

治疗大法,组建“紫七软肝片”,其中紫草凉血解毒、三七养血活血为君药,一通一补,凉血而不留瘀,活血而不伤血;赤芍、虎杖配合紫草,凉血化瘀,清热利湿为佐药,黄芪健脾利湿,土旺湿自除;益气养血,与三七配伍,起到养肝肾,调脾气的作用为使药,诸药相合,共同起到清化瘀毒,滋养肝肾的作用,从而减少肝纤维化。

肝细胞损伤的常见原因有 ROS、TNF- α 、高血脂、高糖等,其中,ROS 对肝细胞的损伤最常见、最重要。乙醇作用肝细胞后,通过作用肝细胞线粒体、细胞色素 P4502E1 (CYP2E1)、过氧化物酶体(peroxisome)从而产生内源性的 ROS,ROS 激活 IKK 的 IKK β 亚单位被磷酸化,继而引起 I κ B α 的 Ser32 和 Ser36 位点被磷酸化,被释放的 p50/p65 则进行核移位,与基因上的 κ B 位点发生特异性结合,从而发挥调节细胞功能的作用,同时引起线粒体膜的通透性的增加,使各种凋亡因子从线粒体释放到细胞质中,从而激活 caspase 体系,引起 DNA 链的断裂、核苷酸的剔除和核苷酸碱基的各种修饰,致使细胞发生凋亡^[6]。

整体实验中对肝纤维化模型大鼠结果显示紫七软肝片能减少胶原沉积,减轻肝纤维化的症状^[7,8]。实验结果显示,乙醇作用肝细胞后,细胞活力降低,形态学上细胞核出现核分裂;mRNA 和蛋白水平 caspase3、NF- κ B 表达明显增高,紫七软肝片兔含药血清干预后,细胞形态学得到一定的恢复, caspase3、

NF- κ B 表达也接近正常水平,药物血清能清除 ROS,减少细胞 NF- κ B 表达,抑制炎症因子的释放和反应,从而减轻细胞的凋亡,这是紫七软肝片防治肝纤维化的可能机制之一。

参考文献

- Hiroshi Kubota, Hsin-lei Yao, Lola M. Reid. Identification and Characterization of Vitamin A - Storing Cells in Fetal Liver; Implications for Functional Importance of Hepatic Stellate Cells in Liver Development and Hematopoiesis. *Stem Cells*, 2007, 25(9): 2339 - 2349
 - Novo E, Cannito S, Zamara E, et al. Proangiogenic Cytokines as Hypoxia - Dependent Factors Stimulating Migration of Human Hepatic Stellate Cells. *Am J Pathol*, 2007, 170(6): 1942 - 1953
 - Dodig M, Ogunwale B, Dasarathy S, et al. Differences in regulation of type I collagen synthesis in primary and passaged hepatic stellate cell cultures; the role of $\alpha_5\beta_1$ - integrin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, 293(1): G154 - G164
 - 薛博瑜, 胡荣昕, 孙丽霞. 中医药治疗肝纤维化临床研究思路探讨. *中华中医药杂志*, 2007, 8(22): 540 - 542
 - 叶放, 薛博瑜, 吴勉华, 等. 重视对慢性肝炎肝纤维化进程中湿热瘀毒证治研究. *中华中医药学刊*, 2007, 12(25): 2477 - 2479
 - Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 2000; 407(6805): 770
 - 周玲玲, 方泰惠, 徐立, 等. 紫七软肝片对二甲基亚硝胺所致大鼠慢性肝损伤的保护作用. *中药新药与临床药理*, 2004, 6(15): 392 - 395
 - 杨舜民, 张良, 周玲玲, 等. 紫七软肝片对四氯化碳所致慢性肝纤维化大鼠的保肝作用. *抗感染药学*, 2003, 3(13): 17 - 19
- (收稿: 2009 - 12 - 25)
(修回: 2010 - 03 - 14)

