

补肾化浊方对非酒精性脂肪肝大鼠 血清瘦素与胰岛素抵抗的影响

孙建光^{1*}, 高继龙²

(1. 山东中医药大学临床学院, 济南 250011; 2. 济宁市第一人民医院, 山东 济宁 272137)

〔摘要〕 目的:研究补肾化浊方对高脂饲料喂养大鼠肝功、血脂、血糖、胰岛素抵抗、瘦素的影响,探讨补肾化浊方防治非酒精性脂肪肝作用机制。方法:45 只 Wistar 大鼠随机分为空白组、模型组、水林佳(19 g·kg⁻¹)组和补肾化浊方(含生药 20 g·kg⁻¹)组。空白组予普通饲料喂养,其余 3 组予高脂饲料喂养,水林佳组、补肾化浊方组在高脂饲料喂养的同时进行相应的药物干预,12 周后,处死大鼠,计算大鼠肝指数、Lee's 指数、胰岛素抵抗指数(IRI)、胰岛素敏感指数(ISI),检查肝功能、血脂、血糖、胰岛素(INS)、瘦素(LEP),并进行肝脏病理检查。结果:与模型组比较,补肾化浊方组、水林佳组均能明显改善大鼠丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、LEP 水平($P<0.01$);在改善大鼠 INS、IRI、ISI 方面,补肾化浊方组优于水林佳组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),水林佳组对 INS、IRI 无明显改善作用,水林佳组、补肾化浊方组大鼠脂肪染色、糖原染色改善优于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:补肾化浊方通过保肝、调节血脂、改善瘦素及胰岛素抵抗等方面发挥治疗作用。

〔关键词〕 补肾化浊方; 非酒精性脂肪肝大鼠; 瘦素; 胰岛素抵抗

〔中图分类号〕 R285.5 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2012)24-0288-04

Influence of Bushen Huazhuo Fang on Leptin and Insulin Resistance in Rats with Nonalcoholic Fatty Liver

SUN Jian-guang^{1*}, GAO Ji-long²

(1. Affiliated Hospital, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250011 China;

2. Jining First People's Hospital, Jining 272137, China)

〔Abstract〕 **Objective:** To study the influence of Bushen Huazhuo Fang (BHF) on improving leptin and insulin resistance in rats with nonalcoholic fatty liver, and to explore its mechanism. **Method:** Forty-five Wistar rats were randomly divided into blank group, model group, silybin capsules (19 g·kg⁻¹) group and BHF group. The blank group was fed with normal diet, model group, silybin capsules and BHF group were fed with the high fat diet. Silybin capsules and the BHF group were fed with the corresponding drug. After 12 weeks, rats were sacrificed, the rat liver index, Lee's index, insulin resistance index (IRI), insulin sensitivity index (ISI) were calculated. Liver chemical parameters, blood lipids, blood glucose, insulin (INS), leptin (LEP) and tumor necrosis factor and liver Pathological investigation were carried out and evaluated. **Result:** BHF and silybin could significantly improve the alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), LEP ($P<0.01$); BHF was better than silybin for improving INS, IRI, ISI ($P<0.05$ or $P<0.01$), Silybin had no significant effect on improving INS and IRI. Silybin and BHF groups were better than the model group in fat staining, glycogen staining ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion:** The therapeutic effect of BHF may come from protecting liver, regulating blood lipids, improving LEP and IRI.

〔Key words〕 Bushen Huazhuo fang; non-alcoholic fatty liver; leptin; insulin resistance

〔收稿日期〕 20120629(427)

〔基金项目〕 山东省高等学校科技计划项目(J09LF14)

〔通讯作者〕 * 孙建光,副主任医师,医学博士,从事中西医结合肝病研究,Tel:0531-68617961,E-mai:sjg0303@163.com

前期临床研究已证实补肾化浊方具有良好的抗脂肪肝作用^[1],本研究通过观察补肾化浊方对非酒精性脂肪肝(nonalco-holic fatty liver,NAFL)大鼠血清瘦素(LEP)及胰岛素抵抗的干预作用,探讨其防治NAFL的作用机制。

