

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.22.014

非酒精性脂肪性肝病痰瘀互结证大鼠模型的构建及评价

朱晓宁, 汪静*, 郑丁, 张玉蓉, 彭孟云, 尹玥, 陈然

(西南医科大学附属中医医院, 四川省泸州市龙马潭区春晖路 182 号, 646000)

摘要 目的 探讨非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 痰瘀互结证大鼠模型的构建。方法 将 20 只 SD 大鼠随机分成对照组、模型组、经方组、协定方组, 每组 5 只。除对照组外其余各组采用伤湿法加外界慢性轻度刺激、高脂饮食多因素复合刺激的方法建立 NAFLD 痰瘀互结证大鼠模型, 连续 10 周。经方组和协定方组于造模 8 周后给予相应中药 1 ml/100 g 灌胃, 对照组和模型组均使用相同体积的生理盐水灌胃, 每日 1 次, 共 2 周。各组分别于造模 1、10 周进行舌象评分。造模 10 周进行肝脏 HE 染色, 观察肝细胞脂肪变性程度; 检测血脂、肝脏酶学指标及血液流变学指标。结果 与对照组比较, 模型组动物舌象评分、肝脏酶学指标、血脂、血液流变学指标均升高 ($P < 0.05$)。经方组和协定方组舌下络脉评分较同时模型组降低, 血脂及肝脏酶学指标水平亦降低 ($P < 0.05$); 协定方组胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 水平较经方组下降明显 ($P < 0.05$)。结论 采用伤湿法加外界慢性轻度刺激、高脂饮食多因素复合刺激的方法建立的大鼠模型病理符合 NAFLD, 同时具有痰瘀互结证中医证候, 中药方剂干预后反证造模成功。

关键词 非酒精性脂肪性肝病; 痰瘀互结证; 动物模型

非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是一种排除过量饮酒史, 以血清游离脂肪酸显著升高、肝实质细胞弥漫性脂肪变性和肝脂质贮积为主要特征的临床病理综合征。随着人们生活水平的提高和饮食结构的变化, NAFLD 正在成为最普遍的肝脏疾病, 影响着全球三分之一的人群^[1]。NAFLD 的中医病名为“肝癖”, 肝郁、脾虚、痰瘀是其基本病机。“痰瘀”贯穿病程始终^[2]。有研究发现, “伤湿法”可以造成脾虚, 脾虚则生痰湿, 外界刺激引起情志不畅, 肝郁导致气滞, 气滞则可形成瘀血, 高脂饮食可以导致脂肪肝^[3-4]。因此, 我们采取伤湿法加外界慢性轻度刺激、高脂饮食多因素复合刺激的方法建立 NAFLD 痰瘀互结证大鼠模型, 并采用中药干预进行模型评价, 为 NAFLD 的中医药研究提供基础。

1 材料

1.1 实验动物

清洁级雄性 SD 大鼠 20 只, 7~9 周龄, 体重 190~250 g, 由西南医科大学医学实验动物中心提供, 实验动物合格证号: SYXK (川) 2015-065。

1.2 实验药物

协定方, 祛痰活血方, 组成: 姜半夏 10 g, 陈皮 10 g, 茯苓 10 g, 丹参 15 g, 郁金 15 g, 山楂 15 g, 薏苡仁 15 g, 南柴胡 10 g, 黄芩 10 g, 泽泻 15 g, 决明子 10 g。经方二陈汤合膈下逐瘀汤, 组成: 姜半夏 10 g, 橘红 10 g, 茯苓 10 g, 五灵脂 6 g, 当归 9 g, 川芎 6 g, 桃仁 9 g, 牡丹皮 6 g, 赤芍 6 g, 乌药 6 g, 延胡索 3 g, 甘草 9 g, 香附 4.5 g, 红花 9 g, 枳壳 4.5 g。药物均由西南医科大学附属中医医院制剂中心制备, 浓缩至 1 ml 含生药 1.5 g。

1.3 主要试剂及仪器

高脂饲料配方: 75% 基础饲料 + 10% 胆固醇 + 10% 猪油 + 4% 蔗糖 + 1% 胆盐 (由成都达硕实验动物公司提供); 丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、谷氨酰转肽酶 (GGT)

