

中药肝脂复煎剂对酒精和高脂饲养诱导的大鼠脂肪肝的影响

陆付耳, 董 慧, 高志强, 徐丽君, 魏世超, 王开富, 邹 欣

陆付耳, 董慧, 高志强, 徐丽君, 魏世超, 王开富, 邹欣, 华中科技大学同济医学院附属同济医院中西医结合研究所 湖北省武汉市 430030
陆付耳, 男, 1961-03-04 生, 汉族, 教授, 博士生导师, 享受国务院特殊津贴, 主要从事中西医结合治疗内分泌及代谢性疾病, 发表论文 70 篇。
湖北省重点攻关项目, No. 2002AA302B13
项目负责人: 陆付耳, 430030, 湖北省武汉市解放大道 1095 号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院中西医结合研究所. felu@tjh.tjmu.edu.cn
电话: 027-83662577 传真: 027-83646605
收稿日期: 2003-10-21 接受日期: 2003-11-19

Effect of Chinese medicine Ganzhifu decoction on murine fatty liver induced by alcohol and high fat feeding

Fu-Er Lu, Hui Dong, Zhi-Qiang Gao, Li-Jun Xu, Shi-Chao Wei, Kai-Fu Wang, Xin Zou

Fu-Er Lu, Hui Dong, Zhi-Qiang Gao, Li-Jun Xu, Shi-Chao Wei, Kai-Fu Wang, Xin Zou, Institute of Integrated Chinese and Western Medicine, Affiliated Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030 Hubei Province, China
Supported by Key Research Projects of Hubei Province. No.2002AA302B13
Correspondence to: Dr Fu-Er Lu, Institute of Integrated Chinese and Western Medicine, Affiliated Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030 Hubei Province, China. felu@tjh.tjmu.edu.cn
Received: 2003-10-21 Accepted: 2003-11-19

Abstract

AIM: To explore the effects of Chinese medicine Ganzhifu decoction on fatty liver in rats.

METHODS: The fatty liver model was established by feeding with high caloric laboratory chow and alcohol. Sixty male Wistar rats were randomized into 6 groups, i.e. a normal control group, a model group, three Ganzhifu groups treated with Ganzhifu decoction (giant knotweed 20 g, rhubarb 5 g, Bupleurum 10 g) in different concentrations and a metformin group. All the animals were killed after treatment for 8 weeks. The activities of alkaline phosphatase and gamma glutamyl transferase, blood lipid, liver triglycerin and pathological changes in all groups were assayed.

RESULTS: The activities of alkaline phosphatase and gamma glutamyl transferase, blood lipid, liver triglycerin of model group increased significantly (ALP: $8\ 156 \pm 2\ 696$ vs $4\ 478 \pm 2\ 229$; GGT: 52 ± 14 vs 24 ± 21 ; TG: 615 ± 106 vs 454 ± 113 , $P < 0.05$; Liver triglycerin: 53 ± 10 vs 27 ± 8 , $P < 0.01$). Liver histology showed mild to moderate steatosis. Those indexes of Ganzhifu groups were significantly lower than those of model group (ALP: $5\ 666 \pm 2\ 187$ vs $8\ 156 \pm 2\ 696$; GGT: 24 ± 14 vs 52 ± 14 ; TG: 442 ± 148 vs 615 ± 106 ; Liver triglycerin: 35 ± 4 , 36 ± 6 , 38 ± 6 vs 53 ± 10 , $P < 0.05$, $P < 0.01$). The hepatic steatosis was also improved. Liver triglycerin

of metformin group was significantly reduced (32 ± 1 vs 53 ± 10 , $P < 0.01$), but there was no significant difference in other indexes between metformin and model groups.

CONCLUSION: Ganzhifu decoction can protect fatty liver in rats.

