文章编号:1000-5404(2008)11-1055-03

论著

电针阻断胰岛素抵抗及过氧化反应治疗非酒精性脂肪肝的实验研究

曾志华[1],曾明慧[2],冯雯琪[1],卓廉士[1] (重庆医科大学:[1]中医药学院,重庆 400050,[2]附属第一医院口腔正畸科,重庆 400016)

摘 要:目的 探讨电针阻断胰岛素抵抗及过氧化反应治疗非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease,NAFLD)的机制。**方法** SD 大鼠 33 只按随机抽签法分组:正常对照组(11 只),造模组(22 只)。正常组以普通饲料喂养,造模组以高脂饲料喂养,8 周后处死 3 只(正常对照组 1 只,造模组 2 只),验证造模成功后将造模组分为 NAFLD 模型组(10 只)和电针治疗组(10 只),后者施以电针治疗。12 周末处死所有大鼠检测血糖(FBG)、血清胰岛素(FINS)、血清游离脂肪酸(FFA)、肝内丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、谷胱甘肽(GSH)含量变化及肝组织病理学。**结果** 与模型组比较,电针组 FBG、FINS、FFA 降低($P<0.05$);肝内 MDA、TG、TC 显著下降($P<0.01$);SOD、GSH 活性升高($P<0.01$),肝组织脂肪变性和炎性损伤得以改善。**结论** 电针通过阻止胰岛素抵抗和过氧化反应之间的恶性循环治疗 NAFLD。

关键词:非酒精性脂肪肝;胰岛素抵抗;氧化抗氧化;针灸治疗
中图法分类号:R-332;R246;R575.505 **文献标识码:**A

Electroacupuncture treats rat non-alcoholic fatty liver by blocking insulin resistance and peroxidation

ZENG Zhi-hua[1], ZENG Ming-hui[2], FENG Wen-qi[1], ZHUO Lian-shi[1] ([1]School of Traditional Chinese Medicine,[2]Department of Orthodontics, The First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400050, China)

Abstract: **Objective** To investigate the mechanism of electroacupuncture in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Methods** Thirty-three male SD rats were randomized into 2 groups: normal control group ($n=11$, fed with normal food) and experimental rats ($n=23$, fed with high-fat food). Eight weeks later, 3 rats were randomly selected from the 2 groups respectively and killed to undergo pathological examination of the liver. When the establishment of experimental rats was confirmed, the remaining 20 experimental rats were divided into 2 equal subgroups: NAFLD group (fed continuously with high-fat food) and electroacupuncture treatment group (fed continuously with high-fat food and received the treatment 15 min per day, once a day for 4 weeks). Then all rats were killed to detect the serum levels of fasting blood glucose (FBG), fasting insulin (FINS) and free fatty acids (FFA), liver contents of malondialdehyde (MDA), glycerin tripalmitate (TG) and total cholesterol (TC), and the activities of liver superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH). Liver pathological changes was examined. **Results** Compared with NAFLD group, electroacupuncture reduced the serum levels of FBG, FINS and FFA ($P<0.05$), the liver contents of MDA, TG and TC ($P<0.01$), and increased the activities of SOD and GSH ($P<0.01$). It also attenuated the liver fatty degeneration and inflammatory injury. **Conclusion** Electroacupuncture can treat NAFLD by blocking the vicious circle of insulin resistance and perooxidation.

Key words: non-alcoholic fatty liver disease; insulin resistance; oxidation antioxidation; acupuncture

非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease,NAFLD)是指以肝小叶内弥漫性肝细胞脂肪变性大于 1/3(每单位视野)为病理特征的临床综合征[1]。近年来 NAFLD 发病率呈上升趋势。研究表明,NAFLD 不再是一种良性及静止的病变,该病具有隐匿地向肝纤维化、肝硬化发展的特点[2]。因此 NAFLD 的防治工作受到国际国内的广泛重视。据近年临床报道,针刺治疗 NAFLD 确有疗效[3],但却鲜有实验方面的研究报道。有鉴于此,本研究建立 NAFLD 大鼠模型,通过

作者简介:曾志华,女,重庆市人,硕士研究生,医师,主要从事电针治疗脂肪肝病方面的研究。电话:(023)86191197,E-mail:zhihua332211@163.com
通信作者:卓廉士,电话:(023)67038391,E-mail:zhuo1828@sina.com
收稿日期:2007-10-28 修回日期:2008-04-07

电针治疗，从而探讨针刺阻断胰岛素抵抗及过氧化反应治疗 NAFLD 的机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

