

葫芦素片对大鼠非酒精性脂肪肝病预防作用

黄邀 吴惠兰 肖铭澍

【摘要】目的 观察葫芦素片对大鼠非酒精性脂肪肝病(NAFLD)的预防作用。**方法** 将 36 只雄性 SD 大鼠根据随机数字表法分成 3 组:普通饮食组(I 组)、高脂饮食组(II 组)和葫芦素片干预组(III 组),每组 12 只,分别给予普通饮食、高脂饮食以及高脂饮食+葫芦素片,10 周后处死,称取各自体重、肝重,测定血 ALT、AST、TG、胆固醇(CHO)、LDL、HDL、脂蛋白 a(LPa)、游离脂肪酸(FFA)、溶血磷脂酰胆碱(LPC)、胞浆型磷脂酶 A2(cPLA2)、分泌型磷脂酶 A2(sPLA2)、钙非依赖性磷脂酶 A2(iPLA2)、空腹血糖、空腹胰岛素等,观察肝脏组织病理变化,并进行组间对比分析。**结果** II 组的体重、肝重、肝指数、ALT、TG、CHO、LDL、LPa、FFA、空腹胰岛素、稳态模型胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)、sPLA2、LPC、TG、CHO 均较 I 组高(均 $P < 0.05$),脂肪变性程度明显加重。III 组的 ALT 较 II 组低($P < 0.05$),肝组织炎症活动度较 II 组减轻。III 组肝重、肝指数、TG、CHO、LPa、LDL、空腹胰岛素、HOMA-IR、FFA、sPLA2、LPC 均较 I 组高(均 $P < 0.05$),脂肪变性程度明显加重,FFA、sPLA2 低于 II 组($P < 0.05$)。**结论** 葫芦素片可降低 NAFLD 大鼠的 ALT 水平,但不能明显改善其体重、脂肪代谢、肝细胞脂肪变性等指标。

【关键词】 葫芦素片 非酒精性脂肪性肝病 大鼠

Preventive effects of cucurbitacin tablet on non-alcoholic fatty liver disease in rats HUANG Yao, WU Huilan, XIAO Mingshu.
Department of Pediatrics, Taizhou Enze Medical Center (Group), Taizhou Hospital of Zhejiang Province, Linhai 317000, China

【Abstract】Objective To observe the preventive effects of cucurbitacin tablet on prevention of non-alcoholic liver disease (NAFLD) in rats. **Methods** Thirty six male SD rats were divided into three groups with 12 rats in each group: rats in group I were fed with regular diet, rats in group II were fed with high-fat diet and those in group III were fed with high-fat diet and cucurbitacin tablet. After ten weeks, all the rats were sacrificed, then rat body weight and liver weight were measured, the levels of glutamic pyruvic transaminase, glutamic oxaloacetic transaminase, triaurate, cholesterol, low density lipoprotein (LDL), high density lipoprotein (HDL), lipoprotein (a), free fatty acids, lyso-phosphatidylcholine (LPC), cytosolic phospholipase a2(cPLA2), secretory phospholipase A2 (sPLA2), calcium independent phospholipase a2 (iPLA2), fasting glucose, fasting insulin were determined. In addition, the histological changes of liver cells were analyzed. **Results** Compared to group I, the liver weight, hepatic exponent, serum alanine aminotransferase, triglyceride, cholesterol, LDL, lipoprotein (a), free fatty acid, insulin, insulin resistance index, sPLA2, LPC, liver triglyceride and cholesterol were significantly increased in group II. Moreover, degree of hepatic steatosis was significantly higher. In comparison with group II, the level of alanine aminotransferase, sPLA2 and LPC in group III was significantly decreased and degree of hepatic inflammation was significantly lower. Compared to group I, the level of hepatic exponent, triglyceride, cholesterol, lipoprotein (a), LDL, insulin, insulin resistance index, free fatty acid, sPLA2 and LPC were higher in group III. **Conclusion** Cucurbitacin tablet can reduce the alanine aminotransferase in NAFLD rats, but can not improve the body weight, fat metabolism and liver steatosis.

