文章编号:1000-5404(2012)07-0609-04

论著

双葛解醒丸对酒精性脂肪肝大鼠炎症及脂质代谢的影响

魏文茂,朱丽丽,罗华丽,蒲晓东 (400016 重庆,重庆医科大学中医药学院)

[摘要] **目的** 探讨双葛解醒丸对酒精性脂肪肝模型的治疗效果。**方法** 将65只SD大鼠分为空白对照组(11只)和酒精性脂肪肝(alcoholic fatty liver, AFL)组(54只),后者给予白酒灌胃建立AFL模型。8周后,处死其中5只(空白对照组1只,AFL组4只)病理组织学检查以验证其造模成功,然后将AFL组进一步分为模型对照组、双葛解醒丸高剂量组、双葛解醒丸中剂量、双葛解醒丸低剂量组和海王金樽治疗组。治疗4周末处死所以大鼠,检测血清肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)、白介素-6(interleukin-6,IL-6)、瘦素(leptin,LEP)、脂联素(adiponectin,ADP)和游离脂肪酸(free fatty acid,FFA)。同时对肝脏进行病理切片组织学检查。**结果** 双葛解醒丸高剂量组大鼠血清IL-6[(62.49±34.16)pg/ml]、TNF-α[(3.25±0.20)ng/ml]、FFA[(572.16±45.37)μmol/L]和LEP[(1.89±0.21)ng/ml]明显低于模型对照组与海王金樽治疗组($P<0.01$),血清ADP[(3.05±0.27)mg/ml]明显高于模型对照组[(2.17±0.37)mg/ml]与海王金樽治疗组[(2.69±0.32)mg/ml,$P<0.01$)],双葛解醒丸对大鼠肝脏的脂肪变性及炎症有明显改善。**结论** 双葛解醒丸对酒精性脂肪肝有治疗作用。

[关键词] 酒精性脂肪肝;肿瘤坏死因子-α;白介素-6;瘦素;脂联素;游离脂肪酸
[中图法分类号] R289.5; R575.5; Q591.5 [文献标志码] A

Effects of Shuangge Jiecheng Pill on inflammatory factors and lipid metabolism in alcoholic fatty liver rats

Wei Wenmao, Zhu Lili, Luo Huali, Pu Xiaodong (School of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 400050, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the efficiency of Shuangge Jiecheng Pill on the treatment of alcoholic fatty liver in the rat model. **Methods** A total of 65 SD rats were randomly divided into normal control group ($n=11$) and model group ($n=54$). The rat model of alcoholic fatty liver disease was induced by Chinese liquor (56% Hongxing wine) by intragastric administration. One rat from normal control and 4 from the model group were used for model identification. The rest 50 rats of model group were further divided into Haiwang group (HW group, $n=10$, gastrically treated by Haiwang Jinzun Pill at 1.5 g/(kg·d), twice per day for 4 weeks), and high-, middle- and low-dosed Shuangge Jiecheng Pill groups [HD, MD, and LD groups, treated with the pill at 20, 10 and 5 g/(kg·d), treated as HW group]. At the end of treatment, all rats were killed and their liver was taken for pathological changes. The serum levels of TNF-α, IL-6, leptin (LEP), adiponectin (ADP) and free fatty acid (FFA) in the rats of all groups were measured and compared. **Results** High-dosed Shuangge Jiecheng Pill resulted in obvious decrease in serum levels of IL-6[(62.49±34.16)pg/ml], TNF-α[(3.25±0.20)ng/ml], FFA[(572.16±45.37)μmol/L] and LEP[(1.89±0.21)ng/ml] when compared with those of normal control and HW group ($P<0.01$), and significant increase in ADP[(3.05±0.27)mg/ml] compared with that of normal control[(2.17±0.37)mg/ml] and HW group[(2.69±0.32)mg/ml,$P<0.01$]. Pathological observation displayed obvious improvement in liver fatty changes and infliammation in Shuangge Jiecheng Pill treatment groups. **Conclusion** Shuangge Jiecheng Pill exerts curative effect on alcoholic fatty liver disease in rats.

