

中挤心脏同时轻扩肋间隙,避免反复挤压胸腔,降低肺损伤。结扎后快速还纳心脏随即挤压胸廓排出气体,用大血管钳夹住切开皮肤及组织,全层缝合皮肤闭胸使胸腔相对负压。(5)术后保暖与护理是提高生存率的重要措施。

笔者从实验结果体分析,此法制备大鼠 HF 模型与左心室功能与临床心肌梗死致 HF 病理基础相似,且准确、稳定,能更全面地了解 MI 发展为 HF 的发病机制、相关基因等研究,为 HF 生物学治疗遴选新型药物,控制其病程恶化具有重要意义,是较理想模拟临床 HF 病理基础实验研究的动物模型。

参考文献

- Gajos G. Optimal treatment for patients after myocardial infarction; some current concepts and controversies[J]. Pol Arch Med Wewn,

2008,118(122):43-51

- 雷娟,伍卫,薛声能,等.大鼠急性心肌梗死动物模型的建立和评估[J].中国实用医药,2009,4(2):1-3
- 孙慧君,范江霖.心肌梗死动物模型研究的最新进展[J].中国动脉硬化杂志,2005,13(1):113-115
- Zhang YL, Zhou SX, Lei J, et al. Effects of perindopril on left ventricular remodeling and osteopontin expression in rats with myocardial infarction[J]. South China Journal of Cardiovascular Disease, 2007, 8(3):159-165
- 云伟,于艳秋,卢晓梅,等.成功建立小鼠心肌梗死模型的探讨[J].中国医科大学学报,2007,36(6):67-69
- 吴振军.心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡与肺血管结构改变及药物干预的研究[D].北京:中国协和医科大学,2004,11:6-7

(收稿日期:2012-03-08)

(修回日期:2012-03-23)

血瘀型非酒精性脂肪性肝病氧化应激水平动态变化的特征

蔡丹莉 陈芝芸 严茂祥 何蓓晖

摘要 目的 研究血瘀型非酒精性脂肪性肝病氧化应激水平动态变化的特征。**方法** SD 大鼠随机分成正常组 10 只、NAFLD 组及血瘀型 NAFLD 组各 30 只;正常组大鼠以标准饲料喂养,其他两组以高脂饲料喂养,血瘀型 NAFLD 组在高脂饲料喂养同时联合 NE 加 BSA 复合因素造模。正常组全部在 12 周末处死,后两组大鼠分别在实验开始后 4、8 及 12 周末 3 个时相点分批随机处死各 10 只。采用硫代巴比妥酸法测定血清及肝组织匀浆 MDA 含量、黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 水平、二硫代硝基苯甲酸法测定 GSH-PX 水平。**结果** NAFLD 和血瘀型 NAFLD 4、8、12 周时相点大鼠血及肝组织 SOD、GSH 均较正常组明显降低($P < 0.01$),MDA 较正常组明显增高($P < 0.01$);血瘀型 NAFLD 8、12 周时相点大鼠血及肝组织 MDA 较同期 NAFLD 组明显增高($P < 0.05$);血瘀型 NAFLD 12 周时相点大鼠血及肝组织 SOD 较同期 NAFLD 组明显降低($P < 0.01$);血瘀型 NAFLD 8 周时相点血 GSH-PX 及 8、12 周时相点大鼠肝 GSH-PX 均较同期 NAFLD 组明显降低($P < 0.05$)。**结论** NAFLD 和血瘀型 NAFLD 大鼠氧化应激水平均随着造模时间的延长而不断增强;而同样造模时间血瘀型病证结合模型的氧化应激反应比单纯疾病模型强。

关键词 非酒精性脂肪性肝病 血瘀证 氧化应激 大鼠 病证结合

Dynamic Change of Related Indicators to Oxidative stress in NAFLD Rats with Blood Stasis. Cai Danli, Chen Zhiyun, Yan Maoxiang, He Beihui. The First Clinical Medical College of Zhejiang TCM University, Zhejiang 310006, China

Abstract Objective To study the dynamic change of related indicators to oxidative stress in NAFLD rats with blood stasis. **Methods** SD rats were randomly divided into the normal group (10 rats), the NAFLD group (30 rats) and the NAFLD with blood stasis group (30 rats). Except for the rats in the normal group being fed with the normal diet, the rats in the other groups were fed with high-fat diet. Simultaneously, the rats in the NAFLD with blood stasis group were dealt with norepinephrine (NE) and bull serum albumin (BSA). The normal rats were executed at the end of the 12th week, and the 10 rats in the NAFLD with blood stasis group were respectively executed at the end of the 4th, 8th and 12th week. The levels of serum and liver MDA, SOD, GSH-PX were respectively examined with thiobarbituric acid method, xanthine oxidase method and two thia nitrobenzoic acid method. **Results** Compared with the normal rats, the levels of serum

