

The Protective Effect of *Viola diffusa* Ging on Nonalcoholic Fatty Liver Disease Induced by High-Fat Diet in Rats

Juan Qu^{1*}, Shuanggui Wu^{2*}, Tian Wu¹, Zhihui Liu¹, Mengjiao Liu¹, Xiaofei Huang¹, Chunyan Li^{1#}

¹Medical College of Jishou University, Jishou Hunan

²Traditional Medical Hospital of Xiangxi Autonomous Prefecture, Jishou Hunan
Email: 18797504967@163.com, [#]lchy1965@163.com

Received: Dec. 11th, 2018; accepted: Jan. 2nd, 2019; published: Jan. 9th, 2019

Abstract

AIM: To investigate the protective effect of *Viola diffusa* Ging (VDG) on nonalcoholic fatty liver disease in rats. **METHODS:** 45 adult male rats, weighing 180-200 grams, were randomly divided into three groups after adaptability keeping five days. The normal group fed with basic animal feeds; fatty liver model group fed with high fat diet. VDG group fed with high fat diet + Kiwi Essence; the body weight, liver index, the serum TG, TC, ALT, AST and hepatic TG, TC, MDA, SOD, GSH-Px were detected, and the histological changes in liver (H.E. staining and oil red staining) were evaluated. **RESULTS:** Compared with the control group, the liver index ($3.73\% \pm 0.19\%$), the serum TG (4.97 ± 0.55 mmol/L), TC (6.65 ± 0.23 mmol/L), ALT (79.36 ± 22.61 U/L), AST (177.36 ± 22.15), hepatic MDA (13.48 ± 2.32 U/mg pro) of the model group were markedly higher ($P < 0.01$), the hepatic SOD (96.82 ± 20.09 U/mg pro) and the hepatic GSH-PX (42.53 ± 9.97 U/mg pro) were significantly lower ($P < 0.01$). Compared with the model group, the liver index, the serum TG, TC ALT, AST, hepatic MDA of the Kiwi Essence middle-dose and high-dose group were markedly lower ($P < 0.01$); the hepatic SOD and the hepatic GSH-PX were significantly higher ($P < 0.01$). Liver pathology showed: Normal group were not unusual; liver steatosis of fatty liver model group was more serious and with infiltration of inflammatory cells and necrosis; liver steatosis of the VDG group was lighter. **CONCLUSION:** VDG has a protective effect on fatty liver of rat.

Keywords

Viola diffusa Ging, Rat, Nonalcoholic Fatty Liver Disease

*并列第一作者。

#通讯作者。

黄瓜香对高脂饲料诱导的大鼠非酒精性脂肪肝保护作用研究

瞿娟^{1*}, 吴双贵^{2*}, 吴甜¹, 刘智慧¹, 刘梦姣¹, 黄小飞¹, 李春艳^{1#}

¹吉首大学医学院, 湖南 吉首

²湘西自治州民族中医院, 湖南 吉首

Email: 18797504967@163.com, [#]lchy1965@163.com

收稿日期: 2018年12月11日; 录用日期: 2019年1月2日; 发布日期: 2019年1月9日

摘要

目的: 研究高脂饲料诱导大鼠非酒精性脂肪肝模型及黄瓜香提取物的保护作用(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD), 并初步探讨其相关作用机制。方法: 健康雄性大鼠45只, 随机分为3组: 对照组、模型组和黄瓜香提取物组(7.5 g·kg⁻¹·d⁻¹), 除对照组用普通饲料喂养外, 其余各组均给予高脂饲料喂养。实验10周后处死全部大鼠, 比较各组之间血清和肝脏生化以及肝脏组织病理学特征的差异。结果: 与对照组相比, 模型组大鼠血清甘油三酯(TG)、胆固醇(TC)、血清丙氨酸转氨酶(ALT)、门冬氨酸转氨酶(AST)含量和肝组织丙二醛(MDA)含量显著升高($P < 0.01$), 肝组织超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)含量显著降低($P < 0.01$); 黄瓜香提取物组大鼠血清TC、TG、ALT、AST和肝组织MDA含量显著低于模型组($P < 0.05$), 肝组织SOD和GSH-Px的含量显著高于对照组($P < 0.01$); 模型组大鼠肝脏脂肪变性严重, 并伴有炎细胞浸润及坏死; 黄瓜香提取物组大鼠肝脏脂肪变性程度轻, 无明显炎细胞浸润及坏死。结论: 黄瓜香提取物对高脂饲料诱导的大鼠非酒精性脂肪肝有明显的保护作用。

