研究快报 RAPID COMMUNICATION

电针夹脊穴对非酒精性脂肪肝模型大鼠肝NF-κB表达及 肝功能的影响

曾志华,曾明慧,周萍,余海

背景资料

非酒精性脂肪性 肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)发病率 逐年升高. 目前临 床上尚无有效的 药物治疗方案, 针 灸治疗NAFLD确 有疗效, 但对其机 制研究则相对滞 后. 我们的前期实 验研究证实电针 可改善NAFLD大 鼠肝损伤, 本实验 在以往实验基础 上,继续研究电针 对NAFLD的治疗 机制.

曾志华, 周萍, 重庆医科大学中医药学院 重庆市 400016 曾明慧, 重庆医科大学校长办公室 重庆市 400016 余海, 重庆市九龙坡区第二人民医院 重庆市 401329 曾志华, 讲师, 主要从事电针治疗脂肪肝病机制的研究. 重庆市卫生局中医药科技计划基金资助项目, No. 2011 - 2 - 146

作者贡献分布: 此课题由曾志华设计; 动物模型制作和生化、病理学、免疫组织化学检测及分析由曾志华、曾明慧、周萍及余海共同操作完成; 论文写作由曾志华与周萍完成. 通讯作者: 周萍, 副教授, 400016, 重庆市渝中区医学院路1号,

重庆医科大学中医药学院. zhouping023@163.com 收稿日期: 2014-04-24 修回日期: 2014-06-19 接受日期: 2014-07-01 在线出版日期: 2014-08-18

Influence of electroacupuncture at Jiaji acupoints on liver NF-kB expression and liver function in nonalcoholic fatty liver rats

Zhi-Hua Zeng, Ming-Hui Zeng, Ping Zhou, Hai Yu

Zhi-Hua Zeng, Ping Zhou, School of Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China Ming-Hui Zeng, Office of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Hai Yu, Jiulongpo District Second People's Hospital, Chongqing 401329, China

Supported by: the Traditional Chinese Medical Science and Technology Project of Chongqing Health Bureau, No. 2011-2-146

Correspondence to: Ping Zhou, Associate Professor, School of Chinese Medicine, Chongqing Medical University, 1 Yixueyuan Road, Yuzhong District, Chongqing 400016, China. zhouping023@163.com

Received: 2014-04-24 Revised: 2014-06-19 Accepted: 2014-07-01 Published online: 2014-08-18

Abstract

AIM: To investigate the role of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and to observe the effect of electroacupuncture (EA) at the Jiaji acupoints on liver NF- κ B expression and liver function in NAFLD rats.

局行译 议者 迟宝荣, 教授, 吉 林大学第一医院 消化内科

METHODS: Wistar rats were randomly divided into either a normal group (11 rats) or a model group (32 rats). Rats were fed a high fat diet

(composed of 20 g/L cholesterol, 100 g/L lard and 880 g/L normal feed) to induce NAFLD. After 8 wk, one rat in each of the two groups was randomly selected and killed to verify the success of modelling. The rest rats were randomly divided into two groups: an NAFLD model group (n = 15) and an EA group (n = 15) 15). The EA group underwent acupuncture at the bilateral Jiaji acupoints (strength 1-2 mA, frequency 1.6-2.0 Hz density wave, 30 min each time) once daily. All the animals were killed after 4 wk of treatment to observe pathological changes of the liver, measure serum levels of aspartate aminotransferase (AST) and glutamic alanine aminotransferase (ALT), and detect the expression of NF-κB in the liver tissue by immunohistochemistry.

RESULTS: Compared with the normal group, rats in the model group showed moderate to severe fatty degeneration of liver cells, up-regulated expression of hepatic NF-κB, and increased serum ALT and AST levels (P < 0.05). Compared with the model group, the EA group showed reduced liver tissue changes, down-regulated liver NF-κB expression, and decreased serum ALT and AST levels (P < 0.05).

CONCLUSION: EA at the Jiaji acupoints exerts a therapeutic effect against NAFLD possibly by inhibiting the up-regulation of NF- κ B expression and improving the liver function in NAFLD rats.

