

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2022.10.002

❖ 基础研究 ❖

919 糖浆对非酒精性脂肪肝大鼠肝功能保护效应及其机制研究

潘丹青^{1,2}, 徐月妹¹

(1. 上海中医药大学, 上海 201203; 2. 复旦大学附属金山医院中医内科, 上海 201508)

【摘要】目的: 探讨 919 糖浆对非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 大鼠肝功能的保护效应及其机制。**方法:** 高脂饲料喂养复制 NAFLD 大鼠模型。将 SD 大鼠分为正常组、模型组、高剂量组、低剂量组, 每组各 8 只。正常组大鼠不予药物干预; 模型组大鼠给予生理盐水 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 进行灌胃给药; 高剂量组大鼠给予 919 糖浆 $27 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 进行灌胃给药; 低剂量组大鼠给予 919 糖浆 $6.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 进行灌胃给药。各组均干预 8 周, 而后采用酶联免疫吸附法检测大鼠血清甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (TC)、谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、肝组织超氧化物歧化酶 (SOD) 及丙二醛 (MDA) 水平; HE 染色光镜下观察肝组织形态, 比较各组间差异。**结果:** 与正常组比较, 模型组大鼠肝功能 TG、TC、ALT、AST 含量上升, SOD 降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 高剂量组和低剂量组 TG、TC、ALT、AST、MDA 降低, SOD 含量增加, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$); 高、低剂量组相比, TG、TC、ALT 水平差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$); HE 染色结果显示, 模型组肝细胞细胞结构紊乱, 肿胀, 呈炎性浸润, 高剂量组和低剂量组肝细胞病理状态有改善。**结论:** 919 糖浆可保护 NAFLD 大鼠肝功能, 减轻肝细胞损伤, 其机制可能与增强抗氧化能力, 减少氧化应激损伤相关, 并呈现一定剂量依赖的特点。

【关键词】 919 糖浆; 非酒精性脂肪肝; 氧化应激; 肝功能

【中图分类号】 R573.9 **【文献标志码】** A

Protective effect and mechanism of 919 syrup on liver function in rats with non-alcoholic fatty liver disease

PAN Dan-qing^{1,2}, XU Yue-mei¹

(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203; 2. Department of Traditional Chinese Medicine, Jinshan Hospital of Fudan University, Shanghai 201508, China)

【Abstract】Objective: To explore the protective effect and mechanism of 919 syrup on liver function in rats with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Methods:** The rat model of NAFLD was replicated by feeding high-fat diet. SD rats were divided into normal group, model group, 919 syrup high-dose group, and 919 syrup low-dose group, with 8 rats in each group. The rats in the normal group were not given drugs, and the rats in the model group were given sodium chloride by gavage at a dose of 10ml/kg per day, and the rats in the high-dose group were given 919 syrup by gavage at a dose of 27g/kg per day. The rats in the low-dose group were administered 919 syrup by gavage at a daily dose of 6.75 g/kg. After 8 weeks of intervention, enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect serum triglyceride (TG), total cholesterol (TC), alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), as well as the activity of superoxide dismutase (SOD) and the content of malondialdehyde (MDA) in liver tissue, the morphology of liver tissue was observed under HE staining light microscope, and the differences between the groups were compared. **Results:** Compared with the normal group, the liver function levels of TG, TC, ALT and AST in the model group increased, and the SOD decreased, which was significantly different ($P < 0.01$). Compared with the model group, TG, TC, ALT, AST and MDA in the high-dose group and the low-dose group decreased, and SOD content increased, with statistical significance ($P < 0.05$). Compared with the high and low dose groups, the levels of TG, TC and ALT were statistically significant ($P < 0.05$). The results of HE staining showed that the hepatocytes in the model group were disorganized, swollen, and inflammatory infiltration. Both the high-dose group and the low-dose group could improve the pathological state of hepatocytes. **Conclusion:** 919 syrup can effectively protect liver function and reduce liver cell damage in NAFLD rats, and its mechanism may be related to enhancing the level of antioxidant defense and reducing oxidative stress injury, and it shows a certain dose-dependent characteristics.

