论著

文章编号:1000-5404(2007)22-2176-03

虫草菌丝和还原型谷胱甘肽对非酒精性脂肪肝大鼠模型治疗效果的研究

杨朝霞,代东伶,沈 薇 (重庆医科大学附属第二医院消化内科,重庆 400010)

提 要: 目的 比较虫草菌丝(CS,商品名金水宝)和还原型谷胱甘肽(GSH,商品名阿托莫兰)对实验性大鼠非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)的治疗效果,探讨其可能的分子机制。**方法** 高脂饮食建立大鼠NAFLD模型,分别给予CS和GSH进行干预。观察肝脏组织学变化,检测血清和肝组织TG、FFA变化和肝组织SOD、ATP含量。**结果** ①随着NAFLD造模的进行,大鼠肝组织广泛脂肪变性,炎性细胞浸润、坏死,局部纤维组织增生。血清和肝组织TG、FFA升高。肝SOD含量和ATP含量下降。②CS组肝组织脂肪变性明显减轻,仅有轻微炎性细胞浸润,未见坏死灶及纤维组织增生,血清和肝组织TG、FFA显著降低($P<0.05$);肝SOD含量和ATP含量也明显增加($P<0.01$)。③GSH组肝组织广泛脂肪变性,炎症细胞浸润,灶性及点状坏死,但是未见纤维组织增生;肝SOD含量显著增加($P<0.01$),但血清和肝组织TG、FFA和肝ATP含量均无明显变化($P>0.05$)。**结论** CS和GSH均对NAFLD有治疗效果,能阻止肝纤维化的发生,而在纠正脂代谢紊乱,阻止脂质在肝沉积,纠正肝细胞能量失衡方面,CS的作用更明显。

关键词: 非酒精性脂肪肝; 虫草菌丝; 还原型谷胱甘肽

中图法分类号: R282.71; R575.505; R977.4 **文献标识码**: A

Effect of cordyceps sinensis and reduced glutathione on experimental mouse model with non-alcoholic fatty liver disease

YANG Zhao-xia, DAI Dong-ling, SHEN Wei (Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To compare the therapeutic effects of cordyceps sinesis (CS) and reduced glutathione on experimental non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) rats and explore the possible molecular mechanisms. Methods After NAFLD rats were induced by high-fat diet and were treated by CS and reduced glutathione. The histopathologic changes of livers were evaluated. The levels of TG and FFA in serum and liver were measured. The levels of SOD and ATP in liver were measured too. Results (1) In the development of NAFLD, extensive adipose degeneration, inflammatory cell infiltration and necrosis, local fibrous tissue hyperplasia were found in the liver. The increase of TG, FFA in the serum and liver and decrease of SOD and ATP in the liver were seen. (2) In CS treated group, adipose degeneration had been alleviated with slightly inflammatory cells infiltration and no necrosis or fibrosis had been found. The concentrations of TG and FFA were decreased in the serum and liver, but SOD and ATP increased. (3) In glutathione treated group, adipose degeneration of liver and inflammatory cells infiltration remained obviously with focus or punctiform necrosis, but without fibrosis. The increase of SOD in liver was distinguished. No changes of TG, FFA, UCP-2 and ATP had been detected. Conclusion Both CS and reduced glutathione have therapeutic effects on NAFLD, by preventing the generation of liver fibrosis. CS has a better therapeutic effects on metabolic disturbance or accumulation of lipid and energy metabolic imbalance of liver cells.

Key words: non-alcoholic fatty liver; cordyceps sinensis; reduced glutathione

随着社会经济的发展,非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)已成为危害人类健康的三大肝病之一[1]。NAFLD疾病谱包括单纯性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)、脂肪性肝硬化3种主要类型。目前,NAFLD发病机制仍不十分清楚,尚无理想的治疗药

作者简介:杨朝霞(1971-),女,重庆市人,博士研究生,主治医师,主要从事脂肪肝方面的研究。电话:(023)63784554, E-mail: yangmeinu2003@yahoo.com.cn

通讯作者:沈 薇,电话:(023)63784554

收稿日期:2006-12-26;修回日期:2007-05-08

物。本研究选择了传统中医认为有强大保肝作用的虫草菌丝和目前临床常用的保肝药物还原性谷胱甘肽作为研究对象，观察其治疗 NAFLD 的效果并探讨可能的作用机制，从而筛选出治疗 NAFLD 更有效的药物。

1　材料与方法

1.1　动物模型的建立[1]

