

七味脂肝方对非酒精性脂肪性肝炎动物模型的药效学评价

杨嘉宁, 赵一颖, 肖伟

Pharmacodynamic effects of Qiwei Zhigan prescription on non-alcoholic steatohepatitis in animal model

YANG Jianing, ZHAO Yiyong, XIAO Wei

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.2097-2024.202404096>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

帕博利珠单抗治疗所致免疫相关不良反应与中医体质的相关性研究

Correlation between immune related adverse reactions in patients treated with pembrolizumab and Traditional Chinese Medicine constitution

药学实践与服务. 2024, 42(5): 217-222 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202311029](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202311029)

度拉糖肽联合二甲双胍对肥胖型2型糖尿病患者机体代谢、体脂成分及血清脂肪因子的影响

Effects of dulaglutide combined with metformin on body metabolism, body fat composition and serum adipokines in obese patients with type 2 diabetes mellitus

药学实践与服务. 2024, 42(7): 305-309 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202305032](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202305032)

89例细菌性肝脓肿的临床特征及抗感染治疗分析

Analysis of clinical characteristics and anti-infection treatment of 89 cases with pyogenic liver abscess

药学实践与服务. 2024, 42(6): 267-272 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202302039](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202302039)

全反式维甲酸对肝星状细胞活化及氧化应激的作用和机制探索

Exploration of the role and mechanism of all-trans retinoic acid on activation and oxidative stress of hepatic stellate cell

药学实践与服务. 2024, 42(7): 291-296 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202312054](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202312054)

全身过表达人METRNL基因小鼠模型的构建与验证

Construction and validation of a mouse model with systemic overexpression of human METRNL gene

药学实践与服务. 2024, 42(5): 198-202, 222 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202311014](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202311014)

黄芪甲苷衍生物治疗慢性心力衰竭小鼠的药效评价及作用机制研究

Efficacy and mechanism of astragaloside IV derivatives on chronic heart failure in mice

药学实践与服务. 2024, 42(5): 190-197 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202310004](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202310004)



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 论著 ·

七味脂肝方对非酒精性脂肪性肝炎动物模型的药效学评价

杨嘉宁¹, 赵一颖¹, 肖伟² (1. 上海图锋医药科技有限公司, 上海 201203; 2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏连云港 222001)

[摘要] **目的** 探讨七味脂肝方对两种经典的非酒精性脂肪性肝炎(NASH)动物模型的药效作用。**方法** 采用蛋氨酸-胆碱缺乏(MCD)饲料饮食诱导大鼠模型和胆碱缺乏的高脂饮食(CDAHFC)诱导小鼠非酒精性脂肪性肝炎模型, 将48只大鼠和96只小鼠均随机分为6组: 对照组、模型组、七味脂肝方组(低、中、高剂量组)、阳性药组, 造模2周后, 连续干预28 d。通过检测各组动物血清肝功能、血脂生化指标以及肝组织脂质水平, 并进行肝脏组织病理学评价, 以评估七味脂肝方治疗非酒精性脂肪性肝炎的药效作用。**结果** 七味脂肝方以临床等效剂量及以上剂量在两种试验动物模型灌胃给药后, 能改善肝脏大体解剖形态, 降低NASH小鼠肝脏重量及肝脏指数; 降低NASH大鼠血清ALT、ALP、LDH, 升高HDL水平; 降低NASH小鼠血清ALT、AST、TBIL、ALP、LDH及TG水平, 并降低肝脏TG含量。其还可改善肝脏组织病理损伤, 减轻肝脏组织炎症程度, 减轻肝细胞气球样变程度, 降低肝脏NAS评分, 且各剂量组间呈一定量效关系趋势; 有效减轻NASH小鼠肝小叶内和汇管区周围胶原纤维增生情况; 降低被F4/80标记的阳性细胞数密度, 减轻Kupffer细胞活化程度。**结论** 七味脂肝方可有效改善两种经典NASH模型的进展程度, 改善NASH肝脏炎症损伤向肝纤维化发展的趋势。

[关键词] 中医药; 七味脂肝方; 非酒精性脂肪性肝炎; 蛋氨酸-胆碱缺乏; 胆碱缺乏

[文章编号] 2097-2024(2024)00-0001-10

[DOI] 10.12206/j.issn.2097-2024.202404096

Pharmacodynamic effects of Qiwei Zhigan prescription on non-alcoholic steatohepatitis in animal model

YANG Jianing¹, ZHAO Yiyi¹, XIAO Wei² (1. Shanghai Tufeng Pharmaceutical Technology Co, Ltd, Shanghai 201203, China; 2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co, Ltd, Lianyungang 222001, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the therapeutic effect of Qiwei Zhigan prescription on two classic animal models of non-alcoholic steatohepatitis (NASH). **Methods** Methionine-choline-deficient (MCD) rat model and choline-deficient, L-amino acid-defined, high-fat and high cholesterol diet (CDAHFC) mouse model were used. 48 rats and 96 mice were randomly divided into 6 groups: control group, model group, Qiwei Zhigan prescription group (low, medium and high dose group), positive drug group. After 2 weeks of modeling, the drugs were administered continuously for 28 days. The efficacy of Qiwei Zhigan prescription in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis was evaluated by detecting the serum liver function, blood lipid biochemical indexes and liver tissue lipid levels of each group of animals, as well as by evaluating the liver histopathological changes. **Results** The gross anatomical morphology of the liver was improved by Qiwei Zhigan after oral administration of clinical equivalent dose or higher doses in two experimental animal models. The liver weight and liver index of NASH mice were reduced by the prescription. The levels of ALT, ALP and LDH in serum of NASH rats were decreased, and the level of HDL was increased. The levels of ALT, AST, TBIL, ALP, LDH and TG in serum of NASH mice were decreased, and the content of TG in liver was also decreased. The pathological damage of liver tissue was ameliorated, the inflammation of liver tissue was reduced, as well as the degree of ballooning of liver cells and the NAS score of the liver, and there was a certain dose-effect relationship between the groups; the proliferation of collagen fibers in the hepatic lobules and around the portal area of NASH mice was significantly reduced; the density of positive cells labeled by F4/80 was decreased, and the activation of Kupffer cells was alleviated. **Conclusion** Qiwei Zhigan prescription could effectively ameliorate the progression of two classic NASH models, and decrease the development trend from liver inflammation to liver fibrosis in NASH.

