文章编号：1674-8085(2017)03-0096-04

虎杖对大鼠酒精性脂肪肝的干预作用及其机制研究

*钱善军，刘　玮，阚　晶，杨宇清，黄　平

(安徽医学高等专科学校药学系，安徽，合肥 230601)

摘　要：目的　探讨中药虎杖对酒精性脂肪肝模型大鼠的防治作用。**方法**　以白酒灌胃的方法建立酒精性脂肪肝大鼠模型。大鼠随机分为空白对照组、模型组、凯西莱(阳性对照)组、虎杖大、中、小剂量组。以肝指数，内脏脂肪指数，血清 NO、ALT、AST、CHOL、TG、LDL、HDL，肝组织匀浆 SOD、MDA 和肝组织脂肪变性程度等为主要观察指标。**结果**　与模型组比较，虎杖大剂量组肝小叶中仅有少量细胞脂肪变性，肝细胞内脂滴颗粒较小，肝指数、内脏脂肪指数、AST、ALT、MAD 和 NO 降低、SOD 升高；虎杖中剂量组除 AST 外也降低；虎杖小剂量组肝指数降低；虎杖大、中、小剂量组 TG、CHOL、HDL、LDL 均显著降低（$P < 0.01$，$P < 0.05$）。**结论**　虎杖对酒精性脂肪肝有明显的防治作用。

关键词：虎杖；酒精性脂肪肝；干预；机制

中图分类号：R285.5　　**文献标识码：**A　　DOI:10.3969/j.issn.1674-8085.2017.03.018

INTERVENTION EFFECT AND MECHANISM OF POLYGONUM CUSPIDATUM ON ALCOHOLIC FATTY LIVER IN RATS

*QIAN Shan-jun，LIU Wei，KAN Jing，YANG Yu-qing，HUANG Ping

(Pharmacy Department of Anhui Medical College, Hefei, Anhui 230601, China)

Abstract　Objective: To explore the preventive and therapeutic effects of *Polygonum cuspidatum* on alcoholic fatty liver in rats. **Methods:** The model of alcoholic fatty liver rats were established by feeding alcohol. Rats were divided into *P. cuspidatum* treatment groups including (high, medium-and low-dose group), corresponding control groups(blank group and model group). Liver index, visceral fat index, NO, ALT, AST, CHOL, TG, LDL, HDL level in serum, SOD, MDA in liver tissue and steatosis of liver tissue were determined. **Results:** Compared with the model group, there were only a small amount of steatosis cell and small particles of lipid droplets in liver cells in *P. cuspidatum* high-dose group, liver index, visceral fat index, AST, ALT, MAD, NO of high-dose group were lower, but SOD was higher than that in model group; AST was lower in *P. cuspidatum* medium-dose group than model group; liver index of *P. cuspidatum* low-dose group was lower than that in model group; TG, CHOL, HDL, LDL of *P. cuspidatum* groups was lower than model group all ($P<0.01$, $P<0.05$). **Conclusion:** *P. cuspidatum* had the effects of preventing and treating alcoholic fatty liver.

Key words: *Polygonum cuspidatum*; alcoholic fatty liver; intervention effect; mechanism

酒精性肝病是由于人体长期大量饮酒所致的肝脏疾病。近年来，随着人们生活水平的提高和饮食结构的改变，酒精性脂肪肝患者发病率呈逐年上升趋势，已成为危害国民健康的重大疾病。酒精性

收稿日期：2016-12-12；修改日期：2017-02-16

作者简介：*钱善军(1969-)，男，安徽滁州人，副教授，博士，主要从事中药药理研究(E-mail:1838121403@qq.com);
刘　玮(1962-)，女，安徽阜阳人，教授，硕士，主要从事抗炎免疫药理研究(E-mail:656338981@qq.com);
阚　晶(1980-)，女，安徽合肥人，讲师，硕士，主要从事抗炎免疫药理研究(E-mail:566372798@qq.com);
杨宇清(1974-)，女，安徽安庆人，讲师，硕士，主要从事心血管药理研究(E-mail:739558000@qq.com);
黄　平(1982-)，男，安徽芜湖人，讲师，硕士，主要从事天然药物化学研究(E-mail:546144705@qq.com).