Lu FE, Dong H, Gao ZQ, Xu LJ, Wei SC, Wang KF, Zou X. Effect of Chinese medicine Ganzhifu decoction on murine fatty liver induced by alcohol and high fat feeding. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(7): 1596-1599

摘要

目的: 观察中药肝脂复煎剂对酒精和高脂饲养诱导的大鼠脂肪肝的防治作用。

方法: 采用高浓度酒精灌胃合高脂饲料饲养制备大鼠脂肪肝模型, 同时给予不同剂量肝脂复煎剂治疗, 以二甲双胍为对照。通过检测血清肝酶谱、肝组织匀浆甘油三酯含量和肝脏组织学变化, 观察不同剂量肝脂复煎剂对脂肪肝的防治作用。

结果: 模型组大鼠肝脏出现明显的脂肪变性, 肝酶活性 (ALP、GGT)、血脂和肝组织甘油三酯含量升高 (ALP: $8\ 156 \pm 2\ 696$ vs $4\ 478 \pm 2\ 229$; GGT: 52 ± 14 vs 24 ± 21 ; TG: 615 ± 106 vs 454 ± 113 , $P < 0.05$; 肝 TG: 53 ± 10 vs 27 ± 8 , $P < 0.01$)。肝脂复剂量组肝细胞脂肪变显著减轻, 肝酶活性 (ALP、GGT)、血脂和肝组织甘油三酯含量较模型组显著下降 (ALP: $5\ 666 \pm 2\ 187$ vs $8\ 156 \pm 2\ 696$; GGT: 24 ± 14 vs 52 ± 14 ; TG: 442 ± 148 vs 615 ± 106 ; 肝 TG: 35 ± 4 , 36 ± 6 , 38 ± 6 vs 53 ± 10 , $P < 0.05$ - $P < 0.01$)。二甲双胍组肝组织甘油三酯含量较模型组下降 (32 ± 1 vs 53 ± 10 , $P < 0.01$)。其余指标无显著差异。

结论: 肝脂复煎剂对脂肪肝具有良好的防治作用。

陆付耳, 董慧, 高志强, 徐丽君, 魏世超, 王开富, 邹欣. 中药肝脂复煎剂对酒精和高脂饲养诱导的大鼠脂肪肝的影响. *世界华人消化杂志* 2004;12(7): 1596-1599

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1596.asp>

0 引言

脂肪肝是由多种疾病和病因引起的肝脏脂肪性变^[1-6]。流行病学调查表明主要为酒精、肥胖等引起的慢性脂肪肝^[7-12]。肝脂复煎剂治疗脂肪肝多年, 取得了满意疗效。

为进一步观察其防治实验性脂肪肝的药理作用, 特进行该复方防治脂肪肝的实验研究。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级 Wistar 大鼠 60 只, 体质量 150 ± 10 g, 由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。测血脂和肝酶的试剂盒均购自浙江东瓯生物工程有限公司; 猪油, 玉米油购自超市; 胆固醇购自郑州利伟生物化工有限公司。肝脂复煎剂(组成: 虎杖 20 g, 生大黄 5 g, 柴胡 10 g。将虎杖、生大黄用乙醇回流提取 2 次, 合并提取液, 回收乙醇至无醇味, 得浸膏 1; 另将柴胡用水煎煮 2 次, 将提取液合并浓缩得浸膏 2; 将 1、2 合并即得肝脂复煎剂浸膏。)由同济医院药剂科提供, 每克浸膏含生药 3.5 g, 双蒸水稀释成不同浓度备用。盐酸二甲双胍片由法国里昂医药工业公司生产, 研制成粉末, 双蒸水溶解成含药 10g/L 混悬液, 其余试剂均为分析纯。

1.2 方法 Wistar 大鼠 60 只, 适应性喂养 1 wk 后随机分为 6 组, 即正常组、模型组、肝脂复低、中、高剂量组(浸膏浓度依次为 0.05, 0.1, 0.2 kg/L)和二甲双胍组, 每组 10 只。正常组予标准饲料饲养, 生理盐水 10 mL/kg 灌胃, 2 次/d, 其余各组均高脂饲料(835 g/kg 标准饲料 +15 g/kg 胆固醇 +50 g/kg 猪油 +100 g/kg 玉米油)饲养, 60 mL/L 酒精按 10 mL/kg 灌胃, 2 次/d。肝脂复各剂量组每日 14:00 分别按照肝脂复低中高剂量给予灌胃, 二甲双胍组给二甲双胍混悬液 10 ml/kg 每日灌胃, 各组均正常饮水, 观察大鼠的食欲、体重、行为、状态、毛发及死亡情况, 连续 8 wk。末次给药 24 h 后, 20 g/L 戊巴比妥钠(30 mg/kg)进行腹腔麻醉。腹主动脉取血, 常规制备血清。同时称体质量及肝质量, 摘取部分肝组织进行生化指标测试和 HE 染色。用赖氏法测 ALT, AST 活性, 酶法 GGT、ALP, 总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)的含量。取新鲜肝脏适量, 制成组织匀浆, 用抽提液(甲醇与氯仿 1:1, V/V)抽提脂质, 用分光光度法测定 TG 的含量。将取出的肝组织用中性甲醛固定, 石蜡包埋, HE 染色, 光镜下观察肝组织学的改变, 肝细胞脂肪变等情况。