[Key words] traditional Chinese medicine; Qiwei Zhigan prescription; non-alcoholic steatohepatitis; methionine-choline deficiency; choline deficiency

[基金项目] [基金项目] 江苏省科学技术厅-基础研究计划自然科学基金--前沿引领技术基础研究专项(SBK2023050003)

[作者简介] 杨嘉宁, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 中药新药开发, Tel: 17717372543, Email: jianing775885@126.com

[通信作者] 肖伟, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 中药新药研发及过程质量控制, Email: kaniontougao2@163.com

非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)是临床常见的肝脏疾病之一,其中非酒精性脂肪性肝炎(NASH)是非酒精性脂肪肝(NAFL)向非酒精性脂肪性肝硬化转化过程中一个非常重要的环节^[1]。非酒精性脂肪性肝炎发展到晚期将导致肝硬化的发生,最终进展为肝细胞癌(HCC),从而影响整体肝功能。因此,NASH的防治具有重要意义。七味脂肝方由垂盆草、豨莶草、牡蛎等7味药组成,处方源于岐黄学者、中医临床肝病专家季光教授临床经验的总结,长期临床应用显示对NASH具有很好的效果。本研究参考常用的NASH动物模型^[2-4],选用蛋氨酸和胆碱缺乏(MCD)饮食诱导以及胆碱缺乏的高脂高胆固醇饮食(CDAHFC)诱导的2个经典NASH的动物模型,研究七味脂肝方对NASH的药效作用,为临床用药提供科学的理论依据。

1 材料与仪器

1.1 药物与试剂

七味脂肝方供试品(江苏康缘药业股份有限公司提供,批号:Z201001),根据项目组前期制定的提取工艺,将七味脂肝方制备成每1g含6.19g生药的浸膏粉;维生素E(VE)软胶囊(上海信谊延安药业有限公司,国药准字H31020237,批号:03210202);罗格列酮片(成都恒瑞制药有限公司,国药准字H20030569,批号:210601);丙氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、甘油三酯(TG)、胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)测定试剂盒(上海惠中生物科技有限公司,批号:01ALT210107、01AST210329、01ALP210222、02TG210330、01CHOL210226、01HDL210525、01LDL210302);乳酸脱氢酶(LDH)测定试剂盒(上海执诚生物科技有限公司,批号:ZCJULT019);游离脂肪酸(FFA)、总胆红素(TBIL)测定试剂盒(美康生物科技股份有限公司,批号:210609101、190731101;苏木素、伊红染色液(珠海贝索生物技术有限公司,批号:719041、719033);F4/80抗体,(Abcam,批号:1004577-2)。

1.2 仪器

全自动生化分析仪(日本东芝,型号:TBA-40R);全自动样品快速研磨仪,(上海净信,型号:Tissuelyser-24);轮转式石蜡切片机、冷冻切片机、组织包埋机(徕卡显微系统(上海)贸易有限公司,型号:RM2235、CM1950、HistoCore Amber);正置显微镜(日本OLYMPUS,型号:CX31RTSF)。

1.3 实验动物

Sprague-Dawley大鼠(SD大鼠),雄性,6周龄,体重200~250g,48只,购自上海市计划生育科学研究所实验动物经营部,生产许可证号:SCXK(沪)2018-0006。C57BL/J小鼠,雌雄各半,6周龄,体重(24±2)g,96只,购置于上海吉辉实验动物饲养有限公司,生产许可证号:SCXK(沪)2017-0012。通过上海中医药大学实验动物中心实验动物伦理(伦理号:PZSHUTCM210625020)审查,实验动物使用许可证号:SYXK(沪)2018-0006,SPF级环境饲养。

2 方法

2.1 造模与分组

2.1.1 MCD诱导的大鼠NASH模型

48只雄性SD大鼠,饲养于上海中医药大学实验动物中心,正常饮食,自由食水,观察7d。第8天,根据动物体重按随机数字法随机分为对照组和模型组,除对照组外,其余动物饲料梯度替换为MCD饲料(正常饲料喂养;25%MCD饲料喂养2d;50%MCD饲料喂养2d;75%MCD饲料喂养2d;100%MCD饲料喂养2周),自由食水。造模2周后,对模型组动物根据体重随机分组,分为模型组、七味脂肝方低剂量组(2.8g/kg生药)、七味脂肝方中剂量组(5.6g/kg生药)、七味脂肝方高剂量组(11.2g/kg生药)、阳性对照VE(40mg/kg)组,每组8只。各给药组每日灌胃1次,连续28d,对照组及模型组灌胃等量的生理盐水。

2.1.2 CDAHFC诱导的小鼠NASH模型

96只C57BL/J小鼠,雌雄各半,饲养于上海中医药大学实验动物中心,正常饮食,自由食水,观察7d。第8天,根据动物体重按随机数字法随机分为对照组和模型组,除对照组外,其余动物饲料梯度替换为CDAHFC饲料(正常饲料喂养;25%CDAHFC饲料喂养2d;50%CDAHFC饲料喂养2d;75%CDAHFC饲料喂养2d;100%CDAHFC饲料喂养2周),自由食水。造模2周后,对模型组动物根据体重随机分组,分为模型组、七味脂肝方低剂量组(4g/kg生药)、七味脂肝方中剂量组(8g/kg生药)、七味脂肝方高剂量组(16g/kg生药)、阳性对照罗格列酮(RSG,1.14mg/kg)组,每组16只。各给药组每日灌胃1次,连续28d,对照组及模型组灌胃等量的生理盐水。

2.2 检测方法

2.2.1 血清肝功能和血脂生化指标检测

使用全自动生化分析仪测定ALT、AST、ALP、

LDH、TG、TC、HDL-C、LDL-C、TBIL、FFA 在血清中的水平。

2.2.2 肝组织脂质水平检测

取新鲜肝脏组织样本,加入1:9(质量体积比)的匀浆介质(乙醇:丙酮=1:1),冰浴条件下匀浆,置于冰箱4℃过夜,4000 r/min离心15 min,收集上清液样本,使用全自动生化分析仪测定TG、TC、HDL-C、LDL-C在肝脏组织中的水平。