[**Key words**] alcoholic fatty liver; tumor necrosis factor-α; IL-6; leptin; adiponectin; free fatty acid

Supported by the Project of Science and Technology Committee of Jiulongpo District of Chongqing(201044). Corresponding author: Pu Xiaodong, E-mail: pxd369@yahoo.com.cn

[基金项目] 重庆市九龙坡区科委资助项目(201044)
[通信作者] 蒲晓东, E-mail:pxd369@yahoo.com.cn

近年来我国酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)发病率逐年上升,酒精成为了继病毒性肝炎后导致肝损害的第二大病因,酒精性脂肪肝(alcoholic fatty liver, AFL)是ALD的早期阶段,其发展为肝硬化的危险性较单纯性脂肪肝高[1],乙醇对肝脏有明显的毒性作用,重度饮酒者中80%以上有一定程度的脂肪肝,因此研究酒精性脂肪肝防治具有重要意义。迄今为止,现代医学对本病尚无特异性的治疗方法,对其治疗效果不佳,且副作用较大,但传统医学通过辨证论治治疗有其独特的疗效。双葛解醒丸是一种新开发的中药复方制剂,本研究采用56%的酒精灌胃建立酒精性脂肪肝的大鼠模型,通过检测血清肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)、瘦素(leptin, LEP)、脂联素(adiponectin, ADP)和游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)的表达水平,来探讨双葛解醒丸对酒精性脂肪肝大鼠肝脏损伤保护效应的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD大鼠65只,雌雄各半,清洁级,体质量(170±20)g由重庆医科大学实验动物中心提供,饲养于重庆医科大学实验动物中心SPF级实验室。

1.2 主要试剂及器材

56°红星二锅头为市售(北京酿造总厂生产);海王金樽片为市售(1.0 g/片,深圳市海王健康科技发展有限公司,TNF-α、IL-6放免分析测定试剂盒,ADP试剂盒、LEP试剂盒、FFA试剂盒均购自南京建成生物有限公司。双葛解醒丸饮片(由重庆市群康大药房提供,由重庆医科大学中医药实验教学中心中药实验室制备成1 g/ml的提取液);UNICO7200分光光度计(龙尼柯上海仪器有限公司);HH-4恒温水浴箱(常州国华电器有限公司);80-2型低速离心机(上海手术器械厂);100 ℃水浴箱(常州国华电器有限公司);赛多利斯BS110S电子秤(德国赛多利斯公司)。

1.3 酒精性脂肪肝模型的建立

取大鼠65只,分为2组,空白对照组11只,每日灌胃10 ml蒸馏水,普通饲料喂养;AFL组(54只),每日灌胃52°白酒10 ml/kg灌胃,每日2次,连续8周,普通饲料喂养。8周后,取空白对照组1只和AFL组4只大鼠处死病理切片证实脂肪肝已形成。将酒精肝模型50只分为模型对照组、双葛解醒丸高剂量组(双葛高剂量组)、双葛解醒丸中剂量(双葛中剂量组)、双葛解醒丸低剂量组(双葛低剂量组)和海王金樽组(海王组),根据文献[2]制定,双葛高剂量组灌胃双葛解醒丸20 g/(kg·d),双葛中剂量组灌胃双葛解醒丸10 g/(kg·d),双葛低剂量组灌胃双葛解醒丸5 g/(kg·d),海王组灌胃海王金樽片1.5 g/(kg·d)灌胃,分别每日灌胃2次,空白对照组灌10 ml蒸馏水持续4周。

1.4 标本采集

治疗4周末,大鼠禁食24 h后称体质量,用10%水合氯醛麻醉,心脏穿刺采血后迅速取出肝脏,每只取肝左叶3块,置于10%的甲醛中保存,用于病理切片。所采集到血液静置于清洁塑料离心管中,在低温离心机上3 000 r/min离心后,常规收集血清置于-80 ℃冰箱保存待测。

1.5 检测项目和方法

1.5.1 肝指数检测 称肝质量和体质量,计算肝质量/体质量的比值,即为肝指数。

1.5.2 观察一般状态 包括大鼠的精神状态,活动情况,皮毛光泽度及肝脏质量、外观、形状、色泽和质地。

1.5.3 FFA的测定 取其血清采用比色法测定上述指标,操作严格按照试剂说明书进行。

1.5.4 血清ADP含量测定 酶联免疫法,操作严格按照试剂说明书进行。

1.5.5 血清TNF-α、IL-6和LEP含量的测定 采用放射免疫法,操作严格按照试剂说明书进行。

1.5.6 病理学检测 取肝脏左叶相同部位大小两块肝组织放入10%的甲醛中固定,常规石蜡包埋、切片、HE染色和光镜下观察。

1.6 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 12.0统计软件,组间比较行单因素方差分析中的SNK法。

