

· 方药研究 ·

祛湿化痰方改善脂肪肝大鼠游离脂肪酸代谢的机制

李红山^{1,2} 冯 琴¹ 胡义扬¹ 彭景华¹ 顾宏图¹ 许丽莉¹ 刘 成¹

(1. 上海中医药大学附属曙光医院, 上海市高校中医内科学 E-研究院,
上海市浦东新区张衡路528号, 201203; 2. 宁波市传染病医院)

[摘要] **目的** 从“脂联素—游离脂肪酸代谢”路径,探讨祛湿化痰方对实验性脂肪肝游离脂肪酸抑制作用的机理。**方法** 运用单纯高脂饮食诱导大鼠脂肪肝模型,自建模第7周起,21只大鼠被随机分为模型组和祛湿化痰方高、低剂量组,每组7只,灌胃饮水或给药4周。观察肝组织游离脂肪酸(FFA)、甘油三酯(TG)、肝脂肪变性程度、血清脂联素(ADP)、肝组织脂联素受体(Adipo R²)、腺苷酸活化的蛋白激酶(AMPK)、脂肪酸合成酶(FAS)、乙酰辅酶A羧化酶(ACCCase)、丙二酰辅酶A(Malonyl-CoA)含量的变化,并与正常组进行对照。**结果** 与模型组比较,祛湿化痰方高、低剂量组的肝组织TG、FFA含量、FAS、ACCCase和Malonyl-CoA显著降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),而Adipo R²、AMPK、血清ADP含量显著升高,并呈量效关系($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 祛湿化痰方对“脂联素—游离脂肪酸代谢”路径有显著的干预效应,其对脂联素及其受体的作用是该方降低肝组织FFA从而减轻肝脏脂质沉积的重要机理之一。

[关键词] 祛湿化痰方;脂肪肝;脂联素;腺苷酸活化的蛋白激酶;游离脂肪酸

Mechanism of Qushi Huayu Decoction in Improving Metabolism of Free Fatty Acid in Fatty Liver Rats

LI Hongshan^{1,2}, FENG Qin¹, HU Yiyang¹, PENG Jinghua¹, GU Hongtu¹, XU Lili¹, LIU Cheng¹

(1. Shuguang Hospital, Shanghai University of Chinese Medicine, Shanghai 201203; 2. Infectious Disease Hospital of Ningbo City)

ABSTRACT **Objective** To investigate the mechanism of Qushi Huayu Decoction (Decoction for dissolving damp and removing stasis) in inhibiting the experimental free fatty acid expression based on ADP-FFA pathway. **Methods** SD male rats were used to establish fatty liver models by high-fat diet. At the beginning of the seventh week of modeling, 21 rats were randomized into the model group, Qushi Huayu Decoction high-dose and low-dose groups, with 7 in each. They were given water or the decoction of different dosage by gavage for 4 weeks. Changes in triglyceride (TG) and Free Fatty Acid (FFA) in liver tissue, hepatic steatosis, serum adiponectin (ADP), adiponectin receptor 2 (Adipo R²), Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase (AMPK), fatty acid synthase (FAS), Acetyl-Coenzyme A Carboxylase (ACCCase), and malonyl coenzyme A (Malonyl-CoA) in liver tissue were observed, and were compared with those of the normal group. **Results** Compared with the model group, TG and FFA, FAS, ACCCase, and Malonyl-CoA in liver tissue of Qushi Huayu Decoction high-dose and low-dose groups were reduced significantly ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), while the Adipo R² and AMPK in liver tissue and ADP in serum were increased markedly, showing a dose-effect relationship ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Qushi Huayu Decoction has a good effect on the FFA metabolism through the ADP-FFA pathway. Improving serum ADP and hepatic Adipo R² levels significantly is one of its important mechanisms in inhibiting hepatic FFA so as to reduce hepatic lipid deposited.