2.2.3 肝脏组织病理学评价

肝脏左叶样本固定后,经组织脱水,石蜡包埋,将其切成4 μm的石蜡切片。

(1)HE染色。取肝脏石蜡切片样本,经HE染色,用正置显微镜拍照并评价肝脏病理变化。NASH病理诊断标准采用NAFLD活动度积分(NAS)进行评估(具体评判标准见表1)。

表1 NAFLD活动度积分(NAS)组织学评分判断标准

评分	肝细胞脂肪变(%)	小叶内炎症	肝细胞气球样变
0	<5	无病灶	无
1	5~33	<2	少量气球样细胞
2	34~66	2~4	较多/显著气球样变
3	>66	>4	

注:NAS≥5分可明确NASH的诊断;NAS<3分则可排除NASH;两者之间者为NASH可能。

(2)Masson染色。取肝脏石蜡切片样本,经Masson三色染色,通过正置显微镜观察并拍照记录,评价肝组织纤维化程度。Masson染色纤维化诊断评分参照以下评分标准(表2)。

(3)免疫组织化学染色。取肝脏石蜡切片样

表2 肝纤维化分期评分判断标准

评分	纤维化程度
0	无
1	窦周或汇管区纤维化
2	窦周和汇管区周围纤维化
3	桥接纤维化
4	肝硬化

本,经F4/80抗体免疫组织化学染色,通过正置显微镜观察并拍照记录,评价肝组织中Kupffer细胞的活化程度。

2.3 统计方法

所有计量资料采用平均值加减标准偏差($\bar{x} \pm s$)表示。计量资料采用单因素方差分析(one-sample Kolmogorov-Smirnov test)进行数据分布判断,正态分布时采用参数检验的单因素方差分析(ANOVA),偏态分布时采用非参数检验(Mann-Whitney test)。所有数据均使用GraphPad Prism 8软件进行统计并进行图表制作。

3 结果

3.1 对肝脏形态、肝重及肝脏指数的影响

3.1.1 MCD诱导的大鼠NASH模型实验结果

对照组肝脏表面光滑,色深红,质地软,有弹性,肝叶边缘锐利。与对照组相比,模型组肝脏体积增大,颜色变浅;与模型组相比,七味脂肝方各剂量组和阳性对照VE组可以观察到肝脏颜色稍红,各组均可一定程度改善肝脏形态,结果见图1和表3。

3.1.2 CDAHFC诱导的小鼠NASH模型实验结果

对照组肝脏表面光滑,色深红,质地软,有弹性,肝叶边缘锐利;与对照组相比,模型组肝脏体积增大,颜色变浅;与模型组相比,七味脂肝方各剂量组和阳性对照RSG组可以观察到肝脏颜色稍红,各组均可一定程度改善肝脏形态,结果见图2。

与对照组相比,模型组肝脏重量、肝脏指数显著升高($P<0.01$);与模型组相比,七味脂肝方的各剂量组和阳性对照RSG组均能显著降低肝脏重量($P<0.05$ 或 $P<0.01$),七味脂肝方的中、高剂量组和阳性对照RSG组能显著降低肝脏指数($P<0.01$),结果见表4。

3.2 对血清肝功能、血脂水平的影响

3.2.1 MCD诱导的大鼠NASH模型实验结果

与对照组相比,模型组血清ALT水平显著升

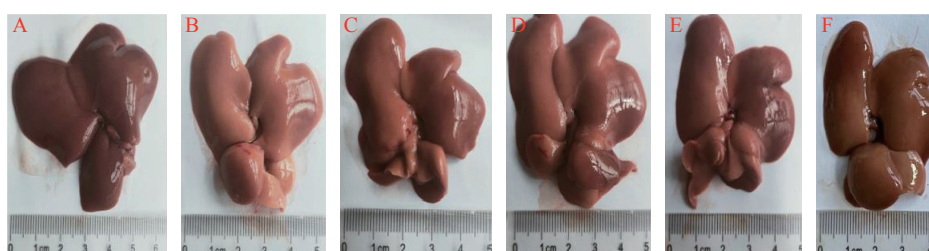


图1 大鼠肝脏形态

A.对照组;B.模型组;C.低剂量组;D.中剂量组;E.高剂量组;F.阳性对照VE组

表3 大鼠体重、肝脏重量及肝脏指数 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(n)	体重(m/g)	肝重(m/g)	肝指数(%)
对照组	8	397.28±31.15	10.46±1.15	2.63±0.14
模型组	8	202.19±15.56 ^{##}	6.91±1.10 ^{##}	3.41±0.42 ^{##}
七味脂肝方低剂量组	8	202.75±14.72	7.31±1.08	3.59±0.34
七味脂肝方中剂量组	8	202.98±17.39	7.90±1.54	3.88±0.57
七味脂肝方高剂量组	8	201.83±16.04	7.82±0.90	3.88±0.43 [*]
阳性对照VE组	8	201.83±11.16	7.22±0.57	3.59±0.34

