

Effects of Quzhi Sanwei Fang on Liver Function and Serum Lipid in Mice with Nonalcoholic Fatty Liver Disease

Tingting Shen¹, Fan Yue², Ce Zheng¹, Lanfeng Xie¹, Qin Zhang^{1*}

¹Infectious Disease Department, Tongren Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai

²Hepatic Oncology Department, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai

Email: *zhangq1030@163.com

Received: Jul. 7th, 2017; accepted: Jul. 21st, 2017; published: Jul. 28th, 2017

Abstract

Objective: To investigate the effect of Quzhi sanwei fang on liver function and serum lipid in mice with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Method:** C57 mice were randomly divided into normal control group (NC, $n = 8$), model control group (MD, $n = 8$) and Quzhi sanwei fang group (QZSWF, $n = 21$), the NC group was fed with a normal diet, while the others were fed with high fat diet for 14 weeks to duplicate the model of NAFLD. The QZSWF group was fed QZSWF at the dose of 16 g/Kg/d on the first day of modeling, the rest were given the same volume of saline, and all treatments were kept 14 weeks. The changes of body weight, liver index, liver HE stain, and serum concentrations of ALT, AST, TC, TG, HDL and LDL were observed at the end of the experiment. **Results:** (1) Compared with the NC group, the body weight of the MD group increased significantly ($P < 0.01$) while liver index decreased significantly ($P < 0.01$), compared with the MD group, QZSWF group significantly decreased ($P < 0.05$), but the liver index did not change significantly. (2) In the model group, diffuse microvesicular steatosis, a few macrovesicular steatosis and significant steatosis of hepatocytes were found in liver cells, while only a few microvesicular steatosis exist in the hepatocytes of QZSWF group. (3) Compared with the NC group, the serum concentrations of ALT and AST of MD group rats were significantly higher ($P < 0.01$ and $P < 0.05$), but the QZSWF group rats were significantly lower than MD group rats ($P < 0.01$, $P < 0.01$). (4) Compared with the NC group, the serum content of TC in MD group rats was significantly increased ($P < 0.05$), while QZSWF group decreased significantly compared with the MD group ($P < 0.05$). **Conclusion:** QZSWF effectively alleviates steatosis of NAFLD mouse hepatocytes prophylactically, also with significant effects on protecting hepatocytes, lowering transaminase and reducing blood fat.

Keywords

QZSWF, NAFLD, Liver Function, Serum Lipid

*通讯作者。

祛脂三味方对非酒精性脂肪肝小鼠肝功能和血脂的影响

沈婷婷¹, 乐凡², 郑册¹, 谢兰丰¹, 张琴^{1*}

¹上海交通大学医学院附属上海市同仁医院感染科, 上海

²复旦大学附属中山医院肝肿瘤内科, 上海

Email: *zhangq1030@163.com

收稿日期: 2017年7月7日; 录用日期: 2017年7月21日; 发布日期: 2017年7月28日

摘要

目的: 观察祛脂三味方对非酒精性脂肪肝小鼠肝功能和血脂的影响。方法: C57小鼠随机分为正常对照组8只、模型对照组8只和祛脂三味方组21只, 正常对照组给予正常饲料, 其余给予高脂饲料14周复制非酒精性脂肪肝模型; 祛脂三味方组在造模第一天开始按照16 g/Kg灌胃祛脂三味方, 每天一次, 共计14周, 其余给予同体积生理盐水。实验结束观察各组小鼠体重、肝脏指数、肝脏HE以及血清ALT, AST, TC, TG, HDL, LDL含量的变化。结果: (1) 与正常组相比, 模型组体重显著升高($P < 0.01$)而肝脏指数显著下降($P < 0.01$), 与模型组相比较, 祛脂三味方组体重显著下降($P < 0.05$), 但肝脏指数变化不明显; (2) 模型组肝脏细胞内可见弥漫性小泡和散在的大泡, 肝细胞脂肪变明显; 与模型组相比较, 祛脂三味方组未见大泡, 肝细胞内仅少量小泡可见; (3) 与正常组相比, 模型组大鼠ALT和AST显著升高($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$), 与模型组相比较, 祛脂三味方组ALT和AST则显著降低($P < 0.01$, $P < 0.01$); (4) 与正常组相比, 模型组大鼠血清中TC含量明显升高($P < 0.05$), TG和HDL有一定程度升高, 但无统计学差异; LDL稍微下降, 但无统计学差异; 相比模型组, 祛脂三味方组大鼠血清TC含量显著下降($P < 0.05$), TG, HDL和LDL略有下降, 但无统计学意义。结论: 祛脂三味方预防性给药能减轻非酒精性脂肪肝小鼠肝细胞脂肪变, 具有显著的保肝降酶和降血脂作用。