1 材料

1.1 动物与饲料 SPF级Wistar大鼠45只,雄性,体重200~240 g。大鼠自由摄食饮水,室温18~26℃,相对湿度55%~65%,通风干燥、安静,12 h光照周期。购自山东中医药大学实验动物中心,许可证号D20100215。标准普通饲料购自山东大学实验动物中心,高脂饲料(基础饲料88%,猪油10%,胆固醇1.5%,胆盐0.5%)由山东中医药大学实验动物中心制作。

1.2 药物与试剂 补肾化浊方:由枸杞子15 g,女贞子15 g,黄精15 g,决明子15 g,炒山药15 g,泽泻12 g,茯苓15 g,薏苡仁30 g,冬瓜仁30 g,茵陈20 g,败酱草20 g,芦根15 g等组成。药材均购自山东中医药大学附属医院门诊中药房,由我院制剂室统一水煎浓缩至每剂50 mL。水飞蓟宾胶囊(水林佳,天津天士力制药股份有限公司)。即用型SABC免疫组化染色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);糖原染色试剂盒、脂肪染色试剂盒(福州迈新生物技术有限公司);胰岛素(INS)、瘦素(LEP)放免试剂盒(解放军总医院科技开发中心放免研究所)。

1.3 仪器设备 AU2700全自动生化分析仪(日本Olympus公司),HPIAS-1000高清晰度彩色病理图文分析系统(武汉同济医科大学千屏影像工程公司)。

2 方法

2.1 动物分组及处理 45只Wistar大鼠适应性喂养1周后,随机分为正常空白组、模型组、补肾化浊方组、水林佳组。正常空白组以普通饲料喂养,其余3组予高脂饲料喂养,同时补肾化浊方组、水林佳组分别予以补肾化浊方(含生药20 g·kg⁻¹)和水林佳(19 g·kg⁻¹),1次/d,连续12周。

2.2 标本采集 12周末,大鼠隔夜空腹,10%水合氯醛300 mg·kg⁻¹ ip麻醉,开腹,下腔静脉取血;暴露肝脏,观察肝脏大小、颜色,称湿重,取约1 cm³肝组织置10%中性甲醛固定,常规制片,片厚4 μm。

2.3 观察项目

2.3.1 一般情况 观察实验期间大鼠死亡情况,每2周称体重。处死大鼠时,测量身长(鼻尖至尾根),称量大鼠体重、肝湿重,计算肝指数及Lee's指数。

肝指数 = 肝湿重/体重 × 100

Lee's 指数 = 体重(g)^{1/3} × 10³/体长(cm)

2.3.2 血清指标观察 包括血清肝功能、血脂、血糖,采用全自动生化分析仪测定。血清LEP,INS采用放射免疫分析法测定。

2.3.3 胰岛素抵抗指数(IRI) 采用稳态模型法(homeostasis model assessment,HOMA)计算。

IRI = 空腹血糖(FBG) × 空腹胰岛素(FINS)/22.5

计算值取自然对数变换后,成为正态分布。

2.3.4 胰岛素敏感指数(ISI)

ISI = 1/(FBG × FINS)

计算值取自然对数变换后,成为正态分布。

2.3.5 肝组织形态学观察

2.3.5.1 肉眼观察 肝脏大小、形态、肝表面及切面的颜色。

2.3.5.2 光镜观察 ①HE染色:染色后细胞核呈蓝色,细胞浆呈粉红色或红色。②脂肪染色(苏丹Ⅲ法):脂肪呈橙红或鲜红色,胞核呈蓝色。③糖原染色(高碘酸—无色品红染色法):阳性颗粒被染紫红色或红色,背景为蓝色。在光学显微镜下(200倍)选择阳性细胞较多的区域采集3~5个视野,输入到HPIAS-1000高清晰彩色病理图文分析系统内,进行计算机定量分析。

2.4 统计学分析 应用SPSS 16.0软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用 t 检验,多样本比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对模型大鼠一般情况和肝指数、Lee's指数的影响 实验过程中,空白组死亡2只,模型组死亡1只,水林佳组死亡1只。各组肝指数及Lee's指数比较无统计学差异。

