

· 方药研究 ·

华夏小葱制剂对脂肪肝大鼠抗脂质过氧化损伤及细胞因子损伤的影响

邴飞虹¹ 常 青¹ 郝建军² 张介眉²

(1. 湖北中医学院中药研究所, 武汉市洪山区黄家湖西路 1 号, 430061; 2. 武汉市中西医结合医院)

[摘 要] **目的** 研究华夏小葱制剂对脂肪肝大鼠的防治作用及其机制。 **方法** 将 60 只 SD 大鼠随机分为空白对照组, 模型对照组, 华夏小葱制剂低、中、高剂量组以及东宝肝泰片组。用高脂饮食、酒精水并结合皮下注射小剂量四氯化碳的方法建立脂肪肝模型。 **结果** 模型对照组总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、丙二醛(MDA)、核因子- κ (NF- κ)、转化生长因子- β (TGF- β)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)mRNA 值显著高于空白对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 超氧化物歧化酶(SOD)活力显著低于空白对照组($P < 0.01$); 华夏小葱制剂低、中、高剂量组及东宝肝泰片组 TC、TG、MDA、NF- κ 、TGF- β 、MCP-1 mRNA 值显著低于模型对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), SOD 活力显著高于模型对照组($P < 0.01$)。 **结论** 华夏小葱制剂对脂肪肝大鼠具有防治作用, 其机制可能与降低大鼠体内血脂、减少脂质过氧化损伤及细胞因子的损伤有关。

[关键词] 脂肪肝; 中医药疗法; 华夏小葱制剂; 大鼠

Effect of Preperation of Chinese Allium fistulosum L. on the Damage of Lipid Peroxidation and Cytokine in Fatty Liver Rats

BING Fei-hong¹, CHANG Qing¹, HAO Jian-jun², et al.

(1. Institute of Chinese Medicine, Hubei College of Chinese Medicine, Wuhan 430061; 2. Wuhan Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine)

ABSTRACT **Objective** To study the preventive and therapeutic effect of Preperation of Chinese Allium fistulosum L. (PCAL) on fatty liver (FL) rats and its mechanism. **Methods** Totally 60 SD rats were randomly divided into blank control group, model control group, small, middle and large dosage of PCAL groups and Dongbao Gantai Tablet group. The rats were fed with high fat diet and water comprised of ethanol and were hypodermically injected with small dosage of carbon tetrachloride to establish FL model. **Results** As compared with blank control group, the content of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), malondialdehyde (MDA), nuclear transcription factor- κ (NF- κ), transforming growth factor- β (TGF- β) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) mRNA in model control group increased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while the activity of superoxide dismutase (SOD) decreased significantly ($P < 0.01$). As compared with model control group, the content of TC, TG, MDA, NF- κ , TGF- β and MCP-1 mRNA in small, middle and large dosage of PCAL groups and Dongbao Gantai Tablet group decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while the activity of SOD increased significantly ($P < 0.01$). **Conclusion** PCAL has a protective and therapeutic effect on FL rats, which might be relevant to its reducing blood fat, diminishing damage of lipid peroxidation and cytokine.

Key Words Fatty liver; Chinese medical treatment; Preperation of Chinese Allium fistulosum L.; Rat

脂肪肝是由多种疾病和病因引起的肝脏脂肪性改变。轻度的肝细胞脂肪变性在大体上可无明显变化, 当半数以上肝细胞有脂滴蓄积, 或者肝内蓄积脂肪含量超过肝湿重的 5%, 即形成脂肪肝。华夏小葱制剂是武汉市中西医结合医院研究的一种中药口服液(已获国家专利), 以往研究表明华夏小葱制剂具有性味辛温、通阳利尿、化解津液及瘀血等功效。本实验旨在研究华夏小葱制剂降低脂肪肝大鼠体内血脂、减少脂质过氧化损伤及细胞因子损伤的作用, 为临床应用提供科学