【Key words】 Cucurbitacin tablet Nonalcoholic fatty liver disease Rat

儿童非酒精性脂肪肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是指在儿童无饮酒的情况下出现的以

肝细胞脂肪变性和脂质堆积为特征的临床综合征。流行病学调查显示儿童 NAFLD 的发病率为 9.6%, 肥胖儿童甚至高达 38%, 严重威胁儿童的身体健康^[1]。至今, 儿童 NAFLD 的发病机制尚不明确, 加上儿童年龄的特殊性, 药物的不良反应比较多, 不主张应用成人的减肥方法治疗儿童肥胖症和非酒精性脂肪肝, 故干预其生活方式 (控制饮食+运动) 被认为是治疗该病的关键。

DOI: 10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.8.2018-2387

基金项目: 恩泽医疗中心(集团)科学研究基金(12EZC24)

作者单位: 317000 台州恩泽医疗中心(集团)浙江省台州医院内儿科(黄邀、吴惠兰); 浙江大学医学院临床医学院(肖铭澍)

通信作者: 吴惠兰, E-mail: whl@tzhospital.com

葫芦素片是一种传统的护肝中药,主要用于在慢性肝炎及原发性肝癌的治疗,其作用机制是可以逆转肝细胞免疫损伤,阻止其脂肪变性,抑制肝纤维增生,从而消退黄疸并降低肝酶^[2]。本研究采用葫芦素片治疗 NAFLD 模型大鼠,观察干预前后大鼠血清酶学、脂代谢、胰岛素抵抗等指标及肝脏的病理学改变等,探讨葫芦素片对大鼠 NAFLD 的预防作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物 选取健康的雄性 SD 大鼠 36 只,体重 160~190g,鼠龄 4~6 周,按 4 只/笼的密度进行饲养,环境温度控制在 20~26℃,设定明暗周期为 12h (上午 8:00~下午 8:00),先进行 1 周的适应性饲养,早晨定时定量投食,按需饮水,观察大鼠摄食情况的变化。

1.2 试剂与设备 葫芦素片(天津药物研究院药业有限责任公司,批准文号:国药准字 Z12020128,规格:0.1mg×10s×3 板),大鼠胰岛素试剂盒(ELISA 法)(美国 R&D 公司分装 BM-E30093),游离脂肪酸试剂盒(日本和光纯药工业株式会社),全自动生化分析仪(美国贝克曼库尔特有限公司 AU5800)。

1.3 分组与建模方法 将大鼠根据随机数字表法分为 3 组:Ⅰ组(普通饮食组)、Ⅱ组(高脂饮食组)和Ⅲ组(葫芦素片干预组,高脂饮食+葫芦素片),每组 12 只。大鼠在适应性饲养 1 周后开始实验,Ⅰ组给予普通饲料。Ⅱ组给予高脂饲料(普通饲料+100g/kg 猪油+20g/kg 胆固醇^[3],喂养 10 周建立 NAFLD 动物模型)。Ⅲ组给予高脂饲料同时给予葫芦素片灌胃,剂量为 0.1 mg/次(溶于 2ml 氯化钠溶液),2 次/d,Ⅱ组给予等量 0.9%氯化钠溶液灌胃,每天上午 9:00 和下午 3:00 左右灌胃。3 组大鼠喂养 10 周,每周定时称体重 1 次,饲养结束时处死(饲养过程中均无死亡)。

1.4 血清指标、肝重及肝指数测定 所有大鼠处死前夜禁食达到空腹状态,次日测量体重后,予 2%戊巴比妥腹腔麻醉,腹主动脉采血后颈椎脱臼处死,测定血 ALT、AST、TG、胆固醇(CHO)、脂蛋白 a(LPa)、LDL、HDL、游离脂肪酸(FFA)、空腹血糖(FPG)、空腹胰岛素(FINS)、溶血磷脂酰胆碱(LPC)、胞浆型磷脂酶 A2(cPLA2)、分泌型磷脂酶 A2(sPLA2)、钙非依赖性磷脂酶 A2(iPLA2)等指标,计算稳态模型胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)=(FINS×FPG)/22.5,胰岛素敏感指数(IAI)=1/(FINS×FPG)。称取肝脏湿重,计算肝指数,肝指数=肝湿重/体重,取 10g 肝组织液氮速冻后保存于-80℃冰箱待检测肝脂质,取肝右叶中部 10g 肝组织,以 10%甲

醛固定后用于病理学检查或以戊二醛-锇酸固定后用于电镜检查。

1.5 肝脂质测定 按 100g 肝组织:1ml Fovch 溶剂(氯仿:甲醇体积比为 2:1 配制)比例处理后,全自动生化分析仪测定标本 CHO、TG 含量,计算肝脂质,以 mg/g 肝组织表示。