基金项目:浙江省实验动物科技计划项目(2009F80014)

作者单位:310006 杭州,浙江中医药大学第一临床医学院/浙江省中医院

and liver SOD, GSH - PX in the NAFLD rats and NAFLD with blood stasis groups at the time phase points of 4th week, 8th week and 12th week were obviously decreased ($P < 0.01$), but the levels of serum and liver MDA were increased ($P < 0.01$). Compared with the corresponding NAFLD rats, the levels of serum and liver MDA increased ($P < 0.05$) at the time phase points of 8th week and 12th week; the levels of serum and liver SOD in the NAFLD with blood stasis group were obviously decreased at the time phase point of 12th week ($P < 0.01$). Compared with the corresponding NAFLD rats, the levels of serum GSH - PX in the NAFLD with blood stasis group at the time phase point of 8th week and the levels of liver GSH - PX at the time phase points of 8th week and 12th week were obviously decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** The levels of related indicators to oxidative stress in NAFLD rats and NAFLD with blood stasis were gradually increased with the molding time. The level of related indicators oxidative stress in rats of blood stasis in NAFLD group was stronger than that in NAFLD group in the corresponding period.

Key words NAFLD; Blood stasis syndrome; Oxidative stress; Rat; Model combined disease with syndrome

病证结合研究是中西医结合医学理论基础,建立动物病证结合模型是中医药现代研究取得突破性进展的关键。目前,中医药对非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)的实验研究大多局限于建立疾病模型,而忽视了动物模型的中医证候表现,难以全方位体现中医药治疗 NAFLD 的机制及特点。中医学认为,血瘀是 NAFLD 的重要病机,活血化瘀是中医药治疗 NAFLD 的主要法则。前期笔者已经报道将 NAFLD 与中医血瘀证相结合,成功创建血瘀型 NAFLD 病证结合模型,该模型既符合 NAFLD 的病理表现,又符合中医血瘀症候^[1]。氧化应激是 NAFLD 形成的重要机制之一。笔者前期研究也发现单纯的 NAFLD 疾病模型具有氧化应激水平的变化^[2]。本研究通过比较 NAFLD 疾病模型和血瘀型 NAFLD 病证结合模型两者氧化应激水平的不同表现,探讨血瘀型 NAFLD 氧化应激水平动态变化的特征。

材料与方法

1. 实验动物:SD 大鼠 76 只,雄性,SPF 级,体重 190 ~ 210g,由上海西普尔 - 必凯实验动物中心提供,许可证号:SCXK(沪)2008 - 0016。饲养于浙江中医药大学实验动物中心,12h 明暗交替,自由采食。

2. 主要试剂与仪器:胆固醇(批号:100208)为上海博奥生物科技股份有限公司产品,3 号胆盐(批号:20100125 - 00)为杭州微生物试剂有限公司产品,小牛血清清蛋白(BSA,批号:2011/04)为美国 Roche 公司产品,去甲肾上腺素(NE,批号:090302)为上海禾丰制药有限公司产品,丙二醛(MDA,批号:20100728)、超氧化物歧化酶(SOD,批号:20100827)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH - PX,批号:20100819)、考马斯亮蓝(批号:20100826)试剂盒均由南京建成生物工程研究所提供。

3. 动物分组及造模:大鼠随机分成 3 组:正常组 10 只、NAFLD 组及血瘀型 NAFLD 组各 30 只,后 2 组又分 4、8、12 周 3 个时相点。正常组大鼠以标准全价颗粒饲料喂养,其余 2 组均以高脂饲料(82.5% 标准饲料、10% 猪油、5% 蛋黄粉、2%

胆固醇及 0.5% 3 号胆盐)喂养;血瘀型 NAFLD 组大鼠同时在每个时相点处死前 28 天及 18 天以 2.5ml/kg 剂量尾静脉注射 50g/L 浓度的 BSA 各 1 次,在每个时相点处死前 21 天起以 0.5ml/(kg · d)体重剂量尾静脉缓慢注射 0.1g/L 浓度的 NE,每 2 天增加 0.25ml/kg 直至增加到 1ml/(kg · d)后持续至处死(即 4、8 及 12 周末),正常组及 NAFLD 组则在同时间点以尾静脉缓慢注射等容量的生理盐水代替;后两组大鼠分别在实验开始后 4、8 及 12 周末分批随机处死 10 只,正常组全部在 12 周末处死。各大鼠禁食 18h 后麻醉,腹腔静脉取血分离血清,取肝组织以生理盐水制成匀浆。