基金项目: 四川省教育厅科研计划 (15ZB0156, 14ZA0144); 泸州市财政局、泸州市科学技术和知识产权局 2016 年市级科技计划 [2016-R-70(23/24)]; 泸州医学院-泸州医学院附属中医院联合专项 (2013ZRQN044)

* 通讯作者: lywj68@126.com, 13882726162

试剂盒 (上海岚派生物科技有限公司, 批号: 2015090011、2015060028、2015090017); 总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG) 试剂盒 (温州东欧生物工程有限公司, 批号: 150310、150667); HE 染色试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 货号: G1120-40)。生物显微镜 (上海点应光学仪器有限公司, 型号: DYS-406); 超低温冰箱 (日本 Sanyo 公司, 型号: MDF-1155); 电子天平 (上海民侨科学精密仪器有限公司, 型号: SL2002N); 全自动血流变检测仪 (重庆赛航科技发展有限公司, 型号: SH210B)。

1.4 分组及造模

将 20 只 SD 大鼠采用随机数字表法分成对照组、模型组、经方组、协定方组, 每组 5 只。除对照组外其余各组均将鼠笼铺设潮湿碎刨花, 置于造模箱内, 箱底部盛满水, 箱顶部有通气孔, 箱内置温湿度计, 造模箱温度保持在 $(33 \pm 1)^\circ\text{C}$, 相对湿度为 $(95 \pm 3)\%$; 采用不可预知的慢性应激刺激法进行干预, 包括噪声刺激 10~12h (噪音频率为 5~15 kHz, 强度等级为 3, 持续时间为 60~120s, 每间隔 8~15min 给予刺激 1 次)、闪烁强光刺激 (频率为 1~3h、持续时间为 60~120s, 每间隔 8~15min 给予刺激 1 次) 以及 24h 光照与黑暗刺激; 以上刺激平均在 7 天中各给予 1 次, 连续重复 10 周。试验期间, 对照组大鼠给予普通饲料喂养, 其余各组给予高脂饲料喂养, 均自由饮水。

1.5 模型评价

参照《中药药理研究方法学》^[7] 计算, 经方组和协定方组于造模 8 周后给予相应中药 1ml/100g 灌胃, 每日 1 次, 共 2 周; 对照组和模型组均使用相同体积的生理盐水灌胃。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 大鼠一般情况 观察大鼠体重 (分别于造模 1、5、10 周时测定 1 次)、食欲、大便、外界的反应及舌象, 舌象评分 (造模 1、10 周) 参照血瘀证模型大鼠舌象评价标准^[8]。

1.6.2 肝细胞脂肪变性程度 10% 甲醛溶液固定大鼠肝脏 24h, 95% 酒精脱水, 石蜡包埋, 在石蜡切片机上进行连续切片, 切片厚度为 $5\mu\text{m}$ 。使用 HE 染色法对肝脏切片染色, 光镜下观察肝脏病理变化。肝细胞脂肪变性判定标准参照脂肪肝病病理诊断标准^[9]。

1.6.3 血脂及肝脏酶学指标检测 采用 ELISA 法测定, 包括 TC、TG、AST、ALT 及 GGT 水平, 均按试剂盒步骤操作。

1.6.4 血液流变学指标检测 包括血浆黏度和全血黏度, 采用全自动血流变检测仪检测, 由西南医科大学附属中医医院检验科完成。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行处理。计量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析; 计数资料采用秩和检验, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况

实验期间对照组大鼠精力充沛, 动作迅速, 反应灵敏, 皮毛整洁有光泽; 模型组大鼠体重增长迅速, 嗜睡慵懒, 动作相对迟缓, 活动量减少, 对外界刺激反应不敏感, 皮毛凌乱暗哑, 且大便常不成形; 协定方组和经方组大鼠一般情况相对模型组均有不同程度缓解。表 1 示, 对照组和模型组大鼠造模 5、10 周时体重较前一个时间点明显增加 ($P < 0.05$)。经方组和协定方组造模 5 周时体重较造模 1 周时明显增加 ($P < 0.05$), 而造模 10 周时体重与造模 5 周时差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。造模 1、5、10 周时模型组、经方组和协定方组大鼠体重均较同时间对照组明显增加 ($P < 0.05$); 而造模 5、10 周时经方组和协定方组大鼠体重较同时间点模型组明显降低 ($P < 0.05$)。经方组和协定方组各时间点大鼠体重差异无统计意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠不同时间体重比较 (g , $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	造模 1 周	造模 5 周	造模 10 周
对照组	5	361.2 $\pm$ 6.54	411.8 $\pm$ 12.26*	438.4 $\pm$ 17.88*
模型组	5	384.4 $\pm$ 7.27 Δ	514.2 $\pm$ 7.73* Δ	549.4 $\pm$ 17.94* Δ
经方组	5	387.4 $\pm$ 10.07 Δ	489.6 $\pm$ 7.37* Δ	509.0 $\pm$ 13.91 Δ
协定方组	5	389.1 $\pm$ 6.18 Δ	498.8 $\pm$ 12.06* Δ	501.0 $\pm$ 8.456 Δ

