

# 化痰泄浊方对脂肪肝模型大鼠 胰岛素抵抗及瘦素的影响

叶放<sup>1</sup>, 赵文霞<sup>2</sup>, 苗明三<sup>2</sup>, 李建国<sup>2</sup>, 张永艳<sup>2</sup>

(1. 南京中医药大学第一临床医学院, 江苏 南京 210029; 2. 河南中医学院肝病研究所, 河南 郑州 450008)

**[摘要]** 目的:探讨化痰泄浊方对大鼠脂肪肝的作用。方法:将 SD 大鼠随机分为 5 组:正常对照组、模型组、东宝肝泰组、化痰泄浊方高剂量和低剂量组。用高脂饮食联合四环素腹腔注射法制作大鼠脂肪肝模型,观察大鼠肝脏组织的病理变化,并检测肝功能、血清瘦素、胰岛素抵抗指数,以及肝匀浆甘油三酯(triglyceride, TG)和游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)的含量。结果:各用药组血清瘦素、胰岛素抵抗指数及肝匀浆 FFA、TG 含量均显著低于模型组( $P < 0.01$ ),且化痰泄浊方组的抗脂肪肝作用显著优于东宝肝泰组( $P < 0.05$ )。结论:化痰泄浊方治疗脂肪肝的作用机制主要为促进脂质代谢、改善胰岛素及瘦素抵抗。

**[关键词]** 化痰泄浊方; 脂肪肝; 游离脂肪酸; 胰岛素抵抗; 瘦素抵抗

**[中图分类号]** R589.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-1997(2005)04-0290-04

## Effects of Huatan Xiezhuo Recipe on insulin resistance and leptin in rats with fatty liver

YE Fang<sup>1</sup>, ZHAO Wen-Xia<sup>2</sup>, MIAO Ming-San<sup>2</sup>, LI Jian-Guo<sup>2</sup>, ZHANG Yong-Yan<sup>2</sup>

(1. First Clinical College, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu Province 210029, China; 2. Institute of Liver Diseases, Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan Province 450008, China)

**ABSTRACT** Objective: To observe the effects of Huatan Xiezhuo Recipe (HTXZR) on fatty liver of rats. Methods: Forty-eight SD rats were randomly divided into five groups: normal control group, untreated group, Dongbao Gantai Tablet (DBGTT)-treated group, low-dose HTXZR-treated group and high-dose HTXZR-treated group. Fatty liver was induced in the rats by hyperlipid diet and intraperitoneal injection of tetracycline. The pathological changes of liver tissues in rats were observed, and the liver function, serum leptin, insulin resistance index, triglyceride (TG) and free fatty acid (FFA) in the liver were detected. Results: The levels of serum leptin, insulin resistance index, FFA and TG in rats of the three treated groups were lower than those of the untreated group ( $P < 0.01$ ), and such effects in the HTXZR-treated groups were more significant than those in the DBGTT-treated group ( $P < 0.05$ ). Conclusion: The main action mechanisms of HTXZR in treating fatty liver are probably to promote the lipid metabolism, decrease the leptin and insulin resistance.

**KEY WORDS** Huatan Xiezhuo Recipe; fatty liver; free fatty acid; insulin resistance; leptin resistance

J Chin Integr Med, 2005, 3(4): 290-293

当外源性脂肪酸供给增加,游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)运输至肝脏过多时,肝细胞内 FFA 合成甘油三酯(triglyceride, TG)就会增多,从而导致肝内脂肪堆积。既往研究表明,胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)和瘦素(leptin)抵抗以及两者之间的相互作用在脂肪肝发病机制中起着重要的作用<sup>[1,2]</sup>。化痰泄浊法是中医治疗脂肪肝最常用的

治法。本实验旨在研究化痰泄浊方(Huatan Xiezhuo Recipe, HTXZR)对高脂饮食联合四环素腹腔注射所致大鼠脂肪肝模型的干预作用及影响环节。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

[基金项目] 河南省科技攻关基金资助项目(No. 0224630002)

[作者简介] 叶放(1965-),男,副主任医师,在读博士研究生.E-mail: yeflm@yahoo.com.cn

Correspondence to: Prof. ZHAO Wen-Xia. E-mail: zhao8536@hotmail.com

1.1.1 动物 健康雄性 SD 大鼠 48 只, 体质量 (150 ± 10)g, 河南医科大学动物实验中心提供。饲养于室温(20 ± 3)、明暗各 12 h 的清洁级动物实验室中, 予以自由饮水和进食。

