



黄连解毒汤对小鼠酒精性脂肪肝的预防作用

王睿林¹, 李晓娟², 白云峰¹, 王立福¹, 李 蓓², 李永纲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 研究黄连解毒汤 (HLJDT) 对小鼠酒精性肝损伤的预防作用, 为黄连解毒汤临床防治酒精性肝病提供实验依据。**方法** 选取 60 只 C57 小鼠随机分为空白对照组、模型对照组和 HLJDT 低、中、高剂量 (0.61、1.22、2.44 g/kg/d) 模型组, 每组各 12 只。模型组用 50% 乙醇灌胃, 同时采用 HLJDT 进行实验干预, 6 周后, 对各组小鼠的体质量、肝指数、血清生化指标以及肝脏和结肠的病理学改变进行综合对比分析。**结果** HLJDT 各剂量模型组小鼠的体重增长量均显著增加 ($P < 0.05$), 肝指数明显降低 ($P < 0.05$), 同时 HLJDT 各剂量模型组能显著降低血清 ALT、AST 和 TG 的含量 ($P < 0.05$)。病理结果显示 HLJDT 各剂量均对酒精性肝损伤有显著的改善作用, 且从低剂量到高剂量组对肠粘膜通透性具有递增的改善作用。**结论** 黄连解毒汤可显著降低肠粘膜的通透性, 对小鼠酒精性肝损伤具有一定的预防保护作用。

【关键词】 黄连解毒汤; 酒精性脂肪肝; 小鼠

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 02-0034-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.002.009

Preventive effects of Huanglian Jiedu Decoction on alcoholic fatty liver in mice

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

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

【Abstract】 Objective To study the preventive effect of a Chinese traditional medicine, Huanglian Jiedu Decoction (HLJDT), on alcoholic fatty liver in mice, and provide experimental evidence for clinical prevention and treatment of alcoholic liver disease. **Methods** Sixty healthy SPF male C57 mice were randomly divided into control group, model group and low, medium and high dose HLJDT (0.61, 1.22, 2.44 g/kg/d) groups, 12 mice in each group. The mice of model groups were given gastric gavage of 50% ethanol, combined with concomitant HLJDT intervention for 6 weeks. The mice of control group received the same volume of saline. The body weight, liver index, serum biochemical indexes were determined and histopathological changes in the liver and colon tissues were examined and analyzed at 6 weeks after the experiment. **Results** Body weight gains of the mice in all the three dose HLJDT groups were significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$), liver index and the serum ALT, AST and TG contents were significantly decreased ($P <$

【基金项目】 解放军第 302 医院院长创新基金 (YNK2013026)。

【作者简介】 王睿林 (1979 -), 男, 博士, 主治医师, 从事中西医结合治疗研究, E-mail: wr7905@163.com; 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; 李永纲 (1965 -), 男, 硕士, 主任医师, 从事传染病学研究, E-mail: lyg100039@sina.com。

0.05 for all). Histological changes in the liver of all the three dose HLJDT groups were significantly milder than those of the model control group, and also improving of the colon mucosal alterations was observed in the three dose HLJDT groups in a dose-dependent manner. **Conclusions** Huanglian Jiedu Decoction can well reduce the permeability of intestinal mucosa, and exerts certain preventive and protective effects on alcoholic liver injury in mice.

【Key words】 Huanglian Jiedu decoction; Alcoholic fatty liver; Mice

酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)是一种进行性发展且后期会严重危害身体健康甚至威胁生命的消化系统疾病。其致病因素单一而明确,主要是长期大量饮酒所造成的,但其发病机制却十分复杂^[1]。近年来酒精致肠粘膜通透性增加,肠道内毒素渗漏入血及其激活肝 Kupffer 细胞产生炎症细胞因子机制,是酒精性肝损伤机理研究的热点之一^[2,3]。而黄连解毒汤(HLJDT)是由黄连、黄柏、黄芩、栀子四味药组成的清热解毒的代表方,具有泻火解毒之功效,主治实热火毒,三焦热盛之证^[4]。目前国内研究证实黄连解毒汤具有抗内毒素、抗肝损伤、抗炎、抗氧化及降血脂等生物活性的作用^[5],但将黄连解毒汤用于干预小鼠酒精性肝损伤的研究国内外还尚未见报道。因此本实验通过黄连解毒汤对酒精性肝损伤小鼠体质量、肝指数、生化指标以及肝脏和结肠组织病理学结果的影响,来探讨黄连解毒汤对酒精性肝损伤的干预作用,以期酒精性肝病的预防和临床治疗提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选择 SPF 级 C57 小鼠,60 只,雄性,单鼠体质量为(20~22)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】。在 302 医院 SPF 级动物实验室内完成,其使用许可证【SYXK(军)2012-0010】。

1.2 实验试剂

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);黄连解毒汤颗粒由解放军 302 医院药剂室制备。

1.3 实验分组与灌胃剂量

60 只 C57 小鼠,随机分为空白对照组、模型对照组、黄连解毒汤颗粒高剂量组(2.44 g/Kg)、中剂量组(1.22 g/kg)、低剂量组(0.61 g/kg)等五组,每