关键词

祛脂三味方, 非酒精性脂肪肝, 肝功能, 血脂

Copyright © 2017 by authors 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

非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)是一种与胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)和遗传易感密切相关的代谢应激性肝脏损伤, 其病理学改变为肝实质细胞脂肪变性和脂肪贮积, 但患者无过量饮酒史。疾病谱包括非酒精性单纯性脂肪肝(nonalcoholic simple fatty liver, NAFL)、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)及其相关肝硬化和肝细胞癌[1]。治疗 NAFLD 的首要目标为改善 IR, 防治代谢综合征及其相关终末期器官病变; 次要

目标为减少肝脏脂肪沉积并避免因二次打击”而导致 NASH 和肝功能失代偿[1]。祛脂三味方(QZSWF)是根据中医对非酒精性脂肪肝的认识,拟定的治疗非酒精性脂肪肝的方药,临床验证其对脂肪肝确有疗效,实验研究也显示出良好的抗脂肪肝作用,现将部分实验研究报道如下。

2. 实验动物

C57 小鼠 37 只, SPF 级, 雄性, 6~8 周龄, 购于上海必凯实验动物有限公司, 饲养于中国科学院上海药物研究所安评中心动物房, 温度 $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 湿度 40%~70%, 自由饮食饮水。动物实验方案经实验动物伦理委员会审批, 符合动物福利和伦理原则, IACUC 号: 2015-10-PGY-11。

3. 实验饲料及药物

3.1. 饲料

60%高脂饲料(内含 0.2%胆固醇)及对照饲料购买于南通特洛菲饲料科技有限公司。

3.2. 药物

祛脂三味方颗粒剂, 由上海方心制药公司提供(配方: 颗粒剂制备: 将生山楂 30 g, 决明子 30 g, 虎杖 20 g。按处方去三味药材, 加水煎煮两次, 第一次加水 10 倍量, 煎煮 2 小时, 第二次加水 8 倍量, 煎煮 1 小时。虑取两次煎液, 合并, 浓缩至相对密度 1.10 (80°C), 放冷, 边搅拌边加入乙醇至乙醇浓度为 60%, 静置 12 小时, 取上清液, 浓缩至密度为 1.35 左右, 60°C 低温真空干燥。浸膏粉碎成细粉, 加适量糊精, 制成颗粒。批号 20160102)。

4. 动物处理

4.1. 分组和造模

小鼠适应性喂养 1 周, 按体重区组随机分为对照组 8 只, 模型组 8 只和祛脂三味方组 21 只, 对照组饲喂对照饲料, 其余喂养 60%高脂饲料(内含 0.2%胆固醇)诱导非酒精性脂肪肝模型, 共计 14 周, 所有小鼠均自由饮食饮水。

