

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.03.006

葛黄颗粒对酒精性肝病模型大鼠的防治作用*

郎 涵^{1,2},魏 颀³,汪 静³,米绍平³,王晓栋³,陈柚伶^{1,2},李 志^{2△}
(1. 西南医科大学中西医结合学院,四川泸州 646000;2. 西南医科大学附属中医医院
脾胃内科,四川泸州 646000;3. 西南医科大学附属中医医院肝胆内科,四川泸州 646000)

[摘要] **目的** 通过动物实验观察葛黄颗粒对酒精性肝病(ALD)模型大鼠的防治作用。**方法** SD 大鼠分为 6 组:正常组、模型组、低剂量组、中剂量组、高剂量组、对照组,每组 18 只。除正常组给予蒸馏水和普通饲料外,其余各组均给予 40%乙醇(1.0 mL·100 g⁻¹·d⁻¹)灌胃,隔日给予高脂饲料。4 周后高、中、低剂量组加用不同剂量的葛黄颗粒,对照组加用美他多辛,持续 8 周。用苏木素-伊红(HE)染色观察肝脏组织的病理形态学改变,用全自动生化分析仪检测血清门冬氨酸氨基转移酶(AST)、血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC),用比色法测定肝组织的 TG、TC;**结果** 在模型组中,血清 AST、ALT、TG、TC 水平,肝组织中的 TG、TC 水平显著升高($P<0.05$);干预后,上述指标在高剂量组和对照组中的表达明显降低($P<0.05$);中、低剂量组降低不明显($P>0.05$);高剂量组和对照组之间差异无统计学意义($P>0.05$);**结论** 葛黄颗粒对 ALD 有较好的防治作用。

[关键词] 肝疾病,酒精性;葛花;葛黄颗粒;防治作用
[中图分类号] R575.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2017)03-0305-03

Preventive and treatment effect of Gehuang granules on ALD model rats*
Lang Han^{1,2}, Wei Mei³, Wang Jing³, Mi Shaoping³, Wang Xiaodong³,
Chen Youling^{1,2}, Li Zhi^{2△}

(1. College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China; 2. Department of Spleen and Stomach Internal Medicine, Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China; 3. Department of Hepatobiliary Internal Medicine, Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To observe the preventive and treatment effect of Gehuang granules(GHG) on alcohol liver disease (ALD) model rats by the animal experiment. **Methods** SD rats were randomly divided into 6 groups: normal group, model group, low dose group, middle dose group, high dose group, control group, 18 in each group. Except the normal group was given distilled water and common fodder, the rest groups were given 40% alcohol by gavage (1.0 mL·100 g⁻¹·d⁻¹) and supplemented with high fat fodder on every other day. Four weeks later, the low, middle and high doses groups were added with different doses of GHG. The control group was added with metadoxine. The intervention persisted for 8 weeks. The histopathological morphology change of liver tissue was observed by HE staining. Serum AST, ALT, TG and TC were detected by the automatic biochemical analyzer. The TG and TC level in liver tissue was detected by the colorimetric method. **Results** The model group showed significantly increased levels of serum AST, ALT, TG, TC and levels of TG and TC in liver tissue($P<0.05$); after intervention, the expressions of above indexes in the high dose group and control group were markedly decreased($P<0.05$), but the decrease in the middle dose and low dose groups were unapparent ($P>0.05$); the difference between the high dose and control group had no statistical significance($P>0.05$). **Conclusion** GHG has better preventive and treatment effect on ALD.

[Key words] liver disease, alcoholic; pueraria flower; Gehuang granules; preventive and treatment effect

酒精性肝病(ALD)是长期大量饮酒所导致的一系列相关的肝脏疾病,包括轻症酒精性肝病、酒精性脂肪肝、酒精性肝炎、酒精性肝纤维化和酒精性肝硬化。ALD 在西方发达国家是导致肝硬化的首要病因^[1],在我国已是继病毒性肝炎之后的第二大肝脏疾患,给个人、家庭及社会带来了严重负担。现今 ALD 的治疗方法除戒酒外,其他有效的治疗方法和药物较少,因此急需研发有效治疗 ALD 的新药。本研究模拟当前人类生活状况,采用酒精与高脂饲料喂养建立大鼠 ALD 模型,观察葛

