

实 验 研 究

理气化痰祛瘀法对非酒精性脂肪性肝炎大鼠 纤溶酶原激活物及其抑制物的影响

严茂祥* 陈芝芸* 施军平* 刘庆生* 何蓓晖*

摘要 目的:观察理气化痰祛瘀中药对高脂饮食诱导的非酒精性脂肪性肝炎(NASH)大鼠血浆组织纤溶酶原激活物(t-PA)和纤溶酶原激活物抑制物(PAI-1)活性的影响,探讨其防治NASH的作用机理。方法:以高脂饮食喂养12周诱导Wistar大鼠建立NASH模型,以不同剂量的理气化痰祛瘀中药预防及治疗,光镜观察肝组织切片病理学改变,发色底物法测定血浆t-PA、PAI-1水平。结果:NASH模型大鼠肝组织出现了严重脂肪变和不同程度的炎症细胞浸润、肝细胞坏死、汇管区渗出;血浆PAI-1活性和PAI-1/t-PA值较正常大鼠显著升高;应用理气化痰祛瘀中药进行预防和治疗后,大鼠肝组织脂肪变程度和炎症活动程度显著改善,同时血浆PAI-1活性和PAI-1/t-PA值显著降低。结论:PAI-1可能参与高脂饮食诱导的大鼠NASH的发生发展,理气化痰祛瘀中药能调节PAI-1的分泌和纤溶系统平衡,防止NASH的进一步发展。

主题词 脂肪肝,非酒精性/中医药疗法 @ 理气化痰祛瘀

Effects of the Method for Regulating Qi to Dissipate Phlegm and Blood Stasis on Plasminogen Activator and Its Inhibitor in Non-Alcoholic Steatohepatitis Rats

Yan Maoxiang, Chen Zhiyun, Shi Junping, et al.

(Affiliated Hospital, Zhejiang College of TCM, Hangzhou 310006)

Objective: To investigate effects of the method for regulating qi to dissipate phlegm and blood stasis on plasma tissue-type plasminogen activator (t-PA) and plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in non-alcoholic steatohepatitis (NASH) rats, and to explore the prevention and treatment mechanism of NASH. **Methods:** NASH model rat was induced by 12-week high fat diet, and different doses of Chinese herbs for regulating qi to dissipate phlegm and blood stasis were given to prevent and treat NASH. Plasma t-PA and PAI-1 were detected with chromophorous substrate assay, and the pathological changes of the liver were observed with optical microscope. **Results:** The liver tissue of NASH rats showed severe steatosis, and different degrees of inflammation, cell infiltration, necrosis of hepatocytes and exudation in the portal area as compared with the normal rats. Plasma PAI-1 activity and the ratio of PAI-1/t-PA in the model group were significantly increased. Chinese herbs could improve the steatosis of hepatocytes and inflammatory activity, and significantly decrease the levels of plasma PAI-1 activity and the ratio of PAI-1/t-PA. **Conclusion:** PAI-1 possibly participates in the generation and development of NASH induced by high fat diet, and Chinese herbs for regulating qi to dissipate phlegm and blood stasis can significantly regulate the secretion of PAI-1, and the balance of the fibrinolytic system, and can prevent further development of NASH.

Key Words Fat liver, non-alcoholic/TCM therapy; @ Regulating qi to dissipate phlegm and blood stasis

非酒精性脂肪性肝炎(NASH)被认为是隐源性肝硬化的原因之一,其发病机制尚未明了。研究认为,胰岛素抵抗、氧应激/脂质过氧化反应、细胞因子等都参与其发病,而NASH患者纤溶系统活性异常也备受关注。组织纤溶酶原激活物(t-PA)和纤溶酶原激活物抑制物(PAI-1)是调节血浆纤溶活性的关键物质。本研究采用高脂饮食建立大鼠NASH模型,观察理气化痰祛瘀中药对t-PA、PAI-1活性的影响。

1 材料

雄性Wistar大鼠130只,体重(190 ± 10)g, SPF级,由中科院上海实验动物中心提供,合格证号:SCXK(沪)2003-0003。胆固醇,上海伯奥生物有限公司产品;3号胆盐,杭州微生物试剂厂产品;易善复胶囊, A·Nattermam & Co. GmbH 公司产品;理气化痰祛瘀中药由桃仁、山楂、泽泻、香橼、郁金、浙贝母等组成,以上诸药按1:3:2.4:1:1.5:1.2比例加水适量,浸泡30分钟,分别煎煮1小时、1小时、0.5小时,合并3次煎液过滤,浓缩为生药浓度4g/ml。t-PA和PAI-1试剂盒由上海太阳生物工程有限公司提供。