1.1.2 药物与试剂 化痰泄浊方浓缩液由泽泻、荷叶、莱菔子、大黄按生药比例 4 : 3 : 2 : 1 制成, 浓缩液含生药 2 g/ml, 由河南中医学院第一附属医院制剂室生产, 批号 20020415; 东宝肝泰片 (Dongbao Gantai Tablet, DBGTT) 由中国通化东宝药业股份有限公司生产, 0.4 g/片, 批号 011106; 四环素粉针剂, 250 mg/支, 江苏常州动物保健品有限公司生产, 批号 010903; 胆固醇(分析纯), 购自上海化学试剂站分装厂, 批号 010903; 丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 检测试剂盒, 购自四川迈克科技有限责任公司; TG 试剂盒, 购自温州东欧生物工程有限公司; FFA 测试盒, 购自南京建成生物医学研究所; 胰岛素放射免疫分析药盒(批号 020615)、瘦素放射免疫分析药盒(批号 020617), 中国原子能科学研究所提供。

1.1.3 主要仪器 LXJ- 离心沉淀机, 上海医用分析仪器厂生产; 722 型光栅分光光度计、7150 型 (BT-2000) 全自动生化分析仪、H-7500 透射电子显微镜, 日本日立公司产品。

## 1.2 方法

1.2.1 分组与模型制作 SD 大鼠 48 只, 常规饲养 1 周后随机分为 5 组: 正常对照组、模型组、DBGTT 组、HTXZR 高剂量和低剂量组, 其中正常对照组 8 只, 其余 4 组各 10 只。正常对照组予以基础饲料喂养, 其余 4 组均以高脂饲料(84% 基础饲料 + 10% 猪油 + 5% 蛋黄粉 + 1% 胆固醇)喂养, 并于造模第 1 天予以腹腔注射四环素 150 mg/kg, 后每隔 6 d 腹腔注射四环素 110 mg/kg 1 次, 共 6 次。

1.2.2 给药方法 自造模第 1 天起, 除正常对照组外, 其余各组均按 5 ml · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>, 1 次/d, 分别灌服生理盐水或相应的药物溶液。HTXZR 高剂量和低剂量组的给药浓度分别为 HTXZR 2 g/ml 和 1 g/ml(相当于成人用药剂量的 20 倍和 10 倍); DBGTT 溶于蒸馏水中, 制成浓度为 0.06 g/ml 的溶液, 给药浓度为 0.225 g · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>(相当于成人用药剂量的 10 倍)。连续 7 周。

1.2.3 标本采集 于造模第 7 周结束时处死各组动物。方法: 隔夜禁食, 次日以 2% 戊巴比妥钠溶液按 1 ml/kg 予以腹腔内注射麻醉后, 自腔静脉采血, 然后迅速取出肝脏称取肝湿重, 取肝左叶组织 0.1 cm × 0.1 cm × 0.6 cm 标本 2~4 块用戊二醛固

定, 再取肝左叶组织 0.5 cm × 1 cm × 0.3 cm 标本 1 块, 用 10% 磷酸缓冲甲醛液固定。最后将剩余肝组织于 -70℃ 保存, 待作肝匀浆。所采血液于 30 min 之内离心取血清待检。

1.2.4 检测指标及测定方法 (1) 血清生化指标检测: 采血 5 ml 静置 30 min 后, 3 000 r/min 离心 10 min, 取血清用全自动生化分析仪检测血清中 TG、ALT、AST 和血糖水平。(2) 血清瘦素及空腹胰岛素定量: 采用放射免疫法, 按推荐公式计算胰岛素抵抗指数(胰岛素抵抗指数 = 空腹血糖含量 × 空腹胰岛素含量/22.5)<sup>[3]</sup>。(3) 肝匀浆 TG 检测: 取肝左叶组织 0.2 g, 4℃ 下制成 10% 肝匀浆, 用氯仿-甲醇为 2 : 1 溶液抽提脂质, 取上清可溶部分, 用酶法测定 TG(单位: mmol/L), 代表肝内脂肪含量。(4) 肝匀浆 FFA 检测: 取 1% 肝匀浆, 离心后取上清液 30 μl, 在 722 型光栅分光光度计上进行比色, 用酶法检测, 按试剂盒操作步骤进行。