4. 检测指标:血清及肝组织匀浆 MDA 采用硫代巴比妥酸法测定,SOD 采用黄嘌呤氧化酶法测定,GSH - PX 采用二硫代硝基苯甲酸法测定,肝匀浆蛋白含量采用考马斯亮蓝法测定。

5. 统计学方法:采用 SPSS 12.0 软件包统计,计量资料分别采用 *t* 检验、单因素方差分析和多重比较,计数资料采用非参数秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. NAFLD 不同时相点氧化应激相关指标的变化:NAFLD 4、8、12 周时相点大鼠血及肝组织 SOD、GSH - PX 均较正常组明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),MDA 较正常组明显增高($P < 0.05$, $P < 0.01$);NAFLD12 周时相点大鼠血及肝组织 SOD、GSH - PX 均较 NAFLD4 周时相点大鼠明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),MDA 较 NAFLD4 周时相点大鼠明显增高($P < 0.01$);NAFLD12 周时相点大鼠血 GSH - PX 较 NAFLD8 周时相点大鼠明显降低($P < 0.05$),MDA 较 NAFLD8 周时相点大鼠明显增高($P < 0.05$, 图 1)。

2. 血瘀型 NAFLD 大鼠血氧化应激相关指标的变化:血瘀型 NAFLD 4、8、12 周时相点大鼠血及肝组织 SOD、GSH 均较正常组明显降低($P < 0.01$),MDA 较正常组明显增高($P < 0.01$);血瘀型 NAFLD 8、12 周时相点大鼠血及肝组织 MDA 较同期 NAFLD 组明显

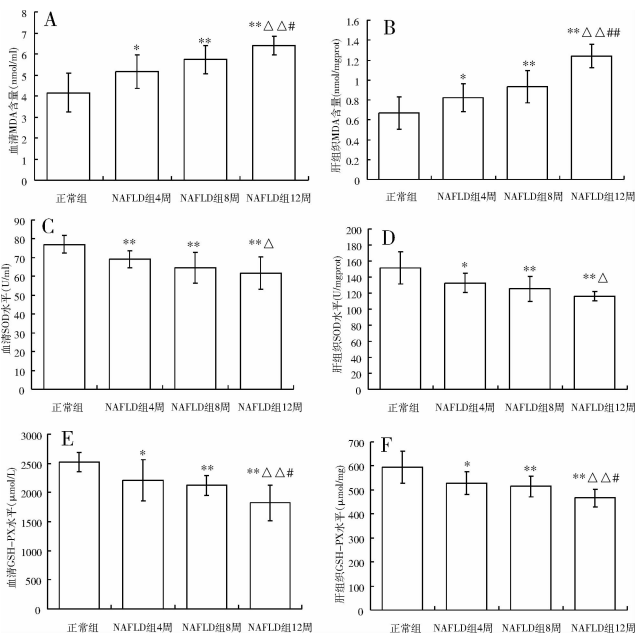


图 1 NAFLD 不同时相点氧化应激相关指标的变化

A. 血清 MDA 含量变化;B. 肝组织 MDA 含量变化;C. 血清 SOD 水平变化;D. 肝组织 SOD 水平变化;E. 血清 GSH - PX 水平;F. 肝组织血清 GSH - PX 水平变化;*n* = 10,与正常组比较,* *P* < 0.05,** *P* < 0.01;与 4 周时相点比较,Δ *P* < 0.05,ΔΔ *P* < 0.01;与 8 周时相点比较,* *P* < 0.05,** *P* < 0.01

增高 (*P* < 0.05);血瘀型 NAFLD12 周时相点大鼠血及肝组织 SOD 较同期 NAFLD 组明显降低 (*P* < 0.01);血瘀型 NAFLD8 周时相点血 GSH - PX 及 8、12 周时相点大鼠肝 GSH - PX 均较同期 NAFLD 组明显降低 (*P* < 0.05),见表 1、表 2。

讨 论

传统中医学中没有 NAFLD 这个病名,根据其临床表现,属于“肝癖”、“胁痛”、“积证”、“瘀血”等范畴^[3]。其病机为本虚标实,病位在肝,与脾、肾等密切相关,其病机为脾肾亏虚、肝失疏泄、脾失健运、气滞血瘀,而最终形成湿、痰、瘀、热互结,痹阻肝脏脉络。气滞、痰阻、血瘀是其主要病机,而血瘀在 NAFLD 的发生发展起重要作用,活血化瘀是治疗 NAFLD 的基本法则。目前中医药抗 NAFLD 是研究热点,而理想的 NAFLD 动物模型的建立是开展中医药防治肝纤维化实验研究的首要条件。笔者前期研究采用高脂饲料喂养同时联合 NE 加 BSA 复合因素造模成功建立了血瘀型 NAFLD 病证结合大鼠模型^[1]。