2 结果

2.1 双葛解醒丸对肝指数和体质量的影响

实验期间,除空白对照组外,各组体质量都有降低,肝指数都有增加,其中模型对照组较空白对照组体质量下降明显,肝指数较空白对照组升高明显($P<0.01$);与模型对照组比较,治疗各组体质量都有所增加,肝指数都有不同程度的降低($P<0.05$, $P<0.01$);双葛高剂量组较海王组体质量增加和肝指数下降更为明显($P<0.01$)。见表1。

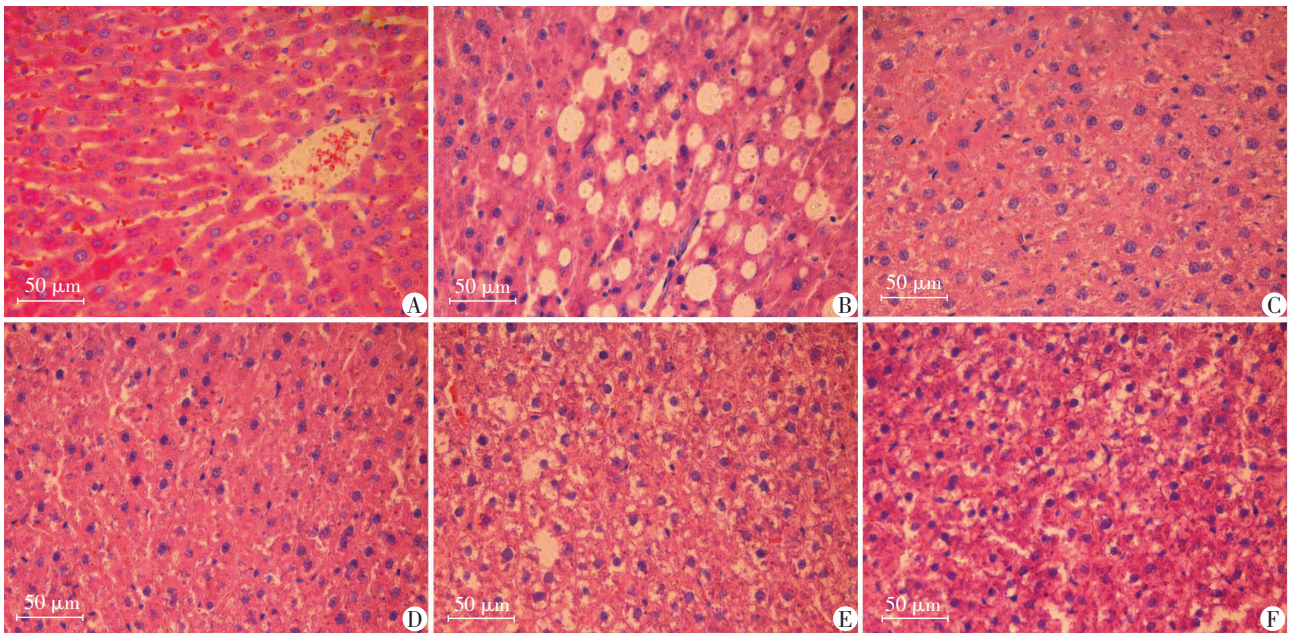
表1 双葛解醒丸对肝指数和体质量的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	体质量(g)	肝指数
空白对照组	10	247.5±16.8	4.03±0.11
模型对照组	10	186.8±17.0[a]	6.71±0.29[a]
双葛高剂量组	10	234.2±25.5[b]	4.74±0.25[b]
双葛中剂量组	10	211.9±13.6[c]	5.16±0.16[c]
双葛低剂量组	10	198.0±19.9[c]	5.27±0.30[c]
海王组	10	218.3±13.5[cd]	5.17±0.24[cd]

a:$P<0.01$,与空白对照组比较;b:$P<0.01$,c:$P<0.05$,与模型对照组比较;d:$P<0.01$,与双葛高剂量组比较

2.2 肝组织病理改变

实验中,模型对照组大鼠形体瘦小、体质量减少、皮毛发黄无光泽,光镜下可见空白对照组大鼠肝小叶结构完整,无变性坏死炎细胞浸润及纤维组织增生,肝细胞排列紧密成条索状,仅有少量脂滴,然而其模型对照组肝细胞质中度至重度的肝细胞脂肪变性,大量肝细胞肿胀水肿,细胞质内的脂滴多为大泡型,偶有点状坏死,细胞核被脂肪空泡挤到肝细胞,经过治疗后,双葛高剂量组肝细胞脂肪样变性较模型对照组明显减轻。双葛中剂量组、双葛低剂量组和海王组也有不同程度的减轻。见图1。