肝病初期通常表现为脂肪肝，进而可发展成酒精性肝炎、酒精性肝纤维化和肝硬化，甚至肝细胞坏死或肝功能衰竭。酒精性脂肪肝是肝脏损伤的初期，也是阻止该病病情发展的重要环节[1]。目前对酒精性脂肪肝的治疗仍以营养支持和戒酒为主，尚无特效的药物和方法。我们研究以白酒诱导大鼠酒精性脂肪肝，再给予虎杖干预，观察其对酒精性脂肪肝的防治效果，并初步探讨其作用机制。

1 实验材料

1.1 实验动物和药品

健康清洁级雄性Wistar大鼠60只，体质量180~200 g，购自安徽医科大学实验动物中心[动物合格证号：SCXX(皖)2011-002]，适应性饲养1周，自由摄食及饮水。虎杖购自安徽中医药大学附属医院中药房，由实验室自提为相当于1 g生药／mL的中药提取液；凯西莱（硫普罗宁片），规格：0.1 g×12片，批号：国药准字H41020799，河南省新谊药业股份有限公司生产；红星二锅头由北京红星股份有限公司生产。

1.2 仪器和试剂

722型光栅分光光度计，上海精密科学仪器有限公司；VANOX AHB-LB型OLYMPUS万能显微镜，日本OLYWPUS公司；MSE-25高速冷冻离心机，上海安亭科学仪器厂；日立7170全自动生化分析仪，日本株式会社日立制作所。血清一氧化氮（NO）、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST) 、总胆固醇（CHOL）、甘油三酯（TG）、低密度脂蛋白（LDL）、高密度脂蛋白（HDL）试剂盒均购自北京中生生物工程技术公司；超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

2 实验方法

2.1 酒精性脂肪肝大鼠模型的建立

参照文献[2]方法建立酒精性脂肪肝大鼠模型：除空白对照组外，其余大鼠每日灌胃给予二锅头白酒1次，连续16周，自由饮水。动物饲养于安徽医学高等专科学校十万级标准化动物房清洁级环境，室温22~26 ℃，明暗周期为12 h。至第4周末，形成酒精性脂肪肝模型。造模后的第7周，开始药物治疗，至造模的第16周结束实验。

2.2 动物分组与给药

将大鼠随机分为空白对照组、模型组、凯西莱组、虎杖大、中、小剂量组，每组10只。参照临床用量，按照动物体表面积比例关系换算成等效剂量，虎杖大、中、小剂量组分别按50 g/kg·d、10 g/kg·d和2 g/kg·d灌胃给药，分两次给药；凯西莱片碾碎，蒸馏水溶解为0.5 mg/mL，按2 mg/kg.d灌胃给药，每日1次。

2.3 指标检测

2.3.1 标本采集

大鼠饲养16周后，各组大鼠禁食过夜，称取体质量后以1％戊巴比妥钠60 mg／kg腹腔麻醉，经腹主动脉取血，分离血清，-80 ℃低温保存，待用；迅速分离肝脏、附睾脂肪及肾周脂肪，称取肝湿重、附睾和肾周脂肪重量；从肝左、右叶固定部位各切取一块肝组织，肝左叶检测生化等指标，肝右叶以用10％甲醛溶液固定。后制备成石蜡切片常规HE染色。

2.3.2 血清测定

血清生化指标测定：取上述保存的血清，严格按说明书的方法，测定丙氨酸转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白（HDL）、低高密度脂蛋白（LDL）等指标，硝酸还原酶法检测血清NO。