1.2.5 肝脏病理观察 (1) 光镜观察: 取肝左叶, 中性甲醛固定肝标本, 予以石蜡切片, HE 染色后, 观察肝脏组织的病理变化。(2) 电镜观察: 标本经戊二醛固定, 环氧树脂包埋, 超薄切片后用透射电镜观察肝脏组织超微结构的变化。

1.2.6 统计学方法 所有实验数据均用 SPSS 10.0 统计软件进行分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用多因素方差分析的两两比较法, 等级资料采用秩和检验。

## 2 结果

2.1 各组大鼠肝湿重与肝指数的变化 模型组中有 1 只大鼠在第 3 次注射四环素后被大鼠间争咬致死, 原因未明。其余大鼠腹腔肥大, 脂肪组织丰富, 解剖观察肝脏体积明显增大, 包膜紧张, 呈砖红色, 切面有油腻感, 呈典型脂肪肝外观; 而 DBGTT 组和 HTXZR 高、低剂量组大鼠腹腔的脂肪组织较模型组少, 肝脏体积稍大, 呈黄色, 部分大鼠肝脏切面有油腻感。模型组、DBGTT 组和 HTXZR 高、低剂量组大鼠的肝湿重和肝指数均明显大于正常对照组 ( $P < 0.01$ ); DBGTT 组和 HTXZR 高、低剂量组的肝湿重与肝指数均明显小于模型组 ( $P < 0.05$ ); 而 HTXZR 高、低剂量组与 DBGTT 组之间肝湿重的比较无统计学意义, HTXZR 低剂量组与 DBGTT 组之间肝指数的比较则有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

2.2 各组大鼠肝组织的病理变化 正常对照组大鼠肝组织形态学基本正常; 模型组大鼠呈中~重度肝细胞脂肪变, 病变以中央静脉周围最为明显, 肝细

胞明显肿胀呈圆形,细胞核被挤向一边,胞浆内充满大量脂肪空泡,脂滴大小不等,甚至融合为大脂滴,少数可见有肝细胞碎屑样坏死和炎细胞浸润,未见有纤维化改变;各用药组大鼠的病理变化表现为肝细胞脂肪变呈不同程度的改善,脂肪变肝细胞数目减少,胞浆内脂滴减少或消失,胞浆丰富,肝索排列整齐,尤以 HTXZR 高、低剂量组改善最为明显,DBGTT 组次之。透射电镜显示:模型组大鼠肝细胞索排列紊乱,胞浆脂滴大量沉积,线粒体嵴明显肿胀或出现碎裂、坏死,肝星状细胞和库普弗细胞数增多;各用药组肝细胞则排列较整齐,胞浆脂质含量较少,线粒体无碎裂、坏死,炎细胞少见。

2.3 各组大鼠血清 ALT、AST、瘦素、胰岛素抵抗指数的变化 造模各组均出现不同程度的 ALT、AST 活性升高,以模型组最为明显;用药各组 ALT、AST 水平与模型组比较,有不同程度的降低,

差异有统计学意义 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); HTXZR 高、低剂量组与 DBGTT 组比较差异亦有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。血清瘦素水平及胰岛素抵抗指数均以模型组为最高,HTXZR 高剂量组的瘦素水平与模型组和 DBGTT 组比较都有显著下降 ( $P < 0.05$ ); HTXZR 高剂量组、DBGTT 组的胰岛素抵抗指数与模型组相比也有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),但各用药组之间的比较则无明显差异。见表 2。

2.4 各组大鼠肝匀浆 FFA、TG 及血清 TG 的变化

肝匀浆 FFA、TG 水平以模型组最高,正常对照组最低;用药各组的 FFA、TG 水平较模型组均有不同程度的下降 ( $P < 0.01$ ); HTXZR 高、低剂量组 FFA、TG 水平与 DBGTT 组比较,亦有统计学意义 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。模型组、DBGTT 组和 HTXZR 高、低剂量组之间血清 TG 水平的比较则无统计学意义。见表 3。