 $\ \odot$ 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Electroacupuncture; Jiaji acupoints; Non-alcoholic fatty liver; NF- κB

Zeng ZH, Zeng MH, Zhou P, Yu H. Influence of electroacupuncture at Jiaji acupoints on liver NF-κB expression and liver function in nonalcoholic fatty liver rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(23): 3440-3444 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3440.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i23.3440



摘要

目的: 探讨核转录因子-κB(nuclear factor-kappa B, NF-κB)在非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)发病机制中的作用并观察电针夹脊穴的疗效及作用途径.

方法: δ Wistar实验大鼠随机分为正常组(11 只)和造模组(32只),造模组饲以高脂饮食(喂养饲料由20 g/L胆固醇、100 g/L猪油和880 g/L普通饲料混合组成)构建NAFLD大鼠模型,8 wk后随机处死正常组1只和造模组2只,病理组织学检查以验证造模成功. 然后将余下的造模组随机分为NAFLD模型组(15只),电针组(15只). 电针组选取双侧胸9-12夹脊穴,针刺后加通电针治疗仪(强度1-2 mA,频率1.6-2.0 Hz的疏密波), 1次/d,每次30 min,连续治疗4 wk后处死所有动物,观察肝组织病理学变化情况;检测血清天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、谷丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)含量;免疫组织化学法检测肝组织中NF-κB的表达.

结果:与正常组比较,模型组大鼠出现中度至重度的肝细胞脂肪变性,肝NF-κB表达上调,血清ALT及AST升高(*P*<0.05);与模型组比较,电针组肝组织脂肪性变得到不同程度的减轻;肝NF-κB表达下调;血清ALT及AST降低(*P*<0.05).

结论: 电针夹脊穴干预可抑制非酒精性脂肪 HNF-κB表达的上调, 改善其肝功能, 该作用 可能是其治疗NAFLD的作用机制之一.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 电针; 夹脊穴; 非酒精性脂肪肝; 核转录因 $\mathbf{F}_{\mathbf{r}}$ · κB

核心提示: 电针夹脊穴干预通过下调非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)模型大鼠肝核转录因子-κB的高表达,缓解胰岛素抵抗的进展以及减弱氧化应激反应,以此改善肝脏微循环和肝组织脂肪变程度,恢复肝功能,该作用可能是其治疗NAFLD的作用机制之一.

曾志华, 曾明慧, 周萍, 余海. 电针夹脊穴对非酒精性脂肪 肝模型大鼠肝NF- κ B表达及肝功能的影响. 世界华人消化杂志 2014; 22(23): 3440-3444 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3440.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i23.3440

0 引言

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver dis-

ease, NAFLD)发病率逐年增加, 相关病因包括遗 传-环境-代谢应激等因素, 其确切的发病机制尚 不完全清楚, 病理上是以弥漫性肝细胞大泡性 脂肪变为主要特征, 临床上包括单纯性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver, NAFL)和由其演变发生 的非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)以及脂肪性肝硬化3种类型[1]. 其发 病机制尚不完全清楚, 近年研究发现核转录因子 -кВ(nuclear factor-kappa B, NF-кВ)作为一类具有 多向转录调节作用的核蛋白因子, 在NAFLD发 生时表达增强, 启动炎症因子的基因转录而参与 肝脏的炎性损伤[2]. 据近年临床报道[3,4], 针灸治 疗NAFLD确有疗效. 我们的以往实验研究[5,6]结 果证实电针治疗可改善其肝功. 但具体机制仍不 十分明确. 本研究通过电针夹脊穴, 观察大鼠肝 NF-κB的表达以及对肝功能的影响, 能进一步探 讨电针治疗NAFLD的作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料 实验动物选用 & Wistar大鼠: 由重庆 医科大学实验动物中心提供[动物使用许可证: SCXK(渝)2007-0001]; 胆固醇购自广州天马精 细化工厂(进口分装); 猪油为市售; 天冬氨酸 氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、 谷丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)试剂购自南京生物建成有限公司; NF-κB 兔抗鼠购自北京福瑞生物工程公司: SABC试剂 盒、DAB显色液购自武汉博士德生物工程公司; 华佗牌一次性无菌针灸针(0.30 mm×25 mm)、 华佗牌电子针灸仪(SDZ-II型)由重庆医科大学 中医药学院实验室提供(购自苏州医疗用品有 限公司). Allegrax-12型离心机(美国贝克曼库尔 特有限公司)、UNICO 7200紫外分光光度计(龙 尼柯仪器有限公司)、生物显微镜(日本Olympus公司)、加液器、图像采集系统及分析系统 等设备由重庆医科大学中医药实验室和基础医 学院提供.