2.3.3 计算肝指数和体脂比：计算方法：

肝指数 ＝ 肝湿质量/体质量×100%

内脏脂肪指数 ＝（附睾脂肪质量+肾周脂肪质量）/体质量×100%

2.3.4 肝匀浆生化指标测定

按试剂盒说明书操作，取肝左叶，4 ℃下制成100 $g\cdot L^{-1}$肝匀浆，分别测定MDA、SOD含量。MDA采用TBA法测定，SOD采用羟胺法测定。结果以每克肝组织蛋白的含量表示。

2.3.5 肝组织病理组织学检查

取上述固定的肝组织，石蜡包埋，HE染色，光镜下观察肝脂肪变性和炎症活动情况。

2.4 数据处理

数据分析采用SPSS13．0统计软件处理。所有

数据用均数±标准差($\overline{X}$±s)表示，用单因素方差分析及Bonferroni法进行两组间比较，$P < 0.05$为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 虎杖对大鼠肝组织生化指标的影响

（1）与模型组比较，虎杖大剂量组内脏脂肪指数、肝指数、AST、ALT明显降低；虎杖中剂量组除AST外也降低；虎杖小剂量组肝指数降低，结果见表1。

表 1 虎杖对各组大鼠大体指标及肝功能的影响($\overline{X}$ ± s，n = 10)

Table1 The effects of huzhang on general index and liver function in rats in each group

组别	内脏脂肪指数（%）	肝指数（%）	AST(U/L)	ALT(U/L)
空白对照组	2.9 ± 0.012	2.5 ± 0.15	85.25 ± 12.32	50.0 ± 6.05
模型组	4.6 ± 0.013★★	4.4 ± 0.14★★	156.33 ± 37.76★★	108.5 ± 16.08★★
凯西莱组	3.5 ± 0.019▲	3.0 ± 0.19▲	125.45 ± 21.62★	53.0 ± 9.61▲▲
虎杖大剂量组	3.0 ± 0.014▲▲	2.6 ± 0.21▲▲	90.25 ± 14.52▲▲	44.25 ± 11.0▲▲
虎杖中剂量组	3.8 ± 0.018▲★	3.0 ± 0.15▲	128.33 ± 53.59★	45.0 ± 17.43▲▲
虎杖小剂量组	4.1 ± 0.212★★	3.4 ± 0.11▲★	143.46 ± 57.86★★	112.0 ± 33.73★★

注：与模型组比较，▲$P < 0.05$，▲▲$P < 0.01$；与空白对照组比较，★$P < 0.05$，★★$P < 0.01$

（2）与模型组比较，虎杖大、中、小剂量组TG、CHOL、HDL、LDL均显著降低，结果见表2。

表 2 虎杖对各组大鼠血脂的影响($\overline{X}$ ± s，n = 10)

Table 2 The effects of huzhang on blood lipid in rats in each group

组别	TG(mmol/L)	CHOL(mmol/L)	HDL(mmol/L)	LDL(mmol/L)
空白对照组	0.24 ± 0.001	1.27 ± 0.21	0.36 ± 0.04	0.17 ± 0.04
模型组	1.85 ± 0.375★★	2.09 ± 0.52★★	0.92 ± 0.27★★	0.36 ± 0.15★★
凯西莱组	0.45 ± 0.161▲▲★	1.57 ± 0.73▲	0.41 ± 0.06▲▲	0.31 ± 0.05★★
虎杖大剂量组	0.25 ± 0.110▲▲	1.12 ± 0.13▲▲	0.23 ± 0.01▲▲★	0.21 ± 0.09▲▲
虎杖中剂量组	0.26 ± 0.047▲▲	1.43 ± 0.42▲	0.42 ± 0.09▲▲	0.29 ± 0.16▲★
虎杖小剂量组	0.41 ± 0.140▲▲★	1.37 ± 0.08▲	0.37 ± 0.03▲▲	0.32 ± 0.04★★