* $P < 0.05$, 与模型组比较; ^{##} $P < 0.01$, 与对照组比较。

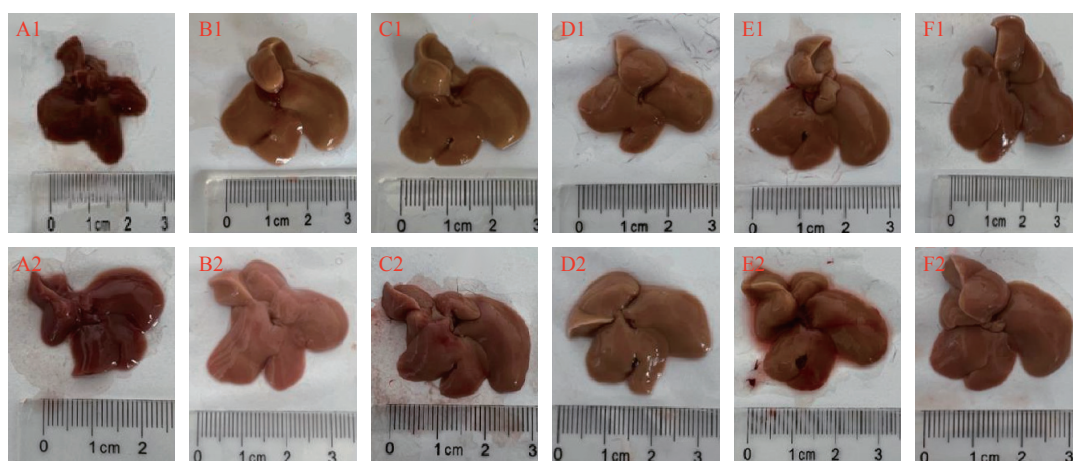


图2 小鼠肝脏形态

A1.对照组雄性; A2.对照组雌性; B1.模型组雄性; B2.模型组雌性; C1.低剂量组雄性; C2.低剂量组雌性; D1.中剂量组雄性; D2.中剂量组雌性; E1.高剂量组雄性; E2.高剂量组雌性; F1.阳性对照RSG组雄性; F2.阳性对照RSG组雌性

表4 小鼠体重、肝脏重量及肝脏指数 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(n)	体重(m/g)	肝重(m/g)	肝指数(%)
对照组	16	22.12±2.00	0.91±0.16	4.11±0.47
模型组	16	18.91±1.36 ^{##}	1.69±0.15 ^{##}	8.96±0.62 ^{##}
七味脂肝方低剂量组	16	18.59±1.01	1.56±0.20 [*]	8.41±1.06
七味脂肝方中剂量组	16	18.48±1.08	1.51±0.18 ^{**}	8.17±0.72 ^{**}
七味脂肝方高剂量组	16	18.32±1.03	1.54±0.13 ^{**}	8.38±0.53 ^{**}
阳性对照RSG组	16	19.14±1.34	1.56±0.18 [*]	8.16±0.68 ^{**}

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与模型组比较; ^{##} $P < 0.01$, 与对照组比较。

高($P < 0.01$); 与模型组相比, 七味脂肝方中剂量组血清 ALT 水平显著降低($P < 0.05$), 七味脂肝方中、高剂量组可改善血清 ALP、LDH、HDL 水平, 结果见表5、表6。

3.2.2 CDAHFC 诱导的小鼠 NASH 模型结果

与对照组相比, 模型组血清 ALT、AST、ALP、LDH、TG、TC、LDL 水平显著升高($P < 0.01$), HDL 水平显著降低($P < 0.01$); 与模型组相比, 七味脂肝方低剂量组血清 ALP、TG 水平显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 七味脂肝方中剂量组血清 LDH、TG 水平显著降低($P < 0.05$), 七味脂肝方高剂

量组血清 ALT、AST、ALP、LDH、TG 水平显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 阳性对照 RSG 组血清 ALT 水平显著降低($P < 0.05$), 结果见表7和表8。

与对照组相比, 模型组血清 TBIL、FFA 水平显著升高($P < 0.01$); 与模型组相比, 七味脂肝方高剂量组和阳性对照 RSG 组血清 TBIL 水平显著降低($P < 0.05$)。结果见表9。

3.3 对肝脏脂质水平的影响

3.3.1 MCD 诱导的大鼠 NASH 模型实验结果

与对照组相比, 模型组肝脏 TG 水平显著升高($P < 0.01$), HDL 水平显著降低($P < 0.01$); 与模型组

表5 大鼠血清肝功能数据 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(n)	ALT(U/L)	AST(U/L)	ALP(U/L)	LDH(U/L)
对照组	8	45.50±3.38	165.38±24.80	88.50±15.73	1547.50±243.04
模型组	8	107.25±32.84 ^{###}	187.50±24.36	93.75±32.65	1250.00±235.02 [#]
七味脂肝方低剂量组	8	107.00±37.80	195.88±25.90	87.25±24.54	1263.00±451.90
七味脂肝方中剂量组	8	69.38±16.33 [*]	171.25±19.91	63.13±18.76 [*]	886.88±304.48 [*]
七味脂肝方高剂量组	8	114.13±51.86	177.88±44.05	89.75±34.65	855.88±375.75 [*]
阳性对照VE组	8	111.00±15.76	165.75±16.61	128.50±58.52	1219.63±368.75

* $P < 0.05$, 与模型组比较; # $P < 0.05$, ^{###} $P < 0.01$, 与对照组比较。

表6 大鼠血脂4项数据 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(n)	TG(mmol/L)	TC(mmol/L)	HDL(mmol/L)	LDL(mmol/L)
对照组	8	0.32±0.10	1.12±0.22	0.28±0.03	0.15±0.02
模型组	8	0.23±0.05 [#]	0.83±0.18 [#]	0.32±0.06	0.14±0.04
七味脂肝方低剂量组	8	0.29±0.07	0.93±0.12	0.38±0.07	0.15±0.03
七味脂肝方中剂量组	8	0.32±0.19	1.25±0.51 [*]	0.49±0.19 [*]	0.21±0.08
七味脂肝方高剂量组	8	0.23±0.06	1.20±0.26 ^{**}	0.48±0.10 ^{**}	0.21±0.08
阳性对照VE组	8	0.23±0.05	0.84±0.23	0.33±0.12	0.15±0.04

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与模型组比较; # $P < 0.05$, 与对照组比较。

表7 小鼠血清肝功能数据 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(n)	ALT(U/L)	AST(U/L)	ALP(U/L)	LDH(U/L)
对照组	16	35.13±6.08	146.06±43.63	88.31±9.41	653.94±145.10
模型组	16	606.06±111.12 ^{###}	486.31±69.39 ^{###}	216.19±28.30 ^{###}	1390.25±128.14 ^{###}
七味脂肝方低剂量组	16	561.44±98.43	440.69±67.29	179.06±46.80 [*]	1347.19±150.78
七味脂肝方中剂量组	16	553.00±116.35	442.94±72.95	198.06±32.64	1261.69±122.55 [*]
七味脂肝方高剂量组	16	486.63±88.90 ^{**}	406.25±75.39 ^{**}	189.94±34.09 [*]	1161.00±134.22 ^{**}
阳性对照RSG组	16	513.56±91.17 [*]	441.81±70.00	273.94±43.98 ^{**}	1328.75±160.91