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备: å Wistar大鼠43只, SPF级, 体质量200 g±20 g, 适应性饲养7 d, 标记后随机分为正常组11只, 造模组32只. 造模采用陈世清^[7]高脂饮食法构建NAFLD大鼠模型, 喂养饲料由20 g/L胆固醇、100 g/L猪油和880 g/L普通饲料混合组成(由重庆医科大学动物实验中心按配方配制). 8 wk后随机抽取正常组大鼠1只和造模组大鼠2只脱颈处死, 取肝脏做病理组织学检查证实脂



表 1 治疗结束后各组大鼠血清AST、ALT的含量变化 (mean ± SD. U/L)

分组	AST	ALT
正常组	159.42 ± 44.15	44.27 ± 13.52
模型组	247.52 ± 93.54°	123.75 ± 43.91^{a}
电针组	$167.56 \pm 46.73^{\circ}$	$62.18 \pm 32.57^{\circ}$

 ${}^{\circ}P$ <0.05 ${}^{\circ}$ 正常组; ${}^{\circ}P$ <0.05 ${}^{\circ}$ 模型组. AST: 天冬氨酸氨基转移酶; ALT: 谷丙氨酸氨基转移酶.

肪肝已形成. 将余下的造模组大鼠30只予以标记后再随机分为2组: NAFLD模型组15只, 电针组15只. 实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国卫生技术部2006年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》.

1.2.2 各组处理: 将造模成功的大鼠予以标记后随机分为2组,一组不做任何治疗,为模型组(n = 15);一组给予电针治疗,为电针组(n = 15);所取穴位参照《实用动物针灸手册》定位^[8],针刺方法: 置大鼠于"固定器"(重庆医科大学中医药实验室自制),取双侧胸9-胸12夹脊穴,穴位在脊柱正中旁开0.3 cm处,使用规格为0.3 mm×15 mm的华佗牌无菌针灸针,直刺至肌层,然后接通电子针灸治疗仪,采用强度1-2 mA,频率1.6-2.0 Hz的疏密波^[9],疏波和密波自动交替,保持清醒状态,1次/d,每次30 min,连续"治疗"4 wk.治疗期间,模型组大鼠分别置入固定器中30 min,连续4 wk. 正常组始终喂以基础饲料,模型组和电针组继续饲以高脂饲料.

1.2.3 标本采集: 实验12 wk末, 大鼠禁食24 h, 腹腔注射20%水合氯醛(0.3 mL/100 g)麻醉, 经心脏穿刺采血, 迅速取出肝脏, 每只均于肝左叶取材3块(约1.0 cm×1.0 cm×0.3 cm), 浸泡于40 g/L中性甲醛固定, 用于病理切片和免疫组织化学切片. 所采血液于清洁塑料离心管中静置后, 在低温离心机上分离血清(3000 r/min, 10 min), 集中待测.

