

非酒精性脂肪性肝病病证结合动物模型的研究进展

鞠大宏, 赵宏艳, 刘梅洁

■背景资料

非酒精性脂肪性肝病现已成为我国常见的慢性肝病之一, 中医药在治疗该病上取得了一定成绩。辨证论治是中医治疗的特点之一, 但是目前的科研并没有将中医“证”的因素考虑其中, 本文主要探讨该病与证候相结合的动物模型制作方法, 为中医药治疗该病的疗效及机制的深入探讨提供有益参考。

鞠大宏, 赵宏艳, 刘梅洁, 中国中医科学院中医基础理论研究所 北京市 100700

国家科技支撑计划重点基金资助项目, No. 2006BAI08B01
通讯作者: 鞠大宏, 研究员, 100700, 北京市东直门内南小街16号, 中国中医科学院中医基础理论研究所病理室。

judahong@sohu.com

电话: 010-84024005

收稿日期: 2009-12-31 修回日期: 2010-04-20

接受日期: 2010-04-27 在线出版日期: 2010-05-18

Advances in animal models of nonalcoholic fatty liver disease that combine disease and syndromes

Da-Hong Ju, Hong-Yan Zhao, Mei-Jie Liu

Da-Hong Ju, Hong-Yan Zhao, Mei-Jie Liu, Department of Pathology, Institute of Basic Theory of Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Supported by: the National Key Technology R&D Program during the 11th Five-Year Plan Period, No. 2006BAI08B01

Correspondence to: Professor Da-Hong Ju, Department of Pathology, Institute of Basic Theory of Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China. judahong@sohu.com

Received: 2009-12-31 Revised: 2010-04-20

Accepted: 2010-04-27 Published online: 2010-05-18

Abstract

As the incidence of obesity and type 2 diabetes mellitus increases in the general population, nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) has become a common problem in clinical practice. Although great advances have been made in the treatment of NAFLD based on syndrome differentiation, syndromes are not considered in animal models of NAFLD. This will prevent an in-depth investigation of the therapeutic efficacy of Chinese medicine against NAFLD and the underlying mechanisms. Here, we will review the recent advances in animal models of NAFLD that combine disease and syndromes.

Key Words: Nonalcoholic fatty liver disease; Animal model combining disease and syndromes; Diabetes; Obesity

Ju DH, Zhao HY, Liu MJ. Advances in animal models of nonalcoholic fatty liver disease that combine disease and

syndromes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(14): 1452-1455

摘要

随着肥胖和糖尿病的发病率增加, 非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)现已成为我国常见的慢性肝病之一, 严重危害人民健康。目前中医应用辨证论治方法治疗NAFLD, 取得了一定成绩, 但NAFLD动物实验研究采用的模型, 没有将中医“证”的因素考虑其中, 这样的实验研究或将在某种程度上, 影响了中医药治疗该病的疗效及其机制的深入探讨。因此, 本文对NAFLD病证结合模型的研究作一深入探讨。

关键词: 非酒精性脂肪性肝病, 病证结合动物模型; 糖尿病; 肥胖

鞠大宏, 赵宏艳, 刘梅洁. 非酒精性脂肪性肝病病证结合动物模型的研究进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18(14): 1452-1455

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1452.asp>

0 引言

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是指除外酒精和其他明确的损肝因素所致的, 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。随着肥胖和糖尿病的发病率增加, NAFLD现已成为我国常见的慢性肝病之一, 严重危害人民健康^[1]。目前对于NAFLD的治疗, 西医尚无特效疗法, 中医应用辨证论治方法治疗NAFLD, 取得了一定成绩^[2-4]。目前开展的中医药治疗NAFLD动物实验研究采用的是病的模型, 没有将中医“证”的因素考虑其中, 这样的实验研究或将在某种程度上, 影响了中医药治疗该病的疗效及其机制的深入探讨。病证结合动物模型一直是这些年来中医药探讨的热点, 目前尚未见到关于NAFLD病证结合模型的研究, 本文对此作一深入探讨。

