

柴胡疏肝散对代谢综合征大鼠肝 X 受体的影响

夏晓莉 罗思聪 刘淑玲 赵 帅 胡晓琴 陈伯钧*

(广州中医药大学第二临床医学院, 广东省广州市越秀区大德路 111 号, 510120)

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(7004839)

* 通讯作者: gzcbj@163.com, (020)39318103

[摘要] 目的 研究肝 X 受体(LXR_s)在代谢综合征(MS)大鼠模型中的表达及柴胡疏肝散的干预作用。方法 采用高脂饲料喂养自发性高血压大鼠造成 MS 模型, 将 12 只 MS 模型大鼠随机分为 MS 组和中药 1 组各 6 只。另选 MS 造模成功的大鼠采用束缚刺激造成 MS 肝气郁结证模型, 将 16 只 MS 肝气郁结证造模成功大鼠随机分为 MS 肝气郁结证组和中药 2 组各 8 只。MS 组和 MS 肝气郁结证组给予生理盐水灌胃, 中药 1 组和中药 2 组给予柴胡疏肝散灌胃, 各组造模结束后大鼠均按 1ml/100g 灌胃, 每日 1 次, 连续 3 周。检测各组大鼠空腹血糖、血脂[包括甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)]; 并开腹取大鼠的肝脏组织, 行免疫组织化学染色, 光镜下观察大鼠肝脏组织中 LXR_s 的表达情况。结果 MS 组与中药 1 组比较, 空腹血糖、TG、TC、HDL-C 差异有统计学意义($P < 0.05$); MS 肝气郁结组与中药 2 组比较, 空腹血糖、TG、TC、HDL-C 差异有统计学意义($P < 0.05$)。MS 组、MS 肝气郁结证组肝脏免疫组化染色均计 9 分为强阳性(+++), 中药 1 组计 2 分为弱阳性(+), 中药 2 组计 3 分为弱阳性(+)。结论 MS 大鼠肝组织存在 LXR_s 的高表达, 柴胡疏肝散可降低 MS 模型大鼠 LXR_s 的表达, 其可能是治疗 MS 机理之一。

[关键词] 代谢综合征; 肝 X 受体; 柴胡疏肝散; 肝气郁结证

Effect of Chaihu Shugan Powder on the Liver X-Receptors of Metabolic Syndrome Rats

XIA Xiaoli, LUO Sicong, LIU Shuling, ZHAO Shuai, HU Xiaoqin, CHEN Bojun

(The Second Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangdong Province 510120)

ABSTRACT **Objective** To study the expression of liver X-receptors (LXR_s) in metabolic syndrome (MS) rats and the intervention effect of Chaihu Shugan Powder (Bupleurum Liver-Coursing Powder). **Methods** Twelve MS model rats were randomized into the MS group and Chinese medicinal group (No. 1 Chinese medicinal group), with 6 in each. Sixteen MS model rats with liver qi stagnation pattern (LQSP) were randomized into the MS LQSP group and MS LQSP Chinese medicinal group (No. 2 Chinese medicinal group), with 8 in each. The MS group and MS LQSP group were gavaged with normal saline. The No. 1 Chinese medicinal group and No. 2 Chinese medicinal group were gavaged with Chaihu Shugan Powder. After the modeling, each group was gavaged with 1ml/100g of corresponding drug once daily for 3 weeks. The levels of fasting blood glucose (FBG), triglycerides (TG), total cholesterol (TC), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) in each group were detected. The rat liver tissue was removed by laparotomy and was conducted immunohistochemical staining. The light microscopy was used to observe the expression of LXR_s in rat liver tissue. **Results** There were significant differences between the MS group and No. 1 Chinese medicinal group in the levels of FBG, TG, TC and HDL-C ($P < 0.05$). There were significant differences between the MS LQSP group and No. 2 Chinese medicinal group in the levels of FBG, TG, TC and HDL-C ($P < 0.05$). The immunohistochemical staining score was 9 in the MS group with strongly positive (+++), 2 in the No. 1 Chinese medicinal group with weekly positive (+), 9 in the MS LQSP group with strongly positive (+++), and 3 in the No. 2 Chinese medicinal group with weekly positive (+). **Conclusion** Chaihu Shugan Powder can decrease the high expression of LXR_s in the MS rat liver tissue, which may be one of the mechanisms in treating MS.

