

清脂颗粒干预酒精性脂肪肝形成的实验研究及对大鼠血清 TNF- α 、Leptin 水平的影响

刘维明¹ 刘相花¹ 王玉娟¹ 于丽丽¹ 李秀丽¹ 薛杰² 侯殿俊³

(1 山东中医药大学附属济南市中医医院消化科, 济南, 250012; 2 山东中医药大学, 济南, 250014; 3 山东省医学科学研究院, 济南, 250062)

摘要 目的:探讨中药清脂颗粒对酒精性脂肪肝大鼠的疗效和作用机制。方法:采用复合造模方法诱导大鼠酒精性脂肪肝模型,给予中药清脂颗粒干预,观察肝组织病理形态和血脂、肝功能、细胞因子瘦素 Leptin 和肿瘤坏死因子 TNF- α 等的变化。结果:试验组大鼠血清 TC、TG、LDL-C、HDL-C 及肝功 ALT、AST、GGT 明显改善,并且具降低血清瘦素 Leptin 及肿瘤坏死因子 TNF- α 含量的作用。结论:中药清脂颗粒可通过改善血脂、肝功指标、降低血清 TNF- α 、Leptin 水平,达到防治酒精性脂肪肝的目的。

关键词 清脂颗粒;酒精性脂肪肝;实验研究

Experimental Study of Qingzhi Granule on the Formation of Alcoholic Fatty Liver and Its Effect on the Level of Rat Serum TNF- α and Leptin

Liu Weiming¹, Liu Xianghua¹, Wang Yujuan¹, Yu Lili¹, Li Xiuli¹, Xue Jie², Hou Dianjun³

(1 Department of Gastroenterology under Ji'nan City Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250012, China; 2 Study 2010 Master degree students in Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250014, China; 3 Shandong Medical Science Research Institute)

Abstract Objective: To investigate the effect and mechanism of traditional Chinese medicine Qingzhi granule on rats with alcoholic fatty liver. **Methods:** The composite molding method was used to induce alcoholic fatty liver rat model, and they were treated with traditional Chinese medicine Qingzhi granule intervention. The changes of liver histopathology and blood lipid, liver function, cytokine leptin Leptin and tumor necrosis factor alpha TNF- etc were observed. **Conclusion:** Traditional Chinese medicine Qingzhi granules can achieve the goal of the prevention and treatment of alcoholic fatty liver by improving blood lipid, liver function, and reducing serum TNF- α , Leptin level.

Key Words Qingzhi granule; Alcoholic fatty liver; Experimental study

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2015.08.025

酒精滥用和酒精依赖已成为当今世界日益严重的公共卫生问题。近年来,随着酒精性脂肪肝(Alcoholic Fatty Liver, AFL)发病率的不断上升,对于 AFL 的发病机制及其预防和治疗已经成为国内外研究的热点之一。本课题组参考了大量文献资料,结合临床实践,在辨证论治思想指导下,组成以疏肝清热解毒、健脾泄浊化瘀为治则的中药复方制剂清脂颗粒,并选取了与酒精性脂肪肝密切相关的血脂、肝功、血清瘦素 Leptin 及肿瘤坏死因子 TNF- α 含量等指标进行相关的动物实验研究,实验结果总结如下。

1 材料与方法

1.1 动物 购健康 Wistar 大鼠 80 只,体重(200 $\pm$ 10) g,雌雄各半,清洁级。购自山东大学实验动物中心。

1.2 药物 清脂颗粒组成:人参、柴胡、葛花、枳椇子、柴胡、泽泻、虎杖、丹参、草决明等。药物常规煎煮过滤,水浴蒸发至含生药 1 g/mL,置 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。东宝肝泰片(复方蛋氨酸胆碱片由通化东宝药业有限公司生产,批准文号:国药准字 H22024764),采用 0.5% 羧甲基纤维素钠配制成 0.09 g/mL 浓度的混悬液。

1.3 主要试剂和仪器 检测细胞因子瘦素 Leptin 及肿瘤坏死因子 TNF- α 放免试剂盒由美国 DRG 公司提供;芬兰(Labsystems Multiskan, MS)352 型酶标仪;芬兰(Thermo Labsystems)AC8 洗板机;日本 OLYMPUS2700 全自动生化仪;日本 OLYMPUS 光学显微镜;瑞士 AE-200 电子天秤;微量高速离心机(国产)TG16W;隔水式恒温培养箱(国产)GNP-9080

基金项目:山东省中医药管理局中医药发展计划项目(编号:2007-170)

通信作者:刘维明(1966.10—)女,医学硕士,主任医师,科主任,硕士研究生导师,研究方向:中医消化系统疾病的研究, E-mail: mmu2006@163.com