4.2. 给药

祛脂三味方组从造模第一天开始按 10 mL/Kg 灌胃祛脂三味方, 每天一次, 共计 14 周; 对照组和模型组灌胃等体积蒸馏水。

4.3. 动物处理和标本收集

处理前动物禁食不禁水过夜, 记录体重, 最后一次给药 1 h 后异氟烷麻醉 1 min, 摘眼球取血, 收集血清(室温静置 20 min, 5000 rpm/min 在 4°C 离心 10 min, 收集上清 -80°C 保存); 取血后立即脱颈处死小鼠, 解剖取肝脏称重, 取大叶一半中性福尔马林固定, 一半 OCT 包埋, 中叶 1.5 mL EP 管装, 液氮速冻后转入 -80°C 保存。

5. 指标检测

5.1. 体重, 肝指数

记录处死前各组动物体重和处死后各组动物肝脏湿重, 并计算肝脏指数(肝脏指数 = 肝脏湿重/体重 $\times 100\%$)。

5.2. HE 染色实验

按照常规 HE 染色对中性福尔马林固定的肝脏标本做 HE 染色：脱水，包埋，4 μm 切片，烘片(71 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤 2 h)，脱蜡水化(二甲苯 I 5 min，二甲苯 II 5 min，无水乙醇 I 5 min，无水乙醇 II 3 min，95% 乙醇 2 min，85% 乙醇 2 min，75% 乙醇 2 min，蒸馏水 2 min)，苏木素染色 15 min，蒸馏水洗 5 min，1% 盐酸酒精分化 30 s，自来水返蓝 10 min，伊红染色 3 s，95% 乙醇 2 min，无水乙醇 2 min，二甲苯 2 min，中性树胶封片，光学显微镜下观察。

5.3. 血清 ALT 和 AST

生化自动检测仪测定血清中 ALT，AST。

5.4. 血脂

生化自动检测仪测定血清中 TG，TC，HDL，LDL。

6. 统计方法

数据分析使用 SPSS 21.0，符合正态分布，方差相齐的使用 $\bar{X} \pm s$ 表示，One-Way ANOVA 进行方差分析，两两比较使用 LSD 检验；数据不符合正态分布则用中位数和四分位差表示，使用非参数检验 (Kruskal-Wallis 检验)。

7. 结果

7.1. 祛脂三味方对 NAFLD 小鼠体重和肝脏指数的影响

与对照组相比，模型组体重显著升高($P < 0.01$)而肝脏指数显著下降($P < 0.01$)；与模型组相比较，祛脂三味方组体重显著下降($P < 0.05$)但肝脏指数变化不明显，如表 1 和图 1。

7.2. 祛脂三味方对 NAFLD 小鼠肝脏 HE 病理染色的影响

对照组肝细胞排列整齐，核大而圆，位于细胞中央；模型组肝细胞内可见弥漫性小泡和散在的大泡，肝细胞脂肪变明显；与模型组相比较，祛脂三味方组未见大泡，肝细胞内仅少量小泡可见，如图 2。

7.3. 祛脂三味方对 NAFLD 小鼠血清 ALT 和 AST 的影响

与对照组相比，模型组大鼠 ALT 和 AST 显著升高($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$)，与模型组相比较，祛脂三味方组 ALT 和 AST 则显著降低($P < 0.01$, $P < 0.01$)，如表 2 和图 3。

7.4. 祛脂三味方对 NAFLD 小鼠血脂的影响

与对照组相比，模型组大鼠血清中 TC 含量明显升高($P < 0.05$)，TG 和 HDL 有一定程度升高，但无

Table 1. The effect of QZSWF on body weight and liver index in mice ($\bar{X} \pm s$)

表 1. 祛脂三味方对 NAFLD 小鼠体重和肝脏指数的影响($\bar{X} \pm s$)

组别	N	体重(g)	肝脏指数(%)
对照组	8	24.4 \pm 0.9188	3.6325 \pm 0.18765
模型组	8	34.0 \pm 2.1247 $\Delta\Delta$	3.1084 \pm 0.21830 $\Delta\Delta$
祛脂三味方组	21	30.854 \pm 3.0243*	3.2550 \pm 0.19947

注：与对照组相比较， $\Delta P < 0.05$ ， $\Delta\Delta P < 0.01$ ；与模型组相比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

