



非乙醇性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是指除外乙醇和其他明确的损害肝脏因素所致的、以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变为主要特征的临床病理综合征, 包括单纯脂肪肝、脂肪性肝纤维化和肝硬化。近年该病发病率逐年增高<sup>[1]</sup>, 但其发病机制尚不十分明确, 药物治疗效果尚不理想。本研究采用高脂饮食建立 NAFLD 大鼠模型, 通过观察疏肝理脾祛湿方对 NAFLD 模型大鼠的干预作用及对肝组织匀浆中超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-PX) 的影响, 探讨疏肝理脾祛湿方防治脂肪肝的可能作用途径, 为临床应用提供实验依据。

### 1 材料与方法

**1.1 动物** 清洁级雄性 Sprague-Dawley 大鼠 60 只, 体质量 180 ~ 200 g, 购于华中科技大学同济医学院实验动物中心, 生产许可证号: SCXK (鄂) 2010-0009, 使用许可证号: SCXK (鄂) 2010-0057。

**1.2 主要试剂与仪器** 中药原材料饮片由湖北省中药材总公司提供, 武汉市中医医院制剂室生产, 配方: 当归、赤芍、白术、茯苓、郁金、柴胡、垂盆草、绞股蓝、香附、山楂、五味子、甘草、荷叶按组方比例称取药材 (加水煎煮 2 次, 每次 1 h, 合并煎液, 加筛滤过, 滤液加热浓缩, 90 °C 测比重为 1 : 1 时, 加入适量乙醇, 放置 48 h, 滤取上清液, 然后回收乙醇) 1 mL 原液含生药 0.385 g。胆固醇 (total cholesterol, TC) 购自北京奥博星生物有限公司, 胆酸钠购自上海南平商贸实业有限公司, 猪油自备。丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 试剂盒、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 试剂盒、SOD 试剂盒、MDA 试剂盒、GSH-PX 试剂盒均购自武汉博士德生物有限公司, 总胆固醇试剂盒、三酰甘油 (triglyceride, TG) 试剂盒购自中生北控生物科技股份有限公司。5415D 型台式离心机为德国 Eppendorf 公司产品。

**1.3 分组与造模** 60 只大鼠普通饲料适应性喂养 1 周, 随机分为 2 组, 12 只为空白对照组, 喂饲普通饲料; 另 48 只为造模组, 喂饲高脂饲料 (质量分数:

87.7% 普通饲料 + 10.0% 猪油 + 2.0% 胆固醇 + 0.3% 胆酸钠)。连续饲养 4 周, 随机抽取对照组大鼠 2 只和造模组大鼠 8 只处死, 取肝脏行病理组织学检查, 造模组大鼠出现脂肪变性, 证明模型制备成功。剩余造模组 40 只大鼠采用随机数字法分为模型组和大、中、小剂量中药治疗组, 每组 10 只。

**1.4 饲养及给药方法** 空白对照组大鼠喂以普通饲料, 模型组及中药治疗组大鼠均喂以高脂饲料。空白对照组及模型组分别给予等剂量蒸馏水; 大、中、小剂量中药治疗组参照人体用量, 依据体表面积法折算出大鼠用量, 分别以 5.850、1.170、0.294 mg · kg<sup>-1</sup> 的剂量灌胃, 每日 1 次, 连续灌胃 8 周。

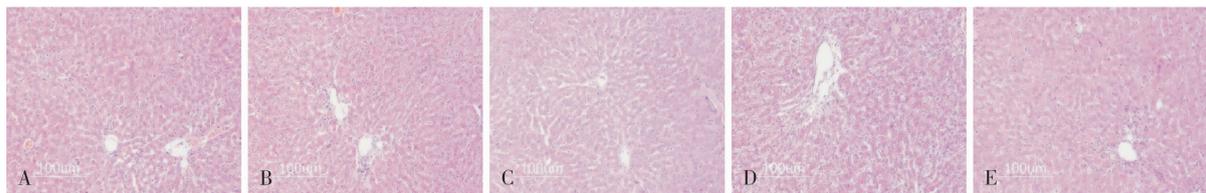
**1.5 检测方法** 实验结束后, 禁食 12 h, 于腹主动脉取血, 离心留血清, 保存于 -20 °C 冰箱, 按照试剂盒说明书方法测定血清 TG、TC、ALT 和 AST。大鼠脱颈处死取肝脏 0.4 g 加冷生理盐水 9 倍匀浆, 离心后取上清液, 按试剂盒说明书测定肝脏 MDA、SOD、GSH-PX 水平。

