

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2014.14.015

实验研究

化痰祛湿活血方对非酒精性脂肪性肝炎大鼠肝脏病理的影响

赵文霞¹, 闫乐¹, 段荣章^{2*}

(1. 河南中医学院第一附属医院, 河南省郑州市, 450000; 2. 河南中医学院)

基金项目: 郑州市创新型科技领军人才项目 (10LJRC171) 河南中医学院科技创新团队项目 (2010XCXTD06)

摘要 目的 探讨化痰祛湿活血方对非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 大鼠肝组织病理学的影响。方法 72 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、对照组和中药高、中、低剂量组, 每组 12 只。空白组给予普通饲料, 剩余各组均给予高脂饲料联合盐酸四环素腹腔注射建立 NASH 大鼠模型。从造模第 2 周起, 对照组给予多烯磷脂酰胆碱胶囊混悬液 28.5 mg/ (100 g · d) 灌胃; 中药高、中、低剂量组分别给予化痰祛湿活血方混悬液 5.0、2.52、1.26 g/ (100 g · d) 灌胃; 正常组、模型组给予等剂量生理盐水灌胃。5 周后测定各组大鼠血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (TC) 水平, 肝组织切片行 HE 及油红 O 染色, 观察肝组织病理及脂肪沉积面积变化。结果 与模型组比较, 对照组和中药高、中、低剂量组治疗后血清 ALT、AST、TG、TC 水平均显著下降 ($P < 0.01$), 且中药高剂量组降低血清 ALT、AST、TG、TC 水平更显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。给药各组与模型组比较, 肝细胞脂肪沉积的面积显著缩小或减少 ($P < 0.01$), 并且以中药高剂量组效果最优 ($P < 0.01$)。结论 化痰祛湿活血方能有效减轻肝脏损伤, 改善肝细胞脂肪沉积, 且以高剂量效果最优。

关键词 非酒精性脂肪性肝炎; 化痰祛湿活血方; 肝脏病理

目前, 非酒精性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH) 的发病率和患病率均有增高趋势^[1]。由于 NASH 是向脂肪性肝纤维化、肝硬化乃至肝癌发展的关键环节, 有效防治 NASH 已成为 21 世纪全球重要的公共健康问题之一^[2]。我们前期研究结果显示, 化痰祛湿活血方可以减少大鼠肝细胞内脂滴数量、减轻线粒体及内质网损伤^[3], 可改善 NASH 患者肝功能、肝/脾 CT 值^[4]。本研究拟在高脂饲料联合四环素腹腔注射建立 NASH 大鼠模型, 探讨不同剂量化痰活血祛湿方对肝脏病理的干预作用。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 72 只, 雄性, 6 周龄, 体重 180 ~ 200 g, 由河南省实验动物中心提供, 实验动物许可证号: SCXK (豫) 2010-002。

1.2 药物

化痰祛湿活血方颗粒 (组成: 泽泻 30 g、海藻 15 g、决明子 10 g、郁金 15 g、丹参 15 g、山楂 15 g、柴胡 6 g、水飞蓟 15 g) 由四川新绿色药业科技发展股份有限公司提供 (批号分别为: 12080295、12030263、11080681、12090231、12090234、12080291、12090260、12090226); 多烯磷脂酰胆碱胶囊 (易善复) 由赛诺菲安万特 (北京) 制药有限公司提供 (批号: D2105)。

1.3 主要试剂和仪器

盐酸四环素: Amresco 公司, 批号: T8180; 胆固醇: Sorlarbio 公司, 批号: C8280; 多聚甲醛: Sigma 公司, 批号: P6148-KG; 油红 O 染色试剂盒: 南京建成科技有限公司, 批号: D027; 丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 试剂盒: 四川迈克科技有限责任公司, 批号: 20120612, 20120612; 甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (TC) 试剂盒: 浙江东瓯生物工程有限公司,