游离脂肪酸、血糖试剂购自南京生物建成有限公司；胰岛素试剂购自北方生物技术研究所；丙二醛（MDA）、超氧化物歧化酶（SOD）、谷胱甘肽（GSH）、甘油三酯（TG）、总胆固醇（TC）试剂盒购自南京建成生物工程研究所，按试剂盒说明书操作方法。低温离心机、分光光度计、生物显微镜、加液器等设备以及生化分析、图像分析由重庆医科大学基础医学院提供。

1.2 实验动物分组与造模

雄性 SD 大鼠 33 只（购于重庆医科大学实验动物中心），体质量（170 ± 20）mg，适应性饲养 3 d 后，标记后按随机抽签法分为正常对照组（11 只）和造模组（22 只），并将后者造成 NAFLD 模型大鼠。造模采用陈世清造模法[4]，即喂养由 10% 猪油、2% 胆固醇和 88% 普通饲料混合而成的高脂饲料。8 周末，造模组大鼠体质量增加、形体肥胖、皮毛发黄、蓬乱不顺滑。断颈处死正常对照组大鼠 1 只和造模组大鼠 2 只，取出大鼠肝脏，以验明造模情况：肉眼可见造模组大鼠肝脏体积变大，边缘钝，颜色变黄，切面有油腻感。取肝左叶，10% 甲醛固定，常规石蜡包埋、切片，苏木精-伊红染色，光镜下观察，计算机彩色图像系统成相。光镜下可见肝细胞胞浆内有大量脂肪空泡呈透明状，细胞核被脂肪空泡挤到肝细胞边缘。病理证实脂肪肝已形成。

1.3 电针治疗方法

将造模成功的实验性肥胖大鼠按随机抽签法分为 2 组：一组不做任何治疗，为 NAFLD 模型组（$n = 10$）；一组给予电针治疗，为电针组（$n = 10$）。根据化痰利湿、活血化瘀的治则，取“丰隆”、“足三里”、“太冲”、“三阴交”穴。针刺方法：置大鼠于“大鼠固定器中”（自制）中，取一侧之上述诸穴，用 32 号 1 寸毫针，分别刺入 1 ~ 7 mm 深度，然后接通电针综合治疗仪（重庆医疗器械厂制造），采用频率 10 Hz，强度 1.5 V 连续波，以下肢轻微抖动为宜。每天 1 次，每次 15 min 左右，连续“治疗”4 周，左右侧穴间日轮换。治疗期间，模型组大鼠亦将分别置入固定器中 15 min，连续 4 周。大鼠腧穴据《实验针灸学》定位[5]。

1.4 检测项目和方法

①空腹胰岛素（FINS）：放免法测定，计算胰岛素抵抗指数（HOMA-IR）=（空腹血糖 × FINS）/22.5；操作严格按试剂盒说明书检测。②空腹血糖（FBG）、游离脂肪酸（FFA）：采用比色法，严格按照试剂盒说明书检测。③肝指数：称量肝质量与体质量，计算肝/体比值，即为肝指数。④肝脏生化指标检测：取大鼠之肝右叶，4 ℃下制成 10% 的生理盐水肝匀浆液，3 000 r/min，10 min 离心取上清液，按试剂盒说明书操作测定 MDA、SOD、GSH、TC 和 TG。⑤肝组织病理：取肝左叶，10% 甲醛固定，常规石蜡包埋、切片，苏木精-伊红染色，光镜下观察。

1.5 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 12.0 统计软件，多组间比较行单因素方差分析，组间两两比较行 q 检验。

2 结果

2.1 肝脏病理学改变

至 12 周末，肉眼观正常组大鼠肝色鲜红，边缘锐利；模型组体积增大，颜色变黄，表面及侧面呈黄红色斑马状，切面有油腻感。光镜下：正常组肝组织肝小叶结构完整，无变性坏死炎细胞浸润及纤维组织增生，仅个别细胞内有少量脂滴（图 1A）；模型组大鼠肝组织出现不同程度的弥漫性脂肪变性，并伴有肝细胞变性坏死，炎症细胞浸润，未见肝纤维化和肝硬化形成（图 1B）；电针组广泛脂肪变性，但是以小泡脂肪变性为主，未见坏死及纤维组织增生（图 1C）。电针组经过治疗后肝组织脂肪变程度较模型组明显下降，肝细胞结构趋于正常。

2.2 胰岛素抵抗指数

12 周末，模型组 FBG、FINS、HOMA-IR 均显著高于正常组（$P < 0.05$）；电针组 FBG、FINS、HOMA-IR 均显著低于模型组（$P < 0.05$，表 1）。