1 NAFLD证型的选择

NAFLD在中医古代文献中并没有记载, 根据

■同行评议者

徐列明, 教授, 上海中医药大学附属曙光医院(东)肝二科; 王炳元, 教授, 中国医科大学附属第一医院消化内科; 王富春, 教授, 长春中医药大学针灸推拿学院

其症状及临床特点,可把其归属于中医学的“胁痛”、“痞满”、“痰痞”、“瘀血”、“积聚”、“黄疸”等病的范畴。最早记载见于《难经》:“肝之积,名曰肥气”,故也称之肥气病,是指体内肥脂之气过多地蓄积于肝脏。

《素问·痹论》:“饮食自倍,肠胃乃伤”和吴鞠通“肝气之郁,痰瘀阻络”,揭示该病与情志、饮食、痰湿及瘀血有关。现代众多医家亦认为,饮食不节、起居无常、情志失调、久病体虚,引起肝失疏泄,脾失健运,肾精亏损等导致肝、脾、肾三脏功能失调,湿热痰瘀互结于肝而致,其病位主要在肝,与胆、脾、肾关系密切。胡义扬教授^[5]认为,NAFLD病机与痰、湿、瘀、积等有关,与肝、脾、肾三脏功能关系密切。关幼波^[6]认为脂肪肝是由于肝炎治疗不彻底,湿热未清,湿伤脾阳,运化失司,聚湿生痰,热伤阴血,灼津生痰。由于湿热互结,阻滞血脉,血液行涩,而痰瘀交阻,终成痞块。加之饮食不节,膏粱厚味,嗜酒成性,进一步促进了病情的发展,其病位在肝脾,主要病理变化为湿热凝痰,痰瘀阻脉。李军祥教授^[7]认为,NAFLD应重视肾虚血瘀对疾病发生发展的影响。黄静娟等^[8]认为NAFLD的病因为饮食不节,过食肥甘厚味,恣意饮酒,情志刺激。肝脾肾三脏功能失调是本病病机的关键,痰湿、瘀血是本病的主要病理基础。

目前NAFLD临床上尚未有统一的中医证型、分型标准以及治法方药。临床常见的辨证分型有肝气郁滞、气滞血瘀、湿热内蕴、痰瘀互阻、痰湿内阻、肝郁脾虚、肝肾阴虚、肝阴不足、阳虚浊阻、脾气虚弱、肾气阴两虚等^[9-11]。叶放等^[12]总结了2003年以前15年来国内主要中医刊物有关脂肪肝的报道223篇,对其中出现的证型和用药频率进行统计,在547个证型频次中,出现频率依次为痰湿内阻(139)、瘀血(121)、肝气郁滞(121)、脾气虚弱(72)、肾气阴两虚(45)、湿热内蕴(35)、其他(14)。本文据此选择了最常见的血瘀型、肝气郁滞型、脾气虚弱型、肾虚型四种,对NAFLD病证结合动物模型制作方法进行探讨。

2 NAFLD动物模型的选择

NAFLD是病理组织学改变与酒精肝相似,但无过量饮酒史的一种慢性疾病^[13]。具有脂肪变性、肝细胞损伤及炎症细胞浸润等病理组织损伤,包括单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎和肝硬化3个阶段^[14]。随着人类生活水平的提高和饮食结构

的变化,NAFLD的发病也呈现上升趋势。人们对该病的研究也越来越深入,但是对其发病机制尚不清楚。动物模型是研究人类疾病的重要手段,目前NAFLD的动物模型,国内外已有很多报道^[15-17]。NAFLD动物模型主要可以分为两大类:一类是由相关基因变异引起的遗传性模型(遗传性瘦素缺乏型小鼠模型、遗传性外周循环游离脂肪酸增加的小鼠模型、遗传性肝脏脂肪生成增加的小鼠模型及遗传性脂肪酸 β 2氧化减少的小鼠模型);一类是由饮食或药物引起的获得性模型(获得性游离脂肪酸和肝脏脂肪生成增加的小鼠模型,获得性脂肪酸 β 2氧化减少小鼠模型)。在众多复制NAFLD模型的方法中,高脂饮食诱导的NAFLD模型最为常见。