* 通讯作者: drz826@163.com, (0371) 66244588

批号: 121016, 121016; 甘油明胶封固剂: 碧云天生物技术有限公司, 批号: C0187。

CM1900 冰冻切片机 (德国 Leica); D-37520 高速冷冻离心机 (美国 Kendro); 2700 型全自动生化分析仪 (日本 Olympus); TU-1901 型双光束紫外可见分光光度计 (北京普析通用仪器有限责任公司); TB-718E 生物组织自动包埋机 (湖北泰维医疗科技有限责任公司); TK-218 恒温摊片烤片机 (湖北泰维医疗科技有限责任公司); RM2245 旋转切片机 (德国 Leica); BX41 摄像光学显微镜 (日本 Olympus)。

2 方法

2.1 动物分组及模型建立

72 只 SD 大鼠按随机数字表法分为空白组、模型组、对照组和中药高、中、低剂量组, 每组各 12 只。空白组给予普通饲料, 剩余各组均给予高脂饲料 (84% 基础饲料、10% 猪油、5% 蛋黄粉、1% 胆固醇) 加腹腔注射盐酸四环素 10 mg/100 g。造模第 1 周后, 盐酸四环素改为 7 mg/100 g, 每 6 天注射 1 次。根据每周大鼠体重变化调整药量, 造模时间共 6 周。

从造模第 2 周起, 对照组给予多烯磷脂酰胆碱胶囊混悬液 28.5 mg/(100 g·d)。中药高、中、低剂量组分别给予化痰祛湿活血方混悬液 5.04 g/(100 g·d)、2.52 g/(100 g·d)、1.26 g/(100 g·d); 正常组、模型组每日灌服等剂量生理盐水; 第 7 周后, 以 10% 水合氯醛溶液麻醉后取材并处死动物。

2.2 肝功能指标检测

取血 10 ml 静置 30 min, 3 000 r/min 4℃ 离心 10 min, 分离血清, 全自动生化分析仪检测血清 ALT、AST、TC、TG 水平。

2.3 肝脏病理学观察

取肝组织左叶 4% 多聚甲醛溶液固定, 常规脱水、透明、包埋, 切片行 HE 染色。另取肝组织制

作厚度 7 μm 的冰冻切片行油红 O 染色。光镜下观察大鼠肝脏脂变程度, 橘红色为阳性表达, 采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件 (Media Cybernetics 公司) 进行分析, 取 5 个随机高倍镜视野 (×400) 测定其积分光密度 (IOD) 值, 取平均值进行统计分析。

2.4 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 对各组数据进行正态性检验和方差齐性检验, 各组间比较采用单因素方差分析 LSD 法。

3 结果

3.1 各组大鼠血清 ALT、AST、TC、TG 水平比较

表 1 示, 模型组血清 ALT、AST、TC、TG 明显高于空白组 ($P < 0.01$), 各给药组 ALT、AST、TC、TG 水平较模型组明显降低 ($P < 0.01$); 中药高剂量组 ALT、AST、TC、TG 水平明显低于对照组和中药中、低剂量组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3.2 各组大鼠肝脏病理学改变

图 1 示, HE 染色后, 模型组肝细胞肿胀, 胞质内存在大小不等脂滴, 见散在点状坏死灶, 汇管区有大量炎症细胞浸润。对照组肝索结构紊乱减轻, 胞内脂滴缩小、数量减少, 部分汇管区炎症细胞浸润。中药各剂量组脂肪变程度均有改善, 中药高剂量组仅少数肝细胞内存在细小脂滴, 小叶结构基本恢复。

图 2 示, 油红 O 染色后, 空白组未见明显橘色脂滴, 细胞核、胞浆呈现蓝色。模型组可见弥漫的脂肪变, 细胞内充满大量橘红色脂滴, 大小不一紧密排列, 部分脂滴甚则融合成链。各给药组与模型组比较, 脂滴明显缩小或减少, 中药高剂量组仅汇管区、中央静脉周围有橘色脂滴, 脂滴明显缩小, 染色变浅。