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与模型组比较; ^{###} $P < 0.01$, 与对照组比较。

表8 小鼠血脂4项数据 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(n)	TG(mmol/L)	TC(mmol/L)	HDL(mmol/L)	LDL(mmol/L)
对照组	16	0.82±0.39	2.70±0.42	1.64±0.35	0.18±0.03
模型组	16	1.27±0.26 ^{###}	3.45±0.55 ^{###}	0.93±0.29 ^{###}	0.57±0.17 ^{###}
七味脂肝方低剂量组	16	1.01±0.25 ^{**}	3.29±0.61	0.91±0.19	0.55±0.18
七味脂肝方中剂量组	16	1.01±0.31 [*]	3.46±0.52	0.99±0.26	0.59±0.13
七味脂肝方高剂量组	16	1.01±0.29 [*]	3.37±0.34	0.99±0.13	0.57±0.10
阳性对照RSG组	16	1.10±0.28	3.33±0.79	0.94±0.32	0.56±0.15

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与模型组比较; ^{###} $P < 0.01$, 与对照组比较。

相比, 阳性对照 VE 组肝脏 HDL 水平显著升高($P < 0.01$), 结果见表 10。

3.3.2 CDAHFC 诱导的小鼠 NASH 模型实验结果
与对照组相比, 模型组肝脏 TG、TC 水平显著升高($P < 0.01$); 与模型组相比, 七味脂肝方高剂量

组肝脏 TG 水平显著降低($P < 0.01$), 结果见表 11。

3.4 对肝脏病理 NAS 评分的影响

3.4.1 MCD 诱导的大鼠 NASH 模型 HE 染色实验结果

对照组大鼠肝小叶结构完整, 肝细胞排列整

表9 小鼠血清TBIL、FFA数据($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(n)	TBIL($\mu\text{mol/L}$)	FFA(mmol/L)
对照组	16	3.59±0.55	1.41±0.31
模型组	16	7.77±1.52 ^{###}	2.16±0.46 ^{###}
七味脂肝方低剂量组	16	6.95±1.78	2.01±0.43
七味脂肝方中剂量组	16	7.79±3.97	1.98±0.49
七味脂肝方高剂量组	16	6.37±1.72 [*]	2.16±0.49
阳性对照RSG组	16	9.09±1.69 [*]	2.20±0.55

* $P<0.05$,与模型组比较; ^{###} $P<0.01$,与对照组比较。

齐,肝板以中央静脉为中心呈放射状排列,未见明显病理性改变。

模型组镜下可见广泛的肝细胞空泡变性,中央静脉及汇管区周围可见肝细胞坏死,小叶间炎症细胞浸润,肝小叶结构被破坏。与对照组相比,模型

组脂肪变性、小叶内炎症及NAS评分显著升高($P<0.01$)。

与模型组相比,七味脂肝方的各给药组和阳性对照VE组可明显减轻小叶内炎症程度。与模型组相比,七味脂肝方低、中、高剂量组和阳性对照VE组小叶内炎症评分显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),七味脂肝方的中剂量组和阳性对照VE组NAS评分显著降低,结果见表12。

3.4.2 CDAHFC诱导的小鼠NASH模型HE染色实验结果

对照组肝小叶结构完整,肝细胞排列整齐,肝板以中央静脉为中心呈放射状排列,未见明显病理性改变。

模型组镜下可见广泛的肝细胞空泡变性,中央静脉及汇管区周围可见肝细胞点状或灶状坏死,小

表10 大鼠肝脏脂质水平($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(n)	TG(mmol/g)	TC(mmol/g)	HDL(mmol/g)	LDL(mmol/g)
对照组	8	3.93±0.56	1.49±0.16	0.11±0.03	0.67±0.08
模型组	8	5.97±0.53 ^{###}	1.14±0.13 ^{###}	0.03±0.02 ^{###}	0.25±0.13 ^{###}
七味脂肝方低剂量组	8	5.73±0.82	1.03±0.12	0.02±0.02	0.27±0.10
七味脂肝方中剂量组	8	5.57±0.93	1.14±0.12	0.03±0.03	0.31±0.07
七味脂肝方高剂量组	8	5.93±0.81	1.10±0.14	0.02±0.01	0.27±0.08
阳性对照VE组	8	7.25±1.40 [*]	1.21±0.15	0.08±0.02 ^{**}	0.34±0.09

* $P<0.05$,** $P<0.01$,与模型组比较; ^{###} $P<0.01$,与对照组比较。

表11 小鼠肝脏脂质水平($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(n)	TG(mmol/g)	TC(mmol/g)	HDL(mmol/g)	LDL(mmol/g)
对照组	16	3.54±1.98	1.04±0.15	0.20±0.07	0.35±0.11
模型组	16	8.78±0.89 ^{###}	2.29±0.21 ^{###}	0.47±0.13 ^{###}	0.42±0.21
七味脂肝方低剂量组	16	8.54±1.04	2.20±0.20	0.47±0.08	0.36±0.16
七味脂肝方中剂量组	16	8.69±1.54	2.28±0.31	0.49±0.09	0.43±0.17
七味脂肝方高剂量组	16	7.85±0.79 ^{**}	2.12±0.39	0.45±0.14	0.39±0.24
阳性对照RSG组	16	8.44±0.97	2.12±0.26	0.47±0.09	0.36±0.16

** $P<0.01$,与模型组比较; ^{###} $P<0.01$,与对照组比较。

表12 大鼠肝脏NAS评分($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(n)	脂肪变性	小叶内炎症	气球样变	NAS
对照组	8	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组	8	2.88±0.35 ^{###}	1.63±0.52 ^{###}	0.00±0.00	4.50±0.76 ^{###}
七味脂肝方低剂量组	8	3.00±0.00	1.00±0.00 [*]	0.38±0.52	4.38±0.52
七味脂肝方中剂量组	8	3.00±0.00	0.88±0.35 [*]	0.00±0.00	3.88±0.35 [*]
七味脂肝方高剂量组	7	3.00±0.00	0.86±0.38 [*]	0.00±0.00	3.86±0.38
阳性对照VE组	8	3.00±0.00	0.63±0.52 ^{**}	0.00±0.00	3.63±0.52 [*]