依据。

1 材料

1.1 动物

(150±20) g SD 大鼠 60 只, 雌雄各半, 购自华中科技大学同济医学院动物中心[合格证号: SCXK(鄂) 2004-0007]。

1.2 药物

华夏小葱制剂是精选百合科植物葱(*Allium fistulosum* L.), 本实验用葱取自湖北黄陂, 采收于 2005 年 11 月份) 近根部的鳞茎(葱白), 切去须根及叶, 剥去外膜, 利用现代技术加工方法将其提取物精制而成的

口服液,由武汉市中西医结合医院制剂中心提供,专利号:200610125543.1,批号:20050326;东宝肝泰片(复方蛋氨酸胆碱片),通化东宝药业股份有限公司生产,批号:060106,灌胃前用 0.2%羟甲基纤维素(CMC)配制成 0.07g/ml 的混悬液。两者均在 4℃冰箱中保存备用。

1.3 试剂

总胆固醇(TC)试剂盒、甘油三酯(TG)试剂盒(上海申能—德赛诊断技术有限公司);超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程公司);SP 超敏反应试剂盒、核转录因子- κ (NF- κ)抗体、转化生长因子- β TGF- β 抗体(福州迈新生物技术开发有限公司);SABC 免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);DEPC、琼脂糖、Trizol、Tag DNA 聚合酶(上海捷瑞生物工程有限公司);M-MLV 逆转录酶(MBI);PCR Marker(大连宝生物工程有限公司)。

1.4 仪器与设备

台式低温离心机(Gentrifuge⁵⁴⁷¹,德国);全自动生化分析仪(Olympus Au⁵⁶⁰,日本);分光光度计(721型,上海科学仪器厂);医学图文分析系统(HUMIAS-2000,武汉千屏影像技术有限责任公司);光学显微镜(Olympus BX-60,日本);梯度PCR仪(Eppendorf公司);凝胶成像及图像分析系统(上海培清科技有限公司)。

2 方法

2.1 分组与造模方法

60只SD大鼠适应性喂养1周后,按体重分层随机分为6组,每组10只。即:空白对照组,模型对照组,华夏小葱制剂低、中、高剂量组(小葱低、中、高剂量组)及东宝肝泰片组。空白对照组用标准大鼠饲料和普通水喂养。其他组参考孙要武等^[1]方法加以改进,复制大鼠脂肪肝模型:动物给予高脂饲料(含10%猪油)和酒精水(含15%乙醇),每周1次后肢皮下注射40%四氯化碳色拉油溶液(首次剂量0.5mg/100g,以后为0.3mg/100g)。

2.2 给药及取材方法

造模同时,空白对照组、模型对照组给予注射用生理盐水8ml·kg⁻¹·d⁻¹,灌胃给药;小葱低、中、高剂量组分别给予华夏小葱制剂0.06g·kg⁻¹·d⁻¹、0.12g·kg⁻¹·d⁻¹、0.24g·kg⁻¹·d⁻¹,灌胃给药;东宝肝泰片组给予东宝肝泰混悬液0.70g·kg⁻¹·d⁻¹,灌胃给药。连续给药8周后,大鼠禁食16小时,称重,以3%戊巴比妥钠溶液40mg/kg腹腔注射后,心脏采血,抽取血样置于含有肝素抗凝液的离心管中,离心后收集上清液, -20℃保存备用。摘取大鼠肝脏并称重,观察大体外观

后,取肝左叶做组织病理学检查;取肝右叶,制成100g/L的肝组织匀浆。TC、TG的含量用全自动生化分析仪测定,其余指标按试剂盒说明书方法进行测定。

2.3 免疫组化染色法测NF- κ B、TGF- β 蛋白的表达

取肝脏,将肝组织用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,然后按SABC免疫组化试剂盒进行操作,阴性对照以PBS代替一抗,阳性对照为已知阳性的大鼠肝组织切片。

观察方法及判断标准:光镜下观察,以胞浆出现黄染者为NF- κ B、TGF- β 的阳性细胞,每组选取3张切片,每张切片镜下(40×)随机选取5个视野,拍照采用HUMIAS-2000医学图文分析系统,imagepro-plus^{5.0}定量分析累积光密度(OD)值,计算每张切片均值。OD能反映选定区域的蛋白表达总量,OD=平均光密度×面积。