氧应激损伤在 NAFLD 的形成和发展过程中起重要作用,是 NAFLD 受到第 2 次打击由单纯脂肪肝发

表 1 各组大鼠血清氧化应激相关指标的变化 ($\bar{x} \pm s$)

分组	MDA (mol/ml)	SOD (U/ml)	GSH - PX (μmol/L)
正常组	4.16 ± 0.92	77.04 ± 4.63	2517.30 ± 164.37
NAFLD4 周	5.17 ± 0.81 *	69.10 ± 4.53 **	2209.21 ± 353.82 *
血瘀型 NAFLD4 周	5.75 ± 0.46 **	66.10 ± 4.53 **	2042.70 ± 273.82 **
NAFLD8 周	5.73 ± 0.66 **	64.56 ± 8.16 **	2122.248 ± 175.30 **
血瘀型 NAFLD8 周	6.33 ± 0.37 ** Δ	60.79 ± 6.54 **	1957.08 ± 130.42 ** Δ
NAFLD12 周	6.39 ± 0.43 **	61.87 ± 8.52 **	1822.92 ± 308.20 **
血瘀型 NAFLD12 周	7.01 ± 0.68 ** Δ	52.01 ± 6.40 ** Δ Δ	1477.75 ± 298.10 ** Δ

与正常组比较,* *P* < 0.05,** *P* < 0.01;与同期 NAFLD 组比较,Δ *P* < 0.05,ΔΔ *P* < 0.01

表 2 各组大鼠肝组织氧化应激相关指标的变化 ($\bar{x} \pm s$)

分组	MDA (mol/mg)	SOD (U/mg)	GSH - PX (μmol/mg)
正常组	0.67 ± 0.16	151.84 ± 20.08	595.39 ± 66.11
NAFLD4 周	0.82 ± 0.14 *	132.77 ± 12.01 *	528.49 ± 47.75 *
血瘀型 NAFLD4 周	0.93 ± 0.12 **	127.21 ± 10.84 **	512.76 ± 42.03 **
NAFLD8 周	0.93 ± 0.16 **	125.33 ± 15.39 **	514.17 ± 42.25 **
血瘀型 NAFLD8 周	1.144 ± 0.22 ** Δ	122.99 ± 7.29 **	488.75 ± 36.33 **
NAFLD12 周	1.24 ± 0.12 **	116.23 ± 6.10 **	467.26 ± 37.04 **
血瘀型 NAFLD12 周	1.37 ± 0.13 ** Δ	107.37 ± 9.50 ** Δ	427.93 ± 27.49 ** Δ

与正常组比较,* *P* < 0.05,** *P* < 0.01;与同期 NAFLD 组比较,Δ *P* < 0.05

展至脂肪性肝炎的重要机制。高脂饮食使肝内积累过多的游离脂肪酸(FFA),特别是多不饱和脂肪酸可损害细胞生物膜及线粒体呼吸链,使线粒体的改变和

呼吸链功能不全,从而使脂肪酸 β 氧化及肝氧化增加,产生大量的 ROS 和自由基。过多的 ROS 和自由基耗竭 GSH、SOD 等抗氧化因子,使促氧化物与抗氧

化物之间的动态平衡失调^[4~6],氧化损害线粒体基因组,导致更多的 ROS 产生,使 ATP 耗竭、DNA 损伤、蛋白质稳定性下降、质膜破坏、致炎性细胞因子的释放,启动炎症反应和肝纤维化的发生,形成恶性循环,使细胞死亡、坏死^[7,8]。研究证实,NAFLD 时机体 MDA 含量增高,SOD、GSH 等水平降低,且与肝组织炎症、坏死及纤维化等呈显著正相关^[9,10]。