3.3 各组大鼠肝脏脂肪变 IOD 值比较

表 2 示, 模型组较空白组肝脏脂肪变 IOD 值

表 1 各组大鼠血清 ALT、AST、TC、TG 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	ALT (U/L)	AST (U/L)	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)
空白组	12	49.83 ± 15.06	93.67 ± 12.26	1.16 ± 0.23	0.86 ± 0.31
模型组	12	132.50 ± 14.62*	203.42 ± 8.03*	2.81 ± 0.18*	2.19 ± 0.21*
对照组	12	84.75 ± 9.51▼	146.67 ± 31.15▼	2.14 ± 0.12▼	1.39 ± 0.20▼
中药高剂量组	12	56.17 ± 10.81▼△△	111.83 ± 16.26▼△	1.40 ± 0.34▼△△	1.10 ± 0.19▼△△
中药中剂量组	12	80.00 ± 7.90▼▲▲	154.70 ± 17.17▼▲▲	1.82 ± 0.31▼▲	1.42 ± 0.18▼▲▲
中药低剂量组	12	98.92 ± 10.94▼△△▲▲	151.42 ± 26.62▼▲▲	2.32 ± 0.25▼▲▲	1.51 ± 0.26▼△△▲▲

注: 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, ▼ $P < 0.01$; 与对照组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$; 与中药高剂量组比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$

显著升高 ($P < 0.01$)。各给药组与模型组比较, 肝脏脂肪变 IOD 值显著降低 ($P < 0.01$); 中药高剂量组与对照组及中药中、低剂量组比较肝脏脂肪变 IOD 显著降低 ($P < 0.01$)。

表 2 各组大鼠肝脏脂肪变 IOD 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	IOD 值
空白组	12	7.45 ± 4.90
模型组	12	223.63 ± 62.89*
对照组	12	56.55 ± 15.69▼
中药高剂量组	12	18.61 ± 12.49▼△
中药中剂量组	12	81.88 ± 30.49▼
中药低剂量组	12	93.76 ± 42.85▼△▲

注: 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, ▼ $P < 0.01$; 与对照组比较, △ $P < 0.01$; 与中药高剂量组比较, ▲ $P < 0.01$

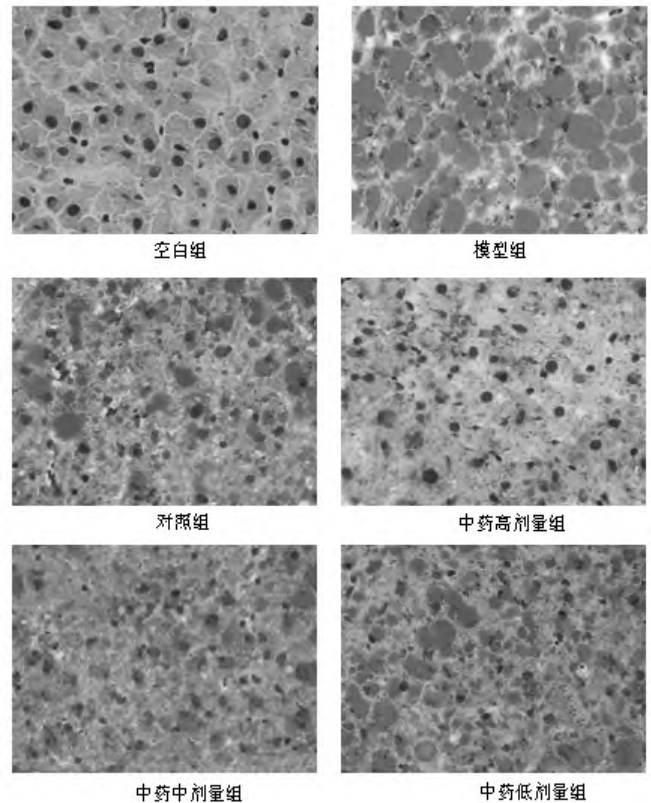


图 2 各组大鼠肝组织病理油红 O 染色结果 ($\times 400$)

痰散结、利水祛湿; 郁金、海藻、山楂以行气活血, 化痰消痞; 水飞蓟、决明子祛瘀化热; 柴胡疏肝理气, 奏活血利湿、清热化痰、理气祛瘀之效果。现代药理学研究表明, 泽泻、海藻、决明子等具有降低具有降低 TG 水平, 减少肝细胞内脂质蓄积^[5-7]; 丹参、山楂能够提高抗氧化酶的活性, 防止脂质过氧化^[8-9]; 水飞蓟清除活性氧, 保护肝细胞膜, 促进肝细胞酶及结构蛋白等的合成, 增强肝细胞修复, 从而起到抗氧化、抗炎、免疫调节及肝细胞再生作用^[10]。