基金项目:浙江省教育厅资助项目(20020080)

* 浙江中医药大学附属医院消化病研究室,杭州市邮电路51号 Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net (310006)

收稿日期:2006-03-01;修回日期:2006-05-23

2 方法

2.1 NASH 模型的建立:大鼠每天予以高脂饲料(脂肪 10%、胆固醇 2%、胆盐 0.5%、蛋黄粉 5%、标准大鼠饲料 82.5%)喂养,连续 12 周。

2.2 理气化痰祛瘀中药的预防作用:60 只大鼠随机分为正常 1 组,模型 1 组,中药预防高、中、低剂量组,易善复预防组,每组 10 只,除正常组喂以标准饲料外,其余 5 组均喂以高脂饲料造模,在造模同时,中药预防高、中、低剂量组分别给予理气化痰祛瘀中药流浸膏 13.20、6.60 和 3.30 g · kg⁻¹ · d⁻¹灌胃,易善复预防组给予易善复混悬液 0.069 g · kg⁻¹ · d⁻¹灌胃,正常 1 组与模型 1 组则予等体积的蒸馏水灌胃,连续 12 周。

2.3 理气化痰祛瘀中药的治疗作用:70 只大鼠随机分为正常 2 组 10 只,每天予以标准饲料喂养,造模组 60 只,每天予以高脂饲料喂养,均连续 12 周。造模结束后将造模大鼠随机分为模型 2 组,中药治疗高、中、低剂量组和易善复治疗组,每组 12 只。中药治疗高、中、低剂量组分别给予理气化痰祛瘀中药流浸膏 13.20、6.60 和 3.30 g · kg⁻¹ · d⁻¹灌胃,易善复治疗组给予易善复混悬液 0.069 g · kg⁻¹ · d⁻¹灌胃,模型 2 组和正常 2 组予等体积的蒸馏水灌胃,共治疗 8 周,在治疗期间易善复治疗组 1 只大鼠因灌胃不当药物吸入气管而死亡。

各组大鼠末次给药后次日上午空腹取血,分离血浆待用;取肝组织,多聚甲醛固定后制备石蜡切片。

2.4 检测指标及评定标准:发色底物法测定血浆 t-PA、PAI-1;常规苏木素-伊红染色,光镜下观察肝组织病理学变化^[1],根据肝小叶内脂肪变的肝细胞数将脂肪变程度量化:0 分为肝细胞内无脂滴沉积、1 分为肝小叶内 <30% 的肝细胞有脂肪变、2 分为肝小叶内 30%~50% 的肝细胞有脂肪变、3 分为 50%~75% 的肝细胞有脂肪变、4 分为 75% 以上的肝细胞有脂肪变;并进行肝脏炎症活动度计分(HAI)^[2]。

2.5 统计学方法:所有数据用均数 ± 标准差表示,采用单因素方差分析,以 SPSS 11.5 软件包进行统计。

3 结果

3.1 各组大鼠肝组织病理学改变比较:正常 1 组、正常 2 组大鼠肝组织光镜下未见明显异常;模型 1 组大鼠肝组织可见弥漫性肝细胞脂肪变,伴小叶内炎症及汇管区炎细胞浸润,以小叶内炎症明显,部分大鼠小叶内坏死灶融合成片,并有碎屑样坏死或桥接坏死,但未见肝纤维化形成;模型 2 组大鼠肝组织可见中到重度弥漫性肝细胞脂肪变,伴小叶内炎症及汇管区炎细胞浸润,以小叶内炎症明显,个别有碎屑样坏死,但较模

型 1 组减轻;各中药预防组肝组织也见弥漫性肝细胞脂肪变,程度较模型 1 组略轻,但差异无显著性意义($P > 0.05$)。肝组织的炎症分布和性质与模型 1 组相似,但程度明显减轻,各中药预防组的炎症活动度计分较模型 1 组显著下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);易善复预防组大鼠肝组织脂肪变程度计分和炎症活动度计分与模型 1 组差异均无显著性意义($P > 0.05$),见表 1。各中药治疗组大鼠肝组织脂肪变以轻到中度为主,脂肪变程度计分和炎症活动度计分较模型 2 组显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。易善复治疗组脂肪变程度计分和炎症程度计分较模型 2 组有下降,但差异无显著性意义($P > 0.05$),见表 2。