注: 与本组前一个时间点比较, * $P < 0.05$; 与对照组同时时间比较, $\Delta P < 0.05$; 与模型组同时时间比较, $\Delta P < 0.05$

2.2 各组大鼠不同时间舌象评分比较

表 2 示, 对照组、经方组、协定方组大鼠造模 10 周舌泽、舌下络脉评分较本组造模 1 周显著降低, 而模型组造模 10 周舌泽评分较造模 1 周升高 ($P < 0.05$)。与对照组同时时间比较, 模型组、经方组及协定方组造模 1、10 周时舌泽评分均明显升高, 但经方组和协定方组造模 10 周舌泽评分较同时时间模型组显著降低 ($P < 0.05$)。模型组造模 1、10 周时舌下络脉评分较同时时间对照组升高, 经方组和协定方组舌下络脉评分较同时时间模型组降低 ($P < 0.05$)。经方组和协定方组各时间点舌泽、舌

下络脉评分差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 各组大鼠肝组织病理学观察比较

HE 染色光镜下观察: 对照组肝小叶结构完整; 肝细胞呈放射状, 排列整齐, 大小一致, 细胞核居中; 肝细胞无脂肪变性、坏死。模型组大鼠肝小叶结构破坏, 镜下可见细胞内大量脂滴分布, 肝脏呈重度弥漫样脂肪变性, 汇管区可见少量细胞破裂后融合为较大脂滴, 呈“气球样”改变, 肝小叶内大量炎性细胞浸润。经方组和协定方组脂肪变性均有不同程度的降低, 肝细胞有再生现象, 炎性细胞减少或消失。对照组肝细胞脂肪变性程度 (-) 5 只, 模型组肝细胞脂肪变性程度 (+++) 5 只, 经方组肝细胞脂肪变性程度 (+) 2 只、(++) 3 只, 协定方组肝细胞脂肪变性程度 (-) 只、(+) 1 只、(++) 3 只。模型组肝细胞变性程度明显高于对照组 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 经方组和协定方组肝细胞变性程度均明显降低 ($P < 0.05$); 经方组和协定方组组间比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 各组大鼠血脂及肝脏酶学指标比较

表 3 示, 与对照组比较, 模型组 TC、TG、ALT、AST、GGT 水平均明显升高 ($P < 0.05$)。经方组和协定方组 TC、TG、ALT、AST 及 GGT 水平明显低于模型组 ($P < 0.05$); 协定方组 TC、TG、ALT 水平较经方组下降明显 ($P < 0.05$), 而 AST、GGT 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.5 各组大鼠血液流变学水平比较

表 4 示, 与对照组比较, 模型组全血及血浆黏度均明显升高 ($P < 0.05$)。经方组和协定方组的

全血及血浆黏度低于模型组 ($P < 0.05$)。

表 4 各组大鼠血液流变学水平比较 (mpa · s, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	血浆黏度	全血黏度
对照组	5	1.04 ± 0.03	22.96 ± 0.99
模型组	5	1.49 ± 0.08*	37.26 ± 4.33*
经方组	5	1.11 ± 0.03 [△]	25.77 ± 2.32 [△]
协定方组	5	1.09 ± 0.04 [△]	26.02 ± 0.74 [△]