Key Words Qushi Huayu Decoction (Decoction for dissolving damp and removing stasis); Fatty liver; Adiponectin (ADP); AMP-activated protein kinase (AMPK); Free fatty acid (FFA)

非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)分为单纯性脂肪肝及由其演变的脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)和脂肪性肝硬化3个阶段,近年来,NAFLD患病率呈快速上升趋势^[1-2]。我们既往在临床实践基础上发现,中药复方“祛湿化痰方”有显著的防治实验性脂肪肝的作用,特别是对脂肪肝模型大鼠中显著升高的肝组织游离脂肪

酸(FFA)的抑制作用很强^[3-4],并证实可通过抑制FFA,从而减轻其肝脂毒性^[5-6],但该方降低FFA的作用机理不明。为此,本研究围绕FFA相关代谢机制,从“脂联素—游离脂肪酸代谢”途径角度观察该方影响FFA代谢的主要环节,以期进一步揭示该方防治非酒精性脂肪肝作用的机理。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD雄性大鼠26只,体重150~180g,清洁级,购自中国科学院上海实验动物中心,实验动物许可证号:

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30622635);上海市优秀学科

带头人计划资助项目(06XD14018);上海高校创新团队建设项目

通讯作者:胡义扬,yyhuliver@163.com, (021) 51328500

Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

SCXK (沪) 2003-0002。上海中医药大学实验动物中心清洁级动物房饲养、造模与观察,自由饮水。

1.2 药物与试剂

祛湿化痰方组成:茵陈(安徽)、虎杖(江苏)、田基黄(江西)、姜黄(四川)、生栀子(福建),按5g∶5g∶5g∶5g∶5g重量比例组成。茵陈、虎杖、姜黄单味药醇提,栀子、田基黄单味水提醇沉,再合并配制成0.93g生药/ml和0.465g生药/ml的混悬药液冷藏备用,由上海中医药大学科技中心合作提取。FFA试剂盒(批号:20080110)购自南京建成生物工程公司,甘油三酯(TG)试剂盒(批号:2007110332),温州津玛生物科技有限公司。大鼠血清脂联素(ADP)ELISA检测试剂盒(批号:QRCT-3013321031111EIA/ULT),肝组织脂联素受体(Adipo R2)(批号:QRCT-3013321033221EIA/ULT)、腺苷酸活化的蛋白激酶(AMPK)(批号:QRC-T-3013321030223EIA/ULT)、脂肪酸合成酶(FAS)(批号:QRCT-3013321033311EIA/ULT)、乙酰辅酶A羧化酶(ACCase)(批号:QRCT-3013321031322EIA/ULT)、丙二酰辅酶A(MalonylCoA)(批号:QRCT-3013321030221EIA/ULT)ELISA检测试剂盒均购自美国ADL公司。

1.3 模型制备

采用单纯高脂饮食大鼠模型,模型制备参照文献[4]:以普通饲料加2%胆固醇及10%猪油组成高脂饲料喂养10周。自由饮水。

1.4 动物分组和给药

26只SD雄性大鼠按随机数表法分为正常组大鼠(5只,予正常饲料喂养)和造模大鼠(21只,予高脂饲料喂养)。造模6周后,再按随机数字表将造模大鼠分为模型组、祛湿化痰方高剂量组、祛湿化痰方低剂量组,每组7只。灌胃给药或饮用水,持续4周(高剂量组予0.93g生药/ml的药液1ml/100g鼠重,低剂量组给予0.465g生药/ml的药液1ml/100g鼠重,模型组和正常组给与饮用水1ml/100g鼠重。)

1.5 观测指标和方法

①肝组织甘油三酯(TG)、游离脂肪酸(FFA)含量,酶比色法检测;②肝组织常规HE染色,并依据《非酒精性脂肪性肝病诊疗指南》^[7],判定肝细胞脂肪变性程度(F₀₋₄):F₀,<5%肝细胞脂肪变;F₁,5%~30%肝细胞脂肪变;F₂,31%~50%肝细胞脂肪变性;F₃,51%~75%肝细胞脂肪变;F₄,75%以上肝细胞脂肪变。③血清脂联素(ADP)、肝组织脂联素受体(Adipo R2)、腺苷酸活化的蛋白激酶(AMPK)、脂肪酸合成酶(FAS)、乙酰辅酶A羧化酶(ACCase)、丙二酰辅酶A(Malonyl-CoA)含量,均采用ELISA法检测。

1.6 统计学方法

采用SPSS 12.0软件进行统计学分析。计量资料均以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)形式表示。组间比较采用单因素方差分析LSD检验(最小显著差t检验)。等级资料用Ridit分析。