**1.6 病理学标本检测** 取大鼠肝脏左叶, 用甲醛固定、石蜡包埋、切片后, 在光学显微镜下观察各组大鼠肝细胞、肝窦、汇管区、肝小叶等病理组织学变化。

**1.7 统计学处理** 应用 SPSS 13.0 软件进行数据处理, 计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间两两比较采用方差分析及 *q* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

### 2 结果

**2.1 大鼠肝脏组织形态改变** 给药 8 周后, 空白组大鼠肝脏组织结构正常, 细胞质呈嗜酸性, 细胞核被染成蓝色, 大而圆, 居中央, 染色质丰富, 核膜清楚, 肝细胞围绕中央静脉呈放射状排列, 中央静脉完整 (图 1A); 模型组肝细胞水肿明显, 肝细胞索排列紊乱、肝窦挤压变窄、肝细胞细胞质疏松, 见较多散在的肝细胞点状坏死, 小叶内及汇管区有淋巴细胞和巨噬细胞为主的炎细胞浸润, 残存肝细胞水肿变形 (图 1B); 中药治疗组肝脏病理损害明显轻于模型组, 肝细胞仅轻度水肿, 偶见散在肝细胞点状坏死灶 (图 1C ~ 1E)。



A: 空白对照组; B: 模型组; C: 大剂量中药治疗组; D: 中剂量中药治疗组; E: 小剂量中药治疗组。

图 1 大鼠肝组织病理形态改变 (HE 染色, ×200)

Fig. 1 Pathological changes in liver tissues of rats (HE staining, ×200)

## 2.2 各组大鼠血清 ALT、AST、TC、TG 水平比较

结果见表1。模型组大鼠血清 ALT、AST、TC、TG 水平均较空白对照组显著升高 ( $P < 0.05$ )。各中药治疗组的 ALT、AST 均较空白对照组显著升高 ( $P < 0.05$ ),但中、大剂量中药治疗组 ALT 水平显著低于模型组 ( $P < 0.05$ ),大剂量中药治疗组的 AST 水平显著低于模型组 ( $P < 0.05$ );中、大剂量中药治疗组的 TC 和 TG 水平显著低于模型组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。各中药治组 ALT、AST、TC 和 TG 水平随剂量增加逐渐恢复正常,大剂量中药治疗组明显低于中、小剂量中药治疗组 ( $P < 0.05$ )。

表1 各组大鼠血清 ALT、AST、TC 和 TG 水平比较

Tab.1 Comparison of the serum ALT, AST, TC and TG levels among the rats in different groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	ALT/ (U·L <sup>-1</sup> )	AST/ (U·L <sup>-1</sup> )	TC/ (mmol·L <sup>-1</sup> )	TG/ (mmol·L <sup>-1</sup> )
空白对照组	63.67 ± 8.36	65.42 ± 27.56	1.05 ± 0.89	0.87 ± 0.26
模型组	153.80 ± 47.54 <sup>a</sup>	156.12 ± 32.30 <sup>a</sup>	3.38 ± 0.84 <sup>a</sup>	1.65 ± 0.56 <sup>a</sup>
小剂量中药治疗组	123.38 ± 35.18 <sup>ac</sup>	142.44 ± 31.96 <sup>ac</sup>	2.18 ± 1.56 <sup>c</sup>	1.23 ± 0.92 <sup>c</sup>
中剂量中药治疗组	116.59 ± 13.48 <sup>abc</sup>	138.93 ± 49.52 <sup>ac</sup>	1.73 ± 0.72 <sup>bc</sup>	1.02 ± 0.59 <sup>bc</sup>
大剂量中药治疗组	88.01 ± 38.24 <sup>ab</sup>	114.16 ± 40.15 <sup>ab</sup>	1.51 ± 0.29 <sup>b</sup>	0.98 ± 0.47 <sup>b</sup>