1.6 肝脏病理学检查 病理学诊断参照 2005 年美国国立卫生研究院 NASH 临床研究网病理工作组指南,常规进行 NAFLD 活动度计分的脂肪变性计分(肝实质脂肪变性的范围与评分:<5%为 0 分,5%~33%为 1 分,33%~66%为 2 分,>66%为 3 分)^[4],炎症活动度计分标准则参考 1981 年 Knodell 等^[5]提出的慢性肝炎组织学活动指数(肝门区无炎症为 0 分,肝门区轻度炎症为 1 分,肝门区中度炎症为 3 分,肝门区显著的炎症为 4 分)。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 20.0 统计软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验;非正态分布资料先开平方根转换成正态分布资料,再进行统计分析。计数资料采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组大鼠体重、肝重、肝指数比较 试验结束时,Ⅱ组大鼠体重、肝重、肝指数均高于Ⅰ组,Ⅲ组大鼠肝重、肝指数均高于Ⅰ组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),见表 1。

表 1 3 组大鼠体重、肝重、肝指数比较

组别	<i>n</i>	体重(g)	肝重(g)	肝指数
Ⅰ组	12	466.17 ± 20.98	12.16 ± 0.82	0.026 ± 0.002
Ⅱ组	12	491.86 ± 26.45*	16.92 ± 2.49*	0.034 ± 0.004*
Ⅲ组	12	470.70 ± 29.47	16.24 ± 1.68*	0.035 ± 0.003*

注:与Ⅰ组比较,* $P < 0.05$

2.2 3 组大鼠病理学检查所见比较

2.2.1 肝脏大体改变 3 组大鼠肝脏的颜色、边缘、体积相比有明显差异,Ⅰ组大鼠肝脏呈红褐色,边缘锐利,质地软而富有弹性。Ⅱ组大鼠肝脏体积明显增大,边缘钝而厚,表面光滑,表面及切面均呈黄色,油腻感明显。与Ⅱ组相比,Ⅲ组肝脏的体积略增大,边缘稍钝,表面及切面亦呈黄色,但油腻感不如Ⅱ组,见图 1(插页)。

2.2.2 光镜下肝组织改变 HE 染色下 3 组大鼠的肝细胞形态、肝索、肝窦及汇管区结构及脂肪变性程度均有明显差异,Ⅰ组肝索结构清楚,肝细胞形态正常,汇管区和中央静脉结构清楚,肝血窦内少许炎症细胞浸润。Ⅱ组肝细胞存在弥漫性大泡性脂肪变性,伴有气球样变

性,肝小叶内见到点灶状坏死,灶性炎症细胞浸润,肝血窦受挤压变窄。Ⅲ组肝细胞存在广泛的大泡性脂肪变

性,与Ⅱ组差异不明显,肝小叶内见到散在的炎症细胞浸润,见图 2。

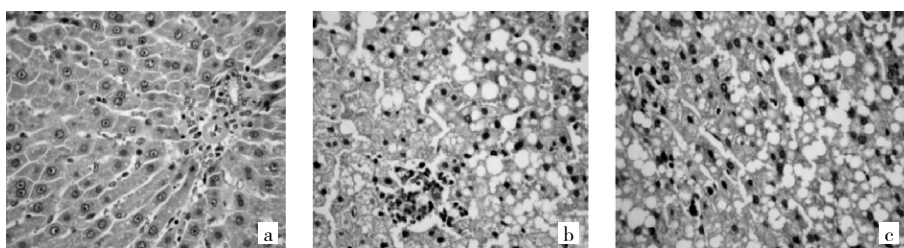


图 2 3 组大鼠光镜下肝组织改变(a: I 组;b: II 组;c: III 组,HE 染色,×200)

2.2.3 电镜下肝组织改变 3 组大鼠肝细胞的线粒体、内质网等细胞器结构变化有明显差异, I 组肝细胞内线粒体、粗面内质网等细胞器结构清楚。Ⅱ组肝细胞内线粒体肿胀明显,线粒体脊结构模糊不清,见到多量脂滴

堆积,内质网肿胀明显,表面颗粒脱落。Ⅲ组肝细胞内线粒体高度肿胀,线粒体脊模糊不清,可见脂滴,内质网肿胀,表面颗粒脱落,与Ⅱ组差异不明显,见图 3。

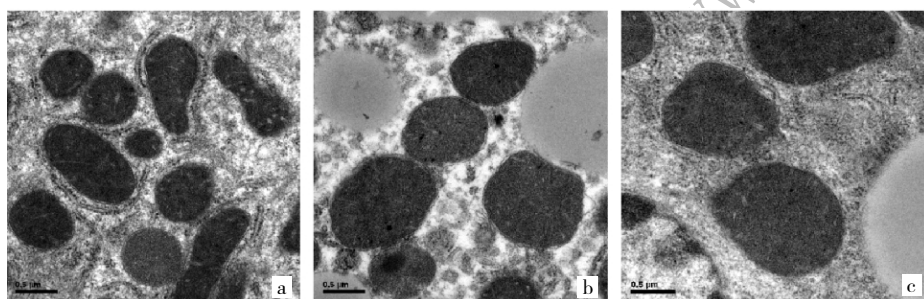


图 3 3 组大鼠电镜下肝组织改变(a: I 组;b: II 组;c: III 组,透射电镜,×40 000)