【Key words】 919 syrup; Nonalcoholic fatty liver disease; Oxidative stress; Liver function

非酒精性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver, NAFLD) 指除酒精和其他明确损肝因素外所致的以肝细胞脂肪沉积过度及脂肪变性为主要特征的临床综合征^[1]。近年来,随着人们饮食结构和生活方式的变化,非酒精性脂肪肝的发病率持续递增,且患病人群逐渐年轻化,已成为人类最常见的慢性肝脏疾病之一^[2]。常规西药干预为 NAFLD 的主要治疗方法,可改善患者肝功能、血脂水平等,但长时间应用易诱发诸多副作用或不良反应,具有一定的局限性。中医认为非酒精性脂肪肝属于“痰浊”“肝癖”“胁痛”“血瘀”范畴,所以中医治疗非酒精性脂肪肝患者一般主张化痰、祛湿、活血、疏肝^[3]。919 糖浆是一个中药复方制剂,由猕猴桃、太子参、茯苓、白术、陈皮、白豆蔻、淫羊藿、丹参、柴胡等药组成,集调理阴阳、理气活血、健脾化湿、清热解毒、滋养肝肾等法于一炉。既往研究^[4-5]证实该方安全有效,具有保肝降酶、抗肝纤维化的作用。本研究拟通过复制 NAFLD 动物模型,观察 919 糖浆对 NAFLD 大鼠的肝功能及其肝组织形态的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD 大鼠,SPF 级,雄性,体重(170 ± 10) g,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,许可证编号:SYXK(沪)2015-0008。动物饲养于上海市公共卫生临床中心实验动物部。室温 20 ~ 26 °C、相对湿度 40% ~ 70%,12 h 避光,12 h 光照,自由饮食。所有实验大鼠的使用和喂养严格遵照动物保护协会所规定的有关条款。

1.2 动物饲料及实验药品

高脂饲料配方:88% 普通饲料,2% 胆固醇,10% 猪油。由北京博爱港生物技术有限公司生产,货号: BAG1001。

919 糖浆委托山东广育堂国药有限公司生产,产品代号 TJ004,生产批号:20181201。

组成:猕猴桃汁 20 g,太子参 5 g,丹参 10 g,柴胡 2 g,白术 5 g,陈皮 2.5 g,淫羊藿 4g,白豆蔻 1.5 g。制法:蒸馏水 45 mL 煮沸,加蔗糖溶解,加热至 100 °C,趁热保温过滤,自滤器加热蒸馏水 100 mL 即得。

1.3 主要仪器与试剂

DNM-9602 酶标分析仪(北京普朗新技术有限公司),A-1506P 紫外分光光度计(上海谱元仪器有限公司),正置显微镜(日本 NIKON 公司),移液器(美国吉尔森 P 型移液器公司),恒温烘箱(上海恒一科学仪器有限公司),冰冻切片机(湖北徕克公司),摊片机(湖北徕克公司),水浴锅[Leica(莱卡

公司)],显微图象分析系统(日本 NIKON 公司),成像系统(Tanon 公司),甲醛(10010018)、异丙醇(40064360)购自上海国药集团,油红 O(S19039,上海源叶生物科技有限公司),甘油明胶(IH0270,北京雷根生物技术有限公司),甘油三酯试剂盒(A110-2),总胆固醇试剂盒(A111-1),谷草转氨酶试剂盒(C0010-2),谷丙转氨酶试剂盒(C009-2),微量丙二醛试剂盒(A003-2),超氧化物歧化酶试剂盒(A001-1)均购自南京建成生物工程研究所。

1.4 方法

1.4.1 实验动物分组与给药 造模及分组:随机选取 9 只雄性 SD 大鼠作为正常组,予以普通饲料喂养;25 只雄性 SD 大鼠作为造模组,予以高脂饲料喂养,连续喂养 14 周,复制 NAFLD 模型。在 14 周末,分别从正常组和造模组随机选取 1 只大鼠处死,对肝脏组织进行油红 O 染色。光镜下见到超过 5% 的脂肪变性的肝细胞即表明造模成功^[6-7]。造模成功后使用 SPSS22.0 软件,随机将造模组大鼠分为模型组、高剂量组、低剂量组。正常组大鼠体重为(521.22 ± 12.58) g;模型组大鼠体重为(522.56 ± 13.86) g;919 糖浆高剂量组大鼠体重为(523.37 ± 14.33) g;919 糖浆低剂量组大鼠体重为(525.45 ± 13.48) g。各组大鼠体质量比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