注:与空白对照组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与大剂量中药治疗组比较<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

## 2.3 各组大鼠肝组织中 MDA、SOD 及 GSH-Px 水平比较

结果见表2。模型组肝组织 SOD 及 GSH-Px 水平较空白对照组显著下降 ( $P < 0.05$ ),而 MDA 水平较空白对照组显著升高 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较,各中药治疗组 MDA 水平均显著下降 ( $P < 0.05$ ),SOD、GSH-Px 水平均显著上升 ( $P < 0.05$ ),且大剂量中药治疗组 MDA、SOD 及 GSH-Px 水平与空白对照组比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表2 各组大鼠肝组织匀浆中 SOD、MDA 和 GSH-Px 水平比较

Tab.2 Comparison of the hepatic tissue homogenate SOD, MDA and GSH-Px in the rats among different groups

组别	$(\bar{x} \pm s)$		
	SOD/ (U·mg <sup>-1</sup> Pro)	MDA/ (nmol·mg <sup>-1</sup> Pro)	GSH-Px/ (U·mg <sup>-1</sup> Pro)
空白对照组	302.06 ± 63.19	11.36 ± 7.15	451.57 ± 55.16
模型组	175.58 ± 42.37 <sup>a</sup>	19.58 ± 4.79 <sup>a</sup>	350.63 ± 48.23 <sup>a</sup>
小剂量中药治疗组	221.33 ± 23.17 <sup>b</sup>	16.67 ± 9.23 <sup>b</sup>	403.54 ± 38.38 <sup>b</sup>
中剂量中药治疗组	234.23 ± 46.16 <sup>b</sup>	16.23 ± 5.56 <sup>b</sup>	427.25 ± 47.63 <sup>b</sup>
大剂量中药治疗组	261.36 ± 43.21 <sup>b</sup>	13.14 ± 3.74 <sup>b</sup>	449.64 ± 39.17 <sup>b</sup>

注:与空白对照组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

## 3 讨论

NAFLD 的发病机制尚未完全阐明,目前普遍

接受的观点是“二次打击”学说<sup>[2]</sup>。第1次打击指各种原因如肥胖、胰岛素抵抗引起的肝脏脂肪蓄积和肝细胞脂肪变性。第2次打击主要为氧化应激导致损伤及异常细胞因子的作用致肝脏的脂质炎症和纤维化。目前认为其发病主要与胰岛素抵抗、氧化应激、肝脏脂质代谢异常以及线粒体损伤等有关<sup>[3]</sup>。

氧化应激和脂质过氧化损伤可产生过多的过氧化自由基,导致肝小叶内炎性细胞浸润及纤维化<sup>[4]</sup>。MDA 水平可衡量氧化应激水平的高低<sup>[5-6]</sup>。而机体内存在一系列抑制和清除自由基的抗氧化防御系统,以消弱或清除各种自由基引起的损伤,其中 SOD、GSH-Px 是体内重要的抗氧化酶<sup>[7]</sup>,SOD 可减少自由基的产生,降低脂质过氧化物的生成,减轻肝细胞损伤;GSH-Px 可催化 GSH 对过氧化物及自由基的还原反应,其活性的增高可反映机体抗氧化水平的增高。MDA 水平的测定与 SOD、GSH-Px 活力的测定相结合,可反映机体抗氧化的能力<sup>[8-9]</sup>。