Keywords metabolic syndrome; liver X-receptors; Chaihu Shugan Powder (Bupleurum Liver-Coursing Powder)

肝 X 受体(LXR_s)作为一种氧化固醇激活的核受体, 参与机体多种生理活动的调节, 包括胆固醇的代谢和转运、脂肪的形成、糖原异生和炎症等过程^[1]。近期研究发现, 在非乙醇性脂肪肝动物模型中随着病变程度的加重, LXR_s 的表达逐渐增多^[2]。本研究探讨柴胡疏肝散对代谢综合征(MS)模型大

鼠 LXR_s 表达的影响, 为 MS 的治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 动物

健康 SPF 级刚离乳(4 周龄)的自发性高血压大鼠 61 只, 雄性, 体重 60~70 g, 北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 动物合格证号: 0129843。

1.2 实验药物

柴胡疏肝散组成:柴胡 120 g,枳壳 100 g,白芍 100 g,川芎 100 g,炙甘草 60 g,香附 100 g,陈皮 120 g。以上药材均由广东省中医院中药房提供,经高级药剂师鉴定均为纯正药材。上述药物按成年人 70 kg 体重剂量的 4 倍水煎浓缩至含生药 1.24 g/ml,高压灭菌,4℃ 冰箱保存备用。

1.3 实验仪器

电子秤(广东省中医院实验动物中心提供)、RBP-1 鼠尾动脉血压测定仪(广州中医药大学第一附属医院实验动物中心提供)、日立-7180 型生化分析仪(广东省中医院提供)。

1.4 造模方法

大鼠给予高脂饲料喂养,高脂饲料配方为普通饲料 55%,猪油 12%,蔗糖 5%,奶粉 8%,花生 5%,蛋黄粉 10%,麻油 3%,食盐 2%。普通饲料和高脂饲料均由广东省医学实验动物中心加工,其中高脂饲料经钴 60 照射,真空包装。14 周后大鼠的体重、腹围、血压、空腹血糖、血脂升高达到文献[3-5]标准为 MS 造模成功。

参照文献[6-8],将 MS 大鼠分别钻进束缚筒(广东省中医院实验动物中心提供)并调整好适当的活动空间,平架木板上开始造模。每次束缚 30 min,每隔 1 h 束缚 1 次,每天束缚 4 次。20 天后大鼠出现反应迟钝,行为迟缓且明显减少,甚至于铁笼内长时间蜷伏不动,对外界声音刺激无警觉性反应,对外来刺激呈躲避态,背毛稀疏且枯黄无泽,眼睛眯小、有眼屎,尾干、覆有棕色鳞片,粪干或溏薄松软,呈细段状,形体瘦小,体重减轻即成功建立 MS 肝气郁结证大鼠模型。

1.5 动物分组及给药

将 12 只造模成功的 MS 大鼠采用 SPSS 13.0 软件生成的随机数字表分为 MS 组和中药 1 组各 6 只,将 16 只造模成功的 MS 肝气郁结证大鼠采用随机数字表分为 MS 肝气郁结证组和中药 2 组各 8

只。MS 组和 MS 肝气郁结证组给予生理盐水灌胃,中药 1 组和中药 2 组给予柴胡疏肝散灌胃,各组造模结束后大鼠均按 1 ml/100 g 灌胃,每日 1 次,连续灌胃给药 3 周。

1.6 观察指标及方法

3 周后麻醉大鼠,腹主动脉采血检测各组大鼠空腹血糖、血脂,包括甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C);并开腹取大鼠的肝脏组织,用 10% 甲醛固定液固定,石蜡包埋,制成 3 μm 厚的切片后行免疫组织化学染色,光镜下观察大鼠肝脏组织中 LXR α 的表达情况。

1.7 免疫组织化学染色结果判断

参照文献[9]标准,细胞浆内出现棕黄色细颗粒状反应为阳性,以检测部分无反应为阴性。根据显色强度和阳性细胞数两项指标判断阳性等级。显色强度分为无色、淡黄、黄色、棕黄色,分别计为 0、1、2、3 分;阳性细胞占同类细胞的比例分为 0、<1/3、1/3~2/3、>2/3,分别计为 0、1、2、3 分。将两项积分相乘,确定 0 分为阴性(-),1~3 分为弱阳性(+),4~6 分为中等阳性(++),7~9 分为强阳性(+++)。