2.4 RT-PCR 测定单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1) mRNA 的表达

其序列参考文献[2]设计如下:MCP-1(627bp)上游引物为:5'-ATG CAG GTC TCT GTC ACG CTT CTG-3',下游引物为:5'-ACC CAT TCA TCT CTC ATA CAT-3';内参照 β actin(349bp)上游引物为:5'-TTG TAA CCA ACT GGG ACG ATA TGG-3',下游引物为:5'-GAT CTT GAT CTT CAT GGT GCT AGG-3'。以上引物均由上海捷瑞生物工程有限公司合成。采用Trizol常规一步法提取肝脏总RNA,紫外分光光度计测A₂₆₀及A₂₈₀,要求A₂₆₀/A₂₈₀比值介于1.8~2.0,根据A₂₆₀计算总RNA含量, -20℃保存备用。RT-PCR按试剂盒说明操作,PCR反应体系为25μl,10×PCR buffer 2.5μl,0.2mmol/L dNTP 0.5μl,25mmol/L MgCl₂ 1.5μl,cDNA 3μl,上游引物和下游引物终浓度为0.8μmol,各加1μl,Taq DNA聚合酶0.5μl,加入无核酸酶水至总体积25μl。然后执行如下反应条件:94℃预变性2分钟后,94℃变性30秒,58℃退火50秒,72℃延伸30秒,末次延伸为72℃,10分钟,循环次数为30次,终止反应, -20℃保存。取4μl PCR产物和4μl β actin 扩增产物与2μl电泳上样缓冲液混合,将其在2.0%的琼脂糖凝胶中进行电泳,每组重复电泳3次,紫外灯下观察后,用凝胶成像分析系统成像及分析图像,以MCP-1与 β actin的条带积分光密度比值表示其mRNA的表达水平。

2.5 统计学方法

各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用SPSS 11.0统计软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 表

表 1 各组大鼠 TC、TG 以及 SOD、MDA 值的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	剂量 ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	SOD (U/mg 蛋白)	MDA (nmol/mg 蛋白)
空白对照组	10	—	1.39±0.31	0.48±0.08	101.54±17.61	2.23±0.51
模型对照组	8	—	2.03±0.38**	1.18±0.57**	55.69±14.74**	3.32±0.36*
小葱低剂量组	9	0.06	1.67±0.31△	0.65±0.23△	85.65±21.45△△	2.72±0.63△
小葱中剂量组	10	0.12	1.65±0.17△	0.60±0.29△	87.69±16.60△△	2.48±0.94△
小葱高剂量组	9	0.24	1.69±0.29△	0.55±0.17△△	88.37±14.90△△	2.44±0.63△
东宝肝泰片组	10	0.70	1.52±0.31△△	0.61±0.27△	89.89±16.18△△	2.38±0.61△

与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型对照组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$; 下表同

表 2 各组大鼠 NF- κ B、TGF- β IOD 值以及 MCP-1/ β actin mRNA 结果的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	剂量 ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)	NF- κ B	TGF- β	MCP-1/ β actin mRNA
空白对照组	3	—	0.53±0.09	0.75±0.08	0.51±0.01
模型对照组	3	—	4.47±0.07**	10.56±0.56**	0.85±0.05**
小葱低剂量组	3	0.06	2.69±0.16△	1.86±0.02△△	0.72±0.03△△
小葱中剂量组	3	0.12	2.11±0.12△△	1.79±0.06△△	0.74±0.02△△
小葱高剂量组	3	0.24	1.20±0.04△△	1.05±0.06△△	0.62±0.02△△
东宝肝泰片组	3	0.70	1.73±0.08△△	1.77±0.17△△	0.63±0.04△△

示差异有显著性意义。

3 结果

3.1 各组大鼠 TC、TG 以及 SOD、MDA 值比较

表 1 示, 模型对照组大鼠 TC、TG、MDA 值显著高于空白对照组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), SOD 活力显著低于空白对照组 ($P < 0.01$); 小葱低、中、高剂量组及东宝肝泰片组大鼠 TC、TG、MDA 值显著低于模型对照组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), SOD 活力显著高于模型对照组 ($P < 0.01$)。