3.2 对模型大鼠肝功能的影响 模型组大鼠丙氨酸氨基转移酶(ALT),门冬氨酸氨基转移酶(AST),碱性磷酸酶(AKP)活性明显高于空白组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);补肾化浊方组大鼠ALT,AST,AKP活性显著低于模型组($P < 0.01$);补肾化浊方组与水林佳组比较无统计学差异。见表1。

3.3 对模型大鼠血脂的影响 模型组大鼠血清甘油三酯(TG)显著高于空白组($P < 0.01$);补肾化浊方组大鼠TG明显低于模型组($P < 0.05$)。见表1。

3.4 对模型大鼠血糖(GLU),INS,IRI,ISI,LEP水平的影响 模型组与空白组GLU水平无明显统计学差异,补肾化浊方组GLU明显低于模型组($P < 0.05$)。INS,IRI,ISI,LEP水平模型组均明显高于空

表 1 补肾化浊方对模型大鼠肝功能的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	AKP/U·L ⁻¹	TG/mmol·L ⁻¹	CHO/mmol·L ⁻¹
空白	—	8	58.00 ± 14.09 ²⁾	225.16 ± 48.78 ¹⁾	182.61 ± 53.46 ²⁾	0.36 ± 0.10 ²⁾	1.35 ± 0.48
模型	—	8	200.92 ± 88.44	303.56 ± 125.34	397.72 ± 82.34	0.58 ± 0.19	1.74 ± 0.45
水林佳	19	11	85.49 ± 32.70 ²⁾	163.42 ± 33.33 ²⁾	374.73 ± 208.66	0.46 ± 0.16	1.74 ± 0.29
补肾化浊方	20	12	91.57 ± 36.28 ²⁾	167.87 ± 39.22 ²⁾	271.85 ± 98.52 ¹⁾	0.42 ± 0.12 ¹⁾	1.70 ± 0.47

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 3,4 同)

表 2 补肾化浊方对模型大鼠 GLU,INS,IRI,ISI,LEP 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	GLU/mmol·L ⁻¹	INS/mmol·L ⁻¹	ISI	IRI	LEP/μg·L ⁻¹
空白	8	8.55 ± 2.66	7.20 ± 1.48 ²⁾	-4.06 ± 0.42 ¹⁾	0.95 ± 0.42 ²⁾	1.63 ± 0.15 ²⁾
模型	8	10.24 ± 3.84	14.11 ± 1.85	-4.91 ± 0.27	1.79 ± 0.27	4.15 ± 0.11
水林佳	11	9.28 ± 2.80	11.90 ± 3.08	-4.62 ± 0.39	1.51 ± 0.39	3.48 ± 0.35 ²⁾
补肾化浊方	12	7.10 ± 1.35 ¹⁾	7.79 ± 2.69 ^{2,4)}	-3.94 ± 0.38 ^{1,3)}	0.83 ± 0.38 ^{2,4)}	2.33 ± 0.23 ^{2,4)}

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与水林佳组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ 。

白组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);补肾化浊方组均低于模型组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且补肾化浊方组亦明显低于水林佳组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 2。

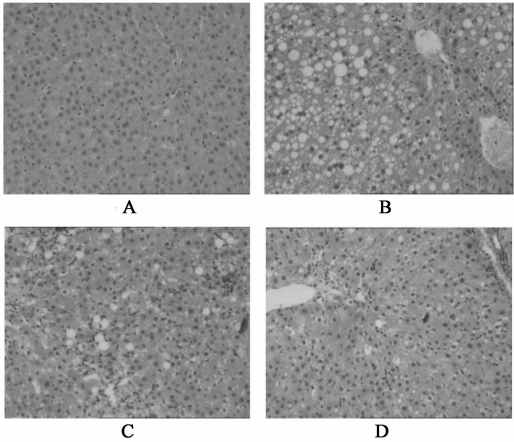
3.5 肝脏病理学变化

3.5.1 肉眼观察 空白组大鼠肝脏体积、色泽、质地无异常。模型组大鼠肝脏较大,包膜紧张,呈灰黄色,切面油腻感。补肾化浊方组及水林佳组大鼠肝脏体积介于空白组与模型组之间,呈红褐色,有少许肝组织呈黄色。