注：与模型组比较，▲$P < 0.05$，▲▲$P < 0.01$；与空白对照组比较，★$P < 0.05$，★★$P < 0.01$

（3）与模型组比较，虎杖大剂量组SOD升高、MAD 和NO降低；虎杖中剂量组MAD 和NO降低，结果见表3。

表 3 虎杖对肝匀浆MDA、SOD和血清NO的影响($\overline{X}$ ± s，n = 10)

Table 3 The effects of huzhang on MDA、SOD and NO in rats in each group

组别	SOD(nu/g)	MAD(nmol/L)	NO/μmol·L^{-1}
空白对照组	14.95 ± 0.021	39.19 ± 1.24	20.33 ± 2.95
模型组	10.13 ± 0.012★	72.22 ± 2.35★★	35.42 ± 3.26★★
凯西莱组	10.56 ± 0.033★	58.36 ± 1.41▲★	30.49 ± 3.14▲★★
虎杖大剂量组	13.98 ± 0.045▲	41.47 ± 3.39▲▲	21.46 ± 5.43▲▲
虎杖中剂量组	10.14 ± 0.065★	43.48 ± 2.94▲▲	25.23 ± 6.36▲▲★
虎杖小剂量组	10.06 ± 0.074★	67.13 ± 1.55★	29.45 ± 4.17▲★

注：与模型组比较，▲$P < 0.05$，▲▲$P < 0.01$；与空白对照组比较，★$P < 0.05$

3.2 虎杖对大鼠肝组织脂肪变性的影响

空白对照组肝脏小叶结构完整，肝细胞排列整齐，肝细胞内未见脂滴。模型组：肝小叶结构完整，肝细胞广泛脂肪变性，肝细胞内可见大量脂滴，脂滴颗粒大小不等。凯西莱组：肝小叶结构完整，肝小叶周边部细胞散在脂肪变性，肝细胞内脂滴颗粒较小。虎杖大剂量组肝小叶结构完整，肝小叶中有少量细胞脂肪变性，肝细胞内脂滴颗粒较小。虎杖中剂量组肝小叶结构完整，肝小叶中有部分细胞脂肪变性，肝细胞内脂滴颗粒较小。虎杖小剂量组肝小叶结构完整，肝细胞广泛脂肪变性，脂滴颗粒较小，结果见图1。