统计学处理 实验数据以 mean \pm SD 表示, 组间比较采用 t 检验。

2 结果

模型组及实验观察组大鼠毛发光泽度差, 体重增长较缓慢, 多数大鼠食欲差。正常组大鼠则精神状态好, 食欲佳。体质量及肝质量/体质量均无显著性差异。将各组死亡大鼠剔除, 最后共取得有效标本 50 份。

2.1 血清肝酶谱变化 模型组与正常组比较, ALT 与 AST 有升高趋势, 但无显著性差异。而 ALP 与 GGT 则显著升高; 与模型组比较, 肝脂复低剂量组 ALP 与 GGT 则显著降低($P < 0.05$, 表 1); 二甲双胍组肝酶活性则无

显著改善。

表 1 各组大鼠酶活性的变化 (mean \pm SD, nkat/L)

分组	n	ALT	AST	ALP	GGT
正常组	9	347 \pm 154	970 \pm 763	4 478 \pm 2 229	24 \pm 21
模型组	8	412 \pm 168	1 157 \pm 211	8 156 \pm 2 696 ^a	52 \pm 14 ^a
低剂量组	10	302 \pm 137	1 102 \pm 300	5 666 \pm 2 187 ^b	24 \pm 14 ^c
中剂量组	9	459 \pm 134	1 498 \pm 281	8 230 \pm 2 539	46 \pm 25
高剂量组	8	386 \pm 173	1 402 \pm 329	7 251 \pm 3 215	46 \pm 9
二甲双胍组	6	560 \pm 126	1624 \pm 370	7000 \pm 4555	29 \pm 31

^aP < 0.05 vs 正常组; ^bP < 0.05 vs 模型组。

2.2 血清和肝组织匀浆脂质的变化 模型组血清 TG 较正常组显著升高($P < 0.05$), 但各治疗组中只有高剂量组降低血清 TG 作用明显($P < 0.05$), 并显示出剂量相关性。模型组肝组织 TG 显著升高($P < 0.01$), 各治疗组均显示出降低肝组织 TG 的作用($P < 0.05$ - $P < 0.01$, 表 2)。模型组血清 TC 有升高趋势, 但无显著性差异。

表 2 各组大鼠血清及肝匀浆脂质的变化 (mean \pm SD)

分组	n	血清 TG(umol/L)	血清 TC(umol/L)	肝 TG(mg/g)
正常组	9	454 \pm 113	1 513 \pm 191	27 \pm 8
模型组	8	615 \pm 106 ^a	1 857 \pm 455	53 \pm 10 ^b
低剂量组	10	551 \pm 214	1 582 \pm 421	35 \pm 4 ^d
中剂量组	9	527 \pm 182	1 887 \pm 329	36 \pm 6 ^c
高剂量组	8	442 \pm 148 ^c	1 954 \pm 488	38 \pm 6 ^c
二甲双胍组	6	650 \pm 190	1 814 \pm 198	32 \pm 1 ^c

^aP < 0.05, ^bP < 0.01 vs 正常组; ^cP < 0.05, ^dP < 0.01 vs 模型组。

2.3 病理学改变 正常组大鼠肝色鲜红、边缘锐利、质韧; 模型组大鼠肝外观呈奶油黄或红黄相间, 体积明显增大, 边缘变钝, 质地变软, 切面略带油腻感。药物防治组肝外观均接近对照组。光镜下正常组大鼠肝小叶清晰, 肝细胞索排列整齐, 模型组肝小叶中央静脉区小泡状脂肪变, 小叶内及汇管区灶性炎细胞浸润(图 1); 高倍镜下, 大鼠肝小叶中心带肝细胞中出现大小不等的脂肪滴, 一些肝细胞核则被脂肪滴挤得明显偏位(图 2)。肝脂复组肝病理学改变较模型组显著减轻(图 3-6), 二甲双胍组较模型组亦有明显改变(图 7, 8)。

