

复方贞术调脂胶囊对大鼠非酒精性脂肪肝调脂保肝作用及机制研究

姚红霞, 郭 姣, 唐春萍*, 杨超燕, 陈艳芬, 陈月凤, 李海华

广东药学院 国家中医药管理局高脂血症调肝降脂重点实验室 国家中医药局脂代谢三级实验室, 广东 广州 510006

摘要: **目的** 探讨复方贞术调脂胶囊对非酒精性脂肪肝模型大鼠调脂保肝的作用及机制。**方法** SD 大鼠 60 只随机分成对照组、模型组、复方贞术调脂胶囊高、中、低剂量(生药 6.0、3.0、1.5 g/kg)组以及辛伐他汀(4 mg/kg)阳性对照组。除对照组外,其他各组 ig 高脂、高糖乳剂制备非酒精性脂肪肝大鼠模型,造模同时各给药组 ig 给予相应药物,对照组和模型组给予生理盐水,连续 8 周,测定各组大鼠血清血脂水平、游离脂肪酸(FFA),以及肝功能、胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)水平,并计算肝指数。**结果** 与模型组比较,复方贞术调脂胶囊能显著降低非酒精性脂肪肝大鼠血脂、FFA、肝脂质、肝功能水平、肝指数和肝 MDA 水平($P < 0.05, 0.01$),并能显著升高肝 SOD 活性($P < 0.05, 0.01$)。**结论** 复方贞术调脂胶囊对大鼠非酒精性脂肪肝具有调节脂质和保护肝脏的作用,其作用机制可能与其减少脂质在肝脏的沉积、减轻过氧化损伤有关。

关键词: 复方贞术调脂胶囊; 非酒精性脂肪肝; 保肝; 调血脂; 氧化应激

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2011)10-2074-04

Liver hypolipidemic protection of Compound Zhenzhu Tiaozi Capsula on nonalcoholic fatty liver disease in rats and its mechanism

YAO Hong-xia, GUO Jiao, TANG Chun-ping, YANG Chao-yan, CHEN Yan-fen, CHEN Yue-feng, LI Hai-hua
Key Laboratory of Modulating Liver to Treat Hyperlipemia SATCM, Level 3 Laboratory of Lipid Metabolism SATCM, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

Key words: Compound Zhenzhu Tiaozi Capsula (CZTC); nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD); liver protection; hypolipidemic function; oxidative stress

非酒精性脂肪肝是一种遗传-环境-代谢应激相关性疾病,常与高脂血症、肥胖、胰岛素抵抗相关^[1]。现有的调血脂药虽能有效降低血脂水平,但清除肝脂不够理想,有些药长期应用对肝脏还会产生一定损害。尽管单纯性脂肪肝是可逆的,但严重的脂肪性肝炎可导致肝纤维化、肝硬化,严重危害人体健康^[2],因此研发有效的降脂保肝药物具有重要意义。

复方贞术调脂胶囊(CZTC)由女贞子、白术、丹参、三七、黄连等药味组成,为广东药学院郭姣教授临床经验方,对高脂血症、动脉粥样硬化、脂肪肝等脂代谢紊乱相关疾病有一定疗效^[3-5]。前期研究表明,复方贞术调脂胶囊能明显改善高脂诱导的非酒精性脂肪肝大鼠病理改变,对非酒精性脂肪肝有较好的防治作用^[4]。本实验采用高脂高糖乳剂制备非酒精性脂肪肝大鼠模型,进一步研究复方

贞术调脂胶囊对非酒精性脂肪肝大鼠模型血脂、肝脂、肝功能以及脂质过氧化的影响,进一步探讨其调脂保肝作用及其可能的机制,为该复方临床治疗非酒精性脂肪肝提供依据。

1 材料与仪器

1.1 药品

复方贞术调脂胶囊(曾用名:调脂灵),生药 3.3 g/粒,每粒胶囊含齐墩果酸 1.80 mg,批号 090503,由广东药学院药物研究所提供;辛伐他汀胶囊,杭州默沙东制药有限公司产品,批号 09143。