中医认为脂肪肝主要为饮食、情志、久病肝郁、气滞、血瘀、痰凝、湿阻、脾虚、肾虚等所致,病危在肝,病变脏腑涉及胆、脾、胃、肾等。作者认为肝郁脾虚为 NAFLD 发病的内在基础,痰湿瘀结为本病发生的病理关键,治本之要当疏肝理脾,治标之旨,应化痰祛湿<sup>[10-11]</sup>。现代药理学研究发现,柴胡茎叶中总黄酮对多种自由基有清除效果,具有抗氧化作用;当归提取物能通过增强抗氧化能力,激活细胞外信号调节蛋白激酶传导途径,保护内皮细胞不受氧自由基的损伤;郁金具有保护肝细胞、促进肝细胞再生、抗癌、抗菌、抗氧化作用;丹参的水溶性提取物丹酚酸有很强的抗氧化活性,抑制肝匀浆 MDA,诱导细胞色素 P450 合成,降低血清脂质过氧化物,防治脂质过氧化物所致的肝损伤<sup>[12]</sup>;山楂黄酮可降低血清 TC、TG、低密度脂蛋白胆固醇、极低密度脂蛋白胆固醇水平,抑制脂质过氧化物。本研究方中柴胡、茯苓、白术共为君药,三者共奏疏肝健脾之功;当归、赤芍、香附、郁金、丹参、山楂、垂盆草合为臣药,以达行气活血、祛湿化痰之功;通过高脂饮食诱导产生非乙醇性脂肪肝动物模型,经中药治疗后血 ALT、AST、TC、TG 水平显著降低,病理结果也显示肝组织炎症反应减轻,以大剂量中药治疗组较为明显,提示中药疏肝理脾化痰祛湿方对 NAFLD 大鼠有降脂保肝作用,并存在一定的量效关系。本研究中,模型组的 SOD 及 GSH-Px 水平较空白对照组显著下降,而 MDA 水平较空白对照组显著升高;经中药干预后,各中药治疗组的 MDA 水平随中药剂量的增加逐渐

(下转第 527 页)

- [5] 杨文巍,韩波,王介忠,等. CD40siRNA对实验性自身免疫性心肌炎大鼠Th17细胞及其细胞因子白细胞介素-17与白细胞介素-23的作用[J]. 中华实用儿科临床杂志,2013,28(19):1498-1501.
- [6] Kanasty R, Dorkin J R, Vegas A, et al. Delivery materials for siRNA therapeutics[J]. *Nat Mater*, 2013, 12(11):967-977.
- [7] Su Z Z, Chen Y, Kang D C, et al. Customized rapid subtraction hybridization (RaSH) gene microarrays identify overlapping expression changes in human fetal astrocytes resulting from human immunodeficiency virus-1 infection or tumor necrosis factor-alpha treatment[J]. *Gene*, 2003, 306:67-78.
- [8] Dompe N, Rivers C S, Li L, et al. A whole-genome RNAi screen identifies an 8q22 gene cluster that inhibits death receptor-mediated apoptosis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(43):E943-E951.
- [9] Lee S G, Kang D C, De Salle R, et al. AEG-1/MTDH/LYRIC, the beginning: initial cloning, structure, expression profile, and regulation of expression[J]. *Adv Cancer Res*, 2013, 120:1-38.
- [10] Emdad L, Das S K, Dasgupta S, et al. AEG-1/MTDH/LYRIC: signaling pathways, downstream genes, interacting proteins, and regulation of tumor angiogenesis[J]. *Adv Cancer Res*, 2013, 120:75-111.
- [11] Ke Z F, He S, Li S, et al. Expression characteristics of astrocyte elevated gene-1 (AEG-1) in tongue carcinoma and its correlation with poor prognosis[J]. *Cancer Epidemiol*, 2013, 37(2):179-185.
- [12] Erdem H, Yildirim U, Uzunlar A K, et al. Relationship among expression of basic-fibroblast growth factor, MTDH/astrocyte elevated gene-1, adenomatous polyposis coli, matrix metalloproteinase 9, and COX-2 markers with prognostic factors in prostate carcinomas[J]. *Niger J Clin Pract*, 2013, 16(4):418-423.
- [13] Noch E K, Khalili K. The role of AEG-1/MTDH/LYRIC in the pathogenesis of central nervous system disease[J]. *Adv Cancer Res*, 2013, 120:159-192.
- [14] Yan J, Zhang M, Chen Q, et al. Expression of AEG-1 in human T-cell lymphoma enhances the risk of progression[J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(6):2107-2114.
- [15] Srivastava J, Siddiq A, Emdad L, et al. Astrocyte elevated gene-1 promotes hepatocarcinogenesis: novel insights from a mouse model[J]. *Hepatology*, 2012, 56(5):1782-1791.
- [16] Zhang F, Yang Q, Meng F, et al. Astrocyte elevated gene-1 interacts with  $\beta$ -catenin and increases migration and invasion of colorectal carcinoma[J]. *Mol Carcinog*, 2013, 52(8):603-610.
- [17] Zhang X, Zhang N, Zhang M X. Astrocyte elevated gene-1 induces breast cancer proliferation and invasion through upregulating HER2/neu expression[J]. *Chin Med J(Engl)*, 2011, 124(21):3546-3550.
- [18] 邓玉屏,刘凤英. RNA干扰与卵巢癌基因治疗[J]. 新乡医学院学报, 2011, 28(1):114-118.