雌性 SD 大鼠 40 只，购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心，体质量（181.42 ± 12.05）g，正常喂养 1 周后按随机数字表法分为 2 大组：正常对照组 8 只，以普通饮食喂养；高脂饮食组 32 只，以 88% 普通饮食 + 10% 猪油 + 2% 胆固醇，自由饮水。实验开始后第 8 周末从高脂饮食组按随机数字表法抽取 8 只处死，作为模型对照组（单纯性脂肪肝组，简称 NAFL 组），剩余大鼠按随机数字法又分为病理对照组（NASH 组）、虫草菌丝组（CS 组）、还原型谷胱甘肽组（GSH 组）。从第 9 周开始，CS 组与 NASH 组分别用浓度为 33% 的虫草菌丝悬液和生理盐水，以 1.5 ml/100 g 每日灌胃，GSH 组给予 GSH（0.6 g/支），以 0.15 g/100 g 每日灌胃。于第 18 周末处死全部大鼠。

1.2　组织病理及免疫组化结果评价

肝脏切片甲醛固定，石蜡包埋，HE 染色并评价组织脂肪变性、炎症、坏死程度。两位病理科医师对切片染色结果按 Lee[2] 的标准进行盲法评分。

1.3　生化指标检测

血清和肝组织匀浆测外源性甘油三酯（TG）、游离脂肪酸（FFA）、超氧化物歧化酶（SOD），检测按试剂盒说明书操作。

1.4　肝组织 ATP 含量测定

采用荧光素酶法，荧光素-荧光素酶购自德国 Calbiochem 公司，标准 ATP 购自美国 Sigma 公司。

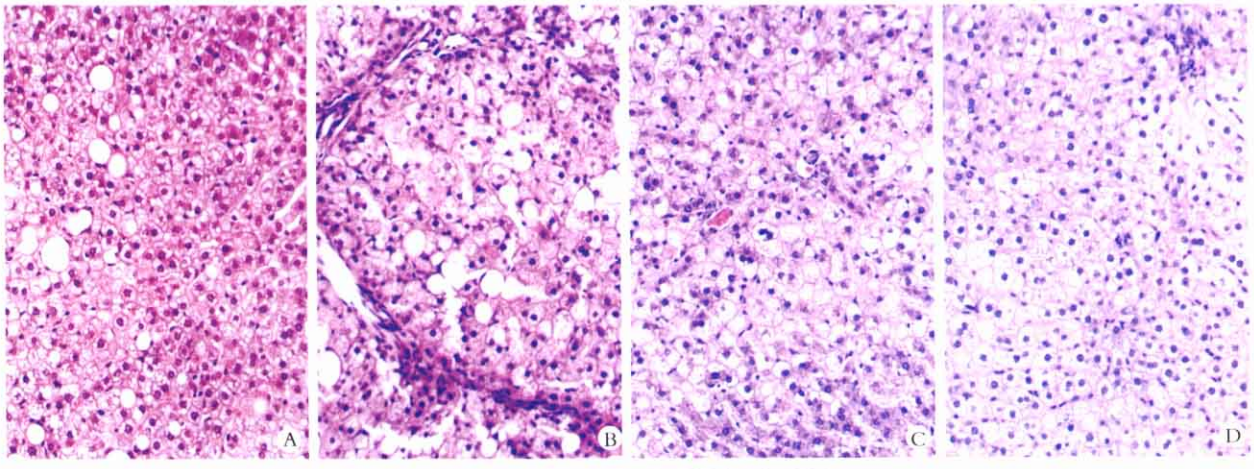
1.5　统计学处理

计量资料以 $x \pm s$ 表示，采用 SPSS 11.5 统计软件行单因素方差分析，计数资料用秩和检验。

2　结果

2.1　肝组织形态学的变化

NAFL 组肝组织虽发生广泛脂肪变性，但肝细胞基本正常，组织结构完整，符合单纯性脂肪肝的诊断标准[3]；NASH 组肝组织在脂肪变性的基础上出现炎性细胞浸润、坏死，局部纤维组织增生，形成假小叶，符合脂肪性肝炎、脂肪性肝纤维化的诊断标准[3]；CS 组脂肪变性明显轻于 NASH 组，仅有轻微的炎性细胞浸润，未见坏死灶及纤维组织增生；GSH 组发生广泛肝细胞脂肪变性，炎症细胞浸润、坏死，但是未见纤维组织增生，提示在同等持续高脂饮食条件下 CS 可以阻止脂质在肝细胞内进一步沉积，而 CSH 无此作用。两种药物均能有效抑制肝脏纤维化的发生（图 1）。