3 讨论

脂肪肝目前缺乏有效防治的药物^[13-16]。肝脂复煎剂成分为虎杖、大黄、柴胡, 其中虎杖、大黄苦寒, 既可清热解毒燥湿, 又可活血化瘀, 柴胡调肝理气。现代研究也表明, 对酒精性肝病的治疗, 活血化瘀的方剂可以奏效^[17]。肝脏组织切片镜检结果表明, 肝脂复 3 个剂量组肝脏脂肪变性程度都比模型组明显减轻。肝脂复高剂量是低

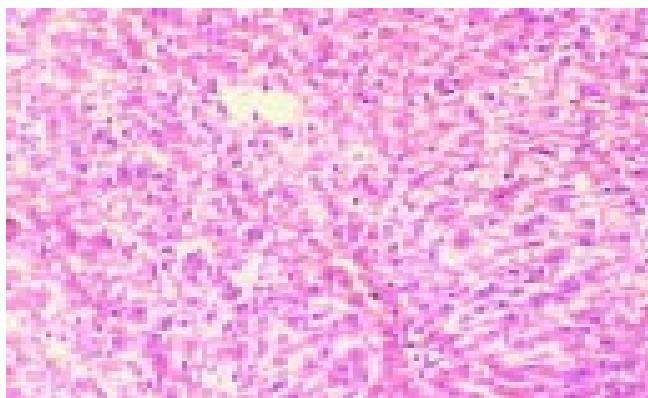


图1 模型组大鼠肝脏病理改变. HE×100.

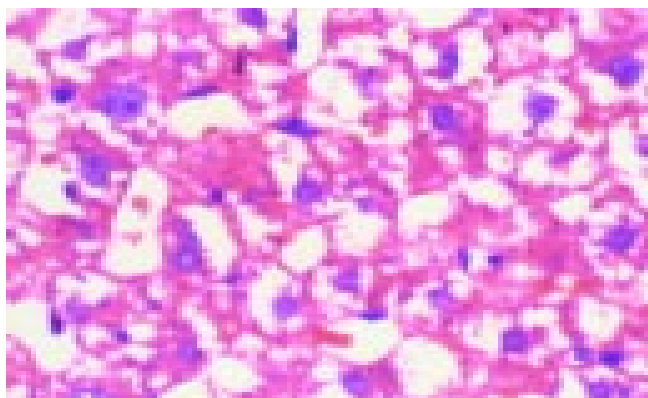


图2 模型组大鼠肝脏病理改变. HE×400.

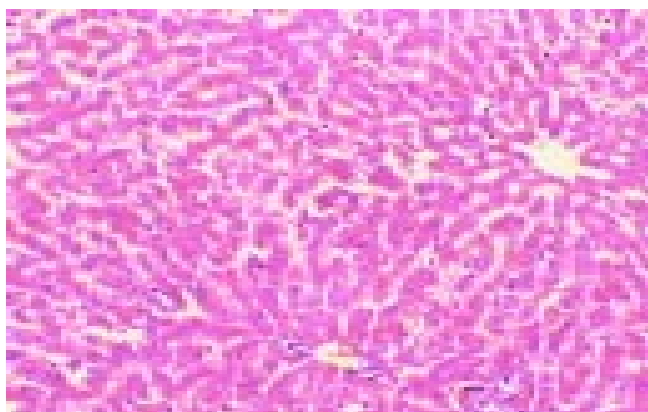


图3 肝脂复组大鼠肝脏病理改变. HE×100.

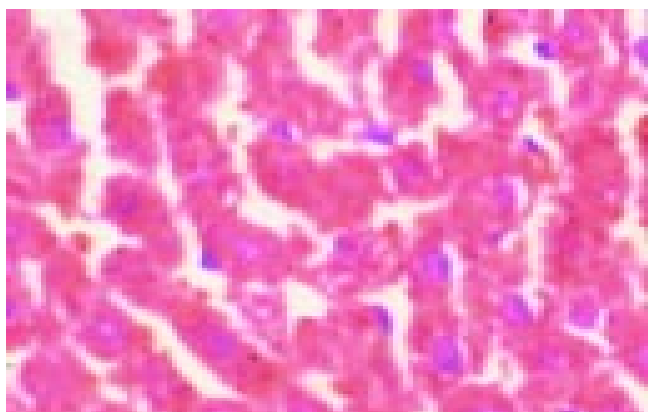


图4 肝脂复组大鼠肝脏病理改变. HE×400.

