

四物汤干预减轻乙醇对小鼠肝脏的损伤作用

白云峰¹, 李晓娟², 李永纲¹, 王立福¹, 李 蓓², 王睿林¹, 李瑞生²

(1. 解放军第 302 医院中西医结合肝病诊疗与研究中心, 北京 100039;
2. 解放军第 302 医院实验技术研究保障中心, 北京 100039)

【摘要】 目的 通过四物汤对小鼠酒精性肝损伤的干预效果的研究, 阐明其对乙醇损伤肝脏的影响, 为四物汤临床防治酒精性肝病提供实验数据。**方法** 选择 60 只 C57 小鼠, 随机分为对照组、模型组 and 四物汤低、中、高剂量(0.91、1.82、3.64 g/kg/d)组, 每组 12 只, 用 50% 乙醇灌胃建立酒精性脂肪肝模型, 同时用四物汤进行干预。实验 6 周后, 对各组小鼠的体质量、肝指数、血清生化指标和肝脏病理学改变进行综合对比分析。**结果** 四物汤各剂量组小鼠与模型组相比其体重增长量均显著增加($P < 0.05$), 肝指数明显降低($P < 0.05$), 血清 ALT、AST 和 TG 含量($P < 0.05$)均显著降低。四物汤从低到高剂量组的肝脏外观从粗糙逐渐变光滑, 颜色逐渐加深。病理结果也显示肝脏脂肪变随着剂量从低到高呈递减的程度, 而高剂量组小鼠的脂肪变改善效果最显著。**结论** 四物汤对小鼠酒精性肝损伤具有一定的保护作用。

【关键词】 四物汤; 乙醇; 肝脏损伤

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 02-0011-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.002.003

Protective effect of Siwu decoction on alcoholic hepatic injury in mice

BAI Yun-feng¹, LI Xiao-juan², LI Yong-gang¹, WANG Li-fu¹, LI Bei², WANG Rui-lin¹, LI Rui-sheng²

(1. Liver Disease Center of Combined TCM and Western Medicine,
2. Research and Technology Service Center, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China)

【Abstract】 Objective To provide experimental data for clinical prevention and treatment of alcoholic liver disease in mice by a Chinese medicine, Siwu decoction, and study the intervention effect of Siwu decoction on alcoholic liver injury. **Methods** Sixty C57 mice were selected and randomly divided into the control group, model group and Siwu decoction low, medium and high dose (0.91, 1.82, 3.64 g/kg/d) groups, 12 mice in each group. The mouse models of alcoholic fatty liver were generated with gastric gavage of 50% ethanol, and Siwu decoction intervention was applied to these mouse models. Six weeks later, the mice body weight, liver index, serum biochemical indexes and liver pathological changes were determined and analyzed. **Results** Compared with the model group, Body weight gains of mice in all dose Siwu Decoction groups were significantly increased ($P < 0.05$), and liver indexes significantly decreased ($P < 0.05$). The serum levels of ALT, AST and TG content significantly decreased ($P < 0.05$). The liver gross appearance was gradually changed from rough to smooth and the color gradually deepened in the mice of Siwu decoction groups, increasingly from low

【基金项目】解放军第 302 医院院长创新基金: YNKT2013026。

【作者简介】白云峰(1970-), 男, 博士, E-mail: yunfengbai3@yahoo.com.cn; 李晓娟(1980-), 女, 硕士, E-mail: sxlily55@163.com。并列第一作者。

【通讯作者】李瑞生(1969-), 男, 博士, 副研究员, 从事人类疾病动物模型研究, E-mail: lrsheng@sohu.com; 王睿林(1979-), 男, 博士, 主治医师, 从事中西医结合治疗研究, E-mail: wrf7905@163.com。

to high dose group. Pathological examination showed a decrease of hepatic steatosis in the mice treated with Siwu decoction from low dose to high dose, and mice in the high dose group showed the best improvement of hepatic steatosis. **Conclusion**

The Chinese medicine Siwu decoction has a protective effect on alcoholic liver injury in mice.