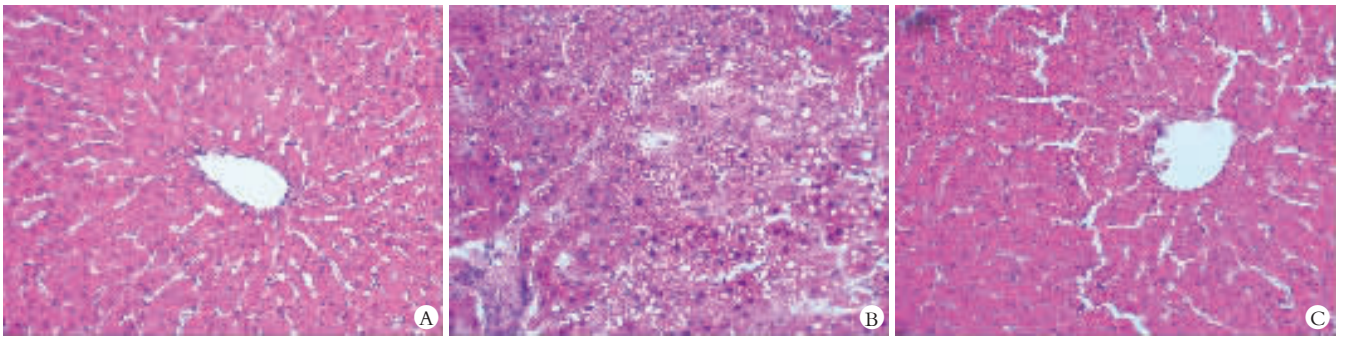
表 1 各组大鼠 FBG、FINS、HOMA-IR 的变化（$n = 10$）

组别	FBG（mmol/L）	FINS（mIU/L）	HOMA-IR
正常组	3.95 ± 0.24	38.20 ± 3.49	6.73 ± 1.01
模型组	4.44 ± 0.24[a]	61.40 ± 4.73[a]	16.23 ± 2.34[a]
电针组	5.93 ± 0.39[b]	42.77 ± 3.02[b]	8.34 ± 1.11[b]

a：$P < 0.05$，与正常组比较；b：$P < 0.05$，与模型组比较

2.3 FFA、大鼠体质量及肝指数

至 12 周末，模型组 FFA 水平、体质量、肝指数均显著高于正常组（$P < 0.05$），电针组 FFA 水平、体质量、肝指数均显著低于模型组（$P < 0.05$，表 2）。



A：正常组；B：模型组；C：电针组

图 1 各组肝组织病理学观察（HE × 400）

表 2　各组大鼠体质量、肝指数及肝血浆 FFA 含量的变化（$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

组别	体质量（g）	肝指数（$\times10^{-3}$）	FFA（μmoL/L）
正常组	432 ± 26	26.7 ± 2.8	398.10 ± 58.87
模型组	482 ± 47[a]	49.8 ± 9.2[a]	566.67 ± 95.50[a]
电针组	460 ± 45[b]	35.5 ± 2.5[b]	467.89 ± 60.25[b]

a：$P<0.05$，与正常组比较；b：$P<0.05$，与模型组比较

2.4　肝匀浆 TC、TG 含量

模型组 TG、TC 含量显著高于正常组（$P<0.01$），电针组 TG、TC 含量显著低于模型组（$P<0.01$，表 3）。

表 3　各组大鼠肝内 TC、TG 含量的变化（$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

组别	TC（mmol/L）	TG（mg/g）
正常组	0.820 ± 0.008	18.817 ± 0.118
模型组	24.625 ± 0.052[a]	45.141 ± 0.109[a]
电针组	0.785 ± 0.066[b]	18.995 ± 0.176[b]

a：$P<0.01$，与正常组比较；b：$P<0.01$，与模型组比较

2.5　肝匀浆 SOD、MDA、GSH 含量

模型组 MDA 含量显著高于正常组（$P<0.01$），电针组 SOD、GSH 含量显著高于模型组（$P<0.01$，表 4）。

表 4　各组大鼠肝内 SOD、MDA、GSH 含量的变化（$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

组别	SOD（U/mg）	MDA（nmol/mg）	GSH（mg/g）
正常组	216.319 ± 3.901	0.474 ± 0.048	52.301 ± 0.844
模型组	95.812 ± 3.906[a]	3.374 ± 0.066[a]	17.979 ± 0.397[a]
电针组	193.381 ± 3.923[b]	0.648 ± 0.064[b]	51.552 ± 0.345[b]

a：$P<0.01$，与正常组比较；b：$P<0.01$，与模型组比较

3　讨论

NAFLD 的确切发病机制目前尚不清楚，但“二次打击学说”较为流行。该学说认为胰岛素抵抗（IR）导致胰岛素信号转导途径改变，进一步引起脂肪代谢失衡，肝脏内脂肪积聚，这是脂肪肝的主要启动因素，成为 NAFLD 发病过程中的一次打击。而在肝脏脂肪沉积基础上所发生的氧化应激和脂质过氧化（LP）则形成二次打击，是导致 NAFLD 的关键[6]。脂肪肝发生后，需经 LP 这一生化和结构破坏性反应的打击才能导致肝脏发生炎症、坏死和纤维化，最终导致非酒精性肝病的发生[7]。LP 反应可干扰肝内脂类代谢，使脂质沉积增多，TC、TG 增加，而脂质沉积的增多又能加重 LP 反应，形成二次打击之间的恶性循环[8]。