(本文编辑:李胜利 英文编辑:王燕)

## (上接第523页)

下降, SOD及GSH-PX水平逐渐上升, 与模型组比较差异均有统计学意义, 且大剂量中药治疗组对SOD、GSH-PX、MDA水平的改善更明显, 与空白对照组比较差异无统计学意义。结果提示, 疏肝理脾化痰祛湿方可有效改善非乙醇性脂肪肝大鼠的肝细胞脂肪变性, 其作用机制可能为有效清除机体中的自由基, 抑制脂质过氧化, 预防脂质代谢紊乱, 减轻肝细胞氧化应激和脂质过氧化的损伤以达到治疗脂肪肝的目的; 综合比较疏肝理脾化痰祛湿方对脂肪肝大鼠的作用效果, 大剂量疗效更优。

## 参考文献:

- [1] Preiss D, Sattar N. Non-alcoholic fatty liver disease: an overview of prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment considerations[J]. *Clin Sci*, 2008, 115(5):141-150.
- [2] Elliott C, Frith J, Day C P, et al. Functional impairment in alcoholic liver disease and non-alcoholic fatty liver disease is significant and persists over 3 years of follow-up[J]. *Dig Dis Sci*, 2013, 58(8):2383-2391.
- [3] Pasumarthy L I, Srour J. Nonalcoholic steatohepatitis: a review of the literature and updates in management[J]. *South Med J*, 2010, 103(6):547-550.
- [4] Fu Y, Luo N, Klein R L, et al. Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation[J]. *J Lipid Res*, 2005, 46(7):1369-1379.
- [5] 陈芳,徐珊,吕伟红,等. 糖尿病大鼠视网膜氧化应激损伤及葛根素的干预作用[J]. 眼科新进展, 2012, 32(1):15-19.
- [6] 喻小龙,谭钢,刘二华,等. 罗格列酮对高糖诱导视网膜神经节细胞损伤的保护作用[J]. 眼科新进展, 2013, 33(2):101-105.
- [7] 段东印. 炎症因子和自由基在诱导缺氧缺血性脑损伤新生大鼠神经细胞凋亡中的作用[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2013, 28(23):1825-1827.
- [8] Aly D G, Shahin R S. Oxidative stress in lichen planus[J]. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat*, 2010, 19(1):3-11.
- [9] Lee S J, Lim K T. Glycoprotein of Zanthoxylum piperitum DC has a hepatoprotective effect via anti-oxidative character *in vivo* and *in vitro*[J]. *Toxicol In Vitro*, 2008, 22(2):376-385.
- [10] 刘敏,李佳明. 非酒精性脂肪肝(NAFL)辨治体会[J]. 中国社区医师:综合版, 2005, 7(16):48.
- [11] 杨钦河,凌家生,平换换,等. 非酒精性脂肪肝的中医药防治思路与对策[J]. 中医杂志, 2007, 48(8):746-748.
- [12] 邬浩杰. 丹参的药理作用研究[J]. 浙江中医药大学学报, 2008, 32(5):694-695.

(本文编辑:李胜利 英文编辑:王燕)