2 结果

2.1 各组大鼠肝组织病理变化

模型组大鼠均出现不同程度的脂肪变性和空泡样变,变性的肝细胞极度肿胀呈圆形,体积较正常明显增大,胞浆内出现大量脂肪空泡,部分细胞可见细胞核挤向胞膜,可见散在的点状坏死灶,坏死区及少量汇管区有少量炎性细胞浸润。祛湿化痰方高、低剂量组大鼠脂肪变性程度及细胞肿胀明显减轻,胞内脂滴数量减少,体积变小,炎性细胞浸润及坏死灶较模型组少。表1示,模型组脂肪变性程度较正常组显著升高($P<0.01$),祛湿化痰方高剂量组和低剂量组的肝组织脂肪变性程度与模型组相比,差异有统计学意义($P<0.01$)。

表1 各组大鼠肝组织病理HE染色脂肪变性比较

组别	鼠数	脂肪变性程度分级				
		F ₀	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄
正常组	5	5	0	0	0	0
模型组	7	0	0	0	2	5
祛湿化痰方高剂量组	7	0	1	3	3	0
祛湿化痰方低剂量组	7	0	0	2	4	1

2.2 各组大鼠肝组织TG、FFA含量变化

表2示,模型大鼠肝组织TG和FFA含量大幅度升高,分别达正常组的3.2倍和3.5倍,而祛湿化痰方两个剂量组的肝组织TG和FFA含量均显著低于模型组($P<0.01$ 或 $P<0.05$),其中TG含量均值分别为模型组的57.5%,72.5%,FFA含量分别为模型组的48.9%,65.7%。此外,祛湿化痰方高剂量组的TG含量与低剂量组相比,差异有统计学意义($P<0.05$),提示量效关系显著;且祛湿化痰高剂量组的FFA含量与正常组组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 各组大鼠血清ADP、肝组织Adipo R2含量变化

表2示,模型大鼠血清ADP及肝组织Adipo R2水平平均显著较正常组降低($P<0.01$),分别为正常组的56.10%、55.95%,而祛湿化痰方两个剂量组的血清ADP及肝组织Adipo R2含量均显著高于模型组($P<0.01$ 或 $P<0.05$),其中祛湿化痰方高剂量组的血清ADP含量高于低剂量组($P<0.01$),显示了量效关系。

2.4 各组大鼠肝组织AMPK、ACCase、Malonyl-CoA、FAS含量变化

表2示,模型组肝组织AMPK含量较正常组显著降低($P<0.01$),其肝组织ACCase、Malonyl-CoA、

表2 各组大鼠肝组织、血清各项指标比较

组别	鼠数	TG (mg/g)	FFA (nmol/gprot)	血清 ADP (μg/ml)	Adipo R ² (μg/g)	AMPK (ng/g)	ACCCase (μg/g)	Malonyl-CoA (μg/g)	FAS (μg/g)
正常组	5	12.4±4.89**	174±39.9**	38.5±3.16**	16.8±1.74**	1962±195**	653±186**	459±30**	14.9±3.45**
模型组	7	40.1±4.35	601±198.0	21.6±4.72	9.4±2.03	1320±257	1344±271	912±226	30.4±6.79
祛湿化痰方高剂量组	7	23.0±3.44**	294±54.3**	35.8±3.72**	14.4±2.08**	1728±217**	696±194**	535±83**	18.8±5.59**
祛湿化痰方低剂量组	7	29.0±7.01**△	395±37.8*△	28.4±3.78*△△	12.9±3.57*	1665±304*	769±179**	606±103**	21.5±4.41**

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与祛湿化痰方高剂量组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$

FAS 均较正常组显著升高($P<0.01$)。而祛湿化痰方组两个剂量组的肝组织 AMPK 含量显著高于模型组($P<0.01$ 或 $P<0.05$),且肝组织 ACCCase、Malonyl-CoA、FAS 均显著低于模型组($P<0.01$)。

3 讨论

既往研究表明,祛湿化痰方对实验性脂肪肝及其肝组织 FFA 有较高强度的抑制作用^[3-4],本实验结果显示,高剂量组肝组织 TG、FFA 含量均值仅为模型组的57.5%和48.9%。再次证实了该方防治脂肪肝的作用及其对 FAA 的作用特点。