* $P<0.05$,** $P<0.01$,与模型组比较; ^{###} $P<0.01$,与对照组比较。

叶间炎性细胞浸润,肝小叶结构被破坏,较多个肝细胞呈气球样变。与对照组相比,模型组脂肪变性、小叶内炎症、气球样变及NAS评分显著升高。

与模型组相比,七味脂肝方中、高剂量组可有

效减轻炎症灶数量和肝细胞气球样变,显著降低小叶内炎症程度评分、气球样变评分及NAS评分($P<0.01$),阳性对照RSG组可减轻小叶内炎症程度,显著降低小叶内炎症程度评分及NAS评分($P<0.01$),结果见表13。

表13 小鼠肝脏NAS评分($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(n)	脂肪变性	小叶内炎症	气球样变	NAS
对照组	16	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组	16	3.00±0.00 ^{###}	2.81±0.40 ^{###}	1.88±0.34 ^{###}	7.69±0.48 ^{###}
七味脂肝方低剂量组	16	3.00±0.00	2.56±0.51	1.69±0.48	7.25±0.86
七味脂肝方中剂量组	16	3.00±0.00	2.13±0.34 ^{**}	1.38±0.50 ^{**}	6.50±0.73 ^{**}
七味脂肝方高剂量组	16	3.00±0.00	1.88±0.34 ^{**}	1.31±0.48 ^{**}	6.19±0.66 ^{**}
阳性对照VE组	16	3.00±0.00	2.19±0.40 ^{**}	1.56±0.51	6.75±0.68 ^{**}

^{**} $P<0.01$,与模型组比较;^{###} $P<0.01$,与对照组比较。

3.5 对肝脏Masson染色及纤维化评分的影响

CDAH2C诱导的小鼠NASH模型Masson染色结果显示,对照组肝小叶结构完整,肝细胞排列整齐,汇管区结构清晰,被染成蓝色的纤维结缔组织分布在肝小叶间血管和胆管周围,汇管区周围的纤维结缔组织呈围管状包裹血管及胆管分支。

模型组可见肝细胞点状或灶状坏死,炎症细胞浸润,镜下多个视野可见小叶内和汇管区周围被染成蓝色的胶原纤维增生。与对照组相比,模型组纤维化评分显著升高($P<0.01$)。

与模型组相比,七味脂肝方的中、高剂量组可观察到肝小叶内和汇管区周围胶原纤维增生情况明显减轻,并呈现一定程度的剂量梯度效应;阳性对照RSG组在肝小叶和汇管区周围的胶原纤维增生情况也可得到一定程度的改善。与模型组相比,七味脂肝方的高剂量组纤维化评分显著降低($P<0.05$),结果见表14。

表14 小鼠肝脏纤维化分期评分($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(n)	纤维化分期评分
对照组	16	0.00±0.00
模型组	16	1.56±0.51 ^{###}
七味脂肝方低剂量组	16	1.75±0.45
七味脂肝方中剂量组	16	1.44±0.51
七味脂肝方高剂量组	16	1.19±0.40 [*]
阳性对照RSG组	16	1.25±0.45

^{*} $P<0.05$,与模型组比较;^{###} $P<0.01$,与对照组比较。

3.6 对肝脏Kupffer细胞的影响

MCD诱导的大鼠和CDAH2C诱导的小鼠

NASH模型F4/80免疫组织化学染色结果显示,对照组大鼠肝脏Kupffer细胞处于静息状态,为不规则或树枝状分布。

模型组可观察到在肝小叶炎性灶及汇管区周围大量的被激活的Kupffer细胞,呈现花冠状分布,被F4/80标记的阳性细胞数明显增加。

与模型组相比,七味脂肝方的中、高剂量组显示被F4/80标记的阳性细胞数密度降低,Kupffer细胞活化程度明显减弱,花冠状分布程度明显减轻,呈一定程度的浓度依赖;阳性对照VE组和RSG组同样可减轻Kupffer细胞活化程度,与文献报道一致,结果见图3、图4。

4 讨论

NASH是在非酒精性肝脂肪变基础上形成的,出现血清生化酶学超过正常值上限,肝穿刺病理组织学显示肝细胞脂肪变 $>5\%$,伴有炎症及肝细胞损伤(如气球样变),并除外导致肝脂肪变的其他原因,如大量饮酒、长期应用促脂肪形成药物或单基因遗传紊乱等的疾病^[1]。近年来,关于NASH发病机制的研究已取得很大进展,但目前治疗选择非常有限^[5-6],FDA、SFDA尚未批准针对该疾病的有效药物。权威指南中推荐使用的药物有维生素E、吡格列酮等,但这些药物的有效性和安全性存在争议^[7-8]。目前,防治NASH的主要方法以生活方式干预为主,其他方法包括降糖、降脂和保肝的间接对症治疗,降低导致NASH的高危因素的相关疾病,使患者间接获益。

中医药因具有多因子、多靶点和多环节的协同

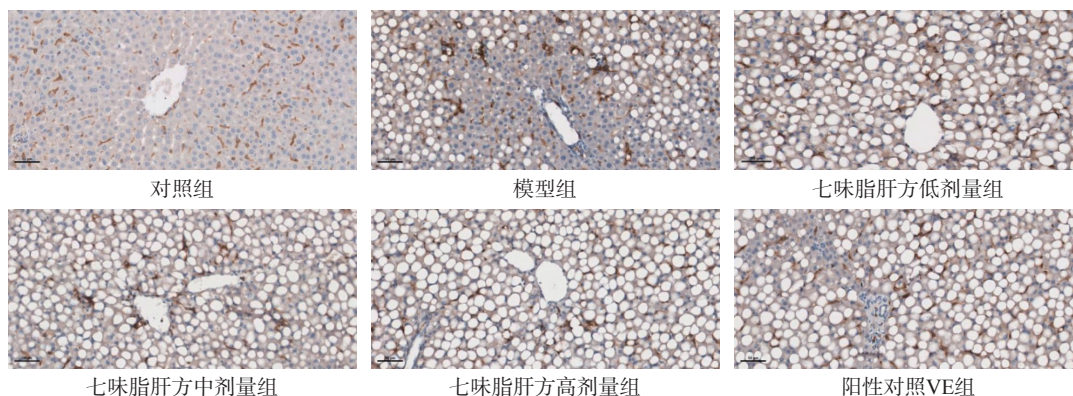


图3 大鼠肝脏 F4/80 免疫组织化学染色图(×20)