表 1 各组大鼠肝湿重与肝指数的变化

Tab 1 Changes of liver weight and liver index of the rats

( $\bar{x} \pm s$ )			
Group	n	Body weight (g)	Liver index (%)
Normal control group	8	275.8 ± 7.9	3.02 ± 0.17
Untreated group	9	333.6 ± 15.2	4.10 ± 0.24
DBGTT-treated group	10	311.0 ± 10.7*	3.80 ± 0.20*
Low-dose HTXZR-treated group	10	300.6 ± 12.8*	3.55 ± 0.17*
High-dose HTXZR-treated group	10	283.5 ± 11.1*	3.68 ± 0.16*

\*  $P < 0.05$ , vs untreated group;  $P < 0.05$ , vs DBGTT-treated group;  $P < 0.01$ , vs normal control group

表 2 各组大鼠血清 ALT、AST、瘦素、胰岛素抵抗指数的变化

Tab 2 Changes of serum ALT, AST, leptin and insulin resistance index of the rats

( $\bar{x} \pm s$ )					
Group	n	ALT (U/L)	AST (U/L)	Leptin ( $\mu\text{g/L}$ )	Insulin resistance index
Normal control group	8	48.88 ± 4.76	149.75 ± 5.37	0.29 ± 0.06	9.94 ± 0.81
Untreated group	9	425.87 ± 72.93	292.12 ± 30.99	1.08 ± 0.37	14.69 ± 1.93
DBGTT-treated group	10	212.13 ± 19.17*	249.63 ± 27.60	0.86 ± 0.20	12.44 ± 1.62*
Low-dose HTXZR-treated group	10	167.11 ± 24.44*	188.44 ± 25.52*	0.69 ± 0.19*	14.10 ± 2.63
High-dose HTXZR-treated group	10	150.88 ± 19.31**	204.50 ± 15.90**	0.62 ± 0.16*	12.84 ± 1.79*

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , vs untreated group;  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ , vs DBGTT-treated group

表 3 各组大鼠肝匀浆 FFA、TG 及血清 TG 的变化

Tab 3 Changes of liver tissue FFA, TG and serum TG of the rats

( $\bar{x} \pm s$ )				
Group	n	Liver homogenate FFA ( $\mu\text{mol/g}$ )	Liver homogenate TG ( $\text{mmol/L}$ )	Serum TG ( $\text{mmol/L}$ )
Normal control group	8	123.71 ± 16.37	0.56 ± 0.05	0.85 ± 0.19
Untreated group	9	560.50 ± 81.67	7.38 ± 0.55	1.49 ± 0.45
DBGTT-treated group	10	382.73 ± 36.71**	5.19 ± 0.52**	1.47 ± 0.44
Low-dose HTXZR-treated group	10	324.46 ± 34.51**	4.68 ± 0.43**	1.26 ± 0.34
High-dose HTXZR-treated group	10	280.51 ± 14.78**	3.77 ± 0.31**	1.43 ± 0.31

\*\*  $P < 0.01$ , vs untreated group;  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ , vs DBGTT-treated group

### 3 讨 论

四环素能使肝脏产生广泛的微囊泡性脂肪变性,抑制线粒体内脂肪酸氧化,从而酯化合成 TG 增多,诱导和促进了高脂饮食大鼠脂肪肝的形成。本实验结果表明:用高脂饮食联合四环素间断腹腔注射诱导建立大鼠脂肪肝模型是一种成功可行的造模方法,其肝脂肪变性造模成功率高且造模时间短。

既往研究表明:在脂肪肝的形成和发展过程中,IR 通过使外周脂肪降解以及增加肝脏对脂肪酸的摄取,促进脂肪变性的发生;IR 通过抑制 FFA 氧化使肝脏内 FFA 利用减少,增加 FFA 在肝脏内的蓄积,进而酯化为 TG 在肝内储存,并通过刺激微粒体的脂质过氧化酶使肝脏易于发生氧化应激,还可通过增高胰岛素水平来抑制线粒体对脂肪酸的  $\beta$ -氧化而发挥作用,脂肪堆积的肝细胞会对胰岛素产生抵抗<sup>[4]</sup>。