关键词

黄瓜香, 大鼠, 非酒精性脂肪肝病

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

湘西土家族民间广泛使用的药物黄瓜香(*Viola diffusa* Ging, VDG), 团队前期的研究实验数据已表明其对四氯化碳诱导的急性大鼠肝脏损害, 显示了一定的保护作用。主要机理与降低脂质的过氧化, 淬灭自由基相关联[1][2]。基于团队对黄瓜香的前期研究结果, 本次进行进一步的实验, 探讨黄瓜香对采用高脂饲料诱导的非酒精性脂肪肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)大鼠模型的保护作用及其初步的作用机理, 为民间黄瓜香的有效合理利用开发, 提供理论指导和实验数据基础。

2. 材料与方法

2.1. 实验主要试剂和仪器

黄瓜香全草入药, 主要采自湖南湘西吉首地区, 由吉首大学民族医药研究室专家提供鉴定。胆固醇(天

津光复精细化工研究所生产批号: 20051010), 胆酸钠(武汉凯通精细化工有限公司), 试剂盒 TG、TC (温州东瓯津玛生物科技有限公司生产批号: 20080022), 试剂盒 SOD、MDA、GSH-P_x、AST、ALT 等(南京建成生物工程研究所生产批号: 20090311), BCA 蛋白定量试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司生产批号: 02/2010), 医用 95%的乙醇; 自制之猪油。

可见紫外分光光度计(UV-3 系列, 上海美谱达仪器有限公司), 医学图像分析系统(BX51 奥林巴斯(OLYMPUS)销售服务有限公司)。

2.2. 大鼠模型制备及分组

Wistar 清洁级大鼠, 45 只雄性, 质量(180 ± 20) g, 由中南大学实验动物学部提供。普通饲料喂养 5 天后, 随机分为 3 组, 即对照组、模型组和药物黄瓜香提取物组, 每组各 15 只。对照组继续普通饲料喂养, 模型组和黄瓜香提取物组均给予高脂饲料(猪油 15%、胆固醇 2.8%、胆酸钠 0. %、普通饲料 81.8%) 喂养。黄瓜香药物组同时给予前期实验已确定的浓度为 0.75 g/ml 黄瓜香水提取物进行预防治疗, 对照组及模型组均给予等量生理盐水灌胃, 试验期间大鼠自由进食和饮水, 饮用自来水, 灌胃剂量 1 mL/100 g 只, 每日 1 次。10 周后, 最后一次操作后全部大鼠禁食但不禁水 24 小时后, 处死大鼠并取材。腹主动脉采血, 静置, 3500 r/min 离心 15 分钟, 分离血清, 4℃冷藏备用。取同一部位大鼠肝脏 1.0 g 制备 10%肝匀浆液备用; 剖取相同部位的肝脏, 采用 10%甲醛固定, 石蜡包埋切片, 常规 HE 染色, 光镜下检测大鼠肝脏病理变化情况。

2.3. 测定大鼠体重和肝脏指数

大鼠于实验开始前称重, 处死大鼠前再次称重并记录。大鼠取材称肝脏湿重, 计算肝指数(肝指数 = 肝湿重/体重 × 100%)。

2.4. 血清及肝脏组织指标检测

检测血清中的 TG、ALT、AST、TC; 配制的大鼠 10%肝匀浆液进行 TC、SOD、TG、MDA、GSH-P_x 检测。同时所有实验操作均按照试剂盒说明书严格进行操作, 双蒸水调零后, 于 490 nm 波长处测定吸光度值并制定绘制标准曲线, 依据标准曲线方程计算样品值。