在高脂饮食诱导非酒精性脂肪性肝病模型中,一种以高脂饲料(含87.7%普通饲料+10%猪油+2%胆固醇+0.3%胆酸钠)喂养8-12 wk后可形成中至重度大泡性肝脂肪变,伴转氨酶增高,100%复制出非酒精性脂肪性肝病模型^[18];另一种是高脂配方的乳剂灌胃的造模方法,采用高脂液体饲料喂养SD大鼠(脂肪71%,碳水化合物11%,蛋白质18%),3 wk即可形成全小叶肝细胞脂肪变,伴有肿瘤坏死因子 2α 和I型胶原mRNA的表达增强和YP2E1 mRNA表达下调,可诱发线粒体损伤和氧化应激^[19]。还有文献报导用花生油代替猪油制成高脂乳剂(花生油40 g、胆固醇15 g、奶粉8 g、蔗糖15 g等),SD大鼠连续灌胃,5 wk内成功复制出大鼠非酒精性脂肪性肝病模型,并且发现富含多不饱和脂肪酸的花生油可比猪油获得更为理想的造模效果^[20],但有文献报道采用高脂乳剂灌胃,实验动物常出现精神萎靡、皮毛无光蓬乱、腹泻、拒食、体质下降甚至死亡的现象^[21,22]。因此我们推荐选择高脂饮食诱导的NAFLD模型。

3 NAFLD病证结合动物模型制作方法探讨

3.1 血瘀型NAFLD 血瘀型动物模型是中医实验研究中常用的证型,关于该证型的制作方法较多,大鼠皮下注射大剂量肾上腺素加冰水应激是最早制作的方法,可复制出血液流变性呈黏、浓、凝、聚的血瘀证模型^[23,24]。该模型全血黏度、血浆黏度、全血还原黏度、血细胞比容、红细胞聚集指数、红细胞变形指数等血液流变学指标均有明显改变,但这种造模方法由于动物的耐受差,状态较差的大鼠易致死亡。因此又相继出现了半高脂饲料复合声、光、电刺激血瘀模型,

■研发前沿

中医药治疗非酒精性脂肪性肝病的机制研究已开展很多,但是一直没有一种能够符合中医证候理念的该疾病动物模型的出现,这样的实验研究或将在某种程度上,影响了中医药治疗该病的疗效及治病机制的深入研究,因此病证结合动物模型是中医药治疗该病及所有疾病疗效及机制研究的关键点。

■相关报道

大量研究表明中医药治疗脂肪肝的优势在于中医的精髓-辨证论治,但是目前,关于该问题的研究存在着诸多问题,例如临床上尚需规范、系统的研究,而科研中缺乏对中医证候、病因病机的系统研究等。这些问题的解决,将对中医药治疗脂肪肝的研究提高到一个新的水平。

■应用要点

进一步加强对非酒精性脂肪性肝病证候动物模型的基础研究,或在某种程度上,对于寻找中医药治疗该病的疗效及其机制的深入的研究具有重要的意义。

饥饿、疲劳等综合因素制作的气虚血瘀模型等多种的血瘀证方法^[25-27]。

我们推荐采用扈新刚等^[27]建立的血瘀证方法,结合NAFLD模型制作血瘀型NAFLD模型。具体方法如下:在室温24℃-25℃,水温22℃-24℃,直径150 cm、高度为60 cm(水深控制为45-50 cm)的圆形水槽,以大鼠体质量4%负重(误差为±0.5%,随大鼠体质量增加不断调整,大约每周调整1次)条件下游泳,停止游泳的条件是以大鼠沉入水中10 s不能自行浮出水面为准,然后立即将大鼠捞出。同时给予高脂饲料(含87.7%普通饲料+10%猪油+2%胆固醇+0.3%胆酸钠)喂养12 wk,实验动物自由进食和饮水。