A:正常对照组;B:模型对照组;C:双葛高剂量组; D:双葛中剂量组; E:双葛低剂量组;F:海王组

图 1　光镜观察各组肝细胞病理变化　(HE)

2.3　双葛解醒丸对大鼠血清 TNF-α、IL-6 的影响

模型对照组大鼠血清 TNF-α 、IL-6 显著高于空白对照组($P<0.01$),双葛治疗组大鼠血清 TNF-α、IL-6 明显低于模型对照组($P<0.05$,$P<0.01$),双葛高剂量组大鼠血清 TNF-α、IL-6 明显低于海王组($P<0.01$)。见表 2。

表 2　双葛解醒丸对大鼠血清 TNF-α、IL-6 的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	TNF-α(ng/ml)	IL-6(pg/ml)
空白对照组	10	2.75 ±0.21	54.37 ±21.11
模型对照组	10	4.01 ±0.39[a]	118.78 ±54.34[a]
双葛高剂量组	10	3.25 ±0.20[b]	62.49 ±34.16[b]
双葛中剂量组	10	3.53 ±0.31[b]	75.19 ±45.33[b]
双葛低剂量组	10	3.65 ±0.15[c]	85.31 ±33.79[c]
海王组	10	3.68 ±0.21[cd]	82.10 ±39.46[cd]

a:$P<0.01$,与空白对照组比较;b:$P<0.01$,c:$P<0.05$,与模型对照组比较;d:$P<0.01$,与双葛高剂量组比较

2.4　双葛解醒丸对大鼠血清 FFA、ADP 及 LEP 的影响

模型对照组大鼠血清 FFA、LEP 显著高于空白对照组($P<0.01$),血清 ADP 显著低于空白对照组($P<0.01$),双葛治疗组大鼠血清 FFA、LEP 明显低于模型对照组($P<0.05$, $P<0.01$),血清 ADP 显著高于模型对照组($P<0.05$, $P<0.01$),双葛高剂量组大鼠血清 FFA、LEP 明显低于海王组($P<0.01$),血清 ADP 显著高于海王组($P<0.01$)。见表 3。

表 3　双葛解醒丸对大鼠血清 FFA、ADP 及 LEP 的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	FFA(μmol/L)	ADP(mg/ml)	LEP(ng/ml)
空白对照组	10	551.89 ±31.76	3.13 ±0.24	1.74 ±0.17
模型对照组	10	923.72 ±75.69[a]	2.17 ±0.37[a]	3.07 ±0.37[a]
双葛高剂量组	10	572.16 ±45.37[b]	3.05 ±0.27[b]	1.89 ±0.21[b]
双葛中剂量组	10	683.42 ±55.31[b]	2.85 ±0.31[b]	2.12 ±0.25[b]
双葛低剂量组	10	734.78 ±62.42[c]	2.74 ±0.29[c]	2.27 ±0.27[c]
海王组	10	783.89 ±51.43[cd]	2.69 ±0.32[cd]	2.35 ±0.29[cd]

a:$P<0.01$,与空白对照组比较;b:$P<0.01$,c:$P<0.05$,与模型对照组比较;d:$P<0.01$,与双葛高剂量组比较

3　讨论

脂肪变性是酒精性脂肪肝最常见的组织改变,其病因通常是脂肪的代谢紊乱,例如脂肪酸的氧化率,甘油三酯的合成增加,脂肪的输出减少以及肝外的脂肪动员[3]。在肝脏出现了异常的脂肪代谢的过程中可以使肝脏遭受进一步的损害[4]。有研究表明,在酒精性脂肪肝变性过程中的发生的肝细胞形态学上的变化使肝细胞更易受到氧化应激、内毒素以及促炎因子的病理性损伤[5]。而促炎因子如 TNF-α 和 IL-6 等对脂肪代谢也均有影响,TNF-α 可增加外周组织游离脂肪的释放,增加肝脏的合成以及使脂肪酸的 β 氧化受损,IL-6 也阻碍甘油三酯的转运和释放,炎性因子增加了 FFA 进入肝脏代谢的量,却降低了肝脏转化和转移脂肪的能力。因此,同时改善脂肪变性和减轻炎症反应是治疗 AFL 的关键。