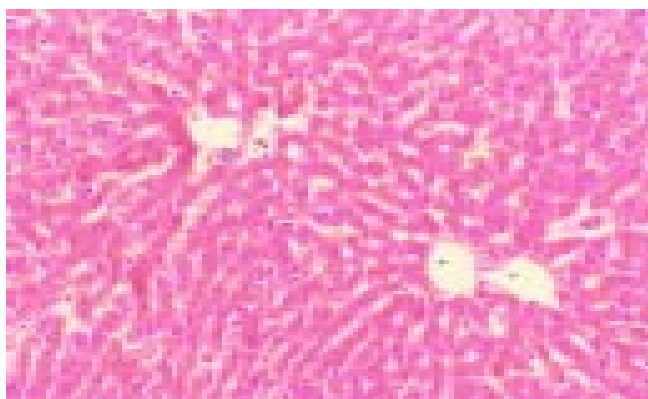


图5 肝脂复组大鼠肝脏病理改变. HE×100.



图6 肝脂复组大鼠肝脏病理改变. HE×400.

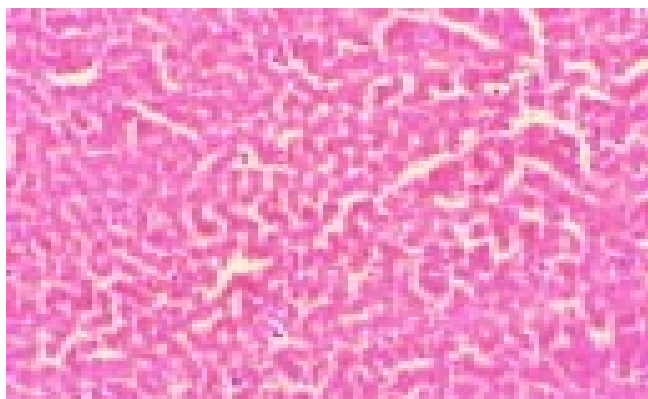


图7 二甲双胍组大鼠肝脏病理改变. HE×100.

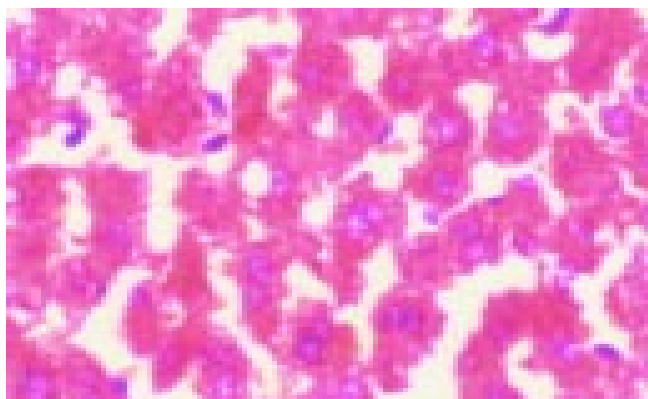


图8 二甲双胍组大鼠肝脏病理改变. HE×400.

剂量的4倍;不同剂量肝脂复对于脂肪肝的影响有较大差异.低剂量组改善肝功能效果较好,而降低血脂效果不明显;高剂量组降低血脂效果优于低剂量组,但对肝功能改善不如低剂量组,提示脂肪肝和高脂血症的发生并不平行^[18-21].肝脏是药物代谢的主要器官,尚无降脂药物有效防治脂肪肝的足够证据^[22],并且,脂肪化的肝脏比正常肝脏更不耐受降血脂药物治疗.在综合治疗的基础上,酌情应用降血脂药物,但需适当减量和监测肝功能.因此,脂肪肝的治疗不应滥用降脂药物^[23].