黄颗粒对 ALD 模型大鼠的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级 SD 大鼠 108 只,雌雄各半,质量(200±20)g,由西南医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 药物 葛黄颗粒:由西南医科大学附属中医医院制剂室提供,处方组成:葛花、赶黄草、虎杖、白术、柴胡、丹参、枳椇子、甘草等,规格:每袋 10.0 g。美他多辛片由山东齐都药业有

* 基金项目:四川省科技厅课题(2013SZ0148);泸州市科技局课题(2013LZLY-J24)。 作者简介:郎涵(1990—),住院医师,在读硕士,主要从事消化系统疾病方面研究。 △ 通信作者,E-mail:724232536@qq.com。

限公司生产,规格:每颗 0.5 g。

1.1.3 主要试剂 无水乙醇,购自成都市科龙化工试剂厂;高脂饲料(2%胆固醇+1%猪油),购自成都达硕生物科技有限公司;戊巴比妥钠,购自江西涟水制药有限公司;苏木精-伊红(HE)染液,肝功酶试剂盒,购自南京建成生物工程研究所;三酰甘油(TG)测试盒,总胆固醇(TC)测试盒,购自浙江东瓯诊断产品有限公司。

1.2 方法

1.2.1 造模与给药 模型组、高、中、低剂量组和对照组给予 40%乙醇灌胃($1.0\text{ mL}\cdot 100\text{ g}^{-1}\cdot \text{d}^{-1}$),每天 1 次,同时,隔天给予高脂饲料,正常组给予相同容积蒸馏水灌胃和普通饲料。每天 20:00 后禁食,次日上午空腹灌胃后开始进食。每周称体质量 1 次,并根据体质量调整给药剂量。4 周后高、中、低剂量组加用不同剂量的葛黄解酒颗粒,给药剂量依次为 5、300、2.650、1.325 $\text{g}\cdot \text{kg}^{-1}\cdot \text{d}^{-1}$,对照组加用美他多辛,给药剂量为 0.090 $\text{g}\cdot \text{kg}^{-1}\cdot \text{d}^{-1}$,单次灌胃体积均为 0.5 mL/100 g,每天灌胃 1 次。持续给药 8 周后,抽取 3 只模型组大鼠,病理检查证实 ALD 已经形成,停止给药。

1.2.2 标本采集 末次给药后禁食 12 h,不禁水,次日上午称质量后,予以 2%戊巴比妥钠 0.3 mL/100 g 腹腔注射麻醉,腹主动脉取血,离心留血清,−20 ℃冰箱保存,用于血清门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、TG、TC 检测。颈椎脱臼处死大鼠迅速剖取肝脏,称取肝脏湿质量后,从每只大鼠肝脏的相同部位取 2 g 经 4%中性甲醛固定,用于 HE 染色。

1.2.3 观测指标及方法 肝脏指数=肝湿质量/末次体质量×100%。肝组织病理学变化:肝组织病理学切片,HE 染色,光镜下观察肝细胞脂肪变性程度。血清各指标检测:按肝功酶试剂盒及血清试剂盒操作说明测定 AST、ALT,血清 TG、TC。肝组织各指标的测定:按 TG 测试盒、TC 测试盒说明进行操作。

1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行数据分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,服从正态分布且方差齐,采用单因素方差分析,各组间两两比较采用 LSD-*t* 检验;不服从正态分布则采用非参数检验中多个独立样本的 Kruskal-Wallis 检验,各组间两两比较采用两个独立样本的 Mann-Whitney 检验,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝脏大体解剖学情况 正常组大鼠的肝脏呈红褐色,包膜光滑,边缘锐利,质地适中。模型组大鼠腹腔肥大,脂肪组织丰富,肝脏颜色呈砖红色或黄褐色,体积增大,包膜紧张,切面油腻,可见黄色脂肪泡,呈脂肪肝外观。4 个用药组介于正常与模型组之间,其中高剂量组与对照组肝脏外观接近正常组。

