

责任公司提供;总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)试剂盒:浙江东瓯生物工程有限公司提供。TRIzol 总 RNA 抽提试剂购自 Invitrogen 公司;M-MuLV 逆转录试剂盒购自上海 Sangon 公司;二乙基焦炭酸盐(DEPC)购自 Sigma 公司;2×Taq PCR MasterMix (由 Taq Polymerase、dNTP、MgCl₂、Tris-HCl 等按比例组成)购自北京天为时代科技有限公司;DNA Mark 购自北京天为时代科技有限公司。

1.3 主要仪器

光学显微镜 PM-10AD(Olympus 日本);光学显微镜照相系统(Leica 德国);722光栅分光光度计(上海医用分析仪器厂);全自动生化分析仪(日立7150型);DL-8R 高速冷冻离心机(Bio-Rad);低速常温离心机(Sigma2-5型,美国);DY89-1电动玻璃匀浆机(宁波新芝科器研究所);PCR 仪(Eppendorf);凝胶成像系统(Syngene Co);电泳仪(Bio-Rad);液氮生物容器(成都金凤液氮容器有限公司)。

2 方法

2.1 动物造模及分组

32只SD大鼠常规喂养1周后,随机分成4组,每组8只,分别为空白组、模型组、观察组和东宝肝泰对照组(对照组)。空白组饲以普通标准饲料,其余3组喂饲高脂饲料(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2%四环素溶液0.75ml/100g(15mg/100g),1周后每6天1次腹腔注射四环素0.5ml/100g(10mg/100g),共计6次。每周称1次体重,按体重相应调整给药量。

2.2 给药方法

自造模第8天起,除空白组外,各组均按1ml·100g⁻¹·d⁻¹分别灌服相应药物,每日1次:对照组灌服6.0%的东宝肝泰混悬液,剂量为0.060g·100g⁻¹·d⁻¹;观察组灌服7.5%的消脂护肝胶囊混悬液,剂量为0.075g·100g⁻¹·d⁻¹;以上两组用药均相当于成人用药量的10倍。模型组灌服同体积生理盐水。疗程均为35天。至造模后第43天处死全部实验动物。以10%水合氯醛溶液腹腔注射麻醉后腹主动脉采血,迅速取肝组织液氮保存待提取肝组织总RNA,再取部分肝组织制备肝匀浆及病理切片。

2.3 观察指标及方法

2.3.1 肝脏病理 取肝左叶组织1块(大小约0.5cm×1cm×0.3cm),中性甲醛固定、石蜡切片、HE染色,参照中华肝脏病学会脂肪肝及酒精性肝病学组制定的NAFLD诊断标准^[4],分为无脂肪变性和轻、中、重度脂肪变性4个等级(以-~+++表示),光镜下评

估各组大鼠肝脏脂肪变性程度。

2.3.2 血清ALT、AST、TC、TG检测 腹主动脉采血6ml,室温静置30分钟,3000转/分钟离心10分钟,分离血清,采用全自动生化分析仪检测。

2.3.3 肝匀浆FFA、MDA、SOD含量 取500mg肝组织,4℃下制备10%肝匀浆,按试剂盒操作步骤进行检测。

2.3.4 PPARαmRNA表达 麻醉采血后迅速取出肝脏,吸水纸吸去附着液体,快速取下肝左叶组织0.5g放入-70℃液氮保存,此过程由专人操作,并在冰盘中进行,力争最短时间内完成(约1分钟内保存标本,以保证所采标本的质量和有效性)。

以3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)作为内参照,采用Primer premier 5.0软件设计并由上海生物工程有限公司合成PCR扩增引物,引物序列见表1。

表1 PCR 引物序列

基因	引物方向	引物序列(5, -3)	产物长度(bp)
PPARα	上游引物	ATGAACAAAGACGGGATG	422
	下游引物	TAAGGATGTGGGAGGAGC	
GAPDH	上游引物	TCCTCCCTGGAGAAGAGCTA	302
	下游引物	TCAGGAGGAGCAATGATCTTG	

采用逆转录PCR(RT-PCR)法检测肝组织CYP2E1 mRNA 相对表达量。(1)TRIzol 常规一步法提取肝脏总RNA:取RNA样品5μl进行1%琼脂糖凝胶电泳,通过凝胶成像系统观察各个条带的亮度与宽度,28S(第1条)条带亮度与宽度约为18S(第2条)的2倍,表明所得RNA完整无降解。(2)逆转录反应(RT反应):取1μl总RNA,根据M-MuLV逆转录试剂盒使用说明进行合成第一链cDNA,总反应体系为20μl。(3)PCR反应:2μl逆转录产物,Master Mix 12.5μl,引物各0.5μl,余量以蒸馏水补足体积至20μl。反应条件变性94℃,30秒,退火56℃,30秒,延伸72℃,30秒,30个循环,最后延伸5分钟,4℃结束反应。(4)产物分析:取PCR产物6μl,加样于2%琼脂糖凝胶中电泳。紫外透视分光仪下观察结果并摄片,经凝胶密度扫描系统处理,测定各电泳带灰度值,计算PPARαmRNA的RT-PCR产物与GAPDH mRNA的灰度比值(V值),作为PPARαmRNA的表达值。