本实验结果表明，与模型组相比较，电针组大鼠空腹血糖、血浆胰岛素均降低，大鼠体质量、肝指数、FFA 胰岛素抵抗指数也显著性下降，大鼠肝内 TC、TG、MDA 也有明显降低，且这些指标在两组中差异有统计学意义（$P<0.05$）。从病理组织学观察，通过电针治疗后，大鼠非酒精性脂肪肝肝组织小叶结构恢复，肝细胞条索较清晰，肝细胞内仅见少量小的脂肪空泡，肝脂肪变性显著减轻。以上研究结果证实，针刺可以阻断胰岛素抵抗及过氧化反应而使大鼠非酒精性脂肪肝获得明显的疗效。虽然其机制还不太清楚，但推测可能是针刺提高了胰岛素的敏感性，进一步改善了胰岛素抵抗状态，使皮下脂肪分解减慢，血浆 FFA 水平降低，从而减少肝细胞中 TG 合成，减轻第一次打击，并减轻在第一次打击基础上产生的 LP 反应，增强机体抗氧化能力，从而减轻肝脏第二次打击损伤，明显降低 LP 反应造成的肝脏脂质沉积，阻止二次打击之间的恶性循环，使肝组织脂肪变性和炎性损伤得以明显改善。

传统医学认为，NAFLD 相当于“痰浊”、“肥气”等，多因过食肥甘厚味，情志不舒，致使肝郁脾虚，气滞湿阻，痰浊瘀血互结，痹阻肝脏脉络而成。故以舒肝健脾、化痰利湿、化瘀降浊为其治疗原则。太冲乃足厥阴肝经的原穴，足三里乃足阳明胃经的合穴，二穴能调理肝脾气机；丰隆为祛痰要穴，用以化湿、除痰、和胃醒脾；三阴交为肝脾肾三经交汇穴，可以增强调理肝脾之功，并能补肾益脾。诸穴合用，能奏行气活血，化瘀除痰之功。有研究表明针刺足三里、丰隆可以改善血液流变学，降低 TC、TG[9,10]，临床上常选用上述诸穴治疗 NAFLD。本实验也是通过针刺“丰隆”、“足三里”、“太冲”、“三阴交”穴，改善胰岛素抵抗状态及减轻脂质过氧化反应损伤，达到“治疗”大鼠 NAFLD 的目的。

总之，本实验结果显示通过针刺可以改善胰岛素抵抗状态，减轻脂质过氧化反应，使大鼠非酒精性脂肪肝获得了较好的疗效，此研究结果对应用针刺治疗非酒精性脂肪肝有一定的参考价值。

参考文献：

[1] 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.

[2] Angulo P，Lindor K D. Nonalcoholic fatty Liver disease[J]. J Gastroenterol Hepatol，2002，17(Suppl)：S918－S920.

[3] 李　怡. 针灸治疗高脂血症近况[J]. 四川中医，2002，20(3)：23－24.

[4] 陈世清，刘　杞，孙　航，等. 脂肪肝胰岛素抵抗大鼠模型的建立[J]. 中华肝脏病杂志，2005，13(2)：105－108.

[5] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 北京：中国中医药出版社，2003：314.

[6] Angulo P，Lindor K D. Non-alcoholic fatty liver disease[J]. J Gastroenterol Hepatol，2002，17(Suppl)：S186－S190.

[7] 杨朝霞，代东伶，沈　薇. 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[J]. 第三军医大学学报，2007，29(22)：2176－2178.

[8] Samuel V T，Liu Z X，Qu X，*et al*. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease[J]. J Biol Chem，2004，279(31)：32345－32353.

[9] 田　虹，金丽敏. 电针艾灸治疗单纯肥胖性脂肪肝 30 例临床观察[J]. 针灸临床杂志，2004，20(12)：32－33.

[10] 明玉华，周家俊. 针刺治疗脂肪肝 31 例[J]. 中西医结合肝病杂志，2001，11(5)：311.

（编辑　王小寒）