2.2 肝脏指数的比较 与正常组[(2.57±0.15)%]相比,模型组[(2.89±0.24)%]的肝脏指数显著升高($P<0.05$),高剂量组[(2.61±0.21)%]和对照组[(2.68±0.21)%]肝脏指数也均有一定范围地增高,但差异无统计学意义($P>0.05$)。与模型组比较,高、中、低剂量组[低剂量组:(2.80±0.48)%;中剂量组:(2.77±0.45)%]的肝脏指数均有不同程度的降低,其中高剂量组降低显著($P<0.05$)。高剂量组的肝脏指数比对照组更低,但差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 大鼠肝组织 HE 染色结果显示 正常组:肝细胞结构正

常,边界清楚,沿汇管区呈放射状整齐排列。模型组:肝细胞显著肿大,边界模糊,细胞质中充满大小不等的脂肪空泡,少数细胞核被挤到一边,肝细胞索紊乱,肝窦及汇管区未见炎性细胞浸润。低剂量组:组织结构恢复不明显,肝细胞肿大,细胞索紊乱,细胞质中可见明显脂肪空泡。中剂量组:肝细胞内的脂肪空泡较低剂量组减少,且以小脂肪泡为主,但肝细胞仍有肿大,肝脏总体结构恢复不理想。高剂量组:肝细胞索恢复放射排列,大部分细胞结构已经恢复正常,仅少数细胞轻度肿大,可见少量的微小脂肪空泡。对照组:肝脏结构恢复接近于正常,肝细胞呈放射状排列,细胞质中基本不见脂肪空泡,见图 1、2。

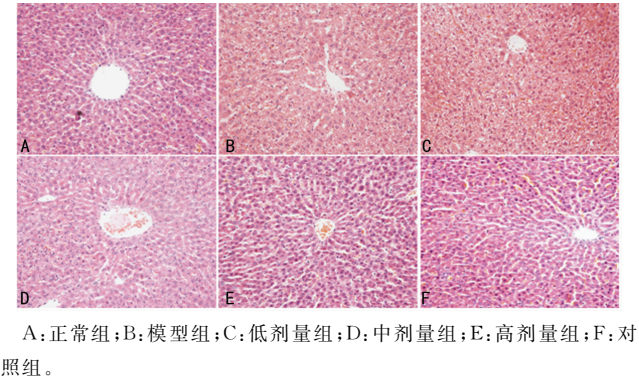


图 1 各组大鼠肝细胞脂肪变性程度(HE,×200)

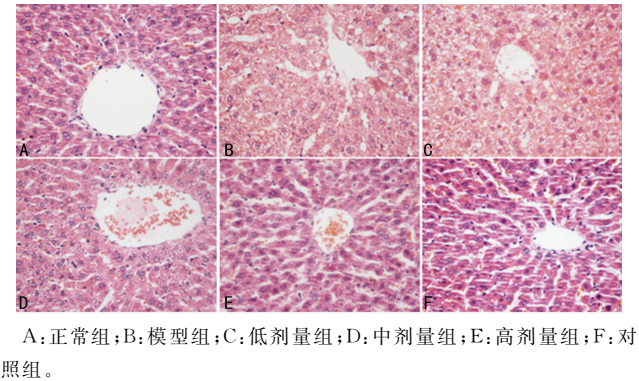


图 2 各组大鼠肝细胞脂肪变性程度(HE,×400)

2.4 大鼠血清各指标比较 模型组的 AST、ALT、TG、TC 的水平均较正常组显著增加($P<0.05$)。与模型组相比,高、中、低剂量组 AST、ALT、TG、TC 的水平呈现出随着剂量增加而递减的趋势,并且 4 项指标在高剂量组和模型组间的差异均有统计学意义($P<0.05$),高剂量组 AST、ALT、TG、TC 的水平已接近于正常组;对照组 AST、ALT、TG、TC 的水平也显著低于其在模型组的水平($P<0.05$)。高剂量组与对照组间的差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠血清 AST、ALT、TG、TC 比较($\bar{x}\pm s, n=18$)