PPARαmRNA 相对表达量(PPARα) = PPARα电泳带灰度值/GAPDH电泳带灰度值。

2.4 统计学方法

计量资料采用方差分析,数据以(x±s)表示。等级资料采用秩和检验。

3 结果

3.1 各组大鼠肝组织病理学变化

大体观:空白组大鼠肝脏颜色鲜红,质地柔软,分叶清楚;模型组大鼠腹腔脂肪组织丰富,肝体积增大,呈砖红色或黄色,多个肝小叶融和增生,切面油腻,呈典型脂肪肝外观;观察组大鼠腹腔脂肪组织减少,肝脏肿大程度减轻,呈暗红色或偏黄色,部分肝脏外观与空白组接近。

光镜下可见:空白组大鼠肝脏病理基本正常,肝细胞无脂肪变性,汇管区未见炎症细胞浸润;模型组肝细胞普遍发生中~重度脂肪变性,肝细胞胞浆内见大小不等的脂滴,部分细胞核被挤到一边,汇管区有炎细胞浸润,表2示,其脂肪变性程度与空白组比较差异有显著性意义($P<0.05$);观察组和对照组肝细胞脂肪变性程度与模型组相比均有减轻,观察组较对照组改善更为明显,二者比较差异有显著性意义($P<0.05$)。

表2 各组大鼠肝细胞脂肪变性测定结果比较(只)

组别	鼠数	—	+	++	+++
空白组	8	8	0	0	0
模型组	8	0	0	3	5
观察组	8	1	3	4	0
对照组	8	1	1	2	4

3.2 各组大鼠血清 ALT、AST、TC、TG 比较

表3、4示,空白组、观察组和对照组的 ALT、AST、TC、TG 均低于模型组,差异有显著性意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);除 TC 外,观察组疗效优于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

表3 各组大鼠血清 ALT、AST 比较(U/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	ALT	AST
空白组	8	43.00±13.98**	90.63±5.68**
模型组	8	125.50±12.40	147.00±16.66
观察组	8	66.63±6.70**△△	105.25±15.57**△
对照组	8	95.25±6.18**	124.00±9.94*

与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与对照组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$

表4 各组大鼠血清 TC、TG 比较(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TC	TG
空白组	8	1.56±0.42**	0.72±0.09**
模型组	8	3.89±0.67	1.25±0.22
观察组	8	2.48±0.12**	0.43±0.16**△
对照组	8	2.89±0.37*	0.78±0.07**

与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与对照组比较,△ $P<0.05$

3.3 各组大鼠肝匀浆 FFA、MDA、SOD 含量比较

表5示,模型组 FFA、MDA 显著高于空白组($P<0.01$),SOD 显著低于空白组($P<0.01$);观察组较模

型组 FFA、MDA、SOD 均有明显改善($P<0.01$), FFA、SOD 疗效优于对照组($P<0.05$)。

表5 各组大鼠肝匀浆 FFA、MDA、SOD 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	FFA ($\mu\text{mol/gprot}$)	MDA (nmol/mgprot)	SOD (U/mgprot)
空白组	8	336.38±85.64*	7.46±0.42*	59.77±9.34*
模型组	8	722.38±104.23	9.62±0.87	39.80±7.66
观察组	8	509.75±67.23*△	8.12±0.60*	54.71±3.92*△
对照组	8	608.75±136.75	8.63±0.51*	46.36±6.88

与模型组比较,* $P<0.01$;与对照组比较,△ $P<0.05$

3.4 各组大鼠肝组织 PPAR α 比较

表6示,空白组及观察组均显著高于模型组($P<0.01$);观察组与空白组差异无显著性意义($P>0.05$),观察组较对照组肝组织 PPAR α mRNA 显著高表达($P<0.01$)。

表6 各组大鼠肝组织 PPAR α mRNA 相对表达情况(V 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	PPAR α
空白组	8	2.75±0.86*
模型组	8	0.66±0.16
观察组	8	2.44±0.60*△
对照组	8	0.96±0.41