1.2 试剂

脱氧胆酸钠、胆固醇均为北京鼎国生物技术有限责任公司产品;丙硫氧嘧啶,广东华南药业集团有限公司产品;聚山梨酯-80,上海审宇医药化工有限公司产品;总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高

收稿日期: 2010-12-12

基金项目: 广东省科技计划重点项目(2008258); 省部产学研项目(2009B090300349)

作者简介: 姚红霞(1985—),女,河南人,在读研究生,研究方向为中药复方药理作用。

*通讯作者 唐春萍 Tel: (020)39352180 E-mail: tchp@tom.com

密度脂蛋白-胆固醇 (HDL-C)、天冬氨酸转氨酶 (AST)、丙氨酸转氨酶 (ALT) 试剂盒, 均为中生北控生物科技股份有限公司产品; 游离脂肪酸 (FFA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 测定试剂盒, 均为南京建成生物工程研究所产品。

1.3 主要仪器

DK—S26 型电热恒温水浴锅 (上海精密实验设备有限公司); TGL—16G 型低温高速离心机 (上海安亭科学仪器厂); AMS—18 型全自动生化仪 (北京奥普森科技发展有限公司); UV—1800 紫外-可见光光度计 (北京瑞利分析有限公司)。

1.4 动物

SD 大鼠, SPF 级, 体质量 180~200 g, 由广东省医学实验动物中心提供, 许可证号 SCXK (粤) 2008-0002。

2 方法

2.1 高脂高糖乳剂的制备

根据文献报道方法^[6]加以改进。取猪油 25 g, 加热溶解, 加入胆固醇 10 g, 搅拌至完全溶解; 再加入丙硫氧嘧啶 1 g 和 7 mL 聚山梨酯-80, 充分搅匀。在另一烧杯中加入蔗糖 20 g 于适量的蒸馏水中溶解, 再加入脱氧胆酸钠 2 g, 适当加热并充分搅拌直至溶解。将两种溶液充分混匀, 最后加水稀释至 100 mL 即制成高脂高糖乳剂。

2.2 分组、造模与给药

SD 大鼠 60 只, 实验开始前禁食不禁水 12 h。按体质量将大鼠随机分成 6 组: 对照组、模型组、辛伐他汀 (4 mg/kg) 阳性对照组、复方贞术调脂胶囊高、中、低剂量 (生药 6.0、3.0、1.5 g/kg) 组, 每组 10 只。除对照组给予普通饲料外, 其他组 ig 高脂高糖乳剂制备大鼠非酒精性脂肪肝模型且自由饮水, 造模同时 4 个给药组 ig 给予相应药物 10 mL/kg,

对照组及模型组给予等量生理盐水, 连续 8 周。

2.3 标本采集

在实验结束时即第 8 周末, 大鼠用 3.3% 水合氯醛 1 mL/kg 麻醉, 剖开腹部, 分离腹主动脉, 取血约 5 mL, 离心分离血清, -20 °C 保存备用。大鼠脱颈椎处死, 立即摘取肝脏, 生理盐水涤洗, 滤纸吸干, 称质量, 取肝左外侧叶部位的肝组织多块, 每块约 0.5 g, 精密称定, 分别置于 1.5 mL 的 EP 管中, 于 -20 °C 冰箱保存备用。

2.4 指标检测

用相应试剂盒检测血清 TC、TG、HDL-C、FFA、AST、ALT 水平, LDL-C 水平根据 Friedwald 公式 (LDL-C=TC-HDL-C-TG / 2.2) 计算。取肝组织, 计算肝指数。

另取 0.5 g 肝左外侧叶部位组织用氯仿-甲醇提取液 (1:1) 制成匀浆, 提取液定容至 5 mL, 混匀。经 24 h 震荡抽提, 3 000 r/min 离心 5 min 得上清液, 分别采用氧化酶法、磷酸甘油酶法测定肝脏中 TC、TG。用生理盐水制成 10% 的肝组织匀浆以测定 SOD、MDA。

2.5 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行分析, 数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组均数间比较采用方差分析。