表 1 预防用药各组大鼠肝组织脂肪变程度和炎症活动度变化比较(分, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g · 鼠数 kg ⁻¹ · d ⁻¹)	脂肪变程度计分	炎症活动度计分
正常 1 组	10 —	0	0.30 ± 0.48
模型 1 组	10 —	3.90 ± 0.32 **	3.80 ± 1.75 **
中药预防高剂量组	10 13.20	3.50 ± 0.53 **	1.60 ± 1.17 △△
中药预防中剂量组	10 6.60	3.70 ± 0.48 **	1.70 ± 1.42 △△
中药预防低剂量组	10 3.30	3.80 ± 0.42 **	1.90 ± 1.29 △
易善复预防组	10 0.069	3.80 ± 0.42 **	2.30 ± 1.34 *

与正常 1 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型 1 组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$, 表 3 同

表 2 治疗用药各组大鼠肝组织脂肪变程度和炎症活动度变化比较(分, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g · 鼠数 kg ⁻¹ · d ⁻¹)	脂肪变程度计分	炎症活动度计分
正常 2 组	10 —	0	0.50 ± 0.71
模型 2 组	12 —	3.42 ± 0.79 **	3.00 ± 1.35 **
中药治疗高剂量组	12 13.20	2.67 ± 0.78 ** △	1.42 ± 0.79 △△
中药治疗中剂量组	12 6.60	2.75 ± 0.75 ** △	1.58 ± 1.16 △
中药治疗低剂量组	12 3.30	2.58 ± 0.79 ** △	1.67 ± 1.23 △
易善复治疗组	11 0.069	2.82 ± 0.87 **	2.09 ± 1.34 *

与正常 2 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型 2 组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$, 表 4 同

3.2 各组大鼠血浆 tPA、PAI-1 变化比较:模型 1 组、模型 2 组大鼠血浆 PAI-1 含量、PAI-1/tPA 值分别较正常 1 组、正常 2 组显著升高($P < 0.01$), tPA 含量与相对应的正常大鼠比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。以高、中、低剂量理气化痰祛瘀中药进行预防和治疗后,大鼠血浆 PAI-1 含量及 PAI-1/tPA 值分别比模型 1 组、模型 2 组显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);易善复预防组、治疗组大鼠血浆 PAI-1 水平、PAI-1/tPA 值与模型 1 组、模型 2 组比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。见表 3、表 4。

表 3 预防用药各组大鼠血浆 tPA、PAI-1 变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	剂量($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)	PAI-1(AU/ml)	tPA(IU/ml)	PAI-1/tPA
正常 1 组	10	—	0.62±0.11	0.91±0.08	0.68±0.11
模型 1 组	10	—	0.85±0.07**	0.89±0.17	1.00±0.23**
中药预防高剂量组	10	13.20	0.66±0.09△△	0.90±0.09	0.74±0.12△△
中药预防中剂量组	10	6.60	0.69±0.12△	0.91±0.09	0.76±0.14△
中药预防低剂量组	10	3.30	0.70±0.15△	0.89±0.12	0.77±0.09△
易善复预防组	10	0.069	0.77±0.16	0.90±0.07	0.85±0.16

表 4 治疗用药各组大鼠血浆 tPA、PAI-1 变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	剂量($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)	PAI-1(AU/ml)	tPA(IU/ml)	PAI-1/tPA
正常 2 组	10	—	0.63±0.07	0.96±0.09	0.67±0.12
模型 2 组	12	—	0.80±0.07**	0.89±0.12	0.92±0.14**
中药治疗高剂量组	12	13.20	0.65±0.11△△	0.91±0.08	0.71±0.11△△
中药治疗中剂量组	12	6.60	0.68±0.10△	0.89±0.08	0.77±0.13△
中药治疗低剂量组	12	3.30	0.69±0.08△	0.92±0.09	0.75±0.12△
易善复治疗组	11	0.069	0.77±0.11*	0.93±0.09	0.82±0.12