组别	ALT(U/L)	AST(U/L)	TG(mmol/L)	TC(mmol/L)
正常组	78.44±12.35	41.00±9.91	0.21±0.08	1.58±0.13
模型组	98.75±10.77 ^a	55.56±7.18 ^a	0.52±0.31 ^a	1.89±0.16 ^a
对照组	81.19±13.59 ^b	42.25±5.99 ^b	0.24±0.09 ^b	1.65±0.10 ^b
低剂量组	93.50±12.07	52.80±6.73	0.45±0.33	1.81±0.29
中剂量组	89.00±14.54	50.43±4.50	0.37±0.19	1.76±0.21
高剂量组	83.80±18.70 ^b	45.00±7.59 ^b	0.26±0.13 ^b	1.65±0.21 ^b

^a: $P<0.05$,与正常组比较;^b: $P<0.05$,与模型组比较。

2.5 大鼠肝组织 TG、TC 的比较 模型组大鼠 TG、TC 的水平均显著高于正常组($P<0.05$)。与模型组相比,对照组大鼠 TG、TC 的水平均显著降低($P<0.05$)。高、中、低剂量组 TG、TC 的水平较模型组均不同程度降低,其中高剂量组下降显著($P<0.05$)。各项指标在高剂量组和对照组间的差异无统计学意义($P>0.05$),并且两项指标在两组水平与正常组均差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

表 2 各组大鼠肝组织 TG、TC 比较($\bar{x}\pm s,n=18$)		
组别	TG(mmol/gprot)	TC(mmol/gprot)
正常组	2.52±0.59	7.17±1.40
模型组	3.77±1.04 ^a	9.03±0.69 ^a
对照组	2.74±0.60 ^b	7.83±1.28 ^b
低剂量组	3.39±0.75	8.48±1.25
中剂量组	3.05±0.63	8.27±0.83
高剂量组	2.84±0.41 ^b	7.96±0.81 ^b

^a: $P<0.05$,与正常组比较;^b: $P<0.05$,与模型组比较。

3 讨 论

ALD 的致病因子早已明确,即大量饮酒,且饮酒量、饮酒时间与肝脏损伤程度呈正相关^[2-3],大量研究表明无论肝脏损伤严重程度如何,ALD 患者最基本的治疗始终都是戒酒^[4]。除此之外,ALD 患者需要良好的营养支持,在戒酒的基础上必须提供高蛋白、低脂饮食,同时补充叶酸及各类维生素也是十分必要的^[5]。目前对 ALD 的治疗除戒酒外确切有效的治疗方法及药物较少,所以,急需研究新的防治 ALD 的药物及方案。国内较多实验证实中医药在治疗 ALD 方面取得了较好的疗效,有着广阔的应用前景^[6-12]。西南医科大学附属中医医院全国著名老中医、肝病专家孙同郊教授寻求古籍,博采众家之长,结合现代医学对 ALD 发病机制的研究成果,认为该病由“酒”所致,而酒性湿热有毒,易伤肝脾,提出中医在治疗 ALD 时“解酒毒”、“护肝脾”是关键。经过多年的临床实践,总结出了“葛黄解酒方”这一治疗 ALD 的有效经验方,现经现代工艺制成颗粒剂药物“葛黄颗粒”。葛黄颗粒组成药物有:葛花、赶黄草、虎杖、白术、柴胡、丹参、枳椇子、甘草等。其中,葛花醒脾解酒为君药;白术健脾利湿,柴胡疏肝为臣药;丹参活血化瘀散结,虎杖、赶黄草分利大小便、清热解毒,除烦止渴,枳椇子解酒毒,利大小便,除烦止渴共为佐药;甘草调和药性为使药。全方共同体现“醒酒解毒、健脾疏肝、清热利湿”之功,完全体现了中医“酒毒湿热致使肝脾肾三脏器功能失调是 ALD 发生、发展的关键”的观点。