2.3 3 组大鼠肝功能、血脂等指标的比较 Ⅱ、Ⅲ组 ALT、TG、CHO、LPa、LDL 均高于 I 组,Ⅲ组 ALT 低于Ⅱ组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),见表 2。

2.4 3 组大鼠血糖及胰岛素抵抗指标的比较 Ⅱ、Ⅲ组 FINS 均高于 I 组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),见表 3。

表 2 3 组大鼠血清生化指标的比较

组别	n	ALT(U/L)	AST(U/L)	TG(mmol/L)	CHO(mmol/L)	LPa(mmol/L)	HDL(mmol/L)	LDL(mmol/L)
I 组	12	29.42 ± 6.73	45.43 ± 9.73	0.85 ± 0.19	1.49 ± 0.33	648.42 ± 78.87	1.23 ± 0.29	0.65 ± 0.22
Ⅱ组	12	45.43 ± 9.73*	127.29 ± 18.93	1.22 ± 0.24*	2.00 ± 0.37*	743.86 ± 32.19*	1.12 ± 0.24	1.31 ± 0.35*
Ⅲ组	12	29.90 ± 4.56 [△]	117.40 ± 22.76	1.03 ± 0.23*	2.02 ± 0.46*	724.20 ± 46.49*	1.16 ± 0.24	1.46 ± 0.38*

注:与 I 组比较,* $P<0.05$;与Ⅱ组比较,[△] $P<0.05$

表 3 3 组大鼠血糖及胰岛素抵抗指标的比较

组别	n	FPG(mmol/L)	FINS(mmol/L)	HHOMA-IR	IAI	FPG/FINS
I 组	12	40.89 ± 0.80	16.86 ± 5.35	3.59 ± 0.99	0.013 ± 0.003	0.32 ± 0.12
Ⅱ组	12	5.16 ± 0.74	22.16 ± 5.16*	5.10 ± 1.45	0.009 ± 0.003	0.24 ± 0.06
Ⅲ组	12	5.20 ± 0.94	21.79 ± 5.24*	5.09 ± 1.77	0.010 ± 0.003	0.25 ± 0.07

注:与 I 组比较,* $P<0.05$

2.5 3 组大鼠肝脏脂质、脂肪变性及炎症活动度比较 Ⅱ、Ⅲ组 TG、CHO 均高于 I 组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。Ⅱ、Ⅲ组肝脏脂肪变性程度较 I 组严重,Ⅱ组炎症活动度较 I 组严重,Ⅲ组炎症活动度较Ⅱ组轻,见表 4。

2.6 3 组大鼠 FFA、LPC 及 PLA2 水平比较 Ⅱ、Ⅲ组 FFA、LPC、sPLA2 水平高于 I 组,Ⅲ组 LPC、sPLA2 水平低于Ⅱ组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),各组 cPLA2、iPLA2 水平比较差异均无统计学意义(均 $P>0.05$),见表 5。

表 4 3 组大鼠肝脏脂质、脂肪变性及炎症活动度比较(mg/g)

组别	n	TG	CHO	脂肪变性计分				炎症活动度计分				
				0	1	2	3	0	1	2	3	4
I 组	12	12.03 ± 1.14	1.94 ± 0.12	12	0	0	0	1	5	6	0	0
II 组	12	13.57 ± 0.65*	2.19 ± 0.15*	0	0	1	11	0	0	0	10	2
III 组	12	13.18 ± 1.46*	2.38 ± 0.19*	0	1	2	9	2	4	5	1	0

注:与 I 组比较,* $P < 0.05$

表 5 3 组大鼠血清 FFA、LPC 及 PLA2 水平比较

组别	n	FFA(mEq/L)	LPC(umol/L)	sPLA2(umol/min/l)	cPLA2(umol/min/l)	iPLA2(ng/ml)
I 组	12	0.35 ± 0.07	508.87 ± 96.50	0.098 ± 0.024	0.013 ± 0.004	161.38 ± 53.07
II 组	12	0.57 ± 0.10*	707.26 ± 92.38*	0.130 ± 0.016*	0.012 ± 0.002	157.32 ± 44.49
III 组	12	0.51 ± 0.10*	638.10 ± 91.02* [△]	0.114 ± 0.016* [△]	0.011 ± 0.001	170.88 ± 47.77