3 结果

3.1 对非酒精性脂肪肝大鼠血脂水平和 FFA 的影响

与对照组比较, 模型组大鼠血清 TC、LDL-C、FFA 显著升高 ($P < 0.01$), HDL-C 显著降低 ($P < 0.01$), 表明造模成功。给药 8 周后, 辛伐他汀、复方贞术调脂胶囊均能显著降低血清 TC、LDL-C、FFA 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 显著升高 HDL-C 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 而 TG 与模型组比较无显著差异 ($P > 0.05$)。结果见表 1。

表 1 复方贞术调脂胶囊对非酒精性脂肪肝大鼠血脂和 FFA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of CZTC on serum lipids and FFA levels in NAFLD rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)	HDL-C/(mmol·L ⁻¹)	LDL-C/(mmol·L ⁻¹)	FFA/(μmol·L ⁻¹)
对照	—	1.84±0.13	0.87±0.16	0.72±0.23	0.73±0.26	264.78±40.86
模型	—	6.19±1.83 ^{▲▲}	0.76±0.10	0.37±0.06 ^{▲▲}	5.48±1.86 ^{▲▲}	535.73±102.21 [▲]
复方贞术调脂胶囊	6.0	4.42±1.78 [*]	0.67±0.18	0.62±0.22 ^{**}	3.49±1.61 [*]	239.19±60.47 ^{**}
	3.0	3.82±1.21 ^{**}	0.68±0.19	0.42±0.05 [*]	3.10±1.25 ^{**}	173.54±100.63 ^{**}
	1.5	3.26±1.22 ^{**}	0.69±0.20	0.56±0.12 ^{**}	2.38±1.09 ^{**}	259.89±76.15 ^{**}
辛伐他汀	0.004	4.10±1.45 ^{**}	0.67±0.26	0.50±0.18 [*]	3.30±1.45 ^{**}	203.12±74.41 ^{**}

与对照组比较: ^{▲▲} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$; 下表同

^{▲▲} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group; following tables are same

3.2 对非酒精性脂肪肝大鼠肝指数及肝脂质水平的影响

与对照组比较, 模型组肝指数及肝脏中 TC、TG 水平均明显升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 辛伐他汀、复方贞术调脂胶囊高剂量和中剂量均能显

著降低肝指数 ($P < 0.05$); 辛伐他汀和复方贞术调脂胶囊各剂量还能显著降低肝脏 TC、TG 水平 ($P < 0.01$), 表明复方贞术调脂胶囊能够显著减少脂质在肝脏中的积聚, 从而减轻肝脂质变化程度。结果见表 2。

表 2 复方贞术调脂胶囊对非酒精性脂肪肝大鼠肝指数及肝脂质水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 2 Effects of CZTC on liver index and liver lipids level in NAFLD rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	肝指数/%	TC/(mmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	2.53 ± 0.17	0.36 ± 0.06	0.46 ± 0.07
模型	—	3.62 ± 0.18 ^{▲▲}	2.10 ± 0.45 ^{▲▲}	1.70 ± 0.22 ^{▲▲}
复方贞术调脂胶囊	6.0	3.43 ± 0.21*	1.06 ± 0.24**	0.90 ± 0.32**
	3.0	3.39 ± 0.22*	0.68 ± 0.27**	0.56 ± 0.10**
	1.5	3.50 ± 0.19	0.96 ± 0.22**	0.55 ± 0.26**
辛伐他汀	0.004	3.34 ± 0.29*	1.02 ± 0.42**	0.83 ± 0.35**

3.3 对非酒精性脂肪肝大鼠血清中肝功能指标的影响

与对照组比较, 模型组大鼠血清 AST、ALT 水平均明显升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 辛伐他汀、复方贞术调脂胶囊各剂量均能显著降低 AST、ALT 水平 ($P < 0.05, 0.01$), 表明复方贞术调脂胶囊对非酒精性脂肪肝大鼠具有明显的保肝作用。结果见表 3。

表 3 复方贞术调脂胶囊对非酒精性脂肪肝大鼠肝功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of CZTC on hepatic function in NAFLD rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)
对照	—	40.85 ± 5.57	134.82 ± 10.59
模型	—	64.74 ± 13.80 ^{▲▲}	173.66 ± 35.86 ^{▲▲}
复方贞术调脂胶囊	6.0	47.99 ± 6.44*	137.56 ± 16.31**
	3.0	39.50 ± 4.08**	138.27 ± 19.16**
	1.5	47.41 ± 9.12*	138.98 ± 20.75*
辛伐他汀	0.004	52.07 ± 14.14*	145.66 ± 17.18*