3.2 各组大鼠肝脏组织 NF- κ B、TGF- β IOD 值比较

光镜下可见模型对照组大鼠肝脏组织胞浆出现棕黄色颗粒, 小葱低、中、高剂量组及东宝肝泰片组的大鼠肝脏组织胞浆出现的棕黄色颗粒有不同程度的减轻现象。表 2 示, 经 imagepro-plus 5.0 分析, 模型对照组大鼠肝脏组织 NF- κ B、TGF- β 的 IOD 值显著高于空白对照组 ($P < 0.01$); 小葱低、中、高剂量组及东宝肝泰片组 NF- κ B、TGF- β IOD 值显著低于模型对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3.3 MCP-1 mRNA 的表达分析

通过对琼脂糖凝胶电泳图进行灰度分析, 可得出模型对照组大鼠肝脏组织 MCP-1/ β actin mRNA 值显著高于空白对照组 ($P < 0.01$); 小葱低、中、高剂量组及东宝肝泰片组大鼠肝脏组织 MCP-1/ β actin mRNA 值显著低于模型对照组 ($P < 0.01$)。见表 2。

4 讨论

脂肪肝依临床表现可将其归于中医“痰浊”、“湿阻”、“胀满”、“积证”、“胁痛”等范畴。多数医家认为, 脂肪肝是由于过食肥甘厚味或情志失调或久病体虚引起

肝失疏泄、脾失健运、肾精亏损、湿邪、痰浊、瘀血等病理因素淤积于肝所致, 病位在肝、脾、肾^[3]。我们选用具有性味辛温、通阳利尿作用的华夏小葱制剂为研究对象, 旨在阳气一通、津液得化、瘀血得除, 进而找到一种有效的抗脂肪肝新药。

本实验采用高脂饮食及酒精水喂养, 并结合每周 1 次行后肢皮下注射小剂量四氯化碳色拉油溶液的方法成功建立大鼠脂肪肝模型, 符合脂肪肝发病的一般规律。实验结果表明, 模型对照组大鼠血浆 TC、TG 值显著高于空白对照组 ($P < 0.01$), 且模型对照组 TG 值超过空白对照组 TG 值的两倍; 小葱低、中、高剂量组及东宝肝泰片组大鼠血浆 TC、TG 值显著低于模型对照组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 说明造模后脂肪肝大鼠血浆中的脂质水平显著增高, 给予华夏小葱制剂灌胃后能显著降低 TC、TG 的含量, 为临床上脂肪肝的防治提供了有价值的参考。

SOD 在机体的氧化和抗氧化平衡中起到了极为关键的作用, 能清除超氧离子自由基, 保护细胞免受损伤。同时, 机体通过酶系统与非酶系统产生氧自由基, 引发脂质过氧化作用, 并因此而形成脂质过氧化物, 如 MDA、氧过氧基以及新的氧自由基等。因而测试 MDA 的量常常可反映机体内脂质过氧化的程度, 间接地反映出细胞损伤的程度。MDA 的测定常常与 SOD 的测定相互配合, SOD 活力的高低间接反应了机体清除氧自由基的能力, 而 MDA 的高低又间接反应了机体细胞受自由基攻击的严重程度。NF- κ B 是由 p50 和 p65 多肽亚基组成的同源二聚体及异源二聚体, 在 Ribeiro PS 等^[4]的临床研究中表明了脂肪肝与活化 NF- κ B 表

达的相关性,证明了它在脂肪肝发病过程中起到了极为重要的作用。TGF- β 主要由淋巴细胞和单核细胞产生,并受多种因子调节,TGF- β 适当增高表达是组织损伤后修复的正常反应,而持续增高表达则可能促进脂肪肝转变成肝纤维化。MCP-1 是一种低分子量的多肽因子,它由炎症介质刺激的多种细胞分泌,可参与调节白细胞的趋化性和细胞因子表达。