3.5.2 光镜观察 ①HE 染色 空白组:肝细胞排列正常,无肿胀及脂肪变性,无炎性细胞浸润。模型组:肝细胞体积增大,细胞内可见大量脂肪空泡,部分汇管区炎细胞浸润并纤维结缔组织增生。补肾化浊方组及水林佳组:细胞内脂肪空泡数量较模型组明显减少,肝小叶散在炎细胞浸润,汇管区未见明显纤维结缔组织增生。见图 1。②脂肪染色 模型组大鼠平均灰度显著低于空白组($P < 0.01$),阳性率显著高于空白组($P < 0.01$);水林佳组及补肾化浊方组平均灰度显著高于模型组($P < 0.01$),阳性率显著低于模型组($P < 0.01$)。见表 3。③糖原染色 模型组平均灰度、阳性率与空白组比较有显著差异($P < 0.01$);水林佳组、补肾化浊方组平均灰度显著低于模型组($P < 0.01$),阳性率显著高于模型组($P < 0.01$)。见表 4。

4 讨论

MAFL 的发病机制目前尚不清楚,多数学者认为,IR 是 NAFL 的共同发病基础^[2],LEP 可能通过影响 IR 而对 NAFL 的形成和发展起作用^[3]。IR 可减弱 INS 对脂肪的调节作用,使脂肪组织分解释放脂肪酸(FA)的增多,血液中游离脂肪酸(FFA)增



A. 空白组;B. 模型组;C. 水林佳组;D. 补肾化浊方组

图 1 各组肝组织切片(HE 染色,×200)

表 3 补肾化浊方对模型大鼠肝脏脂肪染色的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	平均灰度	阳性率/%
空白	8	176.27 ± 4.22 ²⁾	6.2 ± 8.3 ²⁾
模型	9	159.34 ± 5.64	66.4 ± 12.6
水林佳	11	163.72 ± 4.53 ¹⁾	42.1 ± 13.7 ²⁾
补肾化浊方	13	169.62 ± 3.71 ²⁾	47.4 ± 10.9 ²⁾

表 4 补肾化浊方对模型大鼠肝脏肝糖原染色的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	平均灰度	阳性率/%
空白	8	136.74 ± 2.64 ²⁾	75.3 ± 26 ²⁾
模型	9	163.32 ± 3.73	18.6 ± 17
水林佳	11	146.47 ± 3.51 ²⁾	34.7 ± 27 ²⁾
补肾化浊方	13	142.28 ± 2.96 ²⁾	38.8 ± 23 ²⁾

多,FFA 可直接由门静脉进入肝脏,引起肝细胞内过多 FA 堆积。另一方面 IR 还可通过抑制 FA 氧化,

使肝内 FA 利用减少而增加肝内 FA 蓄积,FA 的增加使极低密度脂蛋白合成增多,降解减慢,血浆极低密度脂蛋白增多,出现高 TG、低密度脂蛋白血症。LEP 是一种脂源性“脂肪调节激素”,LEP 的缺乏将导致血中 INS 水平的提高,同时可导致肝细胞内 FA 生成增加。在第二次打击中,LEP 与其他细胞因子相互作用,影响炎症反应,使肝脂肪储积发展为脂肪性肝炎^[4]。