2.5. 肝脏病理组织检测

HE 常规染色, 光学显微镜下观察肝组织的脂肪变性情况, 每张切片随机拍摄 2 个视野的图像即低倍镜(10 × 10)和高倍镜(10 × 400), 根据非酒精性脂肪性肝病诊疗指南[3] F0~F4 分级标准, 检测并判断大鼠肝组织的脂肪变性程度。

2.6. 统计方法

采用 spss11.5 软件进行统计学分析, 计量资料使用 $\bar{x} \pm S$ 表达, 两组间采用两独立样本的 *t* 检验; 等级资料使用秩和检验。P < 0.05 组间的差异表示具有统计学意义。

3. 结果

3.1. 黄瓜香提取物对大鼠体重、肝指数变化的影响

模型组的大鼠与对照组比较, 体重增加, 肝指数明显增高(P < 0.01)。黄瓜香药物组的大鼠体重有所降低, 明显升高的肝指数有一定的降低, 比较模型组, 差异有显著性意义(P < 0.01)。见表 1。实验过程中, 模型组的大鼠在第 3 周死亡 2 只, 第 6 周死亡 1 只, 黄瓜香提取物组的大鼠在给药第 1 周死亡 2 只, 第

1 周和第 3 周对照组分别意外死亡 1 只。

Table 1. Diversification of body weight and liver index of rats in each group ($\bar{x} \pm S$)

表 1. 各组大鼠体重、肝指数的变化($\bar{x} \pm S$)

组别	n	体重(g)		肝湿重(g)	肝指数(%)
		实验前	第 10 周		
对照组	13	204.11 ± 12.12	315.25 ± 28.16	8.96 ± 0.18	2.86 ± 0.06
模型组	12	203.52 ± 12.82	387.22 ± 36.47	14.38 ± 0.19	3.73 ± 0.19*
黄瓜香提取物组	13	200.83 ± 10.63	270.43 ± 29.67	6.71 ± 0.15	2.51 ± 0.17 [▲]

注: 与对照组比, * $P < 0.01$; 与模型组比, [▲] $P < 0.01$ 。

3.2. 黄瓜香提取物对大鼠血清 TG、TC、ALT、AST 含量的影响

表 2 显示, 大鼠模型组的血清 TG、TC、ALT、AST 含量明显比对照组高($P < 0.01$), 大鼠黄瓜香提取物组血清 TG、TC、ALT、AST 含量明显比模型组要低($P < 0.01$)。

Table 2. The effect of the VDG on the serum TG, TC, ALT, AST in rats ($\bar{x} \pm S$)

表 2. 黄瓜香提取物对大鼠血清 TG、TC、ALT、AST 含量的影响($\bar{x} \pm S$)

组别	n	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)
对照组	13	2.43 ± 0.65	3.41 ± 0.41	48.47 ± 17.23	80.45 ± 16.61
模型组	12	4.97 ± 0.55*	6.65 ± 0.23*	79.36 ± 22.61*	177.36 ± 22.15*
黄瓜香提取物组	13	2.62 ± 0.78 [▲]	3.85 ± 0.31 [▲]	58.73 ± 20.62 [▲]	115.36 ± 23.36 [▲]

注: 与对照组比, * $P < 0.01$, 与模型组比, [▲] $P < 0.01$ 。

3.3. 黄瓜香提取物对大鼠肝组织 TG、TC、SOD、MDA、GSH-P_x 含量的影响

从表 3 得知, 大鼠模型组的肝组织中 TG、TC 的含量明显比对照组高($P < 0.01$), 黄瓜香提取物组的肝组织中 TG、TC 的含量明显比模型组要低($P < 0.05$); 大鼠模型组的肝组织中 SOD、GSH-P_x 含量明显低于对照组($P < 0.01$), MDA 含量则显著高于对照组($P < 0.01$); 黄瓜香提取物组的大鼠肝组织中 SOD、GSH-P_x 含量明显比模型组高($P < 0.05$), MDA 含量明显比模型组要低($P < 0.05$)。