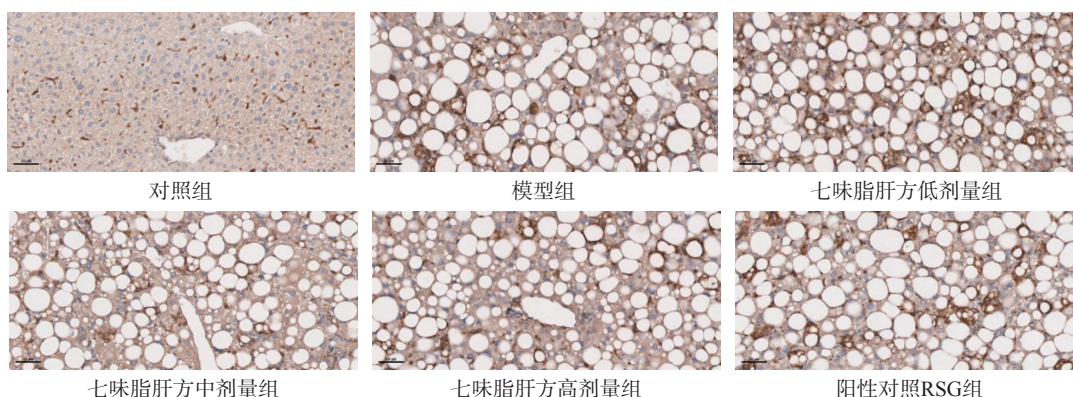


图4 小鼠肝脏 F4/80 免疫组织化学染色图(×20)

药理效应,在治疗该类疾病具有独特的优势,在治 NASH 方面取得了一定进展^[9-11]。非酒精性脂肪性肝炎并无确切中医学病名^[12],根据其临床表现可归属于“肝癖”、“胁痛”、“黄疸”等范畴。病位主要涉及肝脾,病久及肾。由于过食肥甘厚味,运化失职,使谷精不能尽化气血而凝为膏脂,导致肝失疏泄、脾失健运,痰浊淤积于肝;脾胃为气机升降之枢,湿浊困脾,脾气不升,一身气机运化失常,加剧肝气郁结和肝络失养。

七味脂肝方中酒豨莶草、垂盆草清热解毒、利湿退黄,二药合为君药;煅牡蛎软坚散结,《珍珠囊》谓其可“软痞积”,《本草纲目》谓“化痰软坚,清热除湿”,山楂消食积,散淤血,《本草纲目》认为其可“化饮食,消肉积,癥瘕,痰饮痞满吞酸,滞血痛胀”,海藻消痰软坚散结,利水消肿,三药共为臣药;虎杖协同加强解毒、化痰、退黄之功效,为佐药;醋五味子收敛固涩、益气生津、补肾宁心,可补五脏气,为使药。全方七味药物相辅相成,达到湿、痰、瘀、毒兼顾,利湿解毒,消痰散结,用于 NASH 湿热痰瘀互结证。现代药理学表明,方中垂盆草中的槲皮素^[13]、虎杖中的虎杖苷等成分均对 NASH 有一定治疗作用^[14-15]。

NASH 是一种更严重的 NAFLD 病理类型,NASH

的特征是存在肝细胞损伤、肝脂肪变性、炎症和纤维化,进而发生肝硬化并增加肝细胞癌的风险^[16]。在 NASH 发展过程中,肝脏内脂肪合成量不断上升,代谢功能逐渐下降,肝脏对脂质的摄取和代谢能力随之减弱,导致脂质代谢过程中 TC、TG 和 LDL-c 含量升高,同时受损的肝细胞还会释放 AST、ALT 活力到血液中,导致 AST、ALT 活力升高,这些指标的异常变化可作为 NASH 的标志^[17]。肝内过量的脂质沉积可导致炎症反应,促使单纯性脂肪肝向 NASH 的病理进展^[18]。肝纤维化是肝细胞外基质的弥漫性过度沉积与异常分布,是肝脏对慢性损伤的病理性修复反应。目前,肝组织病理学检查仍是肝纤维化诊断的“金标准”。目前的科学研究普遍认为,Kupffer 细胞对 NAFLD 的发生和发展至关重要,如果它们被适度激活,可以发挥防御作用,但如果它们被过度激活,将释放大量的促炎细胞因子,这对肝组织和其他细胞会造成一定程度的损伤。已有文献表明,活化的肝脏巨噬细胞可以促进 NASH 的进展^[19]。

本研究在 MCD 诱导的大鼠和 CDAHFD 诱导的小鼠两个经典 NASH 模型的实验结果显示,经过 2 周的诱导后,模型组的肝脏质量以及 ALT、AST、ALP、LDH、TG、TC、LDL、TBIL 及 FFA 水

平显著高于对照组, HE、Masson 及免疫组化染色显示, 肝脏组织炎症和肝细胞脂肪变性严重, NAS 评分显著增加, 肝小叶内和汇管区周围胶原纤维增生及 Kupffer 细胞活化程度加重, 说明建立 NASH 模型成功。经 4 周的给药后, 七味脂肝方能显著降低上述指标, 此外, HE、Masson 及免疫组化染色显示, 七味脂肝方能显著减轻肝脏组织炎症程度, 降低肝脏组织病理 NAS 评分, 减轻肝纤维化及 Kupffer 细胞活化程度。说明七味脂肝方能有效降低血脂、调节肝脏脂质代谢紊乱, 改善 NASH 小鼠肝脏炎症损伤向肝纤维化发展的趋势改善肝脏组织病理损伤, 从而有效减缓并改善 NASH 的进展程度。