家兔非酒精性脂肪肝病血生化指标研究

李明霞 任伯绪 王昌富

摘要 目的 建立不同程度家兔非酒精性脂肪肝病模型,观察非酒精性脂肪肝病程度与血生化指标的关系。**方法** 选用 32 只新西兰家兔,随机分为对照组($n=8$)和模型组 3 组(每组 $n=8$),采用高脂高糖饲料建立不同程度脂肪肝病模型,分别于 4、6、8 周检测家兔血清 TG、TC、AST、ALT,并进行病理学检查。**结果** 高脂高糖饲料喂养 4 周后可形成轻度的脂肪肝病并出现血脂的升高,随着脂肪肝病程度的发展,血清 TG 水平持续升高。**结论** 血生化指标对脂肪肝病有一定的诊断价值。

关键词 非酒精性脂肪肝病 动物模型 血生化指标 家兔

Study on Blood Biochemical Indexes of NAFLD in Rabbits. Li Mingxia, Ren Boxu, Wang Changfu. The Medical School of Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434023, China

作者单位: 434023 荆州, 长江大学医学院(李明霞、任伯绪); 长江大学荆州临床医学院 荆州市中心医院(王昌富)
通讯作者: 任伯绪, 电子邮箱: boxuren@yahoo.com.cn

Abstract Objective To determine the relationship between blood biochemical indexes and severity of NAFLD by establishing various models of NAFLD with different degrees in rabbits. **Methods** Thirty - two healthy rabbits were randomly divided into normal control ($n = 8$) and three experimental groups($n = 24$). Fatty liver animal models were established by giving high fat, high sugar diet. The serum TG,TC,AST,ALT and pathological evaluation were detected respectively after 4, 6 and 8 weeks. **Results** The rabbits developed hyperlipidemia and slight fatty liver after four weeks. Along with the worsening of fat liver, the serum TG level kept rising. **Conclusion** The blood biochemical indexes can serve as a reliable technique for diagnosing fatty liver disease in clinical.

Key words NAFLD; Animal model; Blood biochemical index; Rabbits

脂肪肝是一种常见的肝脏疾病,在普通人群中脂肪肝的发病率为 10% 左右,且有逐年升高的趋势^[1],已成为仅次于病毒性肝炎位居肝病第 2 位。但脂肪肝严重程度与血生化指标值的关系并不十分清楚。建立适于模拟人类饮食联合高脂高糖喂养致病的家兔脂肪肝模型,检测其血脂水平,并进一步通过病理认证,以此来探讨血脂水平与脂肪肝程度的关系,为临床诊断脂肪肝带来有价值的参考标准。

材料与方 法

1. 实验动物:新西兰家兔 32 只(1.5 ~ 2.5kg),雌雄各半,普通级,许可证为:SCXK(鄂)2008 - 0005,由湖北省实验动物研究中心提供。

2. 实验仪器以及试剂:胆固醇(安徽天启化工科技有限公司);蔗糖(天津市博迪化工有限公司);猪油自制;BECKMAN LX20 全自动生化分析仪。

3. 高脂高糖饲料配制^[2]:普通饲料基础上加 2% 胆固醇、5% 蔗糖、10% 猪油。

4. 脂肪肝模型建立:实验家兔正常喂养 1 周后随机分成对照组(8 只,普通饲料喂养 8 周)和实验 1、2、3 组(每组 8 只,高脂高糖饲料分别喂养 4 周、6 周和 8 周)。

5. 实验方法:分别于饲喂高脂高糖饲料后第 4、6、8 周进行血生化指标检查,检查前实验动物空腹 8 ~ 12h,心脏采血 5ml,分离血清,立即送检。检测谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)。

6. 肝组织病理学检查:采血后处死实验家兔,开腹取出肝

脏,观察肝脏的形状、大小及颜色,并从肝左叶及右叶中部各切取一块肝组织,大小约 1cm × 1cm × 1cm,10% 甲醛水溶液固定标本,制备成石蜡切片,脱蜡后进行 HE(苏木素 - 伊红)染色。光学显微镜下,对每只实验动物的左右叶肝脏切片进行观察,按病理学对脂肪肝的分级标准将脂肪肝分为轻度、中度和重度^[3]:低倍镜下,肝细胞脂肪变性占肝小叶 1/3 ~ 1/2 者为轻度脂肪肝;占肝小叶 1/2 ~ 2/3 者为中度脂肪肝;占肝小叶 2/3 以上或者肝细胞弥漫脂肪性变性呈渔网状者为重度脂肪肝。