组各 12 只。黄连解毒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(0.067 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。每日不同剂量模型组灌服不同剂量的黄连解毒汤,对照组采用相同剂量的生理盐水灌胃,30 min 后^[6],空白对照组灌服生理盐水,其他组灌服 50% 乙醇,剂量为 12 mL/kg,连续灌服 6 周^[7]。且根据每周体重的变化来调整黄连解毒汤和乙醇的灌胃量。

1.4 检测指标及方法

每天观察各实验组小鼠的活动情况,采血前禁食 12 h 后,经小鼠眶后静脉丛采血,离心后取血清检测各组小鼠的丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)和甘油三酯(TG)等三个生化指标。然后再迅速取各组小鼠的肝脏组织,称重,并计算其肝指数=肝质量(g)/体质量(g)×100%;同时再采集所有小鼠同一部位的肝组织和一段结肠组织,用 4% 的甲醛固定,HE 染色后,分析各组小鼠肝脏和结肠组织的病理学检测结果。

1.5 统计学方法

利用 SPSS 17.0 软件的方差分析方法对各组小鼠的检测指标进行统计学分析,以 $P < 0.05$ 为差异显著性。

2 结果

2.1 各组小鼠体重增长量、肝指数及生化指标的分析

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:与空白对照组相比,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($P < 0.05$),血清 ALT、AST 和 TG 也显著增高($P < 0.05$);而与模型对照组相比,HLJDT 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($P < 0.05$),血清 ALT、AST 和 TG 含量明显降低($P < 0.05$),其中 HLJDT 对 ALT 和 TG 含量的影响呈现出剂量依赖性(表 1)。

表 1 各组小鼠体重增长量、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 the 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)	天冬氨酸转移酶 AST (U/L)	甘油三酯 TG (mmol/L)
空白对照组 Control	5.13 ± 1.18	4.58 ± 0.45	34.33 ± 11.36	125.33 ± 31.72	0.64 ± 0.25
模型对照组 Model	1.53 ± 0.85 *	7.21 ± 0.81 *	59.60 ± 12.93 *	160.20 ± 30.10 *	0.94 ± 0.11 *
HLJDT 低剂量组 Low dose HLJDT	3.97 ± 1.07 * ^Δ	6.04 ± 0.57 * ^Δ	48.21 ± 15.71 * ^Δ	139.23 ± 25.64 ^Δ	0.76 ± 0.17 * ^Δ
HLJDT 中剂量组 Med dose HLJDT	4.58 ± 0.87 ^Δ	5.21 ± 0.49 ^Δ	40.89 ± 12.08 ^Δ	142.74 ± 20.61 * ^Δ	0.61 ± 0.25 ^Δ
HLJDT 高剂量组 High dose HLJDT	4.94 ± 1.28 ^Δ	4.98 ± 0.54 ^Δ	36.30 ± 17.15 ^Δ	126.00 ± 17.81 ^Δ	0.52 ± 0.15 ^Δ

注:与空白对照组相比 * $P < 0.05$;与模型对照组相比 ^Δ $P < 0.05$ 。
Note. * $P < 0.05$, compared with the control group; ^Δ $P < 0.05$, compared with the model group.

2.2 各组小鼠肝脏病理学分析

空白对照组小鼠的肝小叶结构清晰,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。模型对照组小鼠肝小叶界限模糊,肝细胞内有成堆的脂肪滴,呈典型的酒精性脂肪病变。而灌服黄连解毒汤各剂量模型组小鼠的脂肪变和肝细胞肿胀程度均比模型对照组明显减轻,各剂量组小鼠肝细胞均观察不到成堆的脂肪滴出现,肝小叶及汇管区未见炎症细胞浸润(图 1,见文后彩插 8)。

2.3 各组小鼠结肠病理学分析

结肠病理学结果显示:空白对照组小鼠结肠粘膜层次清晰,表面光滑、整齐,粘膜上皮和腺体结构完整,上皮细胞与固有层间紧密连结;模型对照组小鼠结肠粘膜上皮细胞脱落,上皮细胞与固有层间距显著增宽,腺体结构破坏,隐窝变浅,粘膜下层水肿;而灌服黄连解毒汤模型组从低剂量到高剂量,其肠粘膜层次较模型对照组清晰,上皮细胞与固有层间距从疏散变为紧密连结,结肠粘膜层次渐变清晰,且表面渐变整齐光滑(图 2,见文后彩插 8)。

3 讨论

酒精性肝病的发生是一个复杂的病理生理过程,涉及多种细胞(中性粒细胞、上皮细胞和 Kupffer 细胞等)和多种有害因子(内毒素、氧化应激和细胞因子等)^[8]。众所周知,内毒素(LPS)是肠道革兰阴性杆菌细胞壁的脂多糖,具有高度的免疫活性并能诱导大量炎性介质产生^[9]。研究发现乙醇可导致肠道血管通透性增加,使内毒素肠渗漏入血,转运至肝脏与 Kupffer 细胞相互作用,激活细胞内的多种细胞因子从而