实验采用文献[24]报道的造模方法,加以改进,成功地制造出大鼠的脂肪肝模型.模型组肝小叶中央静脉区小泡状脂肪变;血清学指标也表明模型组GGT、ALP均高于正常组,具有显著性差异($P < 0.05$),说明本研究模型复制成功^[25-26].其中ALT、AST未见明显差异,有资料显示脂肪肝患者的此两项指标可仅轻度增高^[27],而GGT是反映肝细胞功能的敏感指标^[28-29].因此,GGT常作为酒精所引起脂肪肝的重要监测指标^[30-31].

肝脏是血清胆固醇的重要来源,有极旺盛的胆固醇合成能力,在肝细胞功能受损时,从其处理血浆脂蛋白和合成胆固醇到组装血浆脂蛋白的全过程,都可发生障碍,血清胆固醇可不升高.实验中,大鼠长期灌入乙醇,肝细胞功能受损,故血清总胆固醇未见明显升高.而血清甘油三酯显著增高,与文献[32]报道一致.肝脏甘油三酯明显增多、沉积,可能与酒精灌胃和高脂喂养有关.二甲双胍能促进肝细胞脂蛋白合成转运,减少甘油三酯在肝脏沉积,实验中,二甲双胍组肝脏甘油三酯含量与模型组比较显著降低,但未显示出明显的降低血脂和改善肝功能的作用,与文献报道不一致,可能与样本较少,用药剂量及疗程不足等有关.实验结果证明,肝脂复煎剂对大鼠脂肪肝有良好的防治作用.但用药组无1例能达到治愈脂肪肝的目的,这可能与实验中用药同时仍持续高脂饮食和酒精饲养有关.