1.2.4 检测指标: 血清ALT、AST: 采用比色法, 严格按照试剂盒说明书进行检测. 肝组织病理及免疫组织化学检查: 取肝左叶, 40 g/L甲醛固定, 石蜡包埋、常规切片(切片厚度约4 μm), HE染色, 光镜下观察肝组织病理学改变; NF-κB表达: 肝脏以40 g/L甲醛固定后, 石蜡包埋、切片(切片厚度约4 μm), 每块组织切片3张. 采用链酶素抗生物素蛋白-过氧化酶免疫组织化学法, 二氨基联

苯胺显色,一抗NF-кB的工作浓度为1:100,操作流程按试剂盒说明书进行.每次实验均设阴性对照,以PBS替代一抗.免疫组织化学显示棕黄色或棕褐色颗粒为阳性,每张切片最少20个高倍视野观察阳性颗粒的染色程度,用IPP6.1免疫组织化学分析软件将图片阳性区域转换为累积光密度(I4)值的定量分析.

统计学处理 采用SPSS12.0软件包进行统计学分析,数据结果用mean±SD表示,组间比较选用方差分析中的SNK法. *P*<0.05为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 肝组织病理形态变化 至12 wk末, 肉眼观察 正常组大鼠肝色鲜红; 模型组肝脏体积增大, 颜色偏黄, 电针组大鼠肝色接近正常组. 光镜下: 正常组肝小叶结构清晰, 肝细胞形态正常, 呈放射状整齐排列; 模型组肝细胞出现中度至重度的脂肪变性, 肝索紊乱, 大量的肝细胞肿胀呈圆形, 细胞间界限不清, 胞浆内充满以大泡型为主的脂肪空泡或脂滴, 偶可见碎屑样坏死; 电针组肝脏病理形态接近正常组, 肝细胞结构趋于正常, 胞质疏松, 肝窦增宽, 极少数肝细胞内可见小脂滴, 无炎性细胞浸润. 与模型组比较, 电针组大鼠肝组织脂肪变程度和炎性损伤得到不同程度的改善(图1).

2.2 各组大鼠血清ALT、AST含量变化 模型 组与正常组比较, ALT、AST含量显著升高 (*P*<0.05); 与模型组比较, 电针组含量显著降低 (*P*<0.05)(表1).

2.3 各组大鼠肝NF-κB表达 NF-κB免疫组织化学显示棕黄色或棕褐色颗粒为阳性,正常组大鼠肝组织中NF-κB几乎未见表达,模型组中NF-κB表达增强,主要分布在中央静脉以及肝细胞坏死灶周围,与模型组比较,电针组肝组织中NF-κB的表达下调(图2).

使用IPP6.1软件对图片阳性区域进行累积光密度(IA)值测定. 与正常组(IA)值(51863.301 \pm 2943.120)比较,模型组(IA)值(114671.591 \pm 2984.554)显著升高(P<0.01),为强阳性表达;与模型组比较,电针组IA值(60302.311 \pm 2912.320)显著降低(P<0.01).

3 讨论

近年来, NAFLD患病率逐年增加, 引起医学和社会的密切关注^[10], 目前较公认的"二次打击"



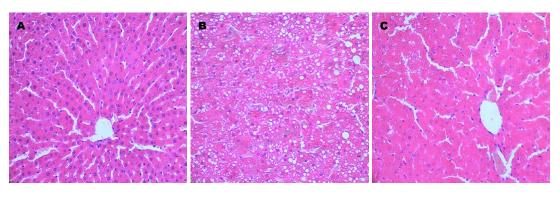


图 1 大鼠肝组织病理学改变(HE×400). A: 正常组; B: 模型组; C: 电针组.

龙用 要显示的 A FLD 的 A FLD 的 A FLD 大公园 A S 是 是 会是 一种 A FLD 大公园 A FLD A

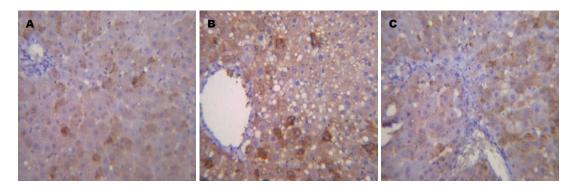


图 2 各组大鼠肝NF- κ B的表达(×400). A: 正常组; B: 模型组; C: 电针组. 阳性表达呈黄色或棕褐色颗粒, 正常组NF- κ B几乎未见表达; 模型组NF- κ B表达增强, 主要表达在中央静脉周围, 电针组NF- κ B的表达均有不同程度的下调. NF- κ B: 核转录因子- κ B.