3.2 肝气郁滞型NAFLD 自1979年湖南医学院用CCl₄注射法建立肝郁证动物模型以来,国内外已相继出现了许多种肝郁模型。这些模型主要从两方面入手,一是用过量或毒性药物造成急慢性中毒损伤来制造模型(艾叶注射法、肾上腺素皮下注射法等),二是通过情志刺激改变动物的生理状况来制造模型(如情志刺激造模法、颈部带枷单笼喂养法(模具法)、夹尾激怒打斗法、捆绑法等^[28-32]。

我们推荐采用模具法与夹尾激怒打斗法联合刺激制作肝气郁滞型模型,结合NAFLD模型制作肝气郁滞型NAFLD模型。具体方法如下:普通饲料适应性喂养1 wk后,模具法(将自制的颈部枷锁套在大鼠的脖子上,模具影响了大鼠日间理毛、挠痒等活动,从而引起大鼠情志变化)与夹尾激怒打斗法(用以纱布包裹尖端的止血钳夹住其中的一只大鼠的尾巴,令其与其他大鼠打斗,进而激怒全笼大鼠,每次刺激30 min)^[28-32]交替使用,同时给予高脂饲料(含87.7%普通饲料+10%猪油+2%胆固醇+0.3%胆酸钠)^[18]喂养12 wk,实验动物自由进食和饮水。

3.3 脾气虚弱型NAFLD 用泻下法致脾虚是脾虚证模型最常用的造模方法,其中绝大多数为苦寒泻下法^[33-35]。早在1983年,于尔辛等用纯系雌性BALB/c小鼠,以大黄芒硝合剂灌胃,2-3 d起出现便软、溏,并持续腹泻,第4-5天起形体消瘦,少活动,毛散乱无华,四肢冷,形成一系列类似脾虚的症状。目前还有饮食失节法、耗气破气法、劳倦过度法、过劳加饥饱失常法、劳倦过度加饮食不节法、利血平法等多种方法制作脾虚动物模型^[36-38]。

我们推荐采用经典的苦寒泻下法制作脾虚证模型,结合NAFLD模型制作脾气虚弱型

NAFLD模型。具体方法如下:普通饲料适应性喂养1 wk后,给大鼠灌服大黄水煎剂^[36]5 g/(kg·d),同时给予高脂饲料(含87.7%普通饲料+10%猪油+2%胆固醇+0.3%胆酸钠)^[18]喂养12 wk,实验动物自由进食和饮水。

3.4 肾虚型NAFLD 去势法(切除双侧的卵巢或睾丸及附睾)是最常用的肾虚证模型造模方法^[39,40],目前还有氢化可的松、羟基脲法、甲基硫氧嘧啶法及肾上腺次全切除法等多种方法制作肾虚动物模型^[41,42]。

我们推荐采用经典的去势法制作肾虚证模型,结合NAFLD模型制作肾虚型NAFLD模型。具体方法如下:普通饲料适应性喂养1 wk后,切除大鼠双侧的睾丸及附睾^[39],同时给予高脂饲料(含87.7%普通饲料+10%猪油+2%胆固醇+0.3%胆酸钠)^[18]喂养12 wk,实验动物自由进食和饮水。

4 结论

辨证论治是中医药治疗NAFLD的优势所在,治疗时可以在基本方的基础上加减治疗,因此具有广阔的前景。建立切实符合疾病发病内在本质的动物模型的制作方法,对中医学的发展具有重要意义,其将有助于中医治疗方法、治疗机制的深入探讨,以进一步提高疗效,有助于方剂配伍规律以及物质基础的揭示,有助于中药新药的研制等,并将成为中医理论与现代科技结合的一个突破口,为中医方药和临床研究提供广阔的前景。但要造出理想的中医病证结合动物模型,得到学界的公认,目前还有很大的难度。本文中所论及的不同证型的NAFLD动物模型,是在中医理论指导下,选择临床常见的证候并结合现有的公认的证候模型而提出来的,肯定存在不足之处,希望能对NAFLD病证结合动物模型的研究起到抛砖引玉的作用。