【Key words】 Siwu decoction; Ethanol; Liver damage

酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)是由于长期大量饮酒所导致的肝脏疾病,由于嗜酒已成为当今世界日益严重的公共卫生问题,因此酒精性肝病的研究也成为全球的研究热点^[1]。乙醇进入体内会经过多种途径对肝脏造成损伤^[2],其中由乙醇引起氧化应激所产生的自由基可使线粒体膜通透性增加^[3],引起细胞能量代谢障碍而导致肝细胞损伤。而中药四物汤由白芍、当归、川芎和地黄组成,这四种中药均归经入肝,具有补血养肝,行瘀破滞之功^[4],近年来还报道四物汤具有增强血清超氧化物歧化酶活力,促进自由基消除的作用^[5]。因此为了探讨四物汤是否对小鼠酒精性肝损伤过程具有干预作用,本实验选取近交系 C57 小鼠^[6],通过观察四物汤对急性酒精性肝损伤试验动物体重、肝指数和肝细胞脂肪变性等的影响,分析其对急性酒精性肝损伤的防护作用及作用机理,以期探寻 ALD 临床治疗药物奠定实验数据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选择 SPF 级 C57 雄性小鼠 60 只,单鼠体质量为 20 g~22 g,购自军事医学科学院实验动物中心,生产许可证【SCXK(军)2012-0004】,实验在本实验室 SPF 级中进行,使用许可证【SYXK(军)2012-0010】。

1.2 试剂及饲料

四物汤颗粒由 302 医院药剂室制备(3 g/袋);乙醇(分析纯,纯度>99.7%)(国药集团化学试剂有限公司,批号:20130315);生理盐水(解放军第 302 医院制剂室提供,批号:130527405,石家庄四药有限公司)。

1.3 动物分组及实验方法

健康雄性 C57 小鼠 60 只,适应性喂养 5 d 后,随机分为 5 个组,分别为正常对照组、模型组、四物汤颗粒高剂量组(3.64 g/kg)、中剂量组(1.82 g/kg)、低剂量组(0.91 g/kg),每组各 12 只。四物汤

的剂量根据人临床剂量换算,换算公式:小鼠剂量(g/kg)=9.1×人临床剂量(0.1 g/kg)。此剂量作为低剂量,中剂量与高剂量分别为低剂量的 2 倍和 4 倍。每日正常组和模型组灌胃生理盐水,实验组灌胃不同剂量的四物汤,灌完间隔 30 min 后^[7],正常组继续用生理盐水灌胃,其余各组小鼠每日给予浓度 50% 乙醇灌胃,灌胃量为 12 mL/(kg 体重)^[8],持续 6 周。小鼠每周称重 1 次,按体重调整四物汤、乙醇灌胃量。实验期间小鼠均可自由进食和饮水。

1.4 观察指标及检测方法

实验过程中每天观察各组小鼠精神状态,于实验结束前 1 d 禁食 12 h,次日称重后经小鼠眶后静脉丛采血,离心取血清,检测各组小鼠血清生化指标:天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)和甘油三酯(TG)。取血后迅速取各组小鼠肝脏组织,称取肝脏重量,按公式计算:肝指数=肝质量(g)/体质量(g)×100%;然后采集所有小鼠相同部位的肝组织用甲醛固定进行 HE 染色,在光学显微镜下观察分析各组小鼠肝脏的组织病理学结果。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行数据处理,各组间采用方差分析进行比较,以 $P<0.05$ 显示差异是否有显著性。

2 结果

2.1 各组小鼠体重增长量及生化指标的分析

通过对各组小鼠体重增长量、肝指数和生化指标的对比分析显示:与对照组比较,模型组小鼠的体重增长量显著降低($P<0.05$),肝指数显著增加($P<0.05$);与模型组比较,四物汤各剂量组小鼠的体重增长量均显著增加($P<0.05$),肝指数明显降低($P<0.05$)。与对照组比较,模型组小鼠血清中 ALT、AST 和 TG 显著增高($P<0.05$);而与模型组比较,四物汤各剂量组血清 ALT、AST 和 TG 含量明显降低($P<0.05$),其中四物汤对 AST 和 TG 含量的影响呈现出剂量依赖性(表 1)。

表 1 各组小鼠体质量、肝指数和生化指标分析
Tab. 1 Analysis of body weight gain, liver index and serum levels of ALT, AST and TG of mice in different groups

组别/指标 Group/indicator	体重增长量 Body weight gain	肝指数 Liver index	丙氨酸转氨酶 ALT (U/L)	天冬氨酸转氨酶 AST (U/L)	甘油三酯 TG (mmol/L)
对照组 Control group	5.13 ± 1.18	4.58 ± 0.45	34.33 ± 11.36	125.33 ± 31.72	0.64 ± 0.25
模型组 Model group	1.53 ± 0.85 *	7.21 ± 0.81 *	59.60 ± 12.93 *	160.20 ± 30.10 *	0.94 ± 0.11 *
四物汤低剂量组 Low dose siwu decoction group	3.94 ± 0.75 * ^Δ	5.89 ± 0.74 * ^Δ	47.25 ± 10.96 * ^Δ	149.71 ± 24.67 * ^Δ	0.83 ± 0.14 * ^Δ
四物汤中剂量组 Medium dose siwu decoction group	4.21 ± 0.98 * ^Δ	5.21 ± 0.61 ^Δ	49.24 ± 10.54 * ^Δ	144.58 ± 22.78 * ^Δ	0.79 ± 0.32 * ^Δ
四物汤高剂量组 High dose siwu decoction group	4.95 ± 1.20 ^Δ	4.89 ± 0.39 ^Δ	41.03 ± 9.96 ^Δ	130.00 ± 27.82 ^Δ	0.73 ± 0.26 ^Δ

注:与对照组比较 * $P < 0.05$, 与模型组比较 $\Delta P < 0.05$ 。
Note. * $P < 0.05$, compared with the control group; $\Delta P < 0.05$, compared with the model group.

