

doi:10.3969/j.issn.1671-038X.2015.07.01

苍菊清肝降脂方对大鼠脂肪肝保护作用的研究

侯天禄^{1,2}, 成 扬¹, 陈建杰²

(¹上海市浦东新区传染病医院 肝病科,上海 201299;

²上海中医药大学附属曙光医院 肝病科,上海 201203)

摘要:[目的]研究苍菊清肝降脂方对大鼠脂肪肝的保护作用。[方法]雄性 Wistar 大鼠 40 只,随机分正常组、模型组、低剂量组、高剂量组。模型组、低剂量和高剂量组以 40%CCl₄ 橄榄油溶液 1 ml/kg 体质量腹腔注射,2 次/周,共 4 周。模型组、低剂量和高剂量组在第 1、2 周给予高脂低蛋白饲料,第 3、4 周予纯玉米粉饲料。自造模之日起,按照 1 ml/100 g 大鼠体重给予低剂量和高剂量中药灌胃。实验结束后大鼠经下腔静脉采血并分离血清,统一于肝脏左叶切取组织,于 10%中性福尔马林固定。检测血清 ALT、AST、GGT 活性,肝组织行 HE 染色。[结果]模型组大鼠血清 ALT、AST 和 GGT 均较正常组显著增高($P<0.01$);经苍菊清肝降脂方中药干预,ALT、AST 和 GGT 均显著下降($P<0.05$),其中高剂量组 ALT 和 AST 下降幅度均优于低剂量组($P<0.05$),而低剂量组和高剂量组 GGT 下降幅度无统计学意义($P>0.05$)。HE 染色可见模型组大鼠小叶结构紊乱,肝细胞胞质疏松,肝细胞变性,胞浆内见大量脂肪空泡。苍菊清肝降脂方干预组可见大鼠肝细胞损伤及脂肪变性程度明显减轻,肝小叶结构比较清晰,肝细胞胞浆内脂肪空泡与模型组相比有显著差异,尤其以高剂量组改善程度更为明显。[结论]苍菊清肝降脂方对大鼠脂肪肝具有良好的保护作用。

关键词:苍菊清肝降脂方;脂肪肝;大鼠

中图分类号:R575.5

文献标志码:A

文章编号:1671-038X(2015)07-0449-04

Effect of Cangju Qinggan Jiangzhi recipe on fatty liver in rats

HOU Tian-lu^{1,2}, CHENG Yang¹, CHEN Jian-jie²

(¹Department of Liver Disease, Shanghai Infectious Disease Hospital of Pudong District, Shanghai 201299, China; ²Department of Liver Disease, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

Corresponding author: CHEN Jian-jie, E-mail: jianjie-chen@hotmail.com

Abstract: [Objective] To study the protective effect of Cangju Qinggan Jiangzhi recipe on rats with fatty liver. [Methods] Forty male Wistar rats were randomly divided into normal, model, low-dose and high-dose group. Rats in model, low-dose and high-dose group were intraperitoneal injected with 40% CCl₄ olive oil solution by 1 ml/kg body weight, 2 times/week for 4 weeks. Rats in model, low-dose and high-dose group were given high-fat and low-protein diet during the first 2 weeks, and pure corn diet during the rest weeks. From the beginning of experiment, Cangju Qinggan Jiangzhi recipe was given orally by 1 ml/100 g body weight with low-and high-dose. At the end of experiment, blood was collected through inferior vena cava and sera were separated. Rat liver left lobe was collected and fixed in 10% neutral formalin. Serum ALT, AST, GGT activity were determined, liver tissue were stained with HE. [Results] Serum ALT, AST and GGT in model group were significantly higher than in control group ($P<0.01$). ALT, AST and GGT in intervention groups were significantly decreased ($P<0.05$); ALT and AST in the high dose group decrease were better than in the low dose group ($P<0.05$), while GGT was not statistically significant ($P>$

收稿日期:2015-01-29

基金项目:上海市浦东新区科委基金(No:PKJ2014-Y37),上海市中医药三年行动计划(No:ZY3-JSFC-1-1011),陈建杰上海市名中医工作室(No:ZYSNXD-CC-MZY003)

作者简介:侯天禄,男,硕士,住院医师

通讯作者:陈建杰, E-mail: jianjie-chen@hotmail.com

0.05)。In model group, HE staining showed that lobular structure disorder, hepatic cells cytoplasm rarefaction, degeneration of liver cells, fat vacuoles in cytoplasm. In intervention groups, the damage in rat liver cells and fatty degeneration significantly reduced, the structure of hepatic lobules was clear, the cytoplasm of liver cells of fat vacuoles compared with the model group had significant differences, improved more obviously especially in the high dose group. [Conclusion] Cangju Qinggan Jiangzhi recipe has good protective effect on fatty liver in rats.