5 参考文献

- 1 中华医学会肝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疗指南. 实用肝病杂志 2007; 10: 1-3
- 2 季光, 范建高, 陈建杰, 陆伦根, 邢练军, 郑培永, 顾宏刚, 魏华凤, 尤圣富, 寿德刚, 朱培庭. 胆宁片治疗非酒精性脂肪性肝病(湿热型)的临床研究. 中国中西医结合杂志 2005; 25: 485-488
- 3 武润梅, 苏娟萍. 非酒精性脂肪肝的中医研究进展. 山西中医 2008; 24: 52-53
- 4 张慧, 孔祥廉. 非酒精性脂肪肝的中医药治疗. 亚太传统医药 2009; 5: 103-105
- 5 胡义扬. 脂肪肝的中医药治疗—一个值得深入研究的课题. 中西医结合肝病杂志 2001; 11: 129-130
- 6 广州中医药大学《中医内科五脏病学》编委会. 中医内科五脏病学. 广州: 广东科技出版社, 2001: 31
- 7 余轶群, 李军祥, 姬爱冬. 何首乌与三七提取物防治大

- 鼠非酒精性脂肪性肝病的实验研究. 山西中医 2009; 25: 54-56
- 8 黄静娟, 刘树军, 车念聪. 论痰瘀理论对非酒精性脂肪肝病证与治疗的指导作用. 中华中医药杂志 2006; 21: 765-767
- 9 叶蕾. 非酒精性脂肪肝纤维化指标与中医辨证分型相关性探讨. 北京中医药大学学报(中医临床版) 2004; 11: 15
- 10 邓银泉, 范小芬, 李剑平. 非酒精性脂肪肝痰瘀证与纤溶状态的关系. 中国中西医结合杂志 2005; 25: 22-24
- 11 邓银泉, 范小芬. 非酒精性脂肪肝纤维化指标与中医证型的关系. 中国中西医结合杂志 2001; 21: 652-653
- 12 叶放, 赵文霞. 中医对非酒精性脂肪肝的研究现状. 中国中西医结合消化杂志 2003; 11: 60-62
- 13 Jansen PL. Nonalcoholic steatohepatitis. *Neth J Med* 2004; 62: 217-224
- 14 Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003; 37: 1202-1219
- 15 Nanji AA. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease and steatohepatitis. *Clin Liver Dis* 2004; 8: 559-574, ix
- 16 Koteish A, Diehl AM. Animal models of steatosis. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 89-104
- 17 杨坤, 孔华丽. 脂肪肝动物实验模型的方法学研究进展. 解放军药理学学报 2005; 21: 374-376, 400
- 18 Hatsugai K, Ohkohchi N, Fukumori T, Akamatsu Y, Satomi S. Mechanism of primary graft non-function in a rat model for fatty liver transplantation. *Transpl Int* 2000; 13 Suppl 1: S583-S590
- 19 Lieber CS, Leo MA, Mak KM, Xu Y, Cao Q, Ren C, Ponomarenko A, DeCarli LM. Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 502-509
- 20 Zou Y, Li J, Lu C, Wang J, Ge J, Huang Y, Zhang L, Wang Y. High-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Life Sci* 2006; 79: 1100-1107