2.2 各组小鼠肝脏外观的分析

肝脏外观标本显示:对照组小鼠肝脏被膜光滑,呈红褐色,质地柔软;模型组小鼠肝脏边缘呈圆钝状,色泽呈淡红色,质地较粗糙。四物汤各剂量组肝脏外观均较模型组肝脏颜色呈暗红色,而且从低剂量组至高剂量组肝脏颜色逐渐加深,肝脏外观从粗糙逐渐变光滑,其结果见图 1(图 1 见文后彩插 2)。

2.3 各组小鼠肝组织病理学的分析

肝脏病理学研究结果显示:对照组小鼠肝小叶结构清晰,肝索排列规则且以中心静脉放射排列,汇管区未见炎症细胞浸润。模型组小鼠肝细胞明显肿胀,肝小叶界限模糊,肝细胞内有成堆的脂肪滴,已呈现典型的酒精性脂肪肝病。与模型组比较,四物汤低剂量组和中剂量组的脂肪变程度均有所改善,而高剂量组小鼠肝细胞肿胀减轻,少数肝细胞轻度水肿,肝小叶及汇管区未见炎性细胞浸润,脂肪变程度明显减轻(图 2,图 2 见文后彩插 2)。

3 讨论

酒精过量引起的肝损伤已经成为严重的世界性公共卫生问题。酒精性肝病的发生与乙醇及其代谢产物的直接毒性、营养改变、脂质过氧化及遗传免疫因素等有关^[9],目前临床上仍以戒酒为主要的治疗手段,至今仍未找到有效的治疗靶点和方法,故寻找有效预防及延缓酒精性肝病发展的理想药物尤为重要^[10]。近年来各类中药材以及从各类药理学植物中提取的有效成分应用于酒精性肝病治疗逐渐成为研究热点。于海玲等^[11]证实了由人参、川芎、白芍、胡桃仁及鸭肉等制备而成的肝康颗粒通过减轻酒精对肝脏的脂质过氧化损伤,从而抑制

酒精的肝毒性反应;付斌等^[12]也证实了由灵芝、葛根、枳椇子、枸杞子为原料的护肝片能够减轻酒精对肝细胞的损伤;刘超群等^[13]将大蒜中提取的大蒜多糖应用于酒精性肝损伤的治疗也得到了有效的结果。众所周知,四物汤是中医临床具有活血化瘀作用的基础方,常用于治疗可见血瘀证候的多种疾病。最新研究表明其具有消除自由基的作用^[5],而自由基在酒精性肝损伤的发病过程中起到关键的作用。但至今尚未见四物汤应用于酒精性脂肪肝治疗的报道。临床观察发现酒精性脂肪肝中医证候类型之“血瘀证”是其主要证型,治疗可以四物汤为基础方以活血化瘀。

因此本实验应用四物汤对酒精中毒小鼠干预 6 周后,对各组小鼠体重增长量和肝指数结果分析显示:模型组小鼠体重增长量显著降低($P < 0.05$),肝指数显著增加($P < 0.05$),表明长期饮酒会降低小鼠食欲和对食物的吸收能力,同时肝脏组织存在受损肿胀情况。而四物汤各组结果与模型组相比较,小鼠体重增长量显著增加($P < 0.05$),肝指数显著降低($P < 0.05$),说明四物汤具有改善酒精中毒小鼠的食欲和吸收功能的作用,对肝脏肿胀情况有所改善。血清 ALT 和 AST 活性升高为肝细胞损伤的特异性指标,只要有 1% 的肝细胞坏死,便可使血中酶活性增高 1 倍。而肝脏病理学检查则被认为是判断肝脏损伤的金标准^[14]。模型组小鼠血清中 ALT、AST 和 TG 与对照组比较均显著增高($P < 0.05$);而四物汤各剂量组血清 ALT、AST 和 TG 含量与模型组比较均显著降低($P < 0.05$),提示四物汤具有较强的抗酒精性肝脏损伤的效应。肝脏外观和肝脏病理学结果显示:四物汤从低剂量到高剂量对酒精性肝损伤有递增的改善作用,也说明四物汤对酒精