药物干预方法:正常组大鼠不进行药物干预,模型组大鼠给予生理盐水 10 mL · kg⁻¹ · d⁻¹ 进行灌胃给药;高剂量组大鼠给予 919 糖浆 27 g · kg⁻¹ · d⁻¹ 进行灌胃给药;低剂量组大鼠给予 919 糖浆 6.75 g · kg⁻¹ · d⁻¹ 进行灌胃给药^[4]。各组均干预 8 周。

1.4.2 样本采集 干预 8 周后,各组通过相同的步骤采集各组大鼠的血液及肝脏标本:先将各组大鼠禁食 12 h,在处死前称重大鼠,用 10% 的水合氯醛进行麻醉,打开腹腔,经下腔静脉采血,离心后取上清液。随后快速地将肝脏分离出来,并用生理盐水予以冲洗,再用滤纸去除上面的水分,最后给肝脏进行称量,得到的数字就是肝湿重,肝湿重占动物体重的百分比即为肝指数。从肝脏右侧最大叶取 2 × 2 cm² 大小的组织保存到 -80 °C 冰箱,待测 MDA、SOD;再取 2 × 2 cm² 大小的肝脏组织,将组织置于 4% 多聚甲醛溶液中进行固定,待 HE 染色用。

1.4.3 指标检测 肝功能、脂代谢及氧化应激指标:取出血清后,严格按照试剂盒说明书操作,采用酶联免疫吸附法测定血清中 TG、TC、ALT、AST、SOD、MDA 含量。

HE 病理学检测:取大鼠肝脏组织,采用 10% 福尔马林固定,石蜡包埋后切片,二甲苯、乙醇依次脱

蜡和水化。将入蒸馏水后的切片放入苏木精水溶液中染色 5 min,并在盐酸及氨水中分色。流水冲洗 1 h 后置入蒸馏水中,将切片置于伊红染色液染色 2 min。切片蒸馏水洗涤后,经无水乙醇脱水,二甲苯透明后进行封片,中性树脂固定后显微镜下观察组织病理变化。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件对各组样本数据进行统计分析。计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。符合正态分布且方差齐性的多组间均数的比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用最小显著差异法(LSD)分析。非正态分布方差不齐的多组均数比较采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠体重、肝湿重、肝指数比较

与正常组比较,模型组大鼠肝湿重与肝指数上升($P < 0.05$);与模型组比较,高剂量组和低剂量组肝湿重与肝指数降低($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠体质量及肝湿重、肝指数指标 $(\bar{x} \pm s)$

指标	正常组(n=8)	模型组(n=8)	高剂量组(n=8)	低剂量组(n=8)
体质量(g)	635.9 ± 41.6	652.8 ± 34.6	631.3 ± 26.7	648.4 ± 32.7
肝湿重(g)	19.4 ± 1.6	27.9 ± 1.9*	23.5 ± 1.9*#	25.5 ± 2.2*#△
肝指数(%)	3.04 ± 0.09	4.27 ± 0.08*	3.72 ± 0.15*#	3.93 ± 0.14*#△

* $P < 0.05$,与正常组比较;# $P < 0.05$,与模型组比较;△ $P < 0.05$,与高剂量组比较。

2.2 各组大鼠肝功能及脂代谢指标比较

与正常组比较,模型组 TG、TC、ALT、AST 含量增加,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,低剂量组与高剂量组 TG、TC、ALT 及 AST 含量均下降,差异有统计学意义($P < 0.01$)。高、低剂量组相比,TG、TC、ALT 及 AST 含量差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 干预后各组大鼠肝功能及脂代谢指标比较 $(\bar{x} \pm s)$

指标	正常组(n=8)	模型组(n=8)	高剂量组(n=8)	低剂量组(n=8)
TG(mmol/L)	1.16 ± 0.35	3.86 ± 0.68*	1.84 ± 0.48*#	2.39 ± 0.48*#△
TC(mmol/L)	2.80 ± 1.23	7.80 ± 1.11*	3.77 ± 1.02*#	4.97 ± 1.18*#△
ALT(U/L)	44.26 ± 5.45	115.44 ± 12.60*	59.46 ± 10.60*#	82.62 ± 17.87*#△
AST(U/L)	140.10 ± 13.74	336.65 ± 27.58*	171.97 ± 28.61*#	215.74 ± 25.06*#△

* $P < 0.05$,与正常组比较;# $P < 0.05$,与模型组比较;△ $P < 0.05$,与高剂量组比较。

2.3 各组大鼠肝组织 MDA 和 SOD 比较

与正常组比较,模型组大鼠肝组织中 MDA 增加,SOD 降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,低剂量组与高剂量组 MDA 值降低,SOD