中医认为,NAFL 的基本病机为肝失疏泄、脾失健运、肾失气化,以致气血津液代谢失常、痰湿浊瘀蕴结于肝所致。其中肾阴亏虚、肾失气化、浊邪内阻是 NAFL 肝形成的主要病机。方中枸杞子、女贞子滋补肝肾为君药;炒山药、黄精补脾益肾,泽泻、薏苡仁、茯苓利水渗湿健脾、升清降浊,共为臣药。决明子益肾清肝、润肠通便,茵陈、败酱清热利湿、解毒活血是为佐药,生山楂消食化积、行气散瘀为佐使药。诸药合用,共奏补肾健脾、祛湿化浊之功。现代药理研究亦证实:方中枸杞子具有明显的降血脂作用^[5]。同时能显著降低肝组织的脂质过氧化程度,提高肝组织中超氧化物歧化酶活性^[6]。女贞子的主要成分齐墩果酸对于 CCl₄ 诱导的肝损伤有保护作用,能显著降低 ALT 和 AST 活性^[7]。决明子水煎剂可明显降低营养性肥胖大鼠的体重、Lee's 指数、血清 TG、INS、MDA、FFA 含量^[8]。薏苡仁有降低血糖、改善 IR 的作用^[9];生山楂、泽泻可显著降低肝匀浆 TC、TG 水平,清除肝内堆积的 TG,减少 FFA 对肝细胞毒性作用,降低丙二醛含量,可清除自由基,增强抗氧化能力,抵御肝细胞的氧应激和过氧化,发挥降脂保肝的作用^[10]。茵陈、败酱有显著的抑制和降低血清 TC、TG、LDL-C 含量的作用,同时还有降低血清 ALT、AST 活力和改善肝细胞的水肿、灶性坏死、炎性细胞浸润等作用^[11-12]。

前期临床研究已证实补肾化浊方可以有效改善患者肝功能、血脂血糖代谢及 IRI,具有良好的抗脂肪肝作用。本实验结果显示,而治疗组均可降低,脂肪肝模型大鼠血清肝酶、血脂、血糖及 IR 指数、LEP 水平,而治疗组均有所降低,以补肾化浊方组降低最

明显。病理结果显示治疗组细胞内脂肪空泡数及炎细胞浸润程度较模型组明显降低,肝细胞脂肪变均有不同程度的改善。说明补肾化浊方可有效改善肝功能,促进脂质代谢,抑制肝脏的脂肪贮积,降低血清 LEP 水平,改善 IR 状态,从而达到防治非酒精性脂肪肝的目的。

[参考文献]

[1] 孙建光. 补肾泻浊饮治疗非酒精性脂肪性肝病 35 例疗效观察[J]. 中医研究, 2011, 24(3): 10.

[2] 颜勤明, 陈莹. 脂肪肝与胰岛素抵抗的关系[J]. 实用医学杂志, 2004, 20(3): 277.

[3] 李芳萍, 陈黎红, 程桦, 等. 血清瘦素水平与胰岛 B 细胞功能、胰岛素抵抗的关系[J]. 新医学, 2006, 34(2): 74.

[4] 谢萍, 周新喜, 张琴. 非酒精性脂肪肝发病机制及治疗[J]. 中西医结合学报, 2010, 8(3): 26.

[5] 衣艳君. 枸杞降血脂作用的实验研究[J]. 首都师范大学学报: 自然科学版, 2000, 21(4): 68.

[6] 朱彩平, 张声华. 枸杞多糖对高脂血症小鼠血脂及脂质过氧化的影响[J]. 营养学报, 2005, 27(1): 79.

[7] 王晓东, 刘永忠, 刘永刚. 红景天苷体外抗肝纤维化的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2004, 15(3): 138.

[8] 吴红, 孙艳, 吴琦, 等. 决明子对糖尿病大鼠糖代谢、脂代谢的影响[J]. 牡丹江医学院学报, 2006, 27(2): 6.

[9] 徐梓辉, 周世文, 黄林清, 等. 薏苡仁多糖对实验性 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗的影响[J]. 中国糖尿病杂志, 2002, 10(1): 44.

[10] 李晶, 冯五金. 生山楂、泽泻、莪术对大鼠脂肪肝的影响及其交互作用的实验研究[J]. 山西中医, 2006, 22(3): 57.

[11] 郑红花, 罗德生, 李映红. 茵陈煎剂保肝作用机理的实验研究[J]. 咸宁学院学报: 医学版, 2003, 17(2): 106.

[12] 将惠娣, 黄夏琴, 杨怡, 等. 九种护肝中药抗脂质过氧化作用的研究[J]. 中药材, 1997, 20(12): 161.

[责任编辑 何伟]