本研究发现 NAFLD 各时相点大鼠和血瘀型 NAFLD 各时相点大鼠血及肝组织 SOD、GSH - PX 均较正常组有不同程度的降低,而血及肝组织 MDA 均较正常组有不同程度的增高,说明单纯 NAFLD 疾病模型和血瘀型 NAFLD 病证结合模型均存在不同程度的氧化应激反应;随着造模时间的延长,NAFLD 大鼠血及肝组织 SOD、GSH 呈动态降低,血及肝组织 MDA 呈动态增高,说明 NAFLD 大鼠氧化应激水平随着造模时间的延长而不断增强;血瘀型 NAFLD 大鼠血及肝组织 SOD、GSH 均较同期 NAFLD 大鼠降低,血及肝组织 MDA 均较同期 NAFLD 大鼠增高,说明同样造模时间血瘀型病证结合模型的氧化应激反应比单纯疾病模型强,故笔者认为使用血瘀型 NAFLD 病证结合模型造模法可能可以适当减少造模时间。

参考文献

- 1 陈芝芸,蔡丹莉,严茂祥,等. 血瘀型非酒精性脂肪性肝病病证结合模型的建立和评价[J]. 中华中医药杂志,2012;27(3):727 - 731
- 2 陈芝芸,严茂祥,何蓓晖. 大鼠非酒精性脂及性肝炎形成中氧化应

- 激水平变化及山楂总黄酮对其影响[J]. 医学研究杂志,2007,36(12):33 - 36
 - 3 张声生,王垂杰,沈洪. 特色专科实用手册·消化病[M]. 北京:中国中医药出版社,2008:214 - 221
 - 4 Videla LA, Rodrigo R, Araya J, *et al.* Oxidative stress and depletion of hepatic long - chain polyunsaturated fatty acids may contribute to non-alcoholic fatty liver disease[J]. Free Radic Biol Med,2004,37(9):1499 - 1507
 - 5 Perez - Carreras M, Del Hoyo P, Martin MA, *et al.* Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis[J]. Hepatology,2003,38(4):999 - 1007
 - 6 Serviddio G, Bellanti F, Tamborra R, *et al.* Uncoupling protein - 2 (UCP2) induces mitochondrial proton leak and increases susceptibility of non - alcoholic steatohepatitis (NASH) liver to ischaemia - reperfusion injury[J]. Gut,2008,57(7):957 - 965
 - 7 Bell LN, Temm CJ, Saxena R, *et al.* Bariatric surgery - induced weight loss reduces hepatic lipid peroxidation levels and affects hepatic cytochrome P - 450 protein content[J]. Ann Surg,2010,251(6):1041 - 1048
 - 8 Matsunaml T, Sato Y, Ariga S, *et al.* Regulation of oxidative stress and inflammation by hepatic adiponectin receptor2 in an animal model of nonalcoholic steatohepatitis[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2010,3(5):472 - 481
 - 9 Yesilova Z, Yaman H, Oktenli C, *et al.* Systemic markers of lipid peroxidation and antioxidants in patients with nonalcoholic Fatty liver disease[J]. Am J Gastroenterol,2005,100(4):850 - 855
 - 10 王旭霞,赵曙光,冯国华,等. 网络抗氧化剂对非酒精性脂肪性肝炎大鼠氧化应激作用的影响[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2009,18(7):601 - 611 (收稿日期:2012 - 04 - 13)
- (修回日期:2012 - 05 - 04)

干扰素 - γ 对大鼠肺纤维化转录因子 T - bet/GATA3 的影响

涂军伟 赵建平 朱景倩 盛琳 章义利

摘要 **目的** 通过检测 IFN - γ 干预博来霉素诱导大鼠肺纤维化时各组转录因子 T - bet/GATA3 mRNA 表达的变化,从而探讨 IFN - γ 干预肺纤维化的机制。**方法** 腹腔注射博来霉素(BLM)诱导大鼠肺纤维化动物模型。雄性 SD 大鼠随机均分为对照组(C)、博来霉素致伤组(BLM1、BLM2、BLM4)及博来霉素 + IFN - γ 治疗组(BLM - IFN1、BLM - IFN2、BLM - IFN4)。对各组肺组织纤维化的程度行病理半定量评估,检测各组外周血单个核细胞转录因子 T - bet/GATA3 mRNA 的表达。**结果** BLM1 及 BLM - IFN1 组肺组织病理改变以肺泡炎为主,BLM2 组兼有肺泡炎和纤维化病变,BLM4 组以肺纤维化为主,BLM + INF2 及 BLM + INF4 组中发现肺纤维化程度减轻。半定量 RT - PCR 法显示各博来霉素致伤组大鼠 T - bet 基因的表达均低于 C 组而 GATA3

基金项目:浙江省金华市科技局技术创新基金资助项目(2006 - 3 - 008)

作者单位:321000 浙江省金华市中心医院呼吸内科(涂军伟、赵建平、朱景倩、盛琳);325000 温州医学院附属第二医院 ICU(章义利)

通讯作者:章义利,电子信箱:seasune@163.com