Table 3. The effect of the VDG on the hepatic tissue TG, TC, SOD, MDA, GSH-PX in rats ($\bar{x} \pm S$)

表 3. 黄瓜香提取物对大鼠肝组织 TG、TC、SOD、MDA、GSH-PX 含量的影响($\bar{x} \pm S$)

组别	n	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	SOD (U/mg-pro)	MDA (U/mg-pro)	GSH-P _x (U/mg-pro)
对照组	10	2.38 ± 0.34	2.66 ± 0.28	146.36 ± 21.87	4.38 ± 0.57	73.35 ± 11.52
模型组	8	3.88 ± 0.45*	4.15 ± 0.33*	96.82 ± 20.09*	13.48 ± 2.32*	42.53 ± 9.97*
黄瓜香提取物组	9	2.52 ± 0.73 [▲]	3.13 ± 0.52 [▲]	119.97 ± 19.19 [▲]	7.41 ± 1.01 [▲]	57.89 ± 12.04 [▲]

注: 与对照组比, * $P < 0.01$, 与模型组比, [▲] $P < 0.05$ 。

3.4. 黄瓜香对大鼠肝组织病理变化的影响

大鼠对照组肝脏无异常, 肝小叶轮廓清晰可辨, 肝索比较规则且围绕中心静脉放射状排列, 汇管区未见炎性细胞浸润; 大鼠模型组显示, 肝索排列出现紊乱, 有弥漫性不同程度的脂肪变性, 炎性细胞大

量浸润；大鼠黄瓜香提取物组肝细胞脂肪变性较轻，肝板排列完好汇管区的血管扩张充血，炎细胞浸润及坏死不明显(图 1~3)。各组大鼠肝组织脂肪变性程度[3]见表 4。

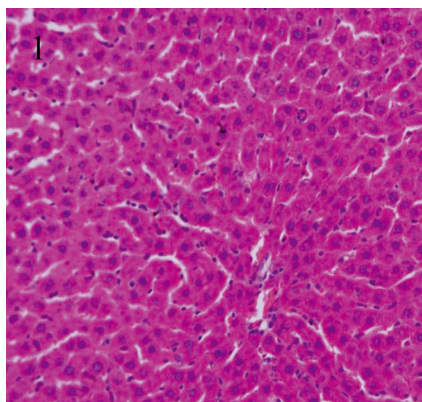


Figure 1. Contrast group, H.E. staining ($\times 200$), the structure of cell is normal and hepatic cords around central vein in radiating outward

图 1. 对照组, HE 染色($\times 200$), 肝索围绕中央静脉呈放射排列, 细胞形态正常

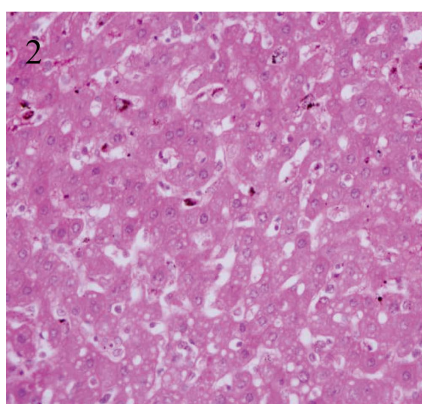


Figure 2. Model group, H.E. staining ($\times 200$), Around hepatocytes which in an irregular shape inflammatory cell infiltration is evident and cytoplasm contains lipid droplets scattered throughout