型。

1.4 实验方法 大鼠适应性饲养 1 周后,随机分为 5 组,正常组(A 组)、模型组(B 组)、中药小剂量组(C 组)、中药大剂量组(D 组),东宝对照组(E 组),每组 16 只。A 组给予基础饲料喂养,正常饮水,其余各组给予高脂饮食及乙醇饮用以造模。普通饲料和猪油(板油)以 85:15(重量比)配比,每 1 kg 饲料中加入 15 g 硫酸亚铁,充分混匀制成成型饲料,60 ℃烘干备用。称取普通饲料 5 kg 先与硫酸亚铁 75 g 充分混合;将 0.88 kg 板油加热炼取液态猪油,再充分混匀;最后加入适量自来水,手工做成饼状饲料,放入 60 ℃烤箱,烘干备用^[1],乙醇为北京红星股份有限公司生产的 52% 北京红星二锅头白酒,产品标准号:GB/T20822。造模时间共 8 周,造模结束后 B 组随机取两只大鼠做肝脏病理切片,显示造模成功。随后给与中药治疗,A、B 组均为生理盐水灌胃(1 mL/100 g 体重),C、D、E 组为不同剂量中药及东宝

对照组灌胃(1 mL/100 g 体重)。4 周后 10% 水合氯醛麻醉,腹静脉取血后摘取肝脏称重,取约 200 mg 肝组织做匀浆处理,取肝左叶 10% 甲醛固定。

1.5 观察指标 一般情况:精神、活动、饮食、皮毛、体重。血生化检测:血清总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG);高、低密度脂蛋白(HDL-C、LDL-C)、肝脏功能:谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、Y-谷氨酰基转移酶(GGT)检测;血清瘦素(Leptin)、肿瘤坏死因子(TNF-α)检测。病理学检查,常规 HE 染色,光镜下观察。

2 结果

2.1 一般情况 A 组动物精神充沛,灵活好动,饮食正常,皮毛整洁,体重持续增加;B 组动物精神萎靡,活动减少,皮毛色黄凌乱,个别大鼠出现鼻孔渗血;C、D、E、F 组均出现整体状况好转,其中以 E 组一般情况最好,毛色基本正常,活动良好。

2.2 各组大鼠治疗后血脂含量变化比较 见表 1。

表 1 各组大鼠治疗后血脂含量变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)
正常组	10	1.04 ± 0.42	2.64 ± 0.70	0.94 ± 0.11	0.33 ± 0.12
模型组	10	4.90 ± 0.35 ^{△△}	6.35 ± 0.38 ^{△△}	0.78 ± 0.12 [△]	3.24 ± 0.09 ^{△△}
中药小剂量	10	1.66 ± 0.24 ^{**▲}	3.26 ± 0.51 ^{**▲}	0.77 ± 0.14	1.96 ± 0.13 ^{**▲}
中药大剂量	10	1.28 ± 0.07 ^{**▲}	3.34 ± 0.20 ^{**▲}	0.86 ± 0.07	1.75 ± 0.06 ^{**▲}
东宝对照组	10	2.83 ± 0.10 [*]	4.73 ± 0.22 [*]	0.85 ± 0.08	2.98 ± 0.07 [*]

注:与正常组比较,**P* < 0.05,***P* < 0.01;与模型组比较,[△]*P* < 0.05,^{△△}*P* < 0.01,与东宝对照组比较,[▲]*P* < 0.05。

2.3 各组大鼠治疗后肝功能变化比较 见表 2。

表 2 各组大鼠治疗后肝功能指标变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	ALT(U/L)	AST(U/L)	GGT(U/L)
正常组	10	40.80 ± 3.21	41.70 ± 302.76	53.61 ± 12.43
模型组	10	191.20 ± 34.03 ^{△△}	187.00 ± 64.82 ^{△△}	123.40 ± 0.70 ^{△△}
中药小剂量组	10	38.70 ± 2.65 ^{**▲}	39.80 ± 3.34 ^{**▲}	58.70 ± 0.82 ^{**▲}
中药大剂量组	10	35.80 ± 2.57 ^{**▲}	35.30 ± 2.04 ^{**▲}	50.81 ± 0.97 ^{**▲}
东宝对照组	10	41.60 ± 2.44 [*]	42.20 ± 3.98 [*]	62.70 ± 0.82 ^{**}

注:与正常组比较,**P* < 0.05,***P* < 0.01;与模型组比较,[△]*P* < 0.05,^{△△}*P* < 0.01,与东宝对照组比较,[▲]*P* < 0.05。