本实验从肝脏指数、肝脏病理学改变、血清酶学、血脂及脂肪 5 个方面探讨葛黄颗粒对 ALD 模型大鼠的保护作用。(1)肝脏指数反映了肝脏受损的情况,ALD 模型大鼠的肝脏从肉眼观察大而软。实验结果可以看出葛黄颗粒对肝脏指数的降低程度为高、中、低的顺序,说明其对肝脏指数的作用在所选取的范围内存在量效依赖趋势。(2)从肝组织病理形态学观察说明模型复制成功。所有用药组大鼠肝细胞脂肪变均得到不同程度的改善,说明葛黄颗粒能够改善 ALD 模型大鼠的肝脏病理改变。(3)血清酶学方面,乙醇进入体内,其代谢过程可生成活性氧,活性氧既可损伤线粒体又可损伤细胞膜,从而使转氨酶进入血内,故血中的转氨酶升高^[13]。实验结果提示葛黄颗粒具有保肝降酶的作用,且在所选剂量范围内,保肝降酶作用与剂量呈正相关。(4)正常情况下,脂肪是以乳糜微粒(CM)的

形式经肠系膜吸收进入血液循环,再运送至肝脏、脂肪组织,形成 TG^[14]。TC 作为血液中所有脂蛋白的胆固醇之和,与脂肪代谢关系密切,能够反映脂代谢状况。因此,血清中的 TG、TC 水平可以反映患 ALD 的危险度以及病理程度。本实验结果提示葛黄解酒颗粒具有较好的降血脂作用。最后,肝脏是机体合成 TG、TC 的主要场所,但正常情况下并不储存。乙醇及其代谢产物能够促使 TG 的合成增加,转运减少,引起脂肪沉淀于肝细胞内。所以监测肝组织中的 TG、TC 水平较血清 TG、TC 的水平能更直接、准确地反映肝脂质代谢情况。本实验结果提示模型组大鼠肝脏已有明显脂肪堆积,模型复制成功,葛黄颗粒和美他多辛均有较好的降肝脂作用。

综上所述,本实验结果显示葛黄颗粒可以降低 ALD 模型大鼠的肝脏指数、血脂及肝脂,改善肝功能,减轻肝脏损伤,说明其对 ALD 有防治的作用。

参考文献

[1] Diale AM. Liver disease in alcohol abuser. Clinical Perspective[J]. Alcohol,2002(1):721.

[2] 刘茂强. 酒精性肝病 62 例临床分析[J]. 医学信息,2010,23(8):2649.

[3] 刘春华. 酒精性肝病 78 例临床分析[J]. 中国医药指南,2011,9(32):66-67.

[4] Percussion F,Ramond MJ,Peters L,et al. Five-year survival predictive factors in patients with excessive alcohol intake and cirrhosis. Effect of alcoholic hepatitis, smoking and abstinence[J]. Liver Int,2003,23(1):45-53.

[5] Stickel F,Hoehn B,Schuppan D,et al. Review article:nutritional therapy in alcoholic liver disease[J]. Aliment Pharmacol Ther,2003,18(4):357-373.

[6] 杨静波. 中医辨证治疗酒精性肝病 46 例[J]. 中国民间疗法,2007,15(6):39-40.

[7] 马彦平. 化浊祛瘀汤治疗酒精性肝病的实验研究[J]. 世界中西医结合杂志,2009,4(10):707-709.

[8] 贾秋颖. 清解酒毒化瘀散结法治疗酒精性肝病体会[J]. 长春中医药大学学报,2010,26(4):520-521.

[9] 李军,王镜辉,田梦源,等. 加减葛花解醒汤治疗酒精性肝病 44 例的临床研究[J]. 贵阳中医学院学报,2013,35(2):75-77.

[10] 吴桂生. 柴胡疏肝汤、复方甘草甜素治疗肝损伤疗效观察[J]. 中国现代药物应用,2010,4(7):149.

[11] 王林元,屈胜胜. 巴西莓对大鼠慢性酒精性肝损伤的保护作用及对 TGF-β1、CD68 的影响[J]. 卫生研究,2014,43(6):1018-1021.

[12] 屈胜胜,张建军. 巴西莓对大鼠慢性酒精性肝损伤的保护作用及对炎性细胞因子的影响[J]. 中国中药杂志,2014,39(24):4869-4872.

[13] 江正辉,王泰玲. 酒精性肝病[M]. 北京:中国医药科技出版社,2001:239-241.

[14] 刘晓彦. 消脂护肝胶囊对非酒精性脂肪肝大鼠 CYP2E1、PPARα 基因表达的影响[D]. 河南:河南中医学院,2006.