学说认为: 首次打击是胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)为主引起肝脏脂质代谢紊乱以及肝细胞脂肪变性,增强了肝细胞对内源性和外源性损害因子的敏感性;二次打击主要包括氧化应激、NF-κB等细胞转录因子活化等因素导致脂肪变性的肝细胞发生炎症、坏死[11]. NF-κB被激活后,快速发生核易位,启动炎症因子的基因转录,加大肝脏炎症反应,以此促进NAFLD肝炎和肝纤维化的进程.

NF-κB作为一种作用十分广泛的真核细胞转录因子,广泛存在于多种细胞组织中,通过调节免疫和炎症递质的表达以及炎症相关因子,在氧化应激、免疫反应、肝组织的炎性反应、肝细胞凋亡以及再生中起重要作用^[12,13]. NF-κB参与了NAFLD过程中的二次打击: NAFLD中存在的高游离脂肪酸血症引起组织蛋白酶B的释放和溶酶体失稳定,从而导致NF-κB的活化和表达增强,促进胰岛素受体底物损害,造成IR的持续进展,同时,NF-κB的活化和表达可激活肝脏枯否细胞,释放大量活性氧和增强氧化应激,加重肝脏的炎症反应和损伤^[14]. 此外,NF-κB还可能通过诱导纤维化因子、肝星状细

胞(hepatic stellate cell, HSC)的活化、cTG等基因的表达介导肝纤维化的过程^[15]. 鉴于NF- κ B与NAFLD的发病关系密切, 探究电针夹脊穴干预对NAFLD大鼠肝NF- κ B表达的影响, 将为电针治疗NAFLD的机制提供新的理论基础.

实验结果表明, NAFLD模型大鼠肝组织病理学结果显示肝细胞出现中度至重度的脂肪变性, 免疫组织化学显示肝NF-κB表达增强, 血清ALT、AST含量上升, 提示NAFLD模型大鼠肝脏出现炎性反应和损伤, 其机制可能是由于NF-κB表达增强, 导致IR的进展以及氧化应激增强, 促进肝细胞发生炎症、坏死; 与模型组比较, 电针组大鼠脂肪变程度和炎性损伤均有不同程度的改善; 血清ALT、AST含量降低; 免疫组织化学显示肝NF-κB表达受到一定程度的抑制, 推测电针夹脊穴干预通过下调NF-κB的高表达, 缓解IR的进展以及减弱氧化应激反应, 以此改善肝脏微循环和肝组织脂肪变程度, 恢复肝功能.

NAFLD在中医学中无独立的病名,可归属于"胁痛"、"肝着"、"积聚"等范畴. 中医认为其主要病机为肝脾气化失司、痰浊内



间存存价 本文设计合理, 与在在的完成的是一个 NAFLD大鼠机的人员 以期为的人。 以期为人。 以期有力的。 是有较好的。 是有较价值。 蕴、湿邪内生, 致使后期肾精亏虚, 肝、脾、肾 功能失调,终致滞气、瘀血、痰湿相互搏结,痹 阻于肝脏脉络而成. 临床采用电针穴位治疗本 病, 以达疏肝健脾、理气燥湿、活血化瘀之功, 华佗夹脊穴(简称夹脊穴)属祖国传统医学的重 要组成部分, 不仅是人体最大的经外奇穴, 而且 是人体与脏腑经络相互流注转输的腧穴, 他依 附于足太阳膀胱经和督脉, 故有助膀胱之气, 夹 督脉之阳, 疏通经脉和调理脏腑的作用. 华佗夹 脊穴的这种独特的调节枢纽作用, 使其对许多 疑难杂症和脏腑疾病具有较好的疗效, 越来越 多的医家在临床上重视其治疗优势[16]. 局部解剖 学研究也证实,夹脊穴从分布形式上与神经节 段关系非常密切, 针刺夹脊穴均可对脊神经后 支以及前支产生影响, 前支因与交干相联系, 能 影响交感神经, 具有调节脏腑气血的功能; 针刺 夹脊穴所引起的针感传导反应, 可通过神经以 及体液的调节作用, 对交感神经末梢释放的化 学介质产生影响, 达到调整脏腑功能, 治疗疾病 的目的[17]. 临床研究证实电针双侧T9、T10夹脊 穴为主治疗NAFLD患者, 可使总胆固醇、甘油 三酯、转氨酶等指标有显著改善[18]. 本次实验 采用电针大鼠夹脊穴收到较好的防治NAFLD的 作用, 此研究结果对临床应用电针夹脊穴治疗 NAFLD有一定的参考价值.