肝脏病理是 NASH 诊断的金标准, 明确反映肝脏脂肪分布、炎症活动度及纤维化分期。NASH 病理是以肝腺泡 3 区大泡性或以大泡为主的混合性肝细胞脂肪变、肝细胞气球样变、小叶内混合性炎症细胞浸润以及窦周纤维化为主要改变^[1]。肝脏脂类代谢稳态的变化是构成 NASH 的基础。脂肪的集聚主要是由于 TG 在肝内合成与分解及转运之间的平衡遭到破坏而引起。来自饮食、高脂血症及脂肪组织动员增加, 使 TG 合成增多; 此外, 极低密度脂蛋白 (VLDL) 合成和分泌减少, 可导致 TG 转运障碍。两方面相互作用, 则可导致 TG 在肝细胞内的合成与其向体循环中释放之间的平衡失调而引起脂质在肝内蓄积, 最终引发 NASH^[11]。本实验

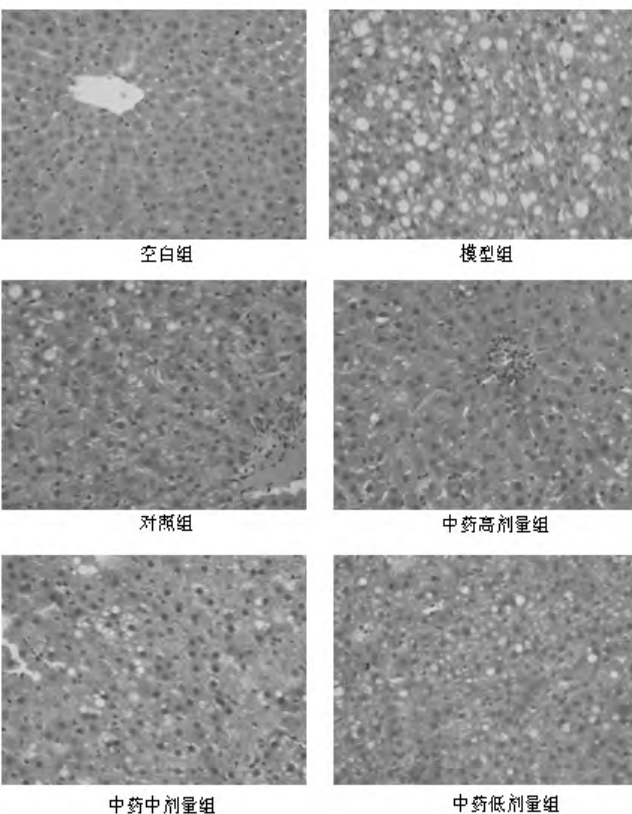


图 1 各组大鼠肝组织病理 HE 染色结果 ($\times 400$)

4 讨论

NASH 属中医“胁痛”、“肥气”、“肝癖”范畴。因过食肥甘厚味、多卧少动, 湿邪壅滞脾胃, 脾胃失健, 土壅木郁, 肝郁气滞, 湿浊羁留, 日久生痰, 痰瘀交结; 气病及血, 血行瘀阻, 致痰浊血瘀等病理产物排泄不畅而癖积发病。NASH 病机为“湿”、“痰”、“瘀”互结, 痹阻肝络, 病性属本虚标实, 本虚即肝脾肾亏虚, 临证治疗时常以疏肝活血、化痰利湿法为基本治法, 方中泽泻与丹参化

结果显示,化痰祛湿活血方能降低有效血清 ALT、AST、TG、TC 水平,减轻肝脏脂肪变程度,且疗效优于多烯磷脂酰胆碱胶囊。化痰祛湿活血方降脂保肝,改善脂质蓄积的药理机制有待开展相关深入研究。

参考文献

- [1] 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诊疗指南(2010 年版) [J]. 中华医学信息杂志, 2010, 25(12): 19-20.
- [2] Fan JG, Farrell GC. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease in China [J]. J Hepatol, 2009, 50(1): 204-210.
- [3] 赵文霞, 刘晓燕, 石艳芬, 等. 消脂护肝胶囊对非酒精性脂肪性肝病大鼠病理及 PPAR α 基因的影响 [J]. 中医杂志, 2007, 48(11): 1020-1023.
- [4] 赵文霞, 刘全忠, 刘君颖, 等. 化痰利湿活血方加减治疗非酒精性脂肪性肝炎患者 96 例临床观察 [J]. 中医杂志, 2012, 53(12): 1025-1027.