图 2. 模型组, HE 染色($\times 200$), 肝细胞形态不规则, 胞浆内有脂滴散状分布, 并出现大量炎症细胞浸润

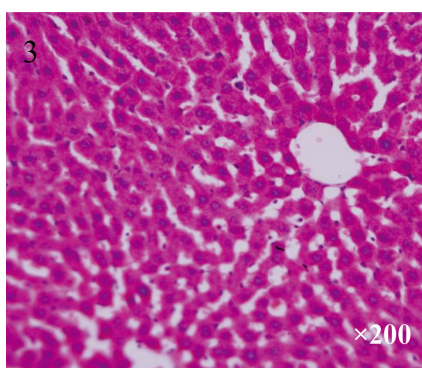


Figure 3. VDG group, H.E. staining ($\times 200$), the degree of hepatocyte steatosis is light and hepatic plate arranged well

图 3. 黄瓜香组, HE 常规染色($\times 200$), 肝细胞脂肪变性较轻, 肝板排列完好

Table 4. Compared to the degree of hepatocyte steatosis in all trail groups**表 4.** 各组大鼠肝组织脂肪变性程度比较

组别	n	脂肪变性程度分级					与模型组比较
		F0	F1	F2	F3	F4	
对照组	13	12	1	0	0	0	$P < 0.01$
模型组	12	0	1	2	7	2	
黄瓜香提取物组	13	6	2	4	1	0	$P < 0.05$

注: F0 代表肝小叶内含脂滴细胞数/总细胞数比值为 0, F1、F2、F3、F4 分别代表比值为 $<1/3$ 、 $1/3\sim 2/3$ 、 $>2/3$ 、 ≈ 1 。

4. 讨论

NAFLD 是指除酒精外和其他无明确的损肝因素等所致的一种多病因导致的以肝细胞脂肪变性和脂质贮积为特征的临床病理综合征, 是世界上很多国家的第一大慢性肝病[4] [5]。本次研究结果显示, 大鼠黄瓜香药物组的血清和肝脏中的 TC、TG 的含量比模型组均明显降低, 血清中 ALT、AST 活性也明显降低, 提示黄瓜香提取物有调节脂肪代谢, 减少脂质在肝内沉积的作用, 并能阻止由高脂饲料诱导的大鼠 NAFLD 形成, 显示了较强的对肝损伤改善效应。同时, 肝组织病理变化结果表明大鼠黄瓜香组的肝组织脂肪变性程度, 相比模型组也有明显地减轻, 表明黄瓜香提对高脂饲料诱导的大鼠非酒精性脂肪肝有一定的保护作用。同时相比模型组, 大鼠黄瓜香组的肝组织中 SOD、GSH-P_x、MDA 含量有显著性差异($P < 0.05$), 因此可推测黄瓜香发挥保护作用的机制之一可能是通过调节 SOD 等抗氧化酶的活性完成的。

5. 结论

实验结果表明, 黄瓜香提取物显著的调节血脂作用和抗过氧化作用及抑制氧化应激等, 能降低肝脂质代谢障碍引起的肝损伤, 从而有效地起到很好的保护肝脏的作用, 同时也阐明了黄瓜香提取物对高脂饲料诱导的大鼠非酒精性脂肪肝有明显的保护作用。为临床应用提供有效的实验基础。

基金项目

吉首大学医学研究平台(JDYXCX201610); 吉首大学科技处 Jdx16013。

参考文献

- [1] 李先辉, 李春艳, 吕江明, 等. 黄瓜香水提物体外抗氧化活性实验[J]. 吉首大学学报, 2006, 27(5): 95-97.
- [2] 李春艳, 李先辉. 黄瓜香水提物对大鼠肝纤维化拮抗作用[J]. 中国公共卫生, 2010, 5(26): 546-547.
- [3] 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南[J]. 中华肝脏病杂志, 2006, 14(3): 161-163.
- [4] Portincasa, P., Grattagliano, I., Palmieri, V.O., et al. (2006) Current Pharmacological Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver. *Current Medicinal Chemistry*, **13**, 2889-2900. <https://doi.org/10.2174/092986706778521878>
- [5] 向志钢, 李先辉, 刘锋, 等. 猕猴桃果仁油对小鼠非酒精性脂肪性肝病的作用[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 17(34): 3491-3496.

知网检索的两种方式：

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2161-8712，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：acm@hanspub.org