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, [△] $P < 0.05$

3 讨论

我国中医临床普遍采用病证结合的中西医结合研究模式, 病证结合动物模型是中西医结合思路在动物模型创制方面的产物, 分别采用中医传统病因复制中医证候模型, 现代科学病因复制疾病动物模型, 使模型同时具有疾病与证候的特征^[4]。本实验采用高脂饮食、伤湿法、外界声光电刺激等复合因素构建 NAFLD 痰瘀互结证大鼠模型, 结果显示, 该大鼠模型具有以下特点: 1) 体重增长迅速, 形体肥胖, 嗜睡慵懒, 动作迟缓, 活动量减少; 2) 中医舌象分级程度高, 舌泽及舌下络脉紫暗; 3) 肝脏病理脂肪变性程度高, 肝脏炎症重; 4) 血液黏稠度高, 符合 NAFLD 和中医痰瘀互结证表现。

为了进一步证明该模型的中医证候特异性, 采用单方反证法, 选用祛痰、活血之经典方剂 (二陈汤合膈下逐瘀汤) 及协定方 (祛痰活血方) 干预。二陈汤为燥湿化痰的基础方, 方中半夏辛温性燥, 善能燥湿化痰, 且又和胃降逆, 为君药。橘红为臣, 既可理气行滞, 又能燥湿化痰。膈下逐瘀汤为活血逐瘀要方, 方中当归、川芎、赤芍养血活血,

表 2 各组大鼠不同时间舌象评分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	舌泽		舌下络脉	
		造模 1 周	造模 10 周	造模 1 周	造模 10 周
对照组	5	1.4 ± 0.55	0.6 ± 0.55*	2.0 ± 0.00	1.4 ± 0.55*
模型组	5	2.0 ± 0.00 [△]	2.4 ± 0.55* [△]	3.0 ± 0.00 [△]	3.0 ± 0.00 [△]
经方组	5	2.0 ± 0.00 [△]	1.0 ± 0.71* ^{△▲}	2.4 ± 0.55 [▲]	1.8 ± 0.50* [▲]
协定方组	5	2.0 ± 0.00 [△]	1.4 ± 0.55* ^{△▲}	2.2 ± 0.45 [▲]	1.6 ± 0.55* [▲]

注: 与本组造模 1 周比较, * $P < 0.05$; 与对照组同时间比较, [△] $P < 0.05$; 与模型组同时间比较, [▲] $P < 0.05$

表 3 各组大鼠血脂及肝脏酶学指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)	GGT (U/L)
对照组	5	88.24 ± 5.15	67.00 ± 5.40	71.61 ± 5.04	63.04 ± 3.97	61.81 ± 3.00
模型组	5	261.10 ± 8.33*	301.28 ± 8.45*	281.92 ± 7.27*	257.53 ± 3.82*	268.87 ± 3.73*
经方组	5	248.43 ± 5.46 [△]	277.99 ± 5.88 [△]	128.86 ± 8.52 [△]	84.35 ± 3.60 [△]	255.76 ± 5.21 [△]
协定方组	5	236.99 ± 5.68 ^{△▲}	269.19 ± 7.47 ^{△▲}	99.20 ± 3.89 ^{△▲}	81.94 ± 3.90 [△]	256.02 ± 5.29 [△]

注: TC, 总胆固醇; TG, 甘油三酯; ALT, 丙氨酸氨基转移酶; AST, 门冬氨酸氨基转移酶; GGT, 谷氨酰转肽酶; 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, [△] $P < 0.05$; 与经方组比较, [▲] $P < 0.05$

与逐瘀药同用,可使瘀血去而不伤阴血;牡丹皮清热凉血,活血化瘀;桃仁、红花、五灵脂破血逐瘀,以消积块;配香附、乌药、枳壳、延胡索行气止痛,气帅血行,血行逐瘀。二方合用共奏祛瘀逐瘀之用。祛瘀活血方是我们治疗 NAFLD 的协定方,方中姜半夏燥湿化痰,柴胡疏肝行气,共为君药,陈皮、茯苓、山楂健脾行气化痰,泽泻、薏苡仁渗湿泄浊,黄芩、决明子清热除湿,郁金、丹参活血化瘀,诸药合用,渗湿泄浊、运脾疏肝,使瘀浊得化,瘀血得行。从研究结果可以看出,在多种复合因素刺激下,大鼠的舌象评分、血流变指标均出现明显升高,在中药复方干预后均有一定程度改善,与国内报道结果基本一致^[1]。目前病证结合动物模型研究尚不成熟,没有统一的质量标准,国内相关报道较少,因此还需进一步探索和完善。