Key words: Cangju Qinggan Jiangzhi recipe; fatty liver; rats

非酒精性脂肪肝(Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一种胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)和遗传易感性相关的代谢应激性肝损伤,疾病谱包括非酒精性单纯性脂肪肝(Non-alcoholic fatty liver, NAFL)、非酒精性脂肪性肝炎(Non-alcoholic steatohepatitis, NASH)及其相关肝硬化。有报道显示,在单纯性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎及肝硬化中,NAFLD的遗传度约为39%,呈家族性聚集形式。同时随着肥胖及其相关代谢紊乱起病渐趋低龄化,并且程度日益加剧,NAFLD对肝脏健康的影响变得越来越严重^[1-3]。

由于脂肪肝发病机制十分复杂,导致现代医学对其治疗缺少有效药物,目前治疗以控制原发病,对症治疗为主。随着中医在理论研究和临床研究方面的不断深入,作为NAFLD的药物治疗途径之一,中医药对NAFLD的防治具有一定的优势^[4]。苍菊清肝降脂方系上海浦东新区传染病医院院内协定方,用于治疗NAFLD患者取得了较好疗效。为阐明该方的作用,本研究采四氯化碳联合高脂低蛋白饮食诱导大鼠脂肪肝模型,使用该方进行干预,以探讨该方的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物:Wistar大鼠40只,雄性,SPF级,体重(170±10)克,上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供,许可证号:SCXR(沪):2008-0016。饲养于上海中医药大学实验动物中心。

药物和主要试剂:苍菊清肝降脂方,根据课题组拥有的国家发明专利进行制备^[5]。

分析纯CCl₄和化学纯橄榄油,购自中国医药集团上海化学试剂公司。丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、谷氨酰转肽酶(GGT)检测试剂盒,购自南京建成生物工程研究所。

1.2 方法

1.2.1 模型制备 大鼠适应性喂养1周后,按体重分层随机法分正常组(10只)、模型组(10只)、低剂量组(10只)、高剂量组(10只)。模型组、低剂量和

高剂量组以40%CCl₄橄榄油溶液1 ml/kg大鼠体重腹腔注射,2次/周,共4周。正常组大鼠予相同时间、相同部位注射等量生理盐水。

模型组、低剂量和高剂量组在第1、2周给予高脂低蛋白饲料(79.5%玉米粉、20%猪油、0.5%胆固醇),第3、4周予纯玉米粉饲料,自由饮水。普通饲料、高脂低蛋白饲料、纯玉米粉饲料均由上海中医药大学动物房提供。正常组常规饮食,自由饮水。

1.2.2 给药方法 按照临床人体用量8倍和16倍,分别设定低剂量组和高剂量组。自造模之日起,按照1 ml/100 g大鼠体重给予低剂量和高剂量中药灌胃。正常组与模型组按1 ml/100 g大鼠体重给予生理盐水灌胃。

1.3 观察指标

标本采集:实验结束后大鼠禁食不禁水24 h,用3%戊巴比妥钠2 ml/kg体重的剂量腹腔注射,麻醉后的大鼠打开腹腔,然后用10 ml注射器经下腔静脉采血,4℃下静置3 h后,3 000 rpm/min,离心15 min,取上清分装于1.5 ml离心管,-70℃低温保存待测。摘下肝脏,统一于肝脏左叶切取1.0 cm×1.0 cm×0.3 cm肝组织2块,分别于10%中性福尔马林固定和O.C.T包埋。余下肝组织-70℃低温保存。

肝组织苏木精-伊红染色:10%中性甲醛溶液固定的肝脏组织修整后于脱水机中脱水,后于自动石蜡包埋机中包埋,4℃保存,切片厚度为4 μm,进行常规苏木精-伊红染色^[5]。

血清肝脏生化功能:根据试剂盒提供的实验方案,检测血清ALT、AST、GGT活性。

1.4 统计学处理

采用SPSS 17.0软件统计系统进行统计处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用ANOVA程序进行单因素方差分析,并用LSD程序进行两两比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