4 讨论

脂肪肝属中医“胁痛”、“痰癖”、“瘀血”、“积聚”范畴。非酒精性脂肪性肝病的起因多为嗜食肥甘厚味,过度肥胖,或情志失调,或久病体虚等,引起肝失疏泄、脾失健运、湿热内蕴、痰浊郁结、瘀血阻滞而最终形成湿痰瘀阻互结,痹阻肝脏脉络而成。气滞、痰湿、血瘀为其发病的三个重要环节。因此,理气、化痰、祛瘀是其最基本的治则,据此组成桃仁、郁金、山楂、泽泻、香橼、浙贝母等中药复方,方中桃仁活血化瘀,山楂消食化积、行气散瘀,郁金行气解郁活血,泽泻利水渗湿、泄热,香橼疏肝解郁、理气宽中、化痰,浙贝母清热化痰、开郁散结,诸药合用,共奏理气化痰祛瘀之功。本研究发现,采用理气化痰祛瘀中药预防和治疗 NASH 后,大鼠肝组织炎症活动度显著减轻,在控制饮食(由高脂饲料改为标准饲料)的同时以理气化痰祛瘀中药治疗后大鼠肝组织脂肪变程度也明显改善,表明该中药复方对高脂饮食诱导的 NASH 有较好的防治作用,同时提示,在 NASH 的防治中,去除高脂饮食这一致病因素仍是最基本和最关键的措施。

t-PA 和 PAI-1 是纤溶系统的关键成分,t-PA 是纤溶系统的始动因子之一,其功能是裂解纤维蛋白(原)为降解产物,此外也水解诸多凝血因子;PAI-1 是其主要的抑制剂,两者的动态平衡对维持正常的血液纤溶系统功能十分重要。血液纤溶状态失调可促使肥胖、血脂紊乱、高胰岛素血症及其相关代谢综合征患者形成动脉血栓。人群调查表明,PAI-1 与胰岛素抵抗和高胰岛素血症具有显著的相关性。高胰岛素血症患者血浆中 PAI-1 水平增加,且其水平与胰岛素呈正相关^[8]。脂肪沉积的肝脏可能是胰岛素抵抗患者血浆 PAI-1 增

加的主要来源^[4]。有研究报道,脂肪肝与血浆 PAI-1 水平增高、t-PA 活性下降密切相关^[5];非酒精性脂肪性肝病大鼠肝脏 t-PA mRNA 表达减弱,而 PAI-1 mRNA 表达明显增强,且与肝脂肪变程度密切相关,说明肝脏纤溶状态改变可通过局部微循环障碍参与高脂饮食大鼠脂肪性肝炎的发生和发展^[6]。本研究发现,高脂饮食诱导的 NASH 大鼠血浆 PAI-1 活性及 PAI-1/t-PA 值较正常大鼠显著增高,表明 NASH 大鼠存在着纤溶系统平衡机制的失调,抗血栓形成能力下降,而血液凝固性倾向增加,应用不同剂量的理气化痰祛瘀中药预防和治疗后,大鼠血浆 PAI-1 活性及 PAI-1/t-PA 值较相对应的模型大鼠显著下降,同时肝组织脂肪变程度、炎症活动度也显著减轻,提示理气化痰祛瘀中药可通过调节纤溶系统平衡,防治 NASH 的发生和发展。

参考文献

1 中华医学会肝病学会分会脂肪肝和酒精性肝病学组.非酒精性脂肪性肝病诊断标准.中华肝病杂志,2003,11(2):71.
2 中华肝病学会肝纤维化学组.肝纤维化诊断及疗效评估共识.中华肝病杂志,2002,10(4):327~328.
3 Ditchl W,Stiko A,Eriksson P,et al.Oxidized LDL and lysophosphatidylcholme stimulate plasminogen activator inhibitor-1 expression in vascular smooth muscle cells.Arterioscler Thromb Vasc Biol,1999,19(12):3025~3032.
4 Alessi MC,Bastelica D,Mavri A,et al.Plasma PAI-1 levels are more strongly related to liver steatosis than to adipose tissue accumulation.Arterioscler Thromb Vasc Biol,2003,23(7):1262~1268.
5 Cigolini M,Targher G,Agostino G,et al.Liver steatosis and its relation to plasma haemostatic factors in apparently healthy men:role of the metabolic syndrome.Thromb Haemostasis,1996,76(1):69~73.
6 范建高,郑晓英,张梅,等.非酒精性脂肪性肝病大鼠肝脏纤溶酶原激活物及其抑制物 mRNA 表达.肝脏,2004,9(2):103~105,128.