A：NAFL 组；B：NASH 组；C：GSH 组；D：CS 组

图 1　各组大鼠肝组织病理观察　（HE × 100）

2.2　机体脂质代谢的变化

随着高脂饮食喂养的时间延长，NAFL、NASH 组大鼠血清和肝脏 TG、FFA 逐渐升高，与正常对照组比较差异有统计学意义（$P < 0.05$）；CS 组明显低于 NASH 组（$P < 0.05$），而与 NAFL 组比较无显著性差异（$P > 0.05$）。CSH 组与 NASH 组比较无显著性差异（$P > 0.05$）。提示 CS 不仅能防治高脂饮食引起的血脂异常，还能抑制脂质在肝细胞内的沉积，而 GSH 无此作用。这与组织病理形态学改变一致（表 1）。

2.3　肝脏 SOD 含量的变化

随着造模的进行，大鼠肝组织 SOD 含量逐渐降低。用 CS 和 GSH 干预后，均可见肝组织 SOD 含量较 NASH 组明显升高（$P < 0.01$），说明两者均有较强的抗氧化作用。而 GSH 的这一作用更为强大，补充 GSH 后 SOD 含量接近正常对照组水平（$P > 0.05$）（表 2）。

表 1　各组大鼠血清和肝脏 TG、FFA 含量的变化（$x \pm s$）

组别	血 TG（mmol/L）	血 FFA（μmol/L）	肝 TG（mmol/L）	肝 FFA（μmol/L）
正常对照组	1.06 ± 0.44	388.85 ± 62.68	2.32 ± 0.52	85.73 ± 14.16
NAFL 组	3.67 ± 1.14[a]	670.42 ± 49.06[a]	5.00 ± 1.15[a]	170.95 ± 16.82[a]
NASH 组	4.87 ± 0.93[a]	823.92 ± 68.95[a]	6.64 ± 0.89[a]	206.07 ± 30.91[a]
CS 组	2.09 ± 0.78[b]	653.72 ± 47.36[b]	3.98 ± 1.13[b]	185.39 ± 5.02[b]
CSH 组	4.67 ± 0.90	803.25 ± 49.64	6.02 ± 0.11	202.19 ± 20.58

a：$P < 0.05$，与正常对照组比较；b：$P < 0.05$，与 NASH 组比较

表2 各组大鼠肝脏组织 SOD 及 ATP 含量变化($\bar{x} \pm s$)

组别	SOD(U/mg)	ATP(μmol/L)
正常对照组	13.99 ± 2.37^{b}	5.47 ± 0.82^{b}
NAFL 组	12.17 ± 1.60^{b}	5.22 ± 0.78^{b}
NASH 组	6.93 ± 0.98	2.35 ± 0.56^{c}
CS 组	8.13 ± 0.69^{ab}	3.45 ± 0.66^{ab}
GSH 组	13.53 ± 2.47^{ab}	2.85 ± 0.56^{c}

a: $P < 0.01$, 与 NAFL 组比较; b: $P < 0.01$, 与 NASH 组比较; c: $P < 0.05$, 与正常对照组比较

2.4 肝脏 ATP 含量的变化

与正常对照组比较,NAFL 组 ATP 含量无显著变化($P > 0.05$),NASH 组明显下降($P < 0.01$)。CS 组显著高于 NASH 组($P < 0.01$)。GSH 组略高于 NASH 组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。说明伴随着脂肪肝的发展,肝组织 ATP 含量逐渐降低,能量代谢与脂肪肝的病变程度相平行。CS 在一定程度上能调节肝脏的能量平衡,而 GSH 作用不明显(表2)。

3 讨论

有研究显示,NAFLD 不仅与失代偿期肝硬化、肝功能衰竭、原发性肝癌的发生密切相关,而且与动脉粥样硬化性心脑血管事件的高发密切相关[4-7]。为此,必需加强 NAFLD 的有效防治,但至今尚缺乏治疗 NAFLD 的特效药物[8]。目前,虽然 NAFLD 的发病机制仍不清楚,但是胰岛素抵抗和氧应激在发病中起关键作用已得到大多数学者的认同。活性氧(ROS)在单纯性脂肪肝向 NASH 的转变过程中起关键作用[9,10]。本研究采用高脂饮食造模,随着 TG 和 FFA 的增加,肝细胞脂质摄取增多,终致 TG、FFA 在细胞内蓄积,成功复制了实验大鼠非酒精性脂肪肝模型。正常情况下,肝脏脂质代谢处于平衡状态。当肝细胞脂质供给过多,输入大于输出时,则引起脂质在细胞内的蓄积,进而发生氧化应激并刺激机体释放细胞因子,导致脂肪肝的发生。由此可见,脂质代谢紊乱是 NAFLD 发生的始动环节,肝细胞脂肪变性是脂质过氧化的物质基础[6,9]。