统计学差异；LDL 稍微下降，但无统计学差异；相比模型组，祛脂三味方组大鼠血清 TC 含量显著下降 ($P < 0.05$)，TG, HDL 和 LDL 略有下降，但无统计学意义(见表 3, 表 4, 图 4)。

8. 讨论

非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)是一种与胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)和遗传易感密切相关的代谢应激性肝脏损伤，患者无过量饮酒史。疾病谱包括非酒精性单纯性脂肪肝(nonalcoholic simple fatty liver, NAFL)、

Table 2. The effect of QZSWF on ALT and AST in mice with NAFLD ($\bar{X} \pm s$)

表 2. 祛脂三味方对 NAFLD 小鼠血清 ALT 和 AST 水平的影响($\bar{X} \pm s$)

组别	ALT (U/L)	AST (U/L)
对照组	21.1375 ± 3.18476	109.3750 ± 20.55409
模型组	32.2250 ± 3.20167 $\Delta\Delta$	129.0875 ± 23.40357 Δ
祛脂三味方组	24.9471 ± 4.00564**	105.3476 ± 16.28913**

注：与对照组相比较， $\Delta P < 0.05$ ， $\Delta\Delta P < 0.01$ ；与模型组相比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

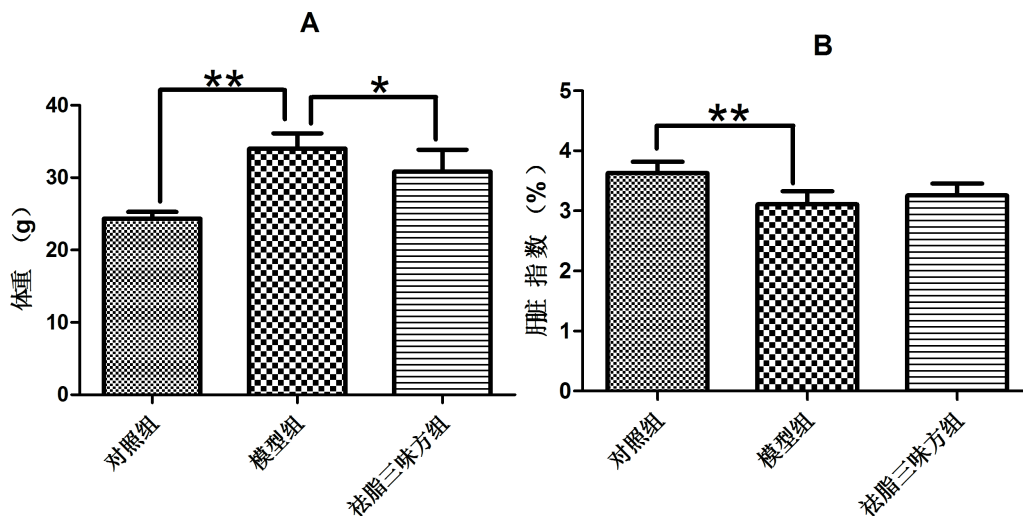


Figure 1. The effect of QZSWF on body weight and liver index in mice with NAFLD