- [5] 郁相云, 钟建华, 张旭泽. 泽泻降血脂药理作用及物质基础研究 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2010, 8(11): 250.
- [6] 张美稀, 陈圣高, 郑文君, 等. 海藻(羊栖菜)干预高脂饲养大鼠脂肪肝的量效研究 [J]. 浙江临床医学, 2006, 8(5): 452-453.
- [7] 高艳青, 刘俊. 决明子的药理作用及其研究进展 [J]. 中国药业, 2008, 17(8): 63-64.
- [8] 路帅, 韩雪, 张睦清, 等. 丹参防治大鼠非酒精性脂肪肝的药效机制研究 [J]. 甘肃中医院学报, 2012, 29(2): 4-6.
- [9] 罗先钦, 黄崇刚, 伍小波, 等. 山楂总黄酮对复合因素致大鼠脂肪肝模型脂质代谢与低密度脂蛋白受体表达的影响 [J]. 中草药, 2011, 42(7): 1367-1373.
- [10] 杨慧莹, 林克荣. 水飞蓟素治疗脂肪肝的作用机制 [J]. 中华现代内科学杂志, 2006, 3(8): 876-878.
- [11] 陈压西, 阮雄中. 炎症应激相关的脂质异位沉积在非酒精性脂肪性肝病发病中的作用 [J]. 中华肝脏病杂志, 2011, 19(9): 643-645.

Effects of *Huatan Qushi Huoxue Formula* on Hepatic Pathological Changes in Nonalcoholic Steatohepatitis Model Rats

ZHAO Wenxia¹, YAN Le¹, DUAN Rongzhang²

(1. The First Affiliated Hospital of Henan University of TCM, Henan Province 450000; 2. Henan University of TCM)

ABSTRACT Objective To study the effects of *Huatan Qushi Huoxue Formula* (formula to resolve phlegm, eliminate dampness and activate blood circulation) on pathological changes of liver tissue in rats with nonalcoholic steatohepatitis (NASH). **Methods** Totally 72 male SD rats were randomized into the blank group, model group, control group and *Huatan Qushi Huoxue Formula* high-dose, middle-dose and low-dose groups, with 12 in each. The blank group was given normal diet. Other 5 groups were given fat diet and intraperitoneal injection of tetracycline to establish NASH models. From the 2nd week of modeling, the control group was gavaged with 28.5 mg/(100 g · d) polyene phosphatidylcholine capsule (Essentiale) suspension, *Huatan Qushi Huoxue Formula* high-dose, middle-dose and low-dose groups were gavaged with 5.0 g/(100 g · d), 2.52 g/(100 g · d) and 1.26 g/(100 g · d) of *Huatan Qushi Huoxue Formula* suspension respectively, and the blank group and model group were gavaged with the equal volume of normal saline. The levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), triglyceride (TG) and total cholesterol (TC) were detected 5 weeks later. The liver tissue sections were stained by HE staining and oil red O staining. The pathological changes of liver tissue and changes of fat deposition area were observed. **Results** Comparing with the model group, the levels of ALT, AST, TG and TC were significantly decreased in the control group and *Huatan Qushi Huoxue Formula* high-dose, middle-dose and low-dose groups ($P < 0.01$), especially in the *Huatan Qushi Huoxue Formula* high-dose group ($P < 0.01$). Comparing with the model group, the area of fat deposition and inflammatory cell infiltration in the liver cells was significantly reduced in all administration groups ($P < 0.01$), especially in the *Huatan Qushi Huoxue Formula* high-dose group. **Conclusion** *Huatan Qushi Huoxue Formula* can effectively reduce liver injury and relieve fat deposition in the liver cells, especially high-dose *Huatan Qushi Huoxue Formula*.

Keywords nonalcoholic steatohepatitis; *Huatan Qushi Huoxue Formula*; hepatic pathology

(收稿日期: 2013-09-30; 修回日期: 2014-03-15)

编辑: 洪 涛