2.4 各组大鼠治疗后血清瘦素 Leptin 及肿瘤坏死因子 TNF-α 含量变化比较 见表 3。

表 3 各组大鼠血清 TNF-α、Leptin 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Leptin(ug/l)	TNF-α(pg/ml)
正常组	10	0.59 ± 0.13 ^{**}	0.92 ± 0.14 ^{**}
模型组	10	1.08 ± 0.24	1.75 ± 0.25
中药小剂量	10	0.64 ± 0.175 ^{**△△}	1.12 ± 0.17 ^{**△}
中药大剂量	10	0.61 ± 0.11 ^{**△△}	1.09 ± 0.22 ^{**△}
东宝对照组	10	0.90 ± 0.22 ^{**}	1.38 ± 0.20 ^{**}

注:与模型组比较,***P* < 0.01,与对照组比较,[△]*P* < 0.05,^{△△}*P* < 0.01。

2.5 病理学检查结果 镜下观察正常组大鼠肝组织形态学基本正常;病理对照组大鼠呈中度、重度肝细胞脂肪变,病变以中央静脉周围最为明显,肝细胞明显肿胀呈圆形,细胞核被挤向一边,肝细胞索紊乱,胞质内充满大量脂肪空泡,脂滴大小不等,个别融合为大脂滴,界限不清,肝窦变窄,少数可见点状坏死和炎性细胞浸润,但未见纤维化改变;各用药组大鼠的病理变化显示出肝细胞脂肪变均有不同程度的改善趋势,脂肪变肝细胞数目减少,胞质内脂滴减少或消失,胞质丰富,肝窦基本恢复正常,无炎性细胞浸润和坏死,肝索排列整齐。

3 讨论

酒精滥用和酒精依赖已成为当今世界日益严重的公共卫生问题。近年来,随着酒精性脂肪肝(Alcoholic Fatty Liver,AFL)发病率的不断上升,对于 AFL 的发病机制及其预防和治疗已经成为国内外研究的热点之一。AFL 是指因摄入酒精过量所引起的肝细胞内脂质蓄积量超过肝湿重的 5%,或者组织学上每单位面积有 1/3 以上的肝细胞发生脂变,与

其他类型脂肪肝相比,酒精性脂肪肝发生肝纤维化和肝硬化的进程相对较快,发生率相对较高^[2]。酒精性肝病在西方国家一直是威胁人们健康,导致肝硬化的最主要的病因^[3]。长期摄入酒精可以使肝脏线粒体功能紊乱,使氧化乙醛的能力下降,而乙醇的氧化速度不变甚至提高,造成乙醛生成与降解不平衡,导致肝内乙醛含量增加。对于酒精性脂肪肝的发病机制,近年来有人提出以氧化应激和脂质过氧化为中心的“二次打击”假说^[5],此外,由于 AFLD 是酒精性肝病的前期阶段,故能造成酒精性肝病的损伤因素也有可能是导致 AFLD 的损伤因素。国内外学者普遍认为造成酒精性肝病肝损伤的重要环节是 CYP2E1 在酒精代谢过程中产生的氧自由基^[6],研究表明,乙醇对肝细胞的损伤是通过自由基介导的脂质过氧化作用实现的^[7-9]。另有研究发现在酒精性肝病患者的肝脏中抗氧化物质明显减少,而氧自由基和脂质过氧化产物 MDA 含量明显增高^[10]。可激活磷脂酶及脂质过氧化反应,降低膜磷脂改变其通透性和流动性,从而改变与膜结合的酶、受体和离子通道的微环境,使线粒体功能异常,干扰脂肪酸 β 氧化,ATP 生成减少,脂肪在肝脏沉积增多。另外,脂质过氧化还影响 DNA 和蛋白质的结构和功能^[11],因此抑制氧化应激反应,增强细胞膜稳定性,减少脂质过氧化产物的形成将有助于改善酒精性肝病的肝脏损伤,亦可减轻 AFLD 所造成的肝损伤。迄今为止,对酒精性脂肪肝的治疗,临床上尚无满意的药物。