当肝细胞内脂质过度堆积到一定程度,就会出现氧化应激,引起线粒体氧自由基(ROS)的增加,这些 ROS 可通过激活氧化还原反应敏感性激酶,激活转录因子 NF- κ B,进而提高肿瘤坏死因子- α 和白介素-8 的水平。这样,一方面可增加 ROS 的形成;另一方面可增加炎症细胞的浸润,成为肝炎形成的基础。持续的氧化应激状态导致了线粒体功能的调整,NF- κ B 的激活同时可诱导部分抗氧化蛋白的表达,如 SOD 和线粒体的解偶联蛋白-2 等,这些因子可抑制氧化磷酸化过程,导致线粒体内的 ATP 合成减少,进而使得肝细胞坏死增加。脂质过氧化产物之一——MDA 可激活肝脏星形细胞,刺激胶原和纤维化发生,MDA 还可以交联细胞角蛋白形成 Mallory 小体;它也可以激活 NF- κ B,促进炎症反应。NF- κ B 的过度活化可上调多种促炎因子基因的表达^[5],从而进一步作用于 Kupffer 细胞及其他炎症细胞的活化,产生大量的细胞因子和炎症介质,如白介素-6、TGF- β 、MCP-1 等,参与机体炎症、免疫等反应^[6],造成肝细胞的损伤和坏死。经过测定,在本实

验中可得出:模型对照组大鼠肝脏组织 MDA、NF- κ B、TGF- β 、MCP-1 mRNA 值显著高于空白对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),SOD 活力显著低于空白对照组($P < 0.01$);小葱低、中、高剂量组及东宝肝泰片组 MDA、NF- κ B、TGF- β 、MCP-1 mRNA 值显著低于模型对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),SOD 活力显著高于模型对照组($P < 0.01$)。表明华夏小葱制剂有显著增强机体清除氧自由基的能力,能够显著减轻机体内脂质过氧化损伤以及细胞因子损伤的程度,推测华夏小葱制剂对脂肪肝大鼠具有良好的防治作用。

参考文献

[1]孙要武,何宝国,吴嘉慧,等.大鼠脂肪肝实验模型的建立.齐齐哈尔医学院学报,2005,26(4):361.
[2]Wise GE, Yao S. Expression of tumour necrosis factor- α in the rat dental follicle. Arch Oral Biol, 2003, 48(1): 47~54.
[3]李正全,庞佑清.中医肝胆病证学.北京:人民卫生出版社,2003:320.
[4]Ribeiro PS, Cortez-Pinto H, Sola S, et al. Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors, and activation of NF-kappa B in the liver of nonalcoholic and alcoholic steatohepatitis patients. Am J Gastroenterol, 2004, 99(9): 1708~1717.
[5]Nathens AB, Bitar R, Watson RW, et al. Thiol-mediated regulation of ICAM-1 expression in endotoxin-induced acute lung injury. J Immunol, 1998, 160(6): 2959~2966.
[6]Hutter D, Greene JJ. Influence of the cellular redox state on NF-kappa B-regulated gene expression. J Cell Physiol, 2000, 183(1): 45~52.
(收稿日期:2006-09-25;修回日期:2007-01-22)

国家中医药管理局主管，中国中医药行业惟一国家级权威大报



中国中医药报

报道中医药一切时效信息

您想在第一时间获取最新国家中医药方针政策吗？
您想在第一时间了解中医药最新科研成果吗？
您想在第一时间掌握最新中医药临床经验吗？
您想在第一时间知晓中医药学术思想最新动态吗？
您想在第一时间学习成功医院的管理模式吗？
您想在第一时间研究成功中医药企业文化及研发管理营销案例吗？
您想在第一时间搜集中医教育及人才培养资讯吗？
您想快速提高自己的医疗水平早日成为名医吗？

拥有信息 占得先机

欢迎订阅中国中医药报，全国各地邮局全年均可订阅，本报为周四刊，对开八版，邮发代号：1-140，每份定价：0.8元，全年定价：156元，半年定价：78元