孙丽伟等<sup>[5]</sup>研究发现,高脂饮食诱导的脂肪肝大鼠血清中瘦素水平较正常组明显升高,提示血清瘦素水平与高脂饮食所致脂肪肝的病情发展有关。梁坚等<sup>[6]</sup>、黄伟等<sup>[7]</sup>进一步研究认为:在病理状态下,胰岛素对瘦素的敏感性下降,由于瘦素和胰岛素之间的相互作用,出现高瘦素、高胰岛素水平,即瘦素抵抗和胰岛素抵抗。增加的瘦素可通过增强胰岛素抵抗和改变肝细胞内胰岛素信号而增加细胞内的脂肪酸,从而促成肝脏的脂肪变。

中医认为,痰湿是脂肪肝疾病早、中期的主要病理产物,因此,深入研究化痰泄浊法对脂肪肝的作用机制具有重要意义。化痰泄浊方由泽泻、莱菔子、大黄、荷叶等组成,方中泽泻利水、渗湿、泄浊,切中本

病湿痰郁积的病机,重用为君药;莱菔子消食化积、降气化痰,大黄导湿热、清瘀热、下瘀血,二者合用共助主药渗湿祛浊之功;荷叶芳香轻宣、升清降浊,具有化湿醒脾之功,可升发清阳、分利清浊,以防君、臣药渗泄太过,为佐使药。

本实验结果显示:高脂饮食及四环素腹腔注射所致大鼠脂肪肝模型的 IR 指数、瘦素水平均显著升高,而各药物治疗组的 IR 指数、瘦素水平则明显降低,说明化痰祛浊方能改善 IR 及瘦素抵抗,具有一定的抗脂肪肝作用。

#### [参考文献]

- 1 杨正武,魏良州.瘦素抵抗、胰岛素抵抗与非酒精性脂肪肝[J].医学综述,2004,10(6):335-338.
- 2 吴木潮.瘦素与代谢综合征[J].国外医学·内科学分册,2000,27(12):519-521.
- 3 钟 岚,范建高,王国良,等.肥胖、高脂血症性脂肪肝肝炎模型的建立[J].实验动物科学与管理,2000,17(2):16-20.
- 4 李光伟.当前胰岛素敏感性评估及胰岛素抵抗研究的某些误区[J].中华内科杂志,1998,37(2):81-83.
- 5 孙丽伟,陈芝芸,严茂祥,等.高脂饮食脂肪肝大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6、Leptin 的变化[J].浙江中医学院学报,2004,28(3):41-42.
- 6 梁 坚,王婉梅,揭育丽,等.脂肪肝患者血清瘦素与胰岛素抵抗的关系[J].中国临床康复,2004,8(27):5847-5849.
- 7 黄 伟,季 峰,姜玲玲,等.脂肪肝患者血清瘦素水平检测及其与发病的关系[J].中华检验医学杂志,2004,27(2):106.

[收稿日期] 2004-09-20 [本文编辑] 黄文华 周庆辉

(上接第 289 页)

服 5 剂,诸症消失。

案 2,患者,某女,53 岁,2001 年 12 月 5 日初诊,自诉感冒咳嗽 20 余日,咳嗽,痰少而白,畏寒肢冷,大便稀溏,服多种中、西药疗效差,有慢性支气管炎病史。诊见舌淡、苔白,脉细弱。证属外感寒邪,虚实夹杂,肺失宣肃。治以散寒解表、补阳宣肺。处方:当归 6 g,桂枝 10 g,白芍 12 g,细辛 5 g,炙甘草 5 g,紫苑 12 g,杏仁 10 g。1 剂 d,连服 3 剂。嘱患者避风寒及戒油腻之品。复诊时,自诉诸症减,食欲好转,肢冷畏寒减轻。继服 5 剂,诸症消失,精神好转。嘱其每至冬季艾灸足三里穴,并自服金匱肾气丸以温补肾阳。

### 2 体 会

案 1 患者,病程日久,脾胃虚寒,胃失和降,且兼气血两亏。当归四逆汤有良好的和胃止痛、温中降逆的作用,治疗脾胃虚寒的胃脘痛效果较好,配合鸡内金、香附以消积化痰、调和气血,即所谓“健脾贵在调运,不在滞补”。案 2 患者,咳嗽日久不愈,若专治肺,则难于建其功。应依据“年六十,阴痿,气大衰”的特点,以治肾为根本,兼宣肺气,则久咳可愈,并辅以金匱肾气丸以巩固疗效。足三里为保健要穴,针灸足三里具有脾肾双调之功。

[收稿日期] 2005-01-11 [本文编辑] 黄文华 周庆辉