FFA 的异常增多在 NAFLD 的发生发展中起着非常重要的作用。一般认为,导致肝脏 FFA 异常增多的原因包括胰岛素抵抗引起的脂肪组织脂解增多、肝脏合成 FFA 增多、FFA 氧化分解减少,VLDL 合成与分泌障碍等^[8]。有研究表明,脂联素和游离脂肪酸代谢有密切的关系,ADP 与主要表达于肝脏的 Adipo R²结合后,能激活 AMP 激酶,使 ACCase 磷酸化而活性降低,Malonyl-CoA 含量下降,从而减少肝脏脂肪沉积。当出现脂联素水平低下时,可致 FFA 水平增高和肝脏脂肪蓄积。因而有学者提出“脂联素-游离脂肪酸代谢”路径的变化在脂肪肝发病中具有重要意义^[9]。

本实验结果显示,模型大鼠血清 ADP 水平较正常组显著降低,呈明显的低脂联素血症。而祛湿化痰方干预后其血清 ADP 和 Adipo R²含量显著升高,表明祛湿化痰方能显著改善脂肪肝大鼠低脂联素血症。同时实验也观察到,祛湿化痰方对该模型组中显著降低的肝组织腺苷酸活化激酶含量以及明显升高的肝组织 FAS、ACCCase、Malonyl-CoA 含量等下游变化。由此可见,祛湿化痰方对“脂联素-游离脂肪酸代谢”路径有显著的干预效应。

目前中医临床实践认为,脂肪性肝病的病理基础与痰、湿、瘀、积有关。痰瘀互结是脂肪肝的基本病机^[10]。祛湿化痰方源于临床实践经验,方中茵陈性味苦、辛、微寒,清利肝胆湿热;虎杖、田基黄均有清热利湿、活血散瘀功效;姜黄活血行气,其味辛、苦,性温,偏入肝经血分,破血兼理血中气滞,善破肝、脾二经的血

瘀气结;栀子以助清化湿热、凉血解毒。全方共奏祛痰湿化痰积之功效。本实验药效学结果从以方测证角度也为脂肪肝“痰湿瘀结”理论再次提供了支持。但其病机理论与其病理机制的关系内涵尚难以揭示。

总之,本实验研究表明,祛湿化痰方对脂联素及其受体的作用是该方降低肝组织 FFA 从而减轻肝脏脂质沉积的重要机理之一。其关键靶位和作用的物质基础有待进一步探索。

参考文献

[1] Seidell JC. Obesity, insulin resistance and diabetes: a worldwide epidemic[J]. Br J Nutr, 2000, 83(Suppl):5-8.
[2] 范建高,朱军,李新建,等.上海市成人脂肪肝患病率及其危险因素流行病学调查[J].中华肝脏病杂志,2005,13(2):83-87.
[3] 张慧,冯琴,胡义扬,等.祛湿化痰方对 CCl₄ 复合高脂低蛋白饮食诱导的大鼠脂肪肝的防治作用[J].上海中医药杂志,2006,40(3):52-55.
[4] 冯琴,张慧,胡义扬,等.祛湿化痰方对单纯高脂饮食诱导的大鼠脂肪肝的防治作用[J].中西医结合肝病杂志,2006,16(1):26-29.
[5] 张慧,冯琴,李红山,等.祛湿化痰方对非酒精性脂肪性肝炎大鼠组织蛋白酶 B 和肿瘤坏死因子 α 表达的影响[J].中西医结合学报,2008,6(9):928-933.
[6] 张慧,胡义扬,冯琴,等.祛湿化痰方对游离脂肪酸诱导的 HepG₂ 细胞脂肪沉积和 TNF-α 分泌的抑制作用[J].中国中西医结合杂志,2007,27(12):1107-1111.
[7] 中华医学会肝病学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[J].中华肝脏病杂志,2006,14(3):161-163.
[8] 徐正婕,范建高,王国良.游离脂肪酸在脂肪性肝炎发病中的作用[J].中华肝脏病杂志,2000,8(2):127-128.
[9] You M, Considine RV, Leone TC, et al. Role of adiponectin in the protective action of dietary saturated fat against alcoholic fatty liver in mice[J]. Hepatology, 2005, 42(3):568-577.
[10] 李少东,李红山,冯琴,等.脂肪肝中医证型分类的文献分析[J].中西医结合肝病杂志,2006,16(4):255-256.