1.8 统计学方法

应用 SPSS 13.0 统计软件统计处理,计量资料以均数±标准差表示,组间比较采用 *t* 检验,等级资料采用卡方检验。

2 结果

2.1 各组大鼠空腹血糖和血脂比较

表 1 示,MS 组与中药 1 组比较,空腹血糖、TG、TC、HDL-C 差异有统计学意义($P<0.05$);MS 肝气郁结证组与中药 2 组比较,空腹血糖、TG、TC、HDL-C 差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 各组大鼠 LXR α 表达情况比较

表 2 示,MS 组大鼠肝脏免疫组织化学染色表现为细胞浆内出现棕黄色细颗粒状反应,且阳性细

表 1 各组大鼠空腹血糖及血脂比较(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	空腹血糖	TG	TC	HDL-C	LDL-C
MS 组	6	5.67±0.88	1.13±0.06	1.13±0.11	0.60±0.04	0.16±0.04
中药 1 组	6	4.61±0.31*	0.94±0.10*	0.96±0.08*	0.74±0.13*	0.16±0.04
MS 肝气郁结证组	8	8.34±2.80	1.35±0.16	1.37±0.24	0.48±0.11	0.16±0.02
中药 2 组	8	5.88±1.21 Δ	1.11±0.20 Δ	1.12±0.12 Δ	0.67±0.15 Δ	0.15±0.03

注:与 MS 组比较,* $P<0.05$;与 MS 肝气郁结证组比较, $\Delta P<0.05$

胞占同类细胞的比例大于 $2/3$, 根据显色强度和阳性细胞数两项指标共计得 9 分, 故判断为强阳性(+++)。中药 1 组肝脏免疫组织化学染色表现为细胞浆内出现黄色细颗粒状反应, 且阳性细胞占同类细胞的比例小于 $1/3$, 根据显色强度和阳性细胞数两项指标共计得 2 分, 故判断为弱阳性(+). MS 肝气郁结证组肝脏免疫组织化学染色表现为细胞浆内出现棕黄色细颗粒状反应, 且阳性细胞占同类细胞的比例大于 $2/3$, 根据显色强度和阳性细胞数两项指标共计得 9 分, 故判断为强阳性(+++)。中药 2 组肝脏免疫组织化学染色表现为细胞浆内出现棕黄色细颗粒状反应, 阳性细胞占同类细胞的比例小于 $1/3$, 根据显色强度和阳性细胞数两项指标共计得 3 分, 故判断为弱阳性(+).

表 2 各组大鼠肝 X 受体表达情况比较(分)

组别	鼠数	显色强度	阳性细胞数	总分
MS 组	6	3	3	9
中药 1 组	6	2	1	2
MS 肝气郁结证组	8	3	3	9
中药 2 组	8	3	1	3

3 讨论

自发性高血压大鼠是当前国际上公认的最接近人类原发性高血压病的动物模型^[10], 它的最大优点是完全在自然条件下发病, 其病理生理改变与人类原发性高血压病很相似。利用自发性高血压大鼠结合环境因素诱导, 可以建立一种在最大程度上模拟人类的 MS 各个组分的动物模型, 为更好地开展针对 MS 的实验研究提供了有利条件。

MS 属中医学“肥胖”、“眩晕”、“湿阻”等范畴。中医学认为, 六郁(食、气、血、热、痰、湿)作用于脾胃而酿成痰、瘀、浊、脂等病理产物, 以食郁为主导的六郁是 MS 的发病基础^[11]; 以肝脾功能失调为核心的代谢功能紊乱是其基本病机。患者临床表现为虚实夹杂, 心、肝、脾、肾是主要累及的脏腑。当机体气化功能失常时, 特别是肝脾功能失调, 多导致气机紊乱, 就会发生代谢异常。若饮食不节, 嗜食肥甘、膏粱厚味等, 损伤脾胃; 或情志失调使肝失疏泄; 或中年以后脏腑渐虚复因饮食所伤导致脾失运化, 肝失条达, 水谷精微无以正化, 精液输布、代谢减弱, 液从浊化, 凝聚成痰, 酿成脂膏。肝郁脾虚, 痰浊内盛, 浸淫脉道, 血行不畅而成瘀, 气滞血瘀, 痰瘀互结, 导致气机升降失常, 气化功能紊乱, 又进一步加重肝脾功能异常及各脏腑间的功能失常, 发生一系列病理变