图 1. 祛脂三味方对 NAFLD 小鼠体重和肝脏指数的影响

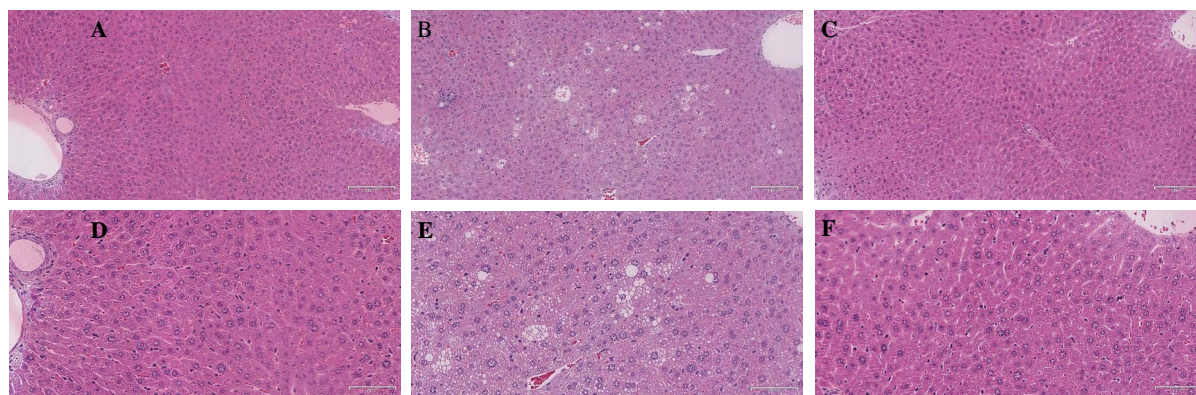


Figure 2. The effect of QZSWF on liver histopathology in mice with NAFLD

图 2. 祛脂三味方对 NAFLD 小鼠肝脏病理的影响

Table 3. The effect of QZSWF on serum lipid in mice with NAFLD ($\bar{X} \pm s$)

表 3. 祛脂三味方对 NAFLD 小鼠血脂的影响($\bar{X} \pm s$)

组别	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)
对照组	3.9075 ± 0.37515	1.2375 ± 0.25319
模型组	4.6463 ± 0.57224△	1.3188 ± 0.22668
祛脂三味方组	4.0910 ± 0.53186*	1.0714 ± 0.19973

注: 与正常组相比较, $\Delta P < 0.05$; 与模型组相比较, $*P < 0.05$ 。

Table 4. The effect of QZSWF on serum lipid in mice with NAFLD

表 4. 祛脂三味方对 NAFLD 小鼠血脂的影响

组别	HDL (mmol/L)				LDL (mmol/L)			
	中位数	4 分位差	平均秩	P 值	中位数	4 分位差	平均秩	P 值
对照组	3.7500	0.65	13.44		0.4250	0.20	20.75	
模型组	4.4500	1.05	22.20	0.115	0.3500	0.15	14.60	0.066
祛脂三味方组	3.6500	1.81	13.53		0.3250	0.20	12.25	