TNF-α 和 IL-6 主要是由肝内实质细胞核 Kupffer 细胞分泌,能诱导肝细胞坏死和凋亡,是引起肝细胞变性的主要因子,也是酒精性脂肪肝发病过程中重要的炎症介质[6]。TNF-α 不仅通过增强脂质过氧化和自由基的产生,还可以直接引起肝细胞炎症、脂肪变性及肝细胞坏死,从而参与脂肪肝炎的发生、发展[7], IL-6 是免疫调节的关键因子,参与炎症损伤,具有刺激细胞生长,促进细胞分化和加速肝细胞蛋白合成的作用,并与机体肝脏免疫生理和免疫病理密切相关[8]。本实验中模型对照大鼠血清中 TNF-α 和 IL-6 较空白对照组显著升高($P<0.01$),经过注射双葛解醒丸干预后,双葛解醒丸组和海王金樽组大鼠的血清 TNF-α 含量和 IL-6 明显低于模型对照组($P<0.05$),而双葛解醒丸

组的效果明显好于海王金樽组,表明双葛解醒丸可能通过减少酒精性脂肪肝病程中 TNF-α 和 IL-6 的合成与释放,从而抑制炎症的发生,最终起到治疗酒精性脂肪肝的作用。

FFA 被认为是重要的起始因子,是脂肪肝发生的重要因素。大量增加的 FFA 可导致线粒体肿胀、细胞膜通透性增加、肝细胞变性、坏死和炎症细胞的浸润,多余的 FFA 在肝细胞内贮积,而加重肝细胞的脂肪变性[9], ADP 是由脂肪细胞分泌的脂肪因子之一。ADP 可以增加脂肪酸 β 氧化,降低循环中的游离脂肪酸,阻止脂质在巨噬细胞中的积聚,可以减少肝脏葡萄糖的输出[10], LEP 是机体脂肪组织的主要调节因子,参与肝脏对脂质代谢的调节作用,与酒精性脂肪肝密不可分。临床研究通过对脂肪肝患者的血清瘦素水平分析发现,血清瘦素水平是酒精性脂肪肝形成的独立的危险因素[11]。本实验中模型对照大鼠血清中 FFA 和 LEP 较空白对照组大鼠显著升高($P<0.01$),ADP 显著低于空白对照组大鼠($P<0.01$),提示大鼠体内脂质代谢紊乱。经过双葛解醒丸干预后,双葛解醒丸组和海王金樽组大鼠的血清 FFA 含量和 LEP 明显低于模型对照组($P<0.05$),ADP 显著高于空白对照组($P<0.01$),而双葛解醒丸组的效果明显好于海王金樽组,说明双葛解醒丸能够减少脂肪沉积,调节脂质代谢,改善肝脏脂肪性变,从而治疗酒精性脂肪肝。

酒精性脂肪肝之名未见于祖国的古代医籍,现在医家一般将其归于“伤酒”、“酒癖”、“酒疳”等范畴,目前关于脂肪肝病因病机的探讨很多,归纳起来,有如下共识:认为饮食不节,嗜食肥甘或饮酒无度,导致脾失健运,肝失疏泄,湿热蕴结脾胃,痰浊(湿)内生,气滞血瘀最终导致气滞、痰湿、瘀血互结,积于胁下。病位在肝脾,与肾有关。脂肪肝与痰浊、湿热、瘀血、气滞等病理因素有关,尤其以痰瘀最为关键[12]。双葛解醒丸全方以健脾化湿,疏肝理气,发汗利水为大法,临床研究表明其葛花解醒汤对酒精性脂肪肝有明显疗效[13],其中以葛花,葛根,枳椇子为主要,其中葛花是解酒良药,有卓著的透解之功,研究表明口服葛花可大幅降低乙醇中毒小鼠血清 ALT、AST 的活性,改变小鼠因醉酒而引起的定向力降低[14],并能显著提高小鼠肝脏乙醇脱氢酶的活性降低乙醇毒性[15],葛花能够在乙醇的肠胃吸收及代谢两个环节发挥作用,其水提取通过激活乙醇脱氢酶活性来降低乙醇的浓度,对酒精引起的肝细胞损伤有保护作用。实验研究证明葛根素能够通过影响花生四烯酸代谢、调节 TXA2 / PGI2 平衡而降低大鼠血脂以及抑制氧化应激[16]。枳椇子,认为其有清热利尿、解酒毒之功效。现代研究表明,枳椇子可加速乙醇的代谢,提高血中谷胱甘肽过氧化物酶的活力, 明显降低乙醇引起的血清 ALT、AST 升高,能抵抗长期摄入乙醇引起的肝脏 ADH、SOD、酶活性降低,具有解酒保肝作用,对小鼠肝脏乙醇脱氢酶活性具有显著的增强作用,可明显减轻其肝脏脂肪变性程度[17-18]。