注:与 I 组比较,* $P < 0.05$;与 II 组比较,[△] $P < 0.05$

3 讨论

NAFLD 的发病机制尚不明确,是由多种病因引起的脂质在肝细胞内蓄积过多导致的临床病理综合征,不论对成人还是儿童的健康都会造成很大的影响。资料表明近 10 年内 NAFLD 呈现低龄化的趋势,以肥胖儿童更为突出,国内报道肥胖儿童和青少年中 NAFLD 的检出率高达 23.33%~59.57%,明显高于国外,这与近几年肥胖儿童增加、肥胖程度加重都有关^[6]。本研究显示 II 组的大鼠体重和肝重明显超过 I 组,形成并达到肥胖水平,同时该组大鼠肝脂质超过 I 组大鼠,肝细胞脂肪变性严重,形成非酒精性脂肪肝。

NAFLD 的病理改变程度不一,可以从单纯的脂肪变性到非酒精性脂肪性肝炎(NASH),伴或不伴有肝纤维化,最后发展为肝硬化、甚至肝细胞癌。肝活检病理分析是区分单纯脂肪变性和 NASH 最明确的方法,而且可同时进行疾病严重程度分级,但是作为一项有创操作,肝活检并不能被所有 NAFLD 的患儿及家长所接受。ALT 是儿童代谢综合征的一个生化指标,脂肪肝患儿常有该酶水平的升高,年龄 ≥ 10 岁的超重和肥胖儿童 ALT ≥ 80U/L 诊断 NAFLD 灵敏度为 57%,特异度为 71%^[7],故本研究团队有必要对肥胖及超重合并高危因素的患儿常规进行肝功能筛查。葫芦素是一种从葫芦科及其他科属多种植物中提取的苦味苷元成分,具有多种生物活性,可以起到保肝、降酶、退黄的作用。研究表明,葫芦素片能提高血浆 cAMP 水平、调节肝蛋白浓度,增加 cAMP/cGMP 比,改善受损肝细胞的 ALT 异常,促进肝细胞修复闭^[8]。本实验利用高脂饮食构建大鼠 NAFLD 的动物模型,检测大鼠体重、肝重和肝脏的组织病理、血

ALT、AST、FINS、HOMA-IR、IAI、FFA、TG、CHO、LDL、LPa 等,发现经葫芦素片干预能明显降低 NAFLD 大鼠的血清谷丙转氨酶水平,减轻干细胞的炎性病变程度,也能一定程度地降低血清 TG、FFA、LPC、sPLA2 水平,改善胰岛素抵抗。这提示笔者早期给予葫芦素片干预可以降低大鼠的血脂和肝脂质,减轻肝细胞炎性病变程度,对 NAFLD 的发生起到一定的预防作用。

4 参考文献

- [1] 刘燕妮, 张知新. 儿童非酒精性脂肪肝发病机制研究进展[J]. 中日友好医院学报, 2015, 29(4):257-259.DOI:10.3969/j.issn.1001-0025.2015.04.020.
- [2] 傅君芬, 梁黎, 王春林, 等. 葫芦素与维生素 E 对肥胖儿童脂肪肝的干预效果[J]. 浙江预防医学, 2014, 7(6A):49-50.
- [3] 徐正捷, 范建高, 王国良, 等. 高脂饮食致大鼠非酒精性脂肪性肝炎肝纤维化模型[J]. 世界华人消化杂志, 2002, 10: 392-396.DOI:10.3969/j.issn.1009-3079.2002.04.006.
- [4] Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease[J]. Hepatology, 2005, 41:1313-1321.DOI:10.1002/hep.20701.
- [5] Knodell RG, Ishak KG, Black WC, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in a symptomatic chronic active hepatitis[J]. Hepatol, 1981, 1:431-435. DOI:10.1016/s0168-8278(03)00005-9.
- [6] 陆喜燕, 董国庆, 钟丽华, 等. 单纯性肥胖患儿非酒精性脂肪肝病与胰岛素抵抗[J]. 实用儿科临床杂志, 2012, 27(11):859-861. DOI: 10.3969/j.issn.1003-515X.2012.11.020.
- [7] 库尔班江·阿布都西库尔, 王建设. 儿童非酒精性脂肪肝病临床进展[J]. 肝脏, 2016, 21(11):975-977.
- [8] 陈雪华, 郑黎明. 扶正化痰葫芦素片治疗小儿非酒精性脂肪肝肝纤维化临床观察[J]. 临床合理用药, 2014, 6(6A):49-50.

(收稿日期:2018-09-19)

(本文编辑:俞骏文)