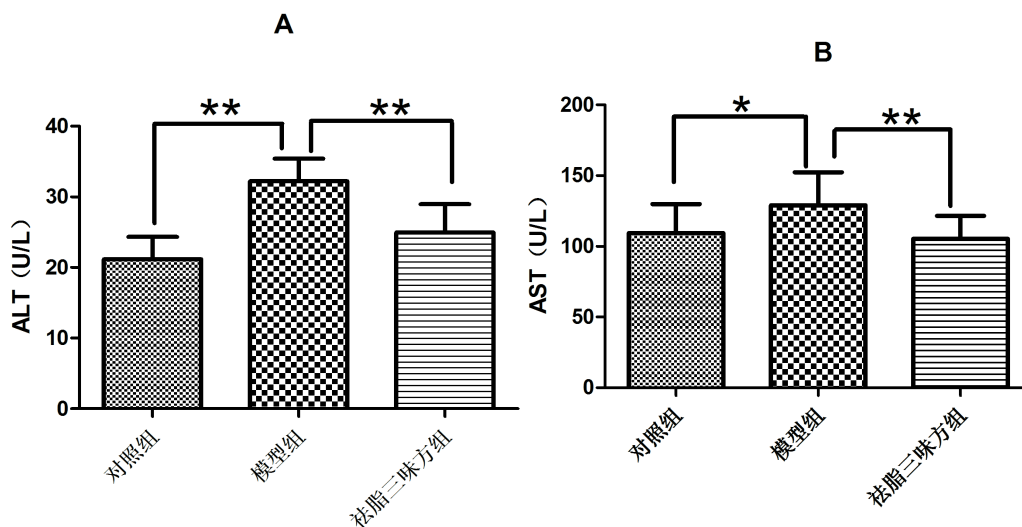
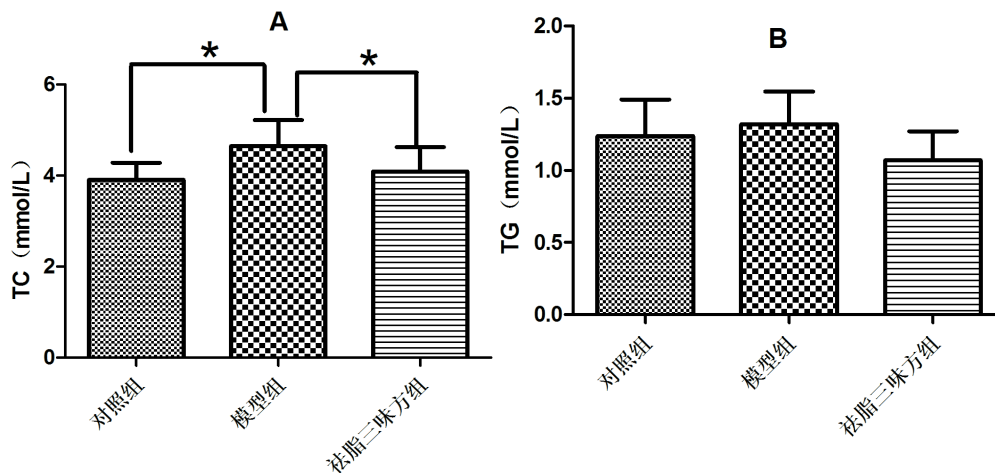


Figure 3. The effect of QZSWF on ALT and AST in mice with NAFLD

图 3. 祛脂三味方对 NAFLD 小鼠血清 ALT 和 AST 水平的影响



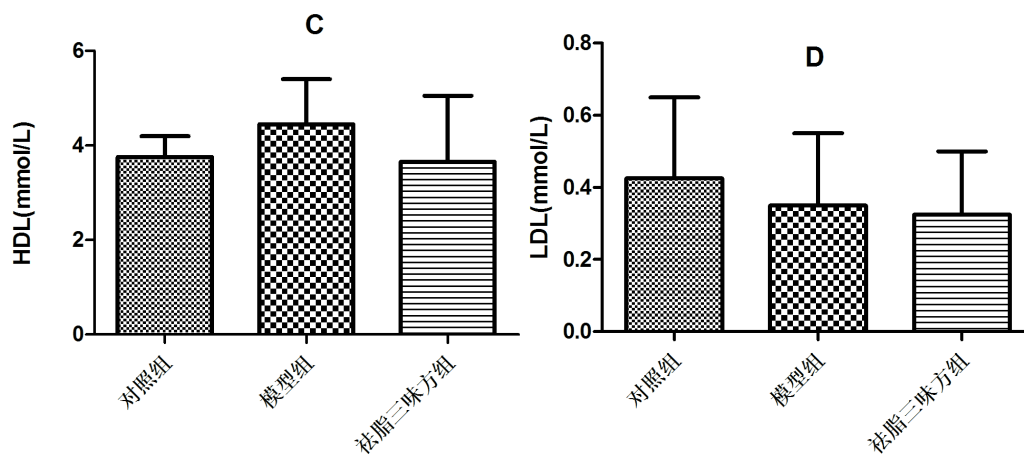


Figure 4. The effect of QZSWF on serum lipid in mice with NAFLD
图 4. 祛脂三味方对 NAFLD 小鼠血脂的影响