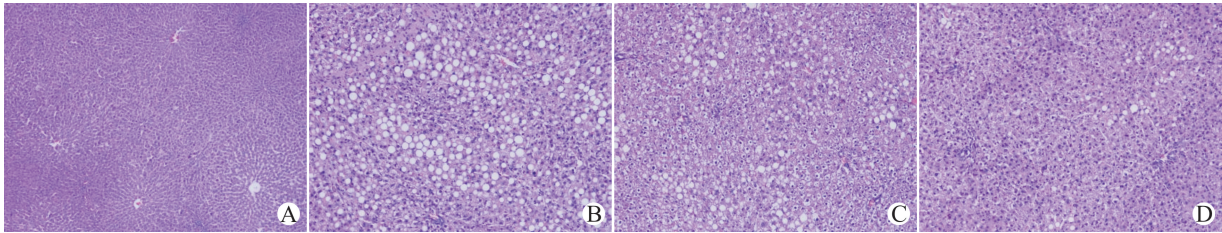
2 结果

2.1 各组大鼠肝脏病理改变

显微镜下观察,苏木精-伊红染色可见正常组大鼠肝组织结构完整,肝细胞以中央静脉为中心呈放

射状排列,肝窦结构清晰,肝细胞形态正常。模型组大鼠小叶结构紊乱,肝细胞胞质疏松,肝细胞变性,胞浆内见大量脂肪空泡。苍菊清肝降脂方干预组可见大鼠肝细胞损伤及脂肪变性程度明显减轻,肝小

叶结构比较清晰,肝细胞胞浆内脂肪空泡与模型组相比有显著差异,尤其以高剂量组改善程度更为明显(见图1)。



A:正常组;B:模型组;C:低剂量组;D:高剂量组。

图1 各组大鼠肝组织病理变化(苏木精-伊红染色×200)

2.2 各组大鼠血清肝功能变化

模型组大鼠血清肝功能指标 ALT、AST 和 GGT 均较正常组显著增高($P<0.01$);经苍菊清肝降脂方中药干预,ALT、AST 和 GGT 均显著下降($P<0.05$),其中苍菊清肝降脂方高剂量组 ALT 和 AST 下降幅度均优于低剂量组($P<0.05$),而低剂量组和高剂量组 GGT 下降幅度无统计学意义($P>0.05$)(见表1)。

表1 各组大鼠血清肝功能的变化 U/L, $\bar{x}\pm s$				
组别	例数	ALT	AST	GGT
正常组	10	47±9	126±11	6±1.5
模型组	10	172±37 ¹⁾	295±43 ¹⁾	58±5.3 ¹⁾
低剂量组	10	93±19 ²⁾	186±37 ²⁾	42±4.3 ²⁾
高剂量组	10	64±10 ³⁾⁴⁾	154±16 ³⁾⁴⁾	38±2.9 ³⁾

与正常组比较,¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较,²⁾ $P<0.05$,
³⁾ $P<0.01$;与低剂量组比较,⁴⁾ $P<0.05$ 。

3 讨论

在 NAFLD 漫长病程中,NASH 为 NAFL 发生肝硬化的限速步骤。现有的动态肝活检资料和队列研究显示,NAFLD 自然转归主要取决于其肝脏组织学类型。NAFL 患者肝病常呈静止状态(除非受到“二次打击”发生了 NASH),随访 10~20 年肝硬化发生率仅 0.6%~3%,而 NASH 患者 10 年内肝硬化发生率 15%~25%。因此对 NASH 的危害需要高度重视,积极防治对阻止肝纤维化、肝硬化的发生发展十分重要^[6]。目前现代医学对治疗 NAFLD 较为局限,主要分为三大类,一是生活方式的改变,例如饮食的调整,运动量的增加,二是临床药物控制,三是外科干预。针对患者整体,饮食结构的改

变、能量摄入的控制和增加运动等措施目前仍是一线使用手段;针对肝脏本身,可以使用药物干预,降低肝脏炎症改变,抑制肝脏的受损。有研究表明在原有体重的基础上下降 5%~10%可以有效改善脂肪变性,但在炎症以及纤维化的改善方面没有得到确实的证据。在药物研究方面,目前取得了一定的进展。奥利司他作为一种胃肠道脂肪酶抑制剂,已经用于辅助体重的降低。在某些 NASH 病患治疗中,也加用了奥利司他,但在组织学上并没有改善。近来关于像 GLP-1 受体激动剂和 DDP-4 抑制剂等药物研究增多,多项研究结果显示,对于 NAFLD 而言,这两类药物的使用益处大于害处。有研究证实普罗布考可以有效降低 NASH 患者 ALT 水平,但它同时也会降低患者的高密度脂蛋白,所以确切疗效仍有待研究。维生素 E 已经被推荐用于患有 NASH 但无糖尿病的患者,糖尿病患者暂不推荐。部分天然草药提取物已经被证实对肝脏有益处,例如水飞蓟素,已经被证实对于肝脏有广泛的抗炎作用,包括抑制中性粒细胞转移,抑制 Kupffer 细胞^[7]。综上所述,针对 NAFLD 和 NASH,在尚未有特效药的情况下,中医药可以发挥很好的预防和治疗作用,中医药的研究仍需进一步开展。

