中草药研究进展.天津中医,1986,3(1):34-36.
- 9 杨智军.中医治疗脂肪肝的方药研究.药学进展,1998,22(3):156-160.

ABSTRACTS FROM ORIGINAL ARTICLES

Intervient Action of Jianxin Decoction on Serum Cytokines in the Patient of Congestive Heart Failure

Zhao Huibin, Shen Chengling, Liu Jinmin

Objective: To investigate intervenient actions of Jianxin Decoction on serum level of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and nitric oxide (NO) in the patient of congestive heart failure (CHF). **Methods:** 66 cases of CHF were randomized to trial group and control group, 33 cases in each. Control group received routine treatment and the trial group was treated by routine treatment plus Jianxin Decoction for 4 weeks. TNF- α , IL-6 and NO level and cardiac function before and after treatment were investigated. **Results:** After treatment, serum TNF- α , IL-6 and NO level in both groups were significantly decreased with the trial group decreased more significantly ($P < 0.05$), and the cardiac function significantly improved ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) with the trial group being superior to the control group. **Conclusion:** Jianxin Decoction can adjust level of cytokines and can prevent and reverse ventricular remodeling and improve cardiac function in the patient of CHF.

Author's address: Dong Fang Hospital, Beijing University of TCM, Beijing 100078

Key Words Heart failure, congestive/TCM therapy: @Jianxin Decoction; @serum cytokines

(Original article on page 186)

Clinical Observation on Chinese Drug Tongxie Mixture for Treatment of 30 Cases of Irritable Bowel Syndrome

Yang Weiming

Objective: To investigate and evaluate therapeutic effect of Tong Xie Mixture on irritable bowel syndrome (IBS). **Methods:** 32 cases of IBS were treated by Tongxie Mixture for 3 weeks. Self-comparison before and after treatment of Tongxie Mixture and comparison among Tongxie Mixture group (treatment group), western medicine control group (control group) and western medicine plus Tongxie Mixture group (integrated treatment group) in the therapeutic effect were made. **Results:** Total effective rate was 93.75% in treatment group, 72.22% in control group and 94.45% in integrated treatment group, with no significant difference between the treatment group and integrated treatment group, and with a significant difference between treatment group and control group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Tongxie Mixture has a good therapeutic effect on IBS.

Author's address: Jiangmen Municipal Central Hospital, Guangdong 529070

Key Words Colic disease, functional/TCM therapy: @Tongxie Mixture

(Original article on page 199)

Clinical Observation on Pugui Pill for Treatment of 30 Cases of Hysteromyoma of Stagnant Heat Type

Lai Huihong, Gao Shanfeng, Deng Yuanmei, et al.

Objective: To introduce a series of study on Chinese drug Pugui Pill for treatment of hysteromyoma of stagnant heat type. **Methods:** Observation group (30 cases) were treated by Pugui Pill and control group (20 cases) were treated by Gongliuqing Capsule. Improvement of clinical symptoms and hemodynamics and therapeutic effects were investigated, and the mechanism was studied. **Results:** Pugui Pill could obviously improve clinical symptoms, reduce size of the hysteromyoma, improve characteristics of hemodynamics, and regulate expression of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) and insulin-like growth factor (IGF-1) in blood. **Conclusion:** Pugui pill functions clearing heat, resolving mass, activating blood circulation by removing blood stasis and analgesia, and it has a definite therapeutic effect on hysteromyoma with a total effective rate of 83.3%.

Author's address: First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080

Key Words Hysteromyoma /TCM therapy: Liomyoma/TCM therapy: @Pugui Pill

(Original article on page 201)

Effects of Ganzhikang Capsule on Ultrastructure Changes in Non-Alcoholic Fatty Liver Rats

Xia Jinyu, Jia Xueping, Cheng Liangbin

Objective: To observe effects of Ganzhikang Capsule on ultrastructures in non-alcoholic fatty liver model rats so as to provide morphological basis for clinical treatment. **Methods:** Fatty liver model rats were induced by high fat diet, and the effects of Ganzhikang Capsule on microstructures in liver tissue were investigated with Dong Bao Gan Tai used as control medicine. **Results:** In the model group, serious fatty degeneration of hepatocytes with inflammatory infiltration, degeneration and necrosis, and deforming, swelling of mitochondrion, dilatation of endoplasmic reticulum were found. After treatment of Ganzhikang Capsule, microstructures of hepatocytes restored obviously, fatty degeneration relieved significantly, and Ganzhikang Capsule was superior to Dong Bao Gan Tai in restoration of fatty degeneration ($P < 0.05$). **Conclusion:** Ganzhikang Capsule is effective for non-alcoholic fatty liver.

Author's address: Institute of State of Viscera and Hepatic Diseases, Hubei Provincial Hospital of TCM, Wuhan 430061

Key Words Fatty liver, non-alcohol/TCM therapy: Liver/ultrastructure: @Ganzhikang Capsule

(Original article on page 220)