近年来,运用中医药治疗酒精性脂肪肝的临床报道逐渐增多,本课题参考了大量文献资料,结合临床实践,在辨证论治思想指导下,组成以疏肝清热解郁、健脾泄浊化瘀为治则的中药复方制剂清脂颗粒,该药由人参、柴胡、葛花、枳椇子、丹参、片姜黄、虎杖、泽泻、草决明等药物组成。方中人参益气扶正,柴胡疏肝解郁、条达肝气,葛花醒脾和胃解酒共为君药;丹参、片姜黄,活血化瘀为臣;枳椇子、虎杖、草决明、泽泻,清热利湿,驱邪外出共为佐使药,诸药合用,共奏益气扶正、化浊降脂、疏肝泻热、解毒利湿之功。并且选取了与酒精性脂肪肝密切相关的血脂、肝功、血清瘦素 Leptin 及肿瘤坏死因子 TNF- α 含量等观察指标,进行了相关的动物实验研究,结果显示:试验组大鼠血清 TC、TG、LDL-C、HDL-C 及肝功 ALT、AST、GGT 明显改善,并且具降低血清瘦素 Leptin 及肿瘤坏死因子 TNF- α 含量的作用,提示中药复方制剂清脂颗粒治疗 AFL 的可能机制为:1)显

著降低血液和肝脏 TC、TG 含量,改善 LDL-C、HDL-C,抑制内源性 TC、TG 的合成,改善脂质在体内的分布及在内脏器官的沉积。2)降低大鼠血清中 TNF- α 含量:TNF- α 是重要的肝脏促炎因子和免疫调节因子,其增高可减少外周组织脂肪分解,促进肝细胞三酰甘油的合成与聚集^[12-13],本研究显示,AFL 大鼠血清 TNF- α 水平明显高于正常组,表明 TNF- α 参与了酒精性脂肪肝损伤过程,应用清脂颗粒干预后,其水平明显下降,提示清脂颗粒预防 AFL 的机制可能是降低 TNF- α 的产生。3)降低血清 Leptin 含量:Leptin 由脂肪组织释放入血,是机体脂肪组织的主要调节因子,通过抑制脂肪的合成来调节体脂平衡^[14],AFL 大鼠模型血清 Leptin 水平明显高于正常组,存在高瘦素血症,机体对瘦素调节作用不敏感^[15],清脂颗粒干预后使 Leptin 水平下降,提示可能为其干预酒精性脂肪肝形成的作用机制之一。4)保护肝细胞,抗肝损伤,降低转氨酶,保护和稳定肝细胞膜结构。5)改善肝脏微循环,促进肝细胞损伤修复。

课题组对中药受试动物大鼠进行急性毒性试验,在实验中未能求出该药的致死剂量,采用最大受试药物量试验方法,即在合理的浓度及合理的容量条件下,用最大的浓度、最大容积给予实验动物药物,观察动物的反应,采用 24 h 内给药最大剂量为 18 g/(kg·d),求出大鼠的清脂颗粒最大耐受量倍数为临床常用量的 142 倍,连续观察,中药受试组未见死亡和其他异常,说明该药口服毒性极小,安全性高。

参考文献

- [1] 冯志强,沈志祥,谭诗云. 大鼠急性酒精性脂肪肝造模方法改进[J]. 世界华人消化杂志,2003,11(8):1189-1192.
- [2] 中华医学会肝病学会分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 酒精性肝病诊疗指南[J]. 中华肝病杂志,2006,14(3):164-166.
- [3] 冯志强,沈志祥,谭诗云. 酒精性脂肪肝的发病机制研究进展[J]. 世界华人消化杂志,2002,10(3):346-348.
- [4] Lieber CS, Leo MA, Cao Q, et al. Research progress of the pathogenesis of alcoholic liver disease[J]. Hepatol, 1991, 12(1):394-401.
- [5] Hoek JB, Pastorino JG. Ethanoloxidative stress and cytokine-induced liver cell injury[J]. Alcohol, 2002, 27(1):63-68.
- [6] Morgan K, French SW, Morgan TR. Production of a cytochrome P4502E1 transgenic mouse and initial evaluation of alcoholic liver damage[J]. Herpetology, 2002, 36(1):122-134.
- [7] Sergeant O, Pereira M, Belhomme C, et al. role for membrane fluidity in ethanol induced oxidative stress of Primary rat hepatocytes[J]. J Pharmacologic EXP Ther, 2005, 313(1):104-111.
- [8] tewart SF, Vidalia M, Day CP, et al. Oxidative stress as a trigger for cellular responses in patients With alcoholic liver disease[J]. Herpetology, 2004, 39(1):197-203.

- [9]邓源,班春林,武晓琼.乙醇诱导肝损伤作用机制的研究进展[J].华北国际医药,2005,17(4):242-244.
- [10]Samper BP, Kerkorian S, Ron's MJ, et al. Immune histochemical characterization of hepatic malondialdehyde and 4-hydroxynonenal modified protein during early stages of ethanol-induced liver injury[J]. Alcohol Clin Res, 2003, 27(6):1015-1022.
- [11]Sava's MC, Karuk M, Prim I et al. Serum glutathione levels in Patients with normal alcoholic steady hepatitis[J]. Hepatic gastroenterology, 2003, 50(51):738-741.
- [12]范建高,曾明德.脂肪肝[M].上海:上海医科大学出版社,

2000:69.