增加,差异有统计学意义($P < 0.05$),高、低剂量组组间比较,MDA,SOD 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 干预后各组大鼠肝组织 MDA、SOD 比较 $(\bar{x} \pm s)$

组别	MDA(nmol/mg)	SOD(U/mg)
正常组(n=8)	2.96 ± 0.60	184.57 ± 30.99
模型组(n=8)	6.90 ± 1.09*	90.07 ± 14.46*
高剂量组(n=8)	4.08 ± 0.78*#	155.79 ± 13.50*#
低剂量组(n=8)	5.89 ± 0.85*#△	119.17 ± 21.63*#△

* $P < 0.05$,与正常组比较;# $P < 0.05$,与模型组比较;△ $P < 0.05$,与高剂量组比较。

2.4 干预后各组大鼠形态学比较

干预 8 周后,各组大鼠肝脏 HE 染色显示(200×):正常组的大鼠的肝小叶结构表现正常,肝细胞大小形态正常、结构清楚完整,核圆清晰可见,少量肝细胞内可见细微空泡,肝窦显示清晰,未见明显炎细胞浸润。与正常组相比,模型组肝细胞结构紊乱,肝小叶的结构比较模糊,肝细胞明显肿胀,肝细胞内呈现大量大小各异的空泡沉积,肝窦消失,局灶可见少量炎细胞浸润。与模型组相比,高剂量组与低剂量组肝细胞肿胀减轻,肝细胞内空泡数量减少、空泡形状缩小,高剂量组较低剂量组改善更为明显。见图 1。

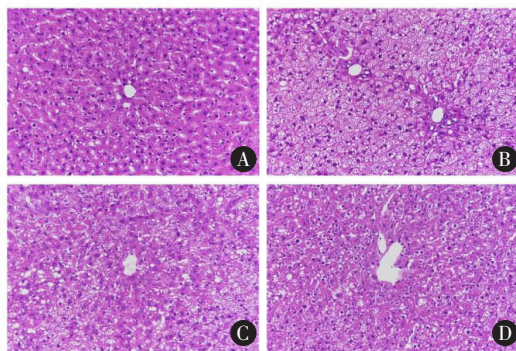


图 1 各组大鼠肝组织 HE 染色组织形态图(200×)

A.正常组;B.模型组;C.低剂量组;D.高剂量组。

3 讨论

NAFLD 是一种与肥胖、胰岛素抵抗、2 型糖尿病、高血压、高脂血症和代谢综合征相关的肝病,给患者、其家人和社会带来严重的健康、经济和体验负担^[8],由于糖尿病和肥胖症的流行,NAFLD 的患病率在中国迅速增加^[9-10]。中医药在治疗非酒精性脂肪肝各个方面均有着突出的优势,追溯古代文献中对非酒精性脂肪肝的临床特点、病因病机等描述,将其归纳为肥气、痰浊、胁痛、积聚、肝癖等范畴^[11]。病因以湿盛为主,病机以脾虚为首,总的来说,非酒

精性脂肪肝多因饮食不节、起居失常、情志不调、久病体虚,引起肝失疏泄、脾失健运、痰湿内阻、气机不利、瘀血阻滞等导致肝脾肾三脏功能失调而致^[12]。919 糖浆是一种中药复方制剂,由猕猴桃、太子参、茯苓、白术、陈皮、白蔻、淫羊藿、丹参、柴胡组成。具有燮理阴阳、理气活血、健脾化湿、清热解毒、滋养肝肾等功效。在临床可以用于肝损伤的肝细胞保护。