7. 数据的统计分析:数据均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。使用 SPSS11.5 软件做方差分析。 $P < 0.05$ 时有统计学意义。

结 果

1. 实验中 28 只新西兰家兔完成实验,腹泻死亡 4 只,正常对照组 7 只,轻度脂肪肝组 8 只,中度脂肪肝组 6 只,重度脂肪肝组 7 只。完成实验处死家兔按病理学结果分析,对照组及轻、中、重度脂肪肝模型数依次为:7、6、7、8 只。正常肝组织镜下表现为肝组织结构正常,肝窦结构清晰,肝细胞无脂肪变性,细胞结构清晰,细胞质丰富,细胞核位于细胞中央。脂肪肝肝组织镜下表现为随着脂肪肝严重程度的增加,发生脂肪变性的肝细胞逐渐增多,肝细胞内脂肪不断累积,肝细胞体积增大,胞质内充满脂肪空泡,脂滴融合增大、增多,将细胞核挤向一侧,严重时细胞核会消失(图 1)。

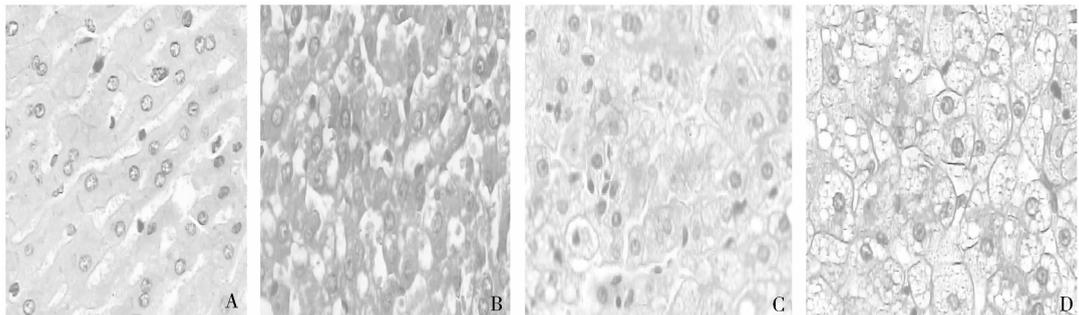


图 1 肝组织镜下表现

A. 对照组(HE × 400); B. 轻度脂肪肝组(HE × 400); C. 中度脂肪肝组(HE × 400); D. 重度脂肪肝组(HE × 400)

2. 血脂变化情况(表 1):实验组家兔血清三酰甘

油与正常对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),

重度脂肪肝组与轻度、中度脂肪肝组比较差异也有统计学意义($P < 0.05$),随着脂肪肝程度的加重,三酰甘油的值逐步上升;实验组家兔血清总胆固醇与正常对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),轻度、中度、重度脂肪肝组血清总胆固醇值均明显高于正常对照组,但轻度、中度、重度脂肪肝组间比较则差异无统

计学意义($P > 0.05$),血清胆固醇值维持在一个相对稳定的范围;谷丙转氨酶 4 组间比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),但中度与重度脂肪肝组的值明显高于正常对照组与轻度脂肪肝组;谷草转氨酶 4 组间比较差异也均无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各组间谷丙转氨酶、谷草转氨酶、总胆固醇、三酰甘油比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	谷丙转氨酶(U/L)	谷草转氨酶(U/L)	总胆固醇(mmol/L)	甘油三酯(mmol/L)
正常对照	7	97.71 ± 35.15	82.73 ± 41.69	7.07 ± 6.05	1.23 ± 0.69 [□]
轻度脂肪肝	6	80.60 ± 14.27	94.00 ± 27.04	22.64 ± 0.52 [*]	5.64 ± 3.83 ^{*□}
中度脂肪肝	7	140.41 ± 87.15	131.73 ± 72.56	21.97 ± 1.86 [*]	5.61 ± 2.63 ^{*□}
重度脂肪肝	8	112.19 ± 92.31	80.08 ± 49.45	23.25 ± 0.59 [*]	10.91 ± 5.17 [*]