- [13]Bouloumié A, Marumo T, Lafontan M, et al. Leptin induces oxidative stress endothelial cells[J]. FASEB J, 1999, 13(10):1231-1238.
- [14]王晓红,周立人.瘦素在大鼠酒精性脂肪肝中的表达[J].安徽农学通报,2006,12(5):71.
- [15]Tobe K, Ogura J, Tsukamoto, et al. Relationship between serum leptin and fatty liver in Japanese male adolescent university student[J]. Am Gastroenterol, 1999, 94(11):3228-3335.

(2014-06-13 收稿 责任编辑:王明)

第四届传统医学与现代医学比较国际学术大会第一轮会议通知

为促进各民族传统医学相互之间及与现代医学的比较、继承、发展与融合,进一步弘扬民族传统医学文化,发扬传统医学与现代医学整合在诊治疾病方面的优势,扩大中国传统医学在国内外影响力,加强国际间的学术交流与合作,促进传统医学融入现代医学,由复旦大学、复旦大学附属华山医院、中国中西医结合学会呼吸病专业委员会、《中国医学人文》杂志、云南省人民政府扶贫开发领导小组办公室、新疆医科大学、新疆维吾尔医学专科学校、内蒙古自治区蒙中医药管理局、甘肃省中医药管理局、青海省果洛藏族自治州卫生和计划生育委员会、东中西部区域发展和改革研究院主办,复旦大学附属华山医院、云南省西双版纳傣族自治州和云南省滇西技术大学承办的“第四届传统医学与现代医学比较国际学术大会”将于2015年11月26日-30日(11月26日报到,29-30日参观或撤离)在中国云南省西双版纳傣族自治州召开。

本次国际学术大会的目的在于构建多种民族传统医学之间及与现代医学比较研究的学术交流平台,通过相互之间全方位的比较与交流,促进彼此之间的认识、交融与提高,吸取各民族传统医学的精华,促进中国传统医学体系的构建和人类共同医学文明的发展。本次国际学术大会的宗旨是认识、交流、比较和融合,而会议的基本主题是相互认识、提高水平、促进融合、更好地为人类服务。另外,根基于传统医学理论的药物和天然药物研发成果的介绍也是本次国际学术大会的重要内容。大会将分别以特邀报告、专题讲座、院士论坛、壁报交流、卫星会等多种形式就会议主题进行学术交流,并积极介绍目前民族传统医学与现代医学诊治常见疾病中的新方法、新药物等最新研究成果。参加本届传统医学与现代医学比较国际学术大会授予I类

学分10分。

大会征文围绕本次大会的主题,征求有关各民族传统医学(包括汉医、藏医、维医、蒙医、傣医、回医、苗医、壮医等)构成要素(包括临床实践、文化特征、古典哲学、宗教特征和历史背景的演变)方面的文章;征求各民族传统医学与现代医学认识和干预优势病种进展及比较方面的文章;征求涉及传统药物及天然药物(包括汉药、藏药、维药、蒙药、傣药、回药、苗药、壮药等)研究与开发进展的文章。要求:1)凡未在国内外刊物上公开发表过的论文均可投稿。2)所提交的论文原则上为英文全文,在特殊情况下可使用中文、维语、藏文或其它语言文字,但需附300字左右英文摘要,并注明论文题目、作者、工作单位、通讯地址、邮政编码。3)论文需用word格式排版,小四号字,1.5倍行距,标准字间距。4)参会论文以附件形式发送电子邮件至jcdong2004@126.com。5)若无条件上网提交论文者,请将论文用软盘邮寄至大会组委会秘书处。截稿日期:2015年10月20日(以邮戳或电子邮件寄出时间为准,逾期恕不受理)。

本届传统医学与现代医学比较国际学术大会的会务费用为130美元或人民币800元,会务费用包括资料费、餐费等,住宿费用等自理。参加本届传统医学与现代医学比较国际学术大会授予I类学分10分。联系人:董竞成,联系地址:上海市乌鲁木齐中路12号复旦大学附属华山医院(邮编200040),联系电话:021-52888301,手机:13601761761,传真:021-52888265,电子邮件:jcdong2004@126.com;李璐璐,联系地址:上海市乌鲁木齐中路12号复旦大学附属华山医院(邮编200040),联系电话:021-52888301,手机:13816862497,传真:021-52888265,电子邮件:lululeehui@163.com