与模型组比较,* $P<0.01$;与对照组比较,△ $P<0.01$

4 讨论

现已知,FFA 代谢障碍、氧应激和脂质过氧化是促使 NAFLD 病情进展的重要因素。PPAR α 是调节机体能量代谢和线粒体、过氧化酶体及微粒体脂肪酸氧化的关键因子,可在多个环节调节 FFA 及脂质在肝脏的代谢,在 NAFLD 的发生发展中起重要作用。PPAR α 是一种能被过氧化物酶体增殖物激活的核内受体,主要在肝细胞表达,参与脂质代谢的调节^[5]。PPAR α 激活后:(1) 转录激活参与脂肪酸氧化的基因,增加对脂肪酸氧化的能力^[6]。(2) 刺激其他器官脂肪酸氧化酶的表达,增加脂肪酸的消耗,降低肝脏合成 TG 的底物水平^[7]。(3) 发挥多种调节血脂的作用,如升高高密度脂蛋白水平和抑制载脂蛋白 C-Ⅲ 的表达等。(4) 纠正胰岛素抵抗,阻止脂肪肝形成^[8]。研究显示,PPAR α 表达受抑,可引起一系列与脂质代谢有关的蛋白质和酶基因的转录水平降低,诱导或加速脂肪肝的发生发展^[9]。相反,PPAR α 激活后,则可上调脂肪酸氧化基因的表达,下调脂质合成基因的表达,控制脂肪肝的发生^[10]。

NAFLD 的中医病机为“湿”、“痰”、“瘀”痹阻肝络,消脂护肝胶囊正是以利湿、化痰、祛瘀为立法组方原则,以泽泻利水渗湿,山楂活血化瘀,决明子清肝化痰,柴胡疏肝理气等共奏祛湿化痰、理气化瘀之效。现代药理研究表明,泽泻、山楂、决明子都具有不同程度的降低 TC、脂蛋白及 TG 水平,提高抗氧化能力的作

用。目前尚缺乏广泛公认的治疗脂肪肝的中药制剂,而东宝肝泰片是临床普遍用来治疗脂肪肝的药物,主要通过促进肝脏磷脂及脂蛋白水平、加速肝内脂肪运输到肝外利用,起到抗脂肪肝作用。

本实验结果显示,模型组与空白组相比 PPAR α mRNA 表达明显减少,观察组则使该基因表达恢复至接近正常水平。同时,肝匀浆 FFA、MDA 含量随 PPAR α mRNA 表达增强而降低,说明 PPAR α 基因与肝匀浆 FFA、MDA 之间呈负相关,与 SOD 呈正相关。从临床指标看,观察组较模型组 ALT、AST、TC、TG 水平明显降低,病理学肝脏脂肪变性程度减轻,这表明消脂护肝胶囊可增强 PPAR α 基因表达,使其促进 FFA 氧化分解,并可增强肝组织抗氧化能力,从而起到抗炎保肝、减少肝脏脂质沉积的作用,其疗效优于东宝肝泰片。这是其防治 NAFLD 的重要分子机制之一,同时也为中医药防治脂肪肝的研究开辟了新的思路。

参考文献

- [1] Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am J Gastroenterol*, 2003, 98(5):960~967.
- [2] 赵文霞, 段荣章, 冀爱英, 等. 消脂护肝胶囊对脂肪肝患者降脂作用和临床及实验研究. *河南中医*, 1998, 18(5):298~300.
- [3] 赵文霞, 张玉禄. 消脂护肝胶囊对非酒精性脂肪肝患者胰岛素抵抗及瘦素水平的影响. *中医研究*, 2005, 18(5):21~23.

- [4] 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病的诊断标准. *中华肝脏病杂志*, 2003, 11(2):73.
- [5] Romics L Jr, Kodys K, Dolganiuc A, et al. Diverse regulation of NF-kappaB and peroxisome proliferators-activated receptors in murine nonalcoholic fatty liver. *Hepatology*, 2004, 40(2):376~385.
- [6] Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev*, 1999, 20(5):649~688.
- [7] Francis GA, Annicotte JS, Auwerx J. PPAR-alpha effects on the heart and other vascular tissues. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 285(1):H1~9.
- [8] Koh EH, Kim MS, Park JY, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha activation prevents diabetes in OLETF rats: comparison with PPAR-gamma activation. *Diabetes*, 2003, 52(9):2331~2337.
- [9] Nanji AA, Dannenberg AJ, Jokelainen K, et al. Alcoholic liver injury in the rat is associated with reduced expression of peroxisome proliferator-alpha (PPARalpha)-regulated genes and is ameliorated by PPARalpha activation. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004, 310(1):417~424.
- [10] Clarke SD. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. I. Molecular mechanism for polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001, 281(4):G865~869.

(收稿日期:2006-09-04;修回日期:2007-01-14)



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

欢迎登陆本报网址: www.cntcm.com.cn

进入中国中医药报网上书店, 大量医药图书供您挑选。咨询电话: 010-64860746

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: I-140, 每份定价: 0.8元, 全年定价: 156元, 半年定价: 78元