与正常对照组比较, * $P < 0.05$;与重度脂肪肝组比较, [□] $P < 0.05$

讨 论

脂肪肝是常见的弥漫性肝病,表现为肝内蓄积脂肪量的异常^[4]。正常肝组织内脂质含量占肝湿重的 3% ~ 5%,由于疾病或药物等因素导致肝细胞组织内脂质超过肝湿重的 5%,或组织学上每单位面积见 1/3 以上肝细胞脂变时,称之为脂肪肝。

本实验模拟人类饮食习惯通过喂食家兔高脂高糖成功建立动物脂肪肝模型,动物在高脂高糖饲料喂养 4 周后即可形成轻度脂肪肝,随着喂养时间延长脂肪肝的病变程度加重。检查动物血清 ALT、AST、TC、TG,实验组家兔血清 TG 与正常对照组比较有 5 倍左右的差异,正常组为 1.23 ± 0.69 mmol/L,轻度脂肪肝组为 5.64 ± 3.83 mmol/L,中度脂肪组为 5.61 ± 2.63 mmol/L,重度脂肪肝组 TG 与轻度、中度脂肪肝组比较也有一倍的差异,重度脂肪肝组为 10.91 ± 5.17 mmol/L,说明血清 TG 值可反应脂肪肝病变的程度,随着脂肪肝病变程度的加重,TG 的值明显上升。脂肪肝时 TG 值明显升高应该是由长期摄入高脂饮食即外源性脂肪增加,肝脏摄取外源性 FA(游离脂肪酸)及其酯化作用增强,而 Apo-B(载脂蛋白 B)及磷脂合成相对减少,TG 合成超过其转运,从而在肝内沉积。高糖摄入使摄入的糖在满足糖原合成后,其代谢生成的三碳化合物由肝细胞摄取转化为 FA,并酯化成 TG 在肝内沉积。实验组家兔血清 TC 与正常对照组比较也有差异,轻度、中度、重度脂肪肝组血清 TC 值均明显高于正常对照组,但轻度、中度、重度脂肪肝组间比较则无明显差异,说明血清 TC 值也对诊断脂肪肝有参考价值,但对脂肪肝的分级诊断却无意义。AST、ALT 值在实验组与正常对照组比较无明显差异,考虑其机制可能是脂肪肝时,肝脏虽有病变,但

尚能代偿,所以转氨酶水平可在正常范围。这与 Pacifico 等和 Browning 等研究结果一致,他们也认为血清 AST、ALT 水平对诊断脂肪肝不敏感,多数脂肪肝患者的 AST、ALT 水平在正常范围^[5,6]。

血清学检查在脂肪肝诊断中有一定的价值,脂肪肝的生化检查常有阳性发现,特别是血清 TG 含量不仅有助于诊断脂肪肝,还有助于脂肪肝的分级诊断,血清 TC 含量对诊断脂肪肝也有一定的参考价值,但对脂肪肝的分级诊断意义不大,AST、ALT 值与脂肪肝的病变范围和严重程度并不一致,所以诊断意义不大。对可疑脂肪肝患者可早期行相关生化检查,并对出现的异常情况给予重视,结合相关的影像学检查,对于临床早期诊断脂肪肝有重要意义,如果早期诊治,可阻止病情进展,甚至使其逆转。

参考文献

- Clark JM, Diehl AM. Defining nonalcoholic fatty liver disease: Implications for epidemiologic studies. *Gastroenterology*, 2003, 124:248 - 250
- Seifalian AM, EI - Desoky A, Davidson BR. Hepatic indocyanine green uptake and excretion in a rabbit model of steatosis. *Eur Surg Res*, 2001, 33(3):193 - 201
- 范建高,曾民德. 脂肪性肝病. 北京:人民卫生出版社,2005:147 - 52
- 曹琦,李俊. 瘦素在肝脏疾病中的作用或分子机制. *中国药理学通报*, 2004, 20(9):972 - 976
- Pacifico L, Celestre M, Ananic C, et al. MRI and ultrasound for hepatic fat quantification: relationships to clinical and metabolic characteristics of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Acta Paediatr*, 2007, 96(4):542 - 547
- Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology*, 2004, 40(6):1387 - 1395

(收稿:2009-12-18)