化, 所以代谢异常应充分考虑与肝的气机气化有密切关系。柴胡疏肝散出自《医学统旨》, 功能疏肝解郁、行气止痛, 主治肝郁气滞证, 为疏肝理气之代表方剂。

LXRs 是机体保持胆固醇相对稳定的关键感受器^[12], 可被胆固醇的氧化衍生物激活^[13]。LXRs 通过调节胆固醇的输出、胆汁酸的产生、脂肪酸的合成及几种脂质转运蛋白从而调控脂质的动态平衡^[14]。研究表明, LXRs 可通过促进胰岛素分泌, 改善胰岛素敏感性及减少肝糖合成等多个环节调节体内血糖代谢^[2]。有研究又表明 LXR 可通过下调 11β -羟化甾醇脱氢酶-1 (11β -HSD-1) 的表达, 减少无活性的皮质类固醇向有生物活性的皮质类固醇转化, 从而减轻内脏肥胖和胰岛素抵抗^[15]。本研究发现, 在 MS 肝气郁结证大鼠和单纯 MS 大鼠中均存在着 LXRs 的高表达现象, 进一步证实了 LXRs 广泛参与了包括脂质代谢紊乱、2 型糖尿病及动脉粥样硬化等多种疾病在内的 MS 的发生与发展。两组在采用柴胡疏肝散治疗后, 空腹血糖、TG、TC、HDL-C 均有明显改善 ($P < 0.05$), LXRs 的表达也明显降低, 从而为柴胡疏肝散可阻断或者减慢 MS 的进一步发展提供了有力的依据。

参考文献

- [1] Houck KA, Borchert KM, Hepler CD, et al. T0901317 is a dual LXR/FXR agonist[J]. Mol Genet Metab, 2004, 83(1-2):184-187.
- [2] 陈洁, 林志辉. 肝 X 受体在非乙醇性脂肪肝中作用的研究[J]. 医学综述, 2008, 14(6):859-861.
- [3] 刘庆春, 刘响辉, 杜金赞, 等. 短期内建立营养性肥胖动物模型的实验研究[J]. 武警医学, 2004, 15(5):371-372.
- [4] 葛可佑. 肥胖的研究方法[M]. 北京: 北京人民卫生出版社, 2004:871-880.
- [5] 薛晚利, 周玲, 李选社, 等. 丙一聚胶囊对营养性肥胖大鼠的减肥作用[J]. 西安交通大学学报, 2002, 23(6):544-546.
- [6] 郝世凤, 张小霞, 许晓波. 肝郁动物造模方法及病理改变[J]. 辽宁中医学院学报, 2004, 6(1):20-21.
- [7] 任路, 李浩. 关于肝郁证动物模型研究现状及存在问题的思考[J]. 中医药学报, 2006, 34(4):44-46.
- [8] 吴相春, 吴以岭. 气郁证动物模型研究进展[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(1):23-25.
- [9] Gatalica Z, Ide SM, Rampy BA, et al. The expression of Fhl1 protein is related inversely to disease progression in patient with breast carcinoma[J]. Cancer, 2000, 88(6):1378-1383.

(下转第 1411 页)

容作为治疗靶点的观察项目,作为决定是否停止通腑导滞治疗的依据。同时也说明临床上针对 SAP 患者采取早期、全程中药通腑导滞治疗的重要性^[15]。

本实验中,模型组、早期组在 24 h、48 h 时胰腺坏死加重,而 TNF- α 浓度与全程组、生长抑素组无明显差异,与人体 SAP 病程中二次打击,继发感染,再次释放炎性介质不一致。另外,全程组 6 h 时 TNF- α 浓度、48 h 时 AMY 浓度、24 h 与 48 h 胰腺病理评分高于生长抑素组,这可能与生长抑素治疗 SAP 的机制有关,生长抑素主要通过抑制胰酶分泌而减少胰酶的消化作用,抑制血小板活化因子的释放,减少毛细血管外渗来治疗 SAP^[16];而在小肠病理损伤、肠系膜细菌移位阳性率、死亡率上全程组较生长抑素组显示出了一定的优势,也提示全程应用大承气汤加味方在恢复肠道功能、防止肠功能衰竭、抑制细菌移位、防止继发感染等方面具有一定优势。有文献报道生长抑素也具有改善肠动力、促进肠蠕动及排空、恢复肠功能的作用,但其效果不及大承气汤通腑导滞好^[17-18]。提示临床上针对 SAP 采用联合的治疗措施具有重要意义。