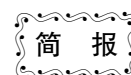
性肝损伤出现的脂肪变性和炎症病理学改变具有抑制和减缓发展的作用。因此初步推断四物汤可能是通过改善微循环消除自由基而发挥抗酒精性肝损伤的效应,而作用机制还有待进一步深入研究。

总之,本实验应用四物汤干预小鼠酒精性肝损伤,表明四物汤具有抑制和减缓肝细胞脂肪变性、减轻炎症和修复肝脏细胞的作用,对乙醇诱导的小鼠酒精性肝损伤具有显著的保护作用,为 ALD 发病机制和临床治疗药物的研发开辟了新的实验平台。

参考文献:

- [1] Gao B, Bataller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets [J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(5): 1572-1585.
- [2] Jampana S, Rashid K. Pathogenesis of alcoholic hepatitis: role of inflammatory signaling and oxidative stress [J]. *World J Hepatol*, 2011, 3(5): 114-117.
- [3] Yan M, Zhu P, Liu HM, et al. Ethanol induced mitochondria injury and permeability transition pore opening: role of mitochondria in alcoholic liver disease [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13: 2352-2356.
- [4] 张荣桃. 四物汤的现代研究进展 [J]. *北京中医药*, 2012, 31(1): 73-75.
- [5] 王茜. 四物汤对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *黑龙江中医药*, 2012, 4: 48-49.
- [6] 白云峰, 李晓娟, 李永纲, 等. 近交系小鼠酒精性脂肪肝模型建立的分析 [J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24(1): 8-11.
- [7] 付萍, 杨铭, 陈颖丽, 等. 玉米肽对小鼠酒精性肝损伤保护作用的研究 [J]. *中国中医药科技*, 2008, 15(2): 115-116.
- [8] 吴伟青, 陈静, 刘超群, 等. 绿茶多酚对小鼠酒精性肝损伤的保护作用 [J]. *食品科学*, 2011, 32(13): 310-313.
- [9] 李晓娟, 张大鹏, 隋丽华, 等. 超声在评价大鼠酒精性脂肪肝模型中的应用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23(4): 19-22.
- [10] 郝银菊, 赵莹, 吴洋, 等. 氧化槐定碱对小鼠酒精性肝损伤的保护作用 [J]. *广东医学*, 2012, 33(21): 3215-3217.
- [11] 于海玲, 郭建鹏, 李迎军, 等. 肝康颗粒对小鼠急性酒精性肝损伤的保护作用 [J]. *延边大学医学学报*, 2010, 33(1): 13-15.
- [12] 付斌, 杨静, 胡居吾, 等. 一种解酒护肝片对小鼠酒精性肝损伤的保护作用的研究 [J]. *江西化工*, 2012, 2: 83-86.
- [13] 刘超群, 陈静, 黄雪松, 等. 大蒜多糖对慢性酒精中毒小鼠肝损伤的保护作用 [J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2012, 38(1): 23-27.
- [14] 向志钢, 李先辉, 刘锋, 等. 果王素对小鼠酒精性肝病保护作用的实验研究 [J]. *中国现代医学杂志*, 2010, 20(3): 373-376.

[修回日期]2014-10-20



可吸收微型螺钉对骨折内固定的有效性研究

刘晓帅¹, 汪林¹, 钟振东¹, 易勇¹, 李军晖¹, 王果¹, 谢强²

(1. 四川省医学科学院 四川省人民医院实验动物研究所, 成都 610212;

2. 成都迪康中科生物医学材料有限公司, 成都 610212)

本研究采用兔单纯股骨外踝骨折模型, 植入可吸收微型螺钉进行内固定, 于恢复不同时期取出螺钉进行检测以观察螺钉对骨折部位的固定情况、螺钉附近骨组织结构及螺钉吸收情况。研究发现, 随着恢复时间延长, 兔活动次数增加, 活动时间增多, 直至活动正常。骨折愈合时或愈合后, 骨细胞存在动态变化。光镜和电镜观察可见骨细胞形态规则, 骨细胞的发展方向趋向正常, 无退变现象, 胞质和细胞器正常, 骨愈合的成骨阶段超微结构未受影响, 这表明所用可吸收微型螺钉与组织有很好的相容性, 兔骨折愈合中可吸收微型螺钉随降解而下降的力学强度完全可以满足兔骨折愈合要求。与标准螺钉相比, 术后 2 周、4 周、6 周、8 周、13 周、26 周螺钉径向膨胀、纵向收缩特性突出, 从而在骨折断面产生自动加压作用。受骨痂重塑改建以及活动力线影响, 螺钉逐渐弯曲, 以适应骨骼生长需要, 促进骨折部位愈合。综上, 本实验所用可吸收微型螺钉应用方便, 安全可靠, 是一种有发展前途的可吸收内固定材料。