冬虫夏草具有保肝、降脂、抗氧化等功效[11],人工培养的冬虫夏草其菌丝体称为 CS,其具有和天然冬虫夏草相同的功能,运用其治疗脂肪肝符合脂肪肝多因素发病,多靶点治疗的原则。GSH 是体内重要的抗氧化物之一,是由谷氨酸、胱氨酸、甘氨酸组成的三肽,具有强大的抗氧化活性,能减轻氧化应激,减少 ROS 生成,对维持体内的氧化还原平衡至关重要[9]。两者在 NAFLD 中的作用效果和环节还有待进一步研究,特别是 CS 在这方面的应用。从本研究的结果来看,组织学证据显示,两种药物均有明显阻止肝纤维化的作用,且两种药物治疗后,大鼠肝组织 SOD 水平明显增加,显示两者均具有强大的抗氧化作用;提示两种药物均能通过减轻氧化应激,减少 ROS 的产生,延缓和阻止 NAFLD 的进一步发展,有较好的治疗效果。在我们的后期研究中还显示两者可以通过抑制肝细胞凋亡来发挥治疗作用。本研究还表明,CS 显示出具有阻止脂质在肝细胞内进一步沉积、改善 NAFLD 时肝脏的能量失衡的作用,而 GSH 在这方面的作用不明显。因为现有保肝药物不能减少肝内脂肪沉积,故 CS 这一效应的发现是令人鼓舞的。从我们的前期研究来看,CS 的这一作用可能是通过调节解偶联蛋白 2(UCP2)的适度表达来实现的[12]。

NAFLD 的治疗一直是一个难题,本研究中 CS 良好的表现虽然提示其在治疗 NAFLD 中是很有应用前景的药物,但是由于造模时间有限,其在更长时间的高脂所致 NAFLD 中的治疗效果如何,是否仍优于 GSH 等问题有待进一步证实。同时,从 NAFLD 的多种致病途径出发,治疗 NAFLD 还是主张联合用药。

参考文献:

[1] 戴 宁, 曾民德, 李继强, 等. 复方中药抑制非酒精性脂肪肝肝细胞色素 P450 Ⅱ E1 表达的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2000, 20(6): 453-455.

[2] Lee R G. Nonalcoholic steatohepatitis: Definitions and pathogenesis [J]. Gastroenterol and Hepatol, 2002, 17(Suppl 1): S377-S384.

[3] 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊断标准[J]. 中华肝脏病杂志, 2003, 11(2): 71.

[4] Targher G, Bertolini L, Poli F, *et al*. Nonalcoholic fatty liver disease and risk of future cardiovascular events among type 2 diabetic patients [J]. Diabetes, 2005, 54(12): 3541-3546.

[5] Santoliquido A, Di-Campli C, Miele L, *et al*. Hepatic steatosis and vascular disease[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2005, 9(5): 269-271.

[6] 田晨光, 李青菊, 李鹏诺, 等. 非酒精性脂肪肝患者 C 反应蛋白和胰岛素抵抗观察[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2005, 40(4): 656-658.

[7] Yatsuji S, Hashimoto E. Natural history of Japanese patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), especially non-alcoholic steatohepatitis (NASH) patients with hepatocellular carcinoma (HCC)[J]. Nippon Rinsho, 2006, 64(6): 1173-1179.

[8] Portincasa P, Grattagliano I, Palmieri V O, *et al*. Current pharmacological treatment of nonalcoholic fatty liver[J]. Curr Med Chem, 2006, 13(24): 2889-2900.

[9] Videla L A, Rodrigo R, Araya J, *et al*. Insulin resistance and oxidative stress interdependency in non-alcoholic fatty liver disease[J]. Trends Mol Med, 2006, 12(12): 555-558.

[10] Baffy G, Zhang C Y, Glickman J N, *et al*. Obesity-related fatty liver is unchanged in mice deficient for mitochondrial uncoupling protein 2 [J]. Hepatology, 2002, 35(4): 753-761.

[11] 李 婧, 姜漠英. 虫草菌素(cordycepin)研究进展[J]. 美国中华健康卫生杂志, 2005, 8(3): 27-30.

[12] 杨朝霞, 沈 薇, 代东伶. 虫草菌丝对实验性大鼠非酒精性脂肪肝的疗效观察及其分子机制探讨[J]. 重庆医学, 2006, 35(18): 1671-1673.

(编辑 王小宾)