4 参考文献

- 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疗指南. 中华肝脏病杂志 2010;
 18: 163-166
- 2 Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, Wynshaw-Boris A, Poli G, Olefsky J, Karin M. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med* 2005; 11: 191-198 [PMID: 15685170]

- 3 王骏, 张春燕,程玲,陈利群.健脾法电针配合耳穴治疗肥胖性脂肪30例临床观察.上海中医药杂志 2006; 40:41-42
- 4 周丽, 林桂权, 庞崇祥, 庞燕. 针刺配合血栓通注射液 治疗脂肪肝疗效观察. 河北中医 2008; 30: 961-962
- 5 冯雯琪,曾志华,卓廉士.电针对非酒精性脂肪肝大鼠血脂及肝功能的影响.中华中医药杂志 2010; 25:853-855
- 6 曾志华, 冯雯琪, 卓廉士. 电针对非酒精性脂肪肝肝细胞色素P4502E1表达及氧化抗氧化的影响. 第四军医大学学报 2008; 29: 994-997
- 7 陈世清, 刘杞, 孙航. 脂肪肝胰岛素抵抗大鼠模型的建立. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 105-108
- 8 胡元亮. 实用动物针灸手册. 北京: 中国农业出版社, 2003: 385-388
- 9 胡卫东. 针灸治疗非酒精性脂肪肝的临床观察. 中国 针灸 2005; 26: 13-16
- Williams R. Global challenges in liver disease. Hepatology 2006; 44: 521-526 [PMID: 16941687]
- 11 Lalor PF, Faint J, Aarbodem Y, Hubscher SG, Adams DH. The role of cytokines and chemokines in the development of steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2007; 27: 173-193 [PMID: 17520517]
- 12 Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, Shoelson SE. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* 2005; 11: 183-190 [PMID: 15685173 DOI: 10.1038/nm1166]
- Ribeiro PS, Cortez-Pinto H, Solá S, Castro RE, Ramalho RM, Baptista A, Moura MC, Camilo ME, Rodrigues CM. Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors, and activation of NF-kappaB in the liver of non-alcoholic and alcoholic steatohepatitis patients. Am J Gastroenterol 2004; 99: 1708-1717 [PMID: 15330907]
- 14 Potoka DA, Upperman JS, Nadler EP, Wong CT, Zhou X, Zhang XR, Ford HR. NF-kappaB inhibition enhances peroxynitrite-induced enterocyte apoptosis. *J Surg Res* 2002; 106: 7-14 [PMID: 12127801 DOI: 10.1006/jsre.2002.6423]
- 15 Choudhury J, Sanyal AJ. Insulin resistance and the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. Clin Liver Dis 2004; 8: 575-594, ix [PMID: 15331065]
- 16 宗振勇, 尚方明, 赵方雁. 华佗夹脊穴的现代研究及临床应用综述. 国医论坛 2012; 27: 54-57
- 17 张永臣, 贾红玲. 华佗夹脊穴的实验研究进展. 江西中 医学院学报 2006; 18: 28-30
- 18 王宁, 谭奇纹. 电针夹脊穴为主治疗非酒精性脂肪肝 30例. 中国针灸 2013; 33: 717-718

编辑 田滢 电编 都珍珍