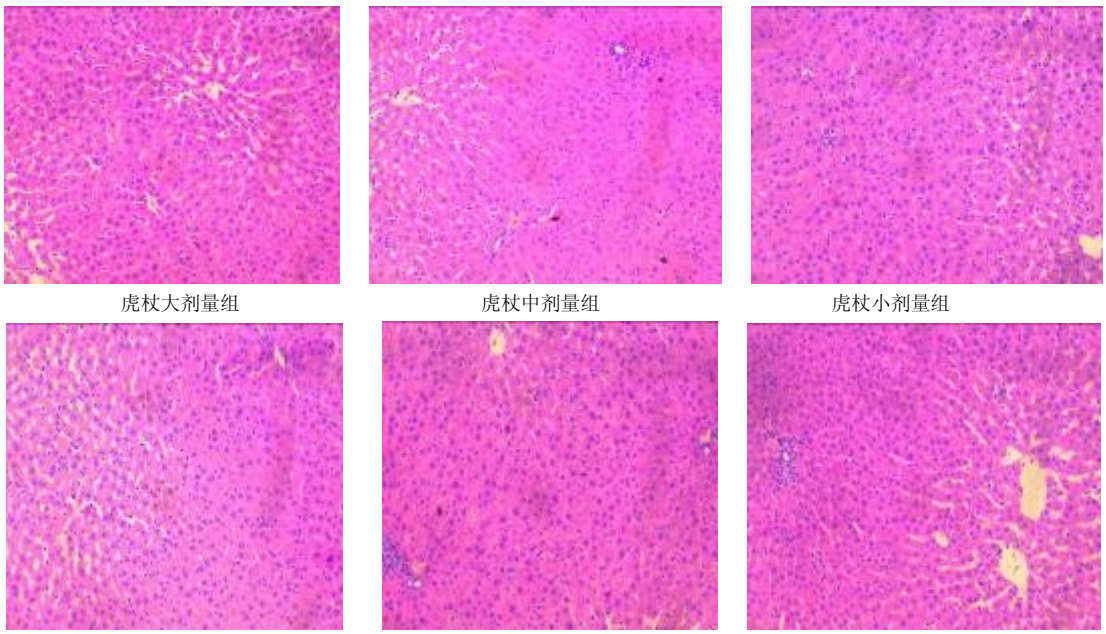

图 1 光学显微镜下大鼠肝组织学改变

Fig.1 The histological change of rat liver tissue by optical microscope in each group

4 讨论

酒精性脂肪肝是临床最常见、最早期的酒精性肝病之一，是由于摄入酒精导致肝细胞内脂质蓄积超过肝湿质量15%的一种肝损害性疾病，目前尚缺乏特效药。有研究表明，酒精性肝损伤主要由于乙醇在肝乙醇脱氢酶(ALDH)和微粒体乙醇氧化酶系的催化下被氧化成乙醛和乙酸盐，并产生氧自由基，诱导膜系统发生脂质过氧化反应，从而破坏生物膜结构和功能，最终导致肝细胞损伤[3]。NO是一种细胞信使分子和细胞毒性因子，不仅本身可以产生毒性作用，而且极易与多种物质反应生成毒性更强的物质，从而导致对肝细胞毒性，并且NO的变化与肝损伤程度相平行[4]。MDA是重要的脂质过氧化产物，其对组织细胞有很强的毒性作用，破坏细胞膜结构而导致细胞肿胀坏死，还可介导肝细胞损伤，从而使肝脏炎症加重[5]。SOD可通过歧化作用清除体内氧自由基，减少脂质过氧化反应，维持生物膜的正常结构和功能，其水平高低反应了机体抗氧化能力的强弱[6]。ALT和AST是反映肝细胞损害的常用酶学检查指标[7]。ALT和AST均很容易受到酒精影响，且酒精性脂肪肝较之病毒性肝炎等急性肝损伤更易引起AST升高。有研究显示，酒精性脂肪肝模型大鼠的血清ALT、AST活性是明显升高的[8]。

虎杖为蓼科蓼属植物虎杖 *Polygonum CuspidatumSieb*. Et Zucc. 的干燥根及根茎，性味苦寒，归肝、胆经，具有祛风利湿、活血化瘀之功效。药理学研究提示虎杖具有抗氧化、降血脂、抗动脉粥样硬化等广泛的药理作用[9]。

通过研究发现：模型组大鼠肝脂肪细胞增加及肝细胞变性明显，表明造模成功。与模型组比较，虎杖防治组肝脂肪细胞减少，肝细胞内脂滴颗粒减小，内脏脂肪指数、肝指数、AST、ALT、MAD、TG、CHOL、HDL、LDL和NO降低、SOD升高，且大部分指标优于凯西莱组。结果提示：中药虎杖可降低乙醇化学性肝损伤时脂质过氧化物的生成，同时可提高抗氧化酶SOD活性，从而阻止肝细胞过多地被氧化破坏。但HDL降低和脂肪肝之间的关系尚难以界定。

综上所述，中药虎杖对酒精性脂肪肝模型大鼠具有一定保护作用，其作用机制可能与提高抗氧化酶活性、抗脂质过氧化损伤及减少NO生成等有关。进一步深入研究虎杖对肝脏的保护作用可望将其开发为新的治疗肝损伤的药物。

(参考文献[1]- [9]转第106页)

American Chemical Society, 1949, 71(3): 847-851.

[12] Tanford C. Physical Chemistry of Macromolecules[M]. New York:John Wiley and Sons., 1971:526.