3.4 对非酒精性脂肪肝大鼠肝 MDA 和 SOD 的影响

与对照组比较, 模型组 SOD 活性显著下降、MDA 的量明显增加 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 辛伐他汀组和复方贞术调脂胶囊高、中剂量组 SOD 活性显著增强 ($P < 0.05, 0.01$), MDA 的量明显下降 ($P < 0.01$); 而复方贞术调脂胶囊低剂量组的 SOD 活性和 MDA 的量与模型组无显著差异。结果表明复方贞术调脂胶囊具有增强 SOD 活力、抗脂质过氧化的作用。结果见表 4。

表 4 复方贞术调脂胶囊对非酒精性脂肪肝大鼠肝中 MDA 和 SOD 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effects of CZTC on MDA and SOD in liver tissues of NAFLD rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)
对照	—	458.15 ± 142.12	1.29 ± 0.23
模型	—	229.04 ± 110.10 ^{▲▲}	2.65 ± 0.56 ^{▲▲}
复方贞术调脂胶囊	6.0	324.26 ± 69.06*	1.74 ± 0.63**
	3.0	385.39 ± 151.80*	1.55 ± 0.24**
	1.5	261.92 ± 107.88	2.26 ± 0.43
辛伐他汀	0.004	432.11 ± 76.96**	1.29 ± 0.19**

4 讨论

非酒精性脂肪肝发病机制极为复杂且不明确, 因而导致尚无一种特异性治疗手段或药物。研究不同方法、不同原因造成的脂肪肝动物模型对阐明脂肪肝的发病机制和治疗尤为重要。本实验在前期研究^[4]中建立的高脂乳剂法制备非酒精性脂肪肝大鼠模型 (以 TC 升高为主) 的基础上, 对造模方法加以改进, 除猪油、胆固醇之外又加入了蔗糖、胆酸盐、丙基硫氧嘧啶等, 其中蔗糖可增加长链脂肪酸的合成而使 TG 的合成增加^[6], 少量胆酸盐可增加外源性胆固醇的吸收^[7], 甲状腺抑制药丙基硫氧嘧啶可抑制胆固醇在肝内转变为胆汁酸, 使胆固醇的代谢减少在肝内蓄积或转化为 TG^[8]。此模型稳定, 可重复性强。

肝脏是脂质代谢的重要器官, 脂肪肝的发生与肝脏 TG 输出的相对不足或绝对不足而导致的肝脏

脂质大量堆积有关^[9]。肝脏脂肪积累有两种情况：一是进入肝脏的和肝内产生的 FFA 增加；二是肝处理低密度脂蛋白的能力下降^[10]。Schmid 等^[11]研究表明血中 FFA 的升高在非酒精性脂肪肝的发病中具有重要的作用。FFA 是机体主要供给能量的来源之一，贮存于脂肪组织细胞中的 TG 分解可提供大量的 FFA。FFA 代谢途径一是供肌肉细胞利用；二是被肝脏摄取，再合成为 TG，组合成极低密度脂蛋白（VLDL）或氧化为乙酰辅酶 A，当肝细胞内 TG 合成的速度过快，超过了肝脏合成 VLDL 的速度，肝内 TG 蓄积达到一定程度，即形成脂肪肝。

氧化应激和脂质过氧化是各种原因引起脂肪肝形成和进展的共同机制。实验证实，脂质过氧化反应干扰了肝内脂类代谢，而脂质沉积的增多又加重了过氧化反应，肝内 FFA、TG 的增加为脂质过氧化反应提供了足够的反应基质，使肝组织抗氧化能力减弱，导致肝脏 SOD 的活力降低，最终导致肝细胞的损伤，引起脂肪肝^[12]。脂肪肝患者不仅血脂代谢紊乱，而且由于脂肪肝时肝细胞内沉积大量脂肪，造成肝细胞脂肪变性，肝脏正常结构发生改变而导致肝功能异常^[13]。