4 参考文献

- 1 范建高, 曾民德, 王国良. 脂肪肝的发病机制. 世界华人消化杂志 1999;7:75-76
- 2 Fan JG, Chen LH, Xu ZJ, Zeng MD. Overexpression of hepatic plasminogen activator inhibitor type 1 mRNA in rabbits with fatty liver. *World J Gastroenterol* 2001;7:710-712
- 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. 世界华人消化杂志 2002;10:346-348
- 4 丁小云, 李定国, 徐芹芳, 陆汉明. 辛伐他汀对大鼠实验性脂肪肝的影响. 世界华人消化杂志 2002;10:650-653
- 5 高健, 吴显才, 李孝生, 沈鼎明. 还原型谷胱甘肽治疗酒精性肝病的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:809-811
- 6 Piao YF, Li JT, Shi Y. Relationship between genetic polymorphism of cytochrome P4501IE1 and fatty liver. *World J Gastroenterol* 2003;9:2612-2615
- 7 Chen WX, Li YM, Yu CH, Cai WM, Zheng M, Chen F. Quantitative analysis of transforming growth factor beta 1 mRNA in patients with alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol* 2002;8:379-381
- 8 Shen L, Fan JG, Shao Y, Zeng MD, Wang JR, Luo GH, Li JQ, Chen SY. Prevalence of nonalcoholic fatty liver among administrative officers in Shanghai: an epidemiological survey. *World J Gastroenterol* 2003;9:1106-1110
- 9 Fan JG, Zhong L, Xu ZJ, Tia LY, Ding XD, Li MS, Wang GL. Effects of low-calorie diet on steatohepatitis in rats with obesity and hyperlipidemia. *World J Gastroenterol* 2003;9:2045-2049
- 10 Iwamoto N, Ogawa Y, Kajihara S, Hisatomi A, Yasutake T, Yoshimura T, Mizuta T, Hara T, Ozaki I, Yamamoto K. Gln27Glu beta2-adrenergic receptor variant is associated with hypertriglyceridemia and the development of fatty liver. *Clin Chim Acta* 2001;314:85-91
- 11 Molina PE, McClain C, Valla D, Guidot D, Diehl AM, Lang CH, Neuman M. Molecular pathology and clinical aspects of alcohol-induced tissue injury. *Alcohol Clin Exp Res* 2002;26:120-128
- 12 Farrell GC. Non-alcoholic steatohepatitis: what is it, and why is it important in the Asia-Pacific region? *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:124-138
- 13 Tsutsumi And M, Takase S. Effect of fenofibrate on fatty liver in rats treated with alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;25(6 Suppl):75S-79S
- 14 Nanji AA, Jokelainen K, Tipoe GL, Rahemtulla A, Dannenberg AJ. Dietary saturated fatty acids reverse inflammatory and fibrotic changes in rat liver despite continued ethanol administration. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;299:638-644
- 15 Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest* 2003;112:91-100
- 16 Mulhall BP, Ong JP, Younossi ZM. Non-alcoholic fatty liver disease: an overview. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:1136-1143
- 17 薄爱华, 田翠时, 薛贵平, 杜建华, 许永利. 大鼠免疫性和酒精性肝病的形态学变化. 世界华人消化杂志 2001;9:157-160
- 18 Tacikowski T, Dzieniszewski J, Nowicka G, Ciok J. Comparative analysis of lipid profiles assessed by ultracentrifugation in patients with various hyperlipoproteinaemia types in correlation with hepatic steatosis. *Med Sci Monit* 2002;8:CR697-701
- 19 Omagari K, Kadokawa Y, Masuda J, Egawa I, Sawa T, Hazama H, Ohba K, Isomoto H, Mizuta Y, Hayashida K, Murase K, Kadota T, Murata I, Kohno S. Fatty liver in non-alcoholic non-overweight Japanese adults: incidence and clinical characteristics. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:1098-1105
- 20 Pagano G, Pacini G, Musso G, Gambino R, Mecca F, Depetris N, Cassader M, David E, Cavallo-Perin P, Rizzetto M. Non-alcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: further evidence for an etiologic association. *Hepatology* 2002;35:367-372
- 21 Bloks VW, Plosch T, van Goor H, Roelofsens H, Baller J, Havinga R, Verkade HJ, van Tol A, Jansen PL, Kuipers F. Hyperlipidemia and atherosclerosis associated with liver disease in ferrochelatase-deficient mice. *J Lipid Res* 2001;42:41-50
- 22 Garcia-Mediavilla V, Villares C, Culebras JM, Bayon JE, Gonzalez-Gallego J. Effects of dietary beta-cyclodextrin in hypercholesterolaemic rats. *Pharmacol Toxicol* 2003;92:94-99
- 23 Angulo P, Lindor KD. Treatment of non-alcoholic steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002;16:797-810
- 24 黄哲, 田德录, 原爱红. 酒精性肝病的实验动物模型的研究. 华人消化杂志 1998;6:712-713
- 25 Lukivskaya OY, Maskevich AA, Buko VU. Effect of ursodeoxycholic acid on prostaglandin metabolism and microsomal membranes in alcoholic fatty liver. *Alcohol* 2001;25:99-105
- 26 Gilat T, Leikin-Frenkel A, Goldiner I, Juhel C, Lafont H, Gobbi D, Konikoff FM. Prevention of diet-induced fatty liver in experimental animals by the oral administration of a fatty acid bile acid conjugate (FABAC). *Hepatology* 2003;38:436-442
- 27 Yano E, Tagawa K, Yamaoka K, Mori M. Test validity of periodic liver function tests in a population of Japanese male bank employees. *J Clin Epidemiol* 2001;54:945-951
- 28 Maher JJ. Treatment of alcoholic hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:448-455
- 29 Lee DH, Ha MH, Kim JH, Christiani DC, Gross MD, Steffes M, Blomhoff R, Jacobs DR Jr. Gamma-glutamyltransferase and diabetes-a 4 year follow-up study. *Diabetologia* 2003;46:359-364
- 30 Rukkumani R, Sri Balasubashini M, Vishwanathan P, Menon VP. Comparative effects of curcumin and photo-irradiated curcumin on alcohol- and polyunsaturated fatty acid-induced hyperlipidemia. *Pharmacol Res* 2002;46:257-264
- 31 肖湘君, 肖强, 明西林, 张振海, 徐丹生, 胡家全. 复方参七胶囊治疗肝功异常性脂肪肝62例. 世界华人消化杂志 2002;10:1062-1064
- 32 Kusunoki M, Tsutsumi K, Hara T, Ogawa H, Nakamura T, Miyata T, Sakakibara F, Fukuzawa Y, Suga T, Kakumu S, Nakaya Y. Correlation between lipid and glycogen contents in liver and insulin resistance in high-fat-fed rats treated with the lipoprotein lipase activator NO-1886. *Metabolism* 2002;51:792-795