[13] Tanford C. The hydrophobic efect:formation of micelles and biological membranes[J]. New York :John Wiley and Sons., 1973: 12.

[14] Ross P D, Subramanian S.Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability[J]. Biochemistry, 1981, 20(11): 3096-3102.

[15] 杨曼曼,杨频,张立伟. 荧光法研究咖啡酸类药物与白蛋白的作用[J]. 科学通报, 1994, 39(1): 31-35.

[16] 王建林,付连春,周实武,等. 维生素 B6 与人血清白蛋白的相互作用[J]. 光谱学与光谱分析,2005,25(06): 912-915.

[17] Qiu B,Guo L H, Chen M L, et al. Study on interaction between a new fluorescent probe 2-methylbenzo[b][1,10] phenanthrolin-7(12H)-one and BSA[J]. Analyst, 2011, 136: 973–978.

[18] 冯喜增,金瑞祥,曲芸,等. 各种离子对血卟啉与牛血清白蛋白相互结合反应的影响研究[J]. 高等学校化学学报, 1996, 17(6): 866-869.

[19] 颜承农,上官云凤,童金强,等. 双嘧达莫与牛血清白蛋白结合热力学特征的荧光光谱法研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2003, 23(3): 543-546.

[20] 商志才,易平贵,俞庆森,等. 环丙沙星与牛血清白蛋白的结合反应[J]. 物理化学学报, 2001, 17(1): 48-52.

[21] 郭灿城,李和平,张晓兵,等. Meso-5,10,15,20-四[4-(N-吡咯烷基)苯基]卟啉的合成及对牛血清白蛋白的作用[J]. 高等学校化学学报, 2003, 24(2): 282-287.

[22] Southampton Electrochemistry Group. Instrumental Methods in electrochemistry[M]. England :Ellis Horwood Limited, 1985.

[23] 严拯宇, 秀芬,姜新民,等. 巴洛沙星与牛血清白蛋白相互作用的研究[J].光谱学与光谱分析,2006,26(8): 1494-1498.

[24] 费燕. 创新药物西那沙星与生物大分子的相互作用机制研究[D]. 上海:第二军医大学,2008.

(上接第99页)

参考文献：

[1] 周俊英,刘英辉,周东方,等. 脂联索-沉默信息调节因子1-腺苷酸激活蛋白激酶通路在大鼠酒精性脂肪肝发病机制中的作用[J].中华肝脏病杂志,2015,23(9):711-714.

[2] 李国春. 赶黄草对大鼠酒精性脂肪肝的保护作用及机制[J].中国老年医学杂志,2015,35(4):3845-3847.

[3] 乌日图那顺,包纳日斯. 地格达-4对酒精性脂肪肝模型大鼠氧化指标的影响[J].中国中医急症,2014,23(9): 1598-1601.

[4] 刘森琴,葛林. 葛根散对酒精性脂肪肝大鼠肝功能损伤的影响[J]. 河北中医,2013,35(11): 1703-1706.

[5] 杨超燕,吉国辉,何伟,等. 参芎滴丸对心肌缺血大鼠抗脂质过氧化损伤的保护作用[J].井冈山大学学报:自然科学版,2015,36(4):84-89.

[6] 肖碧跃,赵国荣,贺又舜,等. 理脾护肝调脂丸对脂肪肝大鼠肝脏MDA、SOD影响的研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(11):230-233.

[7] 王利国,唐灿. 巴中产栀子对大鼠肝损伤保肝降酶药理效应研究[J].井冈山大学学报:自然科学版,2015, 36(1):91-94.

[8] 刘祥兰,徐颖,张钰泉,等. 猪苓多糖降血脂抗大鼠酒精性脂肪肝的药理实验研究[J].中成药,2013,35(8): 1760-1763.

[9] 楼锦英,李雄英,陈素红,等. 复方虎杖提取物对高脂血症大鼠肝脏的影响[J].浙江中医杂志,2013,49(6):400-402.