参考文献

- [1] Miskomtz P. Score of multiple organ dysfunction in patients with severe acute pancreatitis[J]. Crit Care Med, 2002,30(6):1301-1305.
- [2] Hartwig W, Maksan SM, Foitzik T, et al. Reduction in mortality with delayed surgical therapy of severe pancreatitis[J]. J Gastrointest Surg, 2002,6(3):481-487.
- [3] Cicalese L, Sahai A, Sileri P. Acute pancreatitis and bacterial translocation [J]. Dig Dis Sci, 2001, 46(5): 1127-1132.
- [4] 苗彬, 崔乃强, 李忠廉, 等. 早期通里攻下法对重症急性胰腺炎结局影响的系统评价[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(10):1042-1047.
- [5] 张明钧, 姚玮艳, 乔敏敏, 等. 肠壁穿刺逆行胰胆管注射牛黄胆酸钠重症急性胰腺炎造模[J]. 上海交通大学学报,

2006,26(5):488-490.

- [6] Schmidt J, Lewandrowsi K, Warsaw AL, et al. Morphometric characteristics and homogeneity of a new model of acute pancreatitis in the rat[J]. Int J pancreatol, 1992, 12(1):41-51.
- [7] Chiu CJ, Mardle AH, Brown R, et al. Intestinal mucosal lesion in low-flow state[J]. Arch surgery, 1970, 101(4): 478-483.
- [8] 赵喜荣, 刘晓晨, 豆发福, 等. 重症急性胰腺炎早期非手术治疗探讨[J]. 肝胆外科杂志, 2011, 19(4):286-287.
- [9] 许辅端, 宪群. 联合大陷胸汤多途径治疗重症急性胰腺炎 20 例报告[J]. 贵阳中医学院学报, 2010, 32(2):55-56.
- [10] 马志杭. 大承气汤加味辅助治疗重症急性胰腺炎 50 例[J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 15(7):74.
- [11] 贾利辉, 郝景坤, 陈琳, 等. 大承气汤加味灌肠治疗重症急性胰腺炎 38 例[J]. 辽宁中医杂志, 2006, 33(12): 1600.
- [12] 王幼黎, 陈文寿, 王建华, 等. 通里攻下法在重症急性胰腺炎治疗中的作用[J]. 现代中西医结合杂志, 2002, 11(13):1197-1198.
- [13] 陈海龙, 吴成中, 关凤林, 等. 大承气汤对肠道细菌微生态学影响的实验研究[J]. 中国微生态学杂志, 2007, 19(2):132-134.
- [14] Yasuda T, Takeyama Y, Ueda T, et al. Breakdown of intestinal mucosa via accelerated apoptosis increases intestinal permeability in experimental severe acute pancreatitis[J]. J Surg Res, 2006, 135(1):18-26.
- [15] 钦丹萍. 西医疾病开展中医药治疗的若干思考[J]. 浙江中医药大学学报, 2010, 34(5):639-640.
- [16] 徐爱平, 李淑德. 重症急性胰腺炎治疗研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(3):213-216.
- [17] 卢义军. 急性胰腺炎治疗过程中生长抑素对胃肠动力影响的临床观察[J]. 临床消化病杂志, 2011, 23(1):57-64.
- [18] 邓群, 吴承堂, 黎沾良, 等. 急性坏死性胰腺炎并发感染防治方法的实验研究[J]. 中华外科杂志, 2000, 38(8): 625-629.

(收稿日期:2012-10-02;修回日期:2013-05-02)

[编辑:洪 涛]

(上接第 1406 页)

- [10] Pravenec M, Zidek V, Landa V, et al. Genetic analysis of cardiovascular risk factor clustering in spontaneous hypertension[J]. Folia Biol(Praha), 2000, 46(6):233-240.
- [11] 丁国锋, 李志, 刘同刚. MS 的中西医结合防治[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(1):240.
- [12] 许锋, 关瑞锦. 肝 X 受体与胆固醇稳态[J]. 当代医学, 2009, 15(13):22-23.
- [13] 李婧, 孙莹璞. 肝 X 受体在脂肪生成和脂肪细胞形成中的作用[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2010, 29

(2):92-94.

- [14] Schuster GU, Parini P, Wang L, et al. Accumulation of foam cells in liver X receptor-deficient mice[J]. Circulation, 2002, 106(9):1147-1153.
- [15] Wu J, Zhang Y, Wang N, et al. Liver X receptor- α mediates cholesterol efflux in glomerular mesangial cells [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2004, 287(5): 886-895.

(收稿日期:2012-12-05;修回日期:2013-07-02)

[编辑:邓 媛]