NASH 的发病机制尚未完全阐明, 目前公认的是“多重打击”理论, 其认为胰岛素抵抗、脂肪毒性、炎症、氧化应激等多种致病因素共同导致了 NASH 的发生发展, 而炎症在 NASH 的恶化过程中扮演着至关重要的角色^[18]。肝脏具有密集的吞噬细胞网络, 在非炎症条件下维持耐受性, 并快速感知肝细胞损伤和氧化应激信号, 导致促炎级联反应的激活。在损伤后, 白细胞迅速渗入肝实质, 通过产生可溶性介质激活其他免疫细胞和非实质细胞群, 从而促进炎症和纤维化的发生。炎症介质可以激活肝星状细胞(HSCs), HSCs 是肝纤维化形成过程中的主要效应细胞, 导致细胞外基质过度沉积, 形成创伤愈合或瘢痕反应, 进一步促进纤维化发展。活化的 HSCs 产生促炎介质, 进而使肝脏炎症持续存在, 导致炎症的慢性循环和瘢痕组织的形成, 最终导致器官衰竭^[20]。因此, 抑制炎症对于 NASH 的预防和治疗具有重要意义, 深入理解 NASH 相关的炎症信号通路(NF- κ B 和 MAPK 等), 并找到能够有效靶向特定炎症的靶点, 将为治疗 NASH 提供更多的思路和新的策略。已有多次报道 NF- κ B 信号通路参与 NASH 中炎症反应, 损伤相关分子模式(DAMPs)激活 Kupffer 细胞, 诱导细胞内的 NF- κ B 信号激活^[21]。本研究病理染色结果证明, 七味脂肝方可减少炎症浸润, 减轻肝纤维化程度, 改善 NASH 动物肝脏的病理表现, 后续将继续探究七味脂肝方药效物质基础作用的炎症通路, 进一步阐明其治疗 NASH 的机制。

本研究结果初步提示, 七味脂肝方可能是通过改善 NASH 肝脏炎症损伤, 继而阻碍其向肝纤维化发展的趋势来发挥药效, 为其后续机制探究提供研究方向。针对目前的 NASH 临床需求, 七味脂肝方具有较好的临床价值。

【参考文献】

- [1] 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组, 中国医师协会脂肪性肝病专家委员会. 非酒精性脂肪性肝病防治指南(2018 更新版)[J]. 中华肝脏病杂志, 2018, 26(3): 195-203.
- [2] 蔡江帆, 陈民利. 非酒精性脂肪性肝病动物模型的研究概况 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(1): 128-136.
- [3] 王福根, 梁伟峰, 席建军, 等. 非酒精性脂肪性肝病动物模型的建立与应用 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2015, 20(7): 835-840.
- [4] 马富超, 张泉洋, 王帅, 等. 非酒精性脂肪性肝病动物模型研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2017, 44(5): 409-414.
- [5] 刘玉嫣, 朱邗枝, 贾步云, 等. 治疗非酒精性脂肪性肝炎药物研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2023, 32(20): 2044-2050.
- [6] STEFAN N, HÄRING H U, CUSI K. Non-alcoholic fatty liver disease: causes, diagnosis, cardiometabolic consequences, and treatment strategies[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2019, 7(4): 313-324.
- [7] EUROPEAN Association for the Study of the Liver(EASL), EUROPEAN Association for the Study of Diabetes(EASD), EUROPEAN Association for the Study of Obesity(EASO). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease[J]. *J Hepatol*, 2016, 64(6): 1388-1402.
- [8] CHALASANI N, YOUNOSSI Z, LAVINE J E, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases[J]. *Hepatology*, 2018, 67(1): 328-357.
- [9] 郑丁. 加味茵陈五苓散治疗非酒精性脂肪性肝炎(湿热蕴结证)的临床观察及机制研究 [D]. 湖北: 武汉: 湖北中医药大学, 2021.
- [10] 曹羽涵. 泽泻白术汤改善非酒精性脂肪性肝病的药理学评价 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2022.
- [11] 谭利婷. 毛氏降脂方加味治疗非酒精性脂肪性肝炎的临床疗效观察 [D]. 广西: 南宁: 广西中医药大学, 2023.
- [12] 赵文霞, 许二平, 王宪波, 等. 非酒精性脂肪性肝炎中医诊疗指南 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2022, 32(11): 1059-1062.
- [13] 梅桂斌, 陈力, 姜纯杰, 等. 槲皮素对 T2DM 小鼠代谢相关脂肪性肝损伤的保护 [J]. 华中科技大学学报(医学版), 2021, 50(5): 561-565,573.
- [14] 吉秋霞, 许晓乐. 虎杖苷对高脂喂养的中年 LDLr^{-/-}小鼠非酒精性脂肪性肝炎的作用及机制研究 [J]. 中草药, 2021, 52(12): 3602-3610.
- [15] 黄冠华. 虎杖苷对非酒精性脂肪性肝炎大鼠炎症反应、胰岛素敏感性及其信号转导的调节作用 [J]. 数理医药学杂志, 2022, 35(5): 701-704.
- [16] VERNON G, BARANOVA A, YOUNOSSI Z M. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2011, 34(3): 274-285.
- [17] 栾凯, 黄菊, 李江怡, 等. 健肝乐颗粒对高脂和高胆固醇饮食诱导小鼠非酒精性脂肪性肝炎的保护作用 [J/OL]. 中药药理与临床. 1-19. (2024-05-20) [2024-06-03]. <https://doi.org/10.>

- 13412/j.cnki.zyyl.20240520.002.
- [18] 刘鑫, 罗娅, 徐敏轩, 等. 探索炎症相关靶点: 非酒精性脂肪性肝炎治疗的研究进展 [J/OL]. 中国药学杂志: 1-28.(2024-05-30) [2024-06-03]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2162.R.20240529.1553.007.html>.
- [19] 周天智, 何堃, 龚建平. Kupffer 细胞与肝脏脂质代谢紊乱的研究进展 [J]. 世界华人消化杂志. 2015, 23(13): 2071-2076.
- [20] HAMMERICH L, TACKE F. Hepatic inflammatory responses in liver fibrosis[J]. *Nat Rev Gastro Hepat*, 2023, 20(10): 633-646.
- [21] 王星星, 李沫, 高川月, 等. 白杨素减轻非酒精性脂肪性肝炎小鼠脂肪变性及血脂异常 [J]. 中国病理生理杂志, 2024, 40(5): 899-907.
- [收稿日期] 2024-04-30 [修回日期] 2024-07-07
[本文编辑] 李春德