参考文献

- [1] ZHANG X, WANG Y, LIU P. Omic studies reveal the pathogenic lipid droplet proteins in non-alcoholic fatty liver disease [J]. Protein Cell, 2017, 8(11): 4-13.
- [2] 张光海,汪静,米绍平,等.孙同郊治疗脂肪肝经验 [J]. 泸州医学院学报, 2013, 36(4): 372-373.
- [3] 王昕,张永志,孙跃余. 伤湿所致大白鼠脾阳虚证动物模型及其机理研究 [J]. 辽宁中医杂志, 1995, 22(4): 187-188.
- [4] 王倩,管小琴. 大鼠非酒精性脂肪肝造模方法的改进 [J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(11): 1219-1224.
- [5] VERGNES L, PHAN J, STRAUSS M, et al. Cholesterol and cholate components of an atherogenic diet induce distinct stages of hepatic inflammatory gene expression [J]. J Biol Chem, 2003, 278(44): 42774-42784.
- [6] FU JH, SUN HS, WANG Y, et al. The effects of a fat-and sugar-enriched diet and chronic stress on nonalcoholic fatty liver disease in male wistar rats [J]. Dig Dis Sci, 2010, 55(8): 2227-2236.
- [7] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 33.
- [8] 尹军祥,田金洲,王永炎,等. 血瘀证模型大鼠舌象评价标准研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2007, 30(8): 529-531, 578.
- [9] 范建高,曾民德. 脂肪性肝病 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 147-152.
- [10] 赵志强. 建立中医证候模型的基本方法及其评价 [J]. 南京中医学院学报, 1991, 7(1): 3.
- [11] 任建勋,林成仁,王敏,等. 多因素整合建立气滞血瘀证动物模型研究 [J]. 中药药理与临床, 2007, 23(5): 210-212.

Construction and Evaluation of Rat Model of Nonalcoholic Fatty Liver Disease with Intermingled Phlegm and Blood Stasis Syndrome

ZHU Xiaoning, WANG Jing, ZHENG Ding, ZHANG Yurong, PENG Mengyun, YIN Yue, CHEN Ran
(Chinese Medicine Hospital, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan Province 646000)

ABSTRACT Objective To explore the modeling method of rat model of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) with intermingled phlegm and blood stasis syndrome. **Methods** Twenty Sprague Dawley rats were randomized into a control group, a model group, a classical prescription group, and a proved prescription group, $n=5$ in each group. Rats in all groups except those in the control group were exposed to the damp environment, multiple factors compound stimulation, external chronic mild irritation, and high fat diet for 10 weeks to establish the models of NAFLD with intermingled phlegm and blood stasis syndrome. After 8 weeks of modeling, the classical prescription group and the proved prescription group were given 1 ml/100 g of corresponding herbal medicine by gavage. The control group and the model group were given equivalent normal saline by gavage, once every day, for 2 weeks. At the 1st and 10th week of modeling, tongue manifestation scores (including tongue color and sublingual vessel) in each group were recorded. At the 10th week of modeling, liver hematoxylin and eosin (HE) stain was taken to examine the level of hepatic steatosis. Blood fat and liver enzymology indexes as well as hemorheology indexes including plasma viscosity and whole blood viscosity were detected. **Results** Compared with those in the control group, rats' tongue manifestation scores, liver enzymology indexes, blood fat and hemorheology indexes increased in the model group ($P<0.05$). The sublingual vessel score in the classical prescription group and the proved prescription group were lower, and the levels of blood fat and liver enzymology indexes decreased compared with that in the model group at the same time ($P<0.05$). The levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG) and alanine aminotransferase (ALT) in the proved prescription group were lower than those in the prescription group ($P<0.05$). **Conclusion** The pathology of rat model induced by damp environment, multiple factors compound stimulation, external chronic mild irritation and high fat diet is in accordance with NAFLD, and the model is with Chinese medicine syndrome of intermingled phlegm and blood stasis. After herb-prescription intervention, it is proved by contradiction that model construction is successful. **Keywords** nonalcoholic fatty liver disease; intermingled phlegm and blood stasis syndrome; animal model

(收稿日期: 2017-05-05; 修回日期: 2017-07-21)

编辑: 邓 媛