本研究利用高脂饮食成功复制大鼠非酒精性脂肪肝模型,模型组大鼠与正常大鼠比较,肝功能及脂代谢指标出现异常,光镜下肝组织形态出现大量大小各异的空泡沉积,肝窦消失,局部炎细胞浸润,呈现脂肪肝及肝损伤的特点。通过给予 919 糖浆灌胃干预,研究结果表明,无论剂量高低,用药组大鼠肝功能指标 ALT、AST 及脂代谢相关指标 TG、TC 与模型组比较,含量水平降低,光镜下肝组织形态分析也显示:药物组比模型组,肝细胞肿胀减轻,肝细胞内空泡数量减少、空泡形状缩小,结果提示,919 糖浆可以有效改善 NAFLD 大鼠肝功能,纠正大鼠脂代谢异常状态,对肝损伤形成保护效应,且该效应呈现剂量依赖特点,即高剂量组效应比低剂量效应更优。进一步通过检测氧化应激的相关指标 SOD、MDA,结果发现,模型组大鼠 SOD 活性明显降低,MDA 含量明显增多,提示 NAFLD 与氧化应激相关,药物干预后,大鼠肝组织 SOD 含量升高,MDA 含量降低,提示药物效应与改善大鼠氧化应激水平有关。本研究是对于 919 糖浆治疗性给药对脂肪肝大鼠保护作用的初步探讨,与同类研究^[13-16]相比较,我们将目光聚焦于氧化应激和增强抗氧化防御治疗 NAFLD 的机制。但对于其更深层次的分子机制尚未充分揭示,这也将是今后研究的一个重要方向。

综上,919 糖浆可通过减少 NAFLD 大鼠肝组织中的活性氧含量,增强抗氧化防御水平,减少氧化应激损伤来实现对于 NAFLD 大鼠肝组织的保护效应,且该效应成剂量依赖的特点。

参考文献

[1] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组,中国医师协会脂肪性肝病专家委员会,范建高,等.非酒精性脂肪性肝病防治指南(2018 年更新版)[J].临床肝胆病杂志,2018,34

(5):947-957.
[2] 高美丽,赵宝生,周丽华.肠道菌群调节治疗对非酒精性脂肪肝患者肝功能与血脂代谢的影响[J].川北医学院学报,2021,36(12):1597-1599,1608.
[3] 张晨阳,何渝熙,姚政,等.基于真实世界与复杂网络的非酒精性脂肪肝中医证候特点研究[J].时珍国医国药,2019,30(12):27-30.
[4] 徐月妹,张岚,肖茜,等.919 糖浆对肝郁气滞血瘀证模型大鼠脑胃 ghrelin 通路的影响[J].上海中医药杂志,2019,53(5):76-83.
[5] 张岚,陈漫漫,蒋森,等.护肝方 919 糖浆干预后束缚应激小鼠对仔代体质量及血浆 Leptin 的影响[J].上海中医药杂志,2019,53(2):86-90.
[6] 朱潇旭,段小花,王春霞,等.高脂饮食诱导大鼠非酒精性脂肪肝模型简介及技术要点探讨[J].实验动物科学,2019,36(1):73-76.
[7] Ding WJ, Wang Y, Fan JG. Regulation of adipokines by polyunsaturated fatty acids in a rat model of non-alcoholic steatohepatitis [J]. Arch Iran Med, 2014, 17(8):563-568.
[8] Younossi ZM. Non-alcoholic fatty liver disease-A global public health perspective[J]. J Hepatol, 2019, 70(3):531-544.
[9] Amarapurkar DN, Hashimoto E, Lesmana LA, et al. How common is non-alcoholic fatty liver disease in the Asia-Pacific region and are there local differences? [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2007, 22(6):788-793.
[10] Xiao J, Wang F, Wong NK, et al. Global liver disease burdens and research trends: Analysis from a Chinese perspective [J]. J Hepatol, 2019, 71(1):212-221.
[11] 赵红,谢雯.非酒精性脂肪性肝病的中西医结合治疗现状[J].中国临床医生杂志,2020,48(1):16-18.
[12] 刘莉丹,刘晏.健脾利湿法治疗非酒精性脂肪肝的研究进展[J].中成药,2021,43(9):2452-2456.
[13] 彪雅宁,张睦清,韩雪,等.当归芍药散对非酒精性脂肪肝大鼠 Keap1/Nrf2 信号通路的调节作用[J].中药药理与临床,2022,38(1):13-18.
[14] 董璐,曹雅静,薛焕利,等.丹栀逍遥散对非酒精性脂肪性肝病大鼠 LKB1/AMPK/ACC 通路及肝脂肪变性的影响[J].中西医结合肝病杂志,2022,32(01):44-48.
[15] 向晶,刘静.附子理中汤结合芒硝外敷对非酒精性脂肪肝患者临床疗效、肝功能及血清瘦素水平影响研究[J].中华中医药学刊,2022,40(6):213-216.
[16] 尹可欢,罗晓敏,丁翼,等.余甘子及其活性成分肝保护作用及机制的研究进展[J].中草药,2022,53(1):295-307.

(收稿日期:2022-05-01 修回日期:2022-05-27)