中医认为，肝失疏泄，脾失健运，肾精不足，湿热内结，痰浊郁结，淤血阻滞，最终形成痰湿瘀阻互结，痹阻肝脏脉络而形成脂肪肝^[14]。复方贞术调脂胶囊中女贞子滋补肝肾，白术益气健脾，与女贞子相配，则脾肾双补；三七与丹参均具有活血化瘀之功效，配伍使用，使淤浊更易祛除；黄连兼具清热燥湿解毒之功效，诸药合用，集“调肝降脂、健脾补肾、祛瘀解毒”功效于一方。在临床应用和实验研究中发现该方不仅具有明显的降低血清 TC、TG、LDL-C 及 HDL-C 的活性，而且有改善血液流变学指标、抑制动脉粥样硬化形成等作用，对与高脂血症、动脉粥样硬化症及脂肪肝等脂代谢紊乱相关疾病有一定疗效^[3-5]。本实验结果表明，复方贞术调脂胶囊可显著降低非酒精性脂肪肝大鼠血脂、FFA、肝功能水平及肝指数，还能降低肝脂水平以及肝脏中过氧化产物 MDA 的量，显著升高血中 HDL-C 的水平和肝中 SOD 的活性，提示该复方能减少非酒精性脂肪肝大鼠血和肝脏的脂肪沉积，有效地清除自由基，调节和改善自由基代谢平衡，起到一定的保肝作用，其机制可能与其提高大鼠肝脏

抗氧化能力、减轻肝脏氧化损伤有关。

参考文献

- [1] Angulo P. GI epidemiology: nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2007, 25(8): 883-889.
- [2] 范建高, 朱 军, 李新建, 等. 上海市成人脂肪肝患病率及其危险因素流行病学调查 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2005, 13(2): 83-88.
- [3] 唐春萍, 郭 姣, 陈红红, 等. 调脂灵对高脂血症大鼠降脂作用的实验研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2007, 13(5): 24-27.
- [4] 陈芳超, 郭 姣, 杨超燕, 等. 复方贞术调脂胶囊对大鼠非酒精性脂肪肝的影响 [J]. *广东药学院学报*, 2009, 25(2): 175-179.
- [5] 韦艳萍, 郭 娇, 唐春萍, 等. 复方贞术调脂胶囊抗兔动脉粥样硬化的实验研究 [J]. *中草药*, 2010, 41(5): 782-785.
- [6] Dentin R, Girard J, Postic C. Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver [J]. *Biochimie*, 2005, 87(1): 81-86.
- [7] Vergnes L, Phan J, Strauss M, et al. Cholesterol and cholate components of an atherogenic diet induce distinct stages of hepatic inflammatory gene expression [J]. *Bio Chem*, 2003, 278(44): 42774-42784.
- [8] 王 倩, 管小琴. 大鼠非酒精性脂肪肝造模方法的改进 [J]. *世界华人消化杂志*, 2007, 15(11): 1219-1224.
- [9] 林 青. 抗脂肪肝研究的思考 [J]. *云南中医学院学报*, 2002, 25(1): 41-42.
- [10] Valenti L, Fracanzani A L, Dongiovanni P, et al. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms and insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Gastroenterology*, 2002, 122(2): 274-280.
- [11] Schmid G M, Converset V, Walter N, et al. Effect of high-fat diet on the expression of proteins in muscle, adipose tissue, and liver of C57BL/6 mice [J]. *Proteomics*, 2004, 4(8): 2270-2282.
- [12] 宋育纯, 林忠宁. 肝脂类水平与脂质过氧化指标的多元相关分析 [J]. *中国公共卫生学报*, 1997, 16(2): 84.
- [13] 朱黎英. 脂肪肝患者血脂与肝功能指标的变化 [J]. *山东医药*, 2009, 49(45): 71-72.
- [14] 乔娜丽, 杨钦河, 纪桂元, 等. 论肝郁脾虚是脂肪肝的基本发病病机 [J]. *时珍国医国药*, 2008, 19(5): 1238-1239.