NAFLD 在祖国医学中无相对应的病名,依据其临床表现常将其归于“胁痛”、“肝着”、“肥气”、“湿阻”、“痰饮”等范围。上海市名中医、浦东新区名中医陈建杰教授综合传统祖国医学理论,以及长期临床诊治经验总结实践,认为 NAFLD 的病因主要是久坐少动,多食肥甘厚味,其病机多是本虚标实,本虚表现在脾气不足。标实表现在痰湿内蕴。NAFLD 虽病位在肝,但发于脾,久及肾,对于本病的认识及治疗在针对肝的基础上不可脱离脾胃。肝主疏泄,脾主运化,肝气条达可助脾气升降协调;脾

运健旺,运化有度,可滋养肝脏,肝脾二者密不可分。素人往往过食肥甘厚味,壅滞中焦,肠胃乃伤,日久而损及脾脏,脾失健运,脾气不升,浊气不降,全身肌肉无以濡养,故 NAFLD 临床病人多见体肥而纳呆。另一边肥能生热,甘能壅中,水谷化为脂浊灼伤脾胃,水聚成饮,饮聚成湿,湿聚成痰,痰湿互结,痰脂内蕴,皆可变生本病。脾虚可至痰湿,痰湿又进一步碍伤脾脏,故治疗本病应从促脾降脂,祛湿化痰着手^[8-10]。

因此我院在长期的临床实践中不断探索和总结,最终拟定了苍菊清肝降脂方治疗 NAFLD 患者。该方具有疏肝理气、健脾消脂之功。方中苍术可燥湿健脾、菊花可平肝明目;有研究显示,苍术的主要提取物为苍术酮、 β -桉叶醇,对用 CCL₄ 诱导的急性肝损伤小鼠血清中 ALT、AST 水平具有降低作用^[11];菊花提取物可以抑制小鼠高脂性脂肪肝的形成,其作用机制可能与增加肝脏的抗氧化作用有关^[12]。而本次动物实验显示该方可以有效减轻四氯化碳联合高脂低蛋白饮食诱导的大鼠脂肪肝模型肝组织损伤和脂肪变性,减轻肝脏脂肪沉积;能够有效改善肝组织病理改变,显著改善肝脏生化功能,从而减轻肝脏损伤和促进肝功能恢复,具有良好的临床应用前景,值得进一步深入研究。

参考文献

[1] FAN J G. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease in China[J]. J Hepatol, 2009, 50:204—210.
[2] WONG V W, CHU W C, WONG G L, et al. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and advanced fibrosis in Hong Kong Chinese: a population study using proton-magnetic resonance spectroscopy and tran-

sient elastography[J]. Gut, 2012, 61:409—415.
[3] BROUWERS M C, van GREEVENBROEK M M, CANTOR R M, et al. Heritability of nonalcoholic fatty liver disease[J]. Gastroenterology, 2009, 137:1536—1536.
[4] 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, 2010, 18(3):163—166.
[5] 成 扬, 陈建杰, 侯天禄, 等. 一种用于治疗脂肪肝的中药组合物及其用途[P]. 中国, 申请号: 201310669545. 7.
[6] CHENG Y, WANG H H, HU Y Y, et al. Structural shifts of gut flora in rat acute alcoholic liver injury and jianpi huoxue decoction's effect displayed by ERIC-PCR fingerprint[J]. Chin J Integr Med, 2011, 17:361—368.
[7] FEDERICO A, ZULLI C, DE SIO I, et al. Focus on emerging drugs for the treatment of patients with non-alcoholic fatty liver disease[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20:16841—16857.
[8] 杜秀萍, 陈建杰. 陈建杰治疗脂肪肝经验[J]. 辽宁中医药大学学报, 2011, 13(5):81—82.
[9] 叶青艳, 陈逸云, 陈建杰. 陈建杰从“肥人多痰湿”论治非酒精性脂肪性肝病经验[J]. 辽宁中医杂志, 2014, 4(1):26—28.
[10] 奚 骏, 张盛杰, 陈建杰. 陈建杰治疗非酒精性脂肪肝的经验[J]. 中医杂志, 2010, 51(2):117—118.
[11] 沙多依, 杭永付, 宋 菲, 等. 北苍术炮制前后挥发油部位保肝作用比较研究[J]. 现代中药研究与实践, 2010, 24(4):41—43.
[12] 崔 艳. 菊花提取物抑制小鼠高脂性脂肪形成及其机制研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2014.