- 21 潘惠娟, 王超英, 方志敏. 苦丁茶对大鼠高脂血症及脂肪肝形成的影响. 浙江中医杂志 2003; 38: 404-405
- 22 戴林, 邓彬, 李爱萍, 于洪波, 白成, 卢盛明. 非酒精性脂肪性肝炎发病机制的实验研究. 临床肝胆病杂志 2004; 20: 285-286
- 23 李仪奎. 中药药理实验方法学. 上海: 上海科学技术出版社. 1991: 1451
- 24 刘月桂, 冯坤, 张灵菊. 对血瘀证动物模型造模药物 Adr最适浓度的探讨. 中国血液流变学杂志 2001; 12: 60-61, 64
- 25 苗兰, 潘映红, 任建勋, 刘建勋. 气滞血瘀证模型大鼠血清蛋白质组学初步研究. 中国中医基础医学杂志 2008; 14: 106-107
- 26 黄海军, 周迎春. 血瘀复合证动物模型的研制进展. 辽宁中医药大学学报 2009; 11: 222-223
- 27 扈新刚, 张允岭, 郑宏, 张锦, 闫妍, 黄启福. 气虚血瘀大鼠模型糖脂代谢及氧化应激反应研究. 北京中医药大学学报 2009; 32: 249-251
- 28 陈小野. 实用中医证候动物模型学. 北京: 中国协和医科大学、北京医科大学联合出版社. 1993: 264
- 29 乔明琦, 张惠云, 陈雨振, 韩秀珍, 姚泽贤, 刘长华, 宋承木. 肝郁证动物模型研究的理论思考. 中国医药学报 1997; 12: 298-300
- 30 吕志平, 刘承才. "肝郁"大鼠血浆TXA₂、PGI₂水平与肝微循环变化及逍遥散作用. 中国微循环 2000; 4: 160-161
- 31 陈可冀. 活血化瘀研究与临床. 北京: 中国协和医科大学、北京医科大学联合出版社. 1993: 162
- 32 须惠仁, 傅湘琦, 向丽华, 陈燕萍, 刘金红, 逯波. 肝郁证的动物实验研究-激怒刺激对大白鼠血液流变学的影响. 中医杂志 1991; 32: 44-47
- 33 北京师范大学生物系消化生理教研组. 中医脾虚证动物模型的造型. 中华医学杂志 1980; 60: 83-86
- 34 刘汶, 张敦义. 番泻叶致脾虚证动物模型的造型方法. 中国中西医结合脾胃杂志 1998; 6: 231-232
- 35 陈小野, 邹世洁, 张智, 易崇勤, 王丽华, 金敬善. 大鼠长期脾虚造模的实验研究. 中国中医基础医学杂志 1995; 1: 37-41
- 36 黄炳山, 毛翼楷, 范隆昌, 牟树理, 王其方, 许健鹏. 饮食失节所致的脾虚动物模型及中药治疗观察. 中西医结合杂志 1983; 3: 295-296
- 37 罗光宇, 黄秀凤, 杨明均. 偏食法塑造大鼠脾气虚证模型研究. 中医杂志 1990; 31: 49-51
- 38 刘学松, 黄树明, 李织. 利血平致动物脾虚模型机制的研究. 中国医药学报 1989; 4: 68-70
- 39 鞠大宏, 于福祿, 张丽坤, 于智敏, 赵宏艳, 刘梅洁, 张立石, 刘红, 潘静华, 王少君. 滋阴补肾法对卵巢切除所致骨质疏松大鼠成骨细胞COX-2蛋白和mRNA表达的影响. 中国中医基础医学杂志 2006; 14: 44-46
- 40 钱汝红, 庄剑青, 杨秋美, 梁玲利, 郭瑞新, 蔡承妹, 杨扬. 肾虚大鼠脑内雄激素受体的基因表达及补肾中药的调节作用. 中国老年学杂志 2005; 25: 1086-1089
- 41 高岗, 杨根金, 娄子洋. 肾虚证大鼠尿液的核磁共振谱代谢组学研究. 第二军医大学学报 2009; 30: 565-568
- 42 陈小野, 邹世洁, 王震, 吕爱平, 艾景录. 大鼠肾上腺次全切除肾虚模型胃、舌病理观察. 中国中医基础医学杂志 1999; 5: 20

■同行评价

本文对常见的NAFLD病证结合动物模型制作方法进行了论述, 对中医病证动物实验研究具有指导意义。

编辑 李军亮 电编 何基才