本研究从肝功能、肝组织病理学等方面证实,中药复方双葛解醒丸对酒精性脂肪肝的脂质代谢紊乱和炎症都有良性作用,且其作用优于西药海王金樽,价格便宜,若能做成方便剂型,将对酒精性脂肪肝病的早期防治和治疗起到很好的作用。

参考文献:

[1] Hoek J B, Pastorino J. Cellular signaling mechanisms in alcohol-induced liver damage[J]. Semin Liver Dis, 2004, 24(3): 257-272.

[2] 周添浓, 刘丹丹, 唐立海, 等. 牛大力对四氯化碳及酒精所致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(10): 2585-2587.

[3] Zhao C Y, Jiang L L, Li L, *et al*. Peroxisome proliferator activated receptor-gamma in pathogenesis of experimental fatty liver disease[J]. World J Gasteroenterol, 2004, 10(9): 1329-1332.

[4] Fisher M, You M, Matsumoto M, *et al*. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) agonist treatment reverses PPARalpha dysfunction and abnormalities in hepatic lipid metabolism in ethanol-fed mice[J]. J Biol Chem, 2003, 278(30): 27997-28004.

[5] Bykov I, Jarvelainen H, Lindros K. L-carnitine alleviates alcohol-induced liver damage in rats: role of tumour necrosis factor-alpha[J]. Alcohol Alcohol, 2003, 38(5): 400-406.

[6] Crews F T, Benchara R, Brown L A, *et al*. Cytokines and alcohol [J]. Alcohol Clin Exp Res, 2006, 30(4): 720-730.

[7] Day C P. Treatment of alcoholic liver disease[J]. Liver Transpl, 2007, 13(11 Suppl 2): S69-S75.

[8] 达炜, 朱金水, 陈尼维, 等. 肝纤维化大鼠肝星状细胞凋亡的体内研究[J]. 世界华人消化杂志, 2002, 10(8): 978-979.

[9] 潘爱群. 胰岛素抵抗、瘦素在非酒精性脂肪肝发病中的作用[J]. 中国医药导刊, 2008, 10(3): 400-401.

[10] Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell G C, *et al*. NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome[J]. Hepatology, 2002, 35(2): 373-379.

[11] Nakamura T, Nagasaka S, Ishikawa S, *et al*. Clinical implication of serial leptin measurement in subjects with type 2 diabetes mellitus [J]. Endocr J, 2001, 48(1): 87-94.

[12] 李新生. 脂肪肝的中医治疗概况[J]. 山西中医, 2010, 26(4): 56-58, 60.

[13] 张素义. 葛花解醒汤治疗酒精性脂肪肝 45 例[J]. 河南中医, 2011, 31(6): 613-614.

[14] 尹俊亭, 仲英, 孙敬勇, 等. 葛花的研究进展[J]. 中草药, 2005, 36(12): 1905-1906.

[15] 李萍, 钟赣生, 等. 葛花对酒后血中乙醇浓度和肝中乙醇脱氢酶活性的影响[J]. 科技导报, 2009, 27(23): 83-85.

[16] 刘海燕, 石元刚, 等. 葛根素对高脂血症大鼠脂质代谢及血浆 PGI2、TXA2 水平的影响[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(11): 967-969.

[17] 丁静, 朱肖鸿. 枳椇子预防大鼠酒精性脂肪肝的实验研究[J]. 浙江中西医结合杂志, 2007, 17(3): 156-158.

[18] 朱肖鸿, 朱强, 叶蕾, 等. 枳椇子对大鼠酒精性脂肪肝的预防作用及机制[J]. 中西医结合肝病杂志, 2007, 17(4): 220-222.

(**收稿**:2011-10-17;**修回**:2011-12-29)

(编辑 王小寒)