非酒精性脂肪性肝炎(NASH)及其相关肝硬化和肝细胞癌[1]。NAFLD 的危险因素包括：高脂肪高热量膳食结构、多坐少动的生活方式，IR、代谢综合征及其组分(肥胖、高血压、血脂紊乱和 2 型糖尿病)。中医认为非酒精性脂肪肝的病机是土壅木郁，病因为长期过食肥甘厚味，化为湿热蕴结中焦，伤及脾胃致脾胃运化功能失常，水谷精微不能转输，化为湿浊，膏脂堆积，阻滞气机，气机升降失调，影响肝之疏泄功能，成土壅木郁之证[2]。

祛脂三味方由生山楂、决明子、虎杖三味药组成，山楂酸，甘，微温，归脾、胃、肝经，有消食化积，行气散瘀之力；决明子甘，苦，微寒，归肝、大肠经，擅清肝明目，润肠通便；虎杖苦，寒，归肝、胆、肺经，专清热利湿、活血化瘀。三药合用以消食导滞，清利湿热，活血化瘀，通导肠腑，共奏“消土壅”而“解木郁”之效。现代研究表明山楂中的总黄酮[3]、决明子总蒽醌[4]、以及虎杖中的虎杖苷和大黄素[5] [6]均对脂肪肝有干预作用，本次实验中观察到高脂饲料喂养的模型小鼠体重明显升高，肝细胞内可见弥漫性脂肪泡和散在的脂肪大泡，血清 ALT，AST，TC 升高，祛脂三味方采用预防性给药能明显干预上述指标的异常发展，尤其在改善肝细胞内脂肪储积方面效果显著。祛脂三味方有明显的抗脂肪肝、保肝降酶和降血脂作用。

前期实验观察到祛脂三味方有降低脂肪肝大鼠血清 LDL 的作用[7]，遗憾的是在本实验中并未观察到，其原因大概如下：(1) 实验用饲料质量参差不齐，在模型动物中表现不一；(2) 实验周期偏短，未能充分暴露所有病理性改变；(3) 血清样本不足，部分数据未体现出统计意义。

祛脂三味方预防性给药在干预脂肪肝方面有显著作用，无肝毒性却有保肝降酶降血脂作用，校优价廉，无疑是广大脂肪肝患者的福音。但目前对祛脂三味方干预脂肪肝的物质基础和作用机制还知之甚少，开展更多的关于祛脂三味方干预脂肪肝的物质基础和作用机制的研究迫在眉睫，对复方的普及推广和进一步成药开发也亟待进行。

基金项目

基于“土壅木郁”证候病机的祛脂三味方防治非酒精性脂肪性肝病的研究，上海市中医药发展办公室三年行动计划中医药传承和创新类-中医药创新内涵建设 ZY3-CCCX-3-3036。

参考文献 (References)

- [1] 中华医学会肝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(2010 年修订版) [J]. 中华肝脏病杂志, 2010, 18(3): 163-166.

- [2] 孙宁宁, 叶永安. “土壅木郁”理论及其在肝病临床中的应用[J]. 世界中医药, 2015(3): 383-386.
- [3] 罗先钦, 黄崇刚, 伍小波, 等. 山楂总黄酮对复合因素致大鼠脂肪肝模型脂质代谢与低密度脂蛋白受体[J]. 中草药, 2011, 42(7): 1367-1373.
- [4] 罗先钦, 徐晓玉, 黄崇刚, 等. 决明子总蒽醌对酒精性脂肪肝大鼠肝组织脂质过氧化与 PPAR- γ 表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(12): 1654-1659.
- [5] 陈剑明, 张声生, 吴震宇, 等. 虎杖苷对非酒精性脂肪肝保护作用的实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2015(5): 1188-1191.
- [6] 张征波. 大黄素对非酒精性脂肪肝肝脏单纯肝脂肪变性改善作用及机制研究[D]: [博士学位论文]. 南京: 南京中医药大学, 2012.
- [7] 郑册, 陶然, 张琴. 祛脂三味方对非酒精性脂肪性肝病大鼠血脂和氧化应激的影响[J]. 肝脏, 2016, 21(7): 579-583.

期刊投稿者将享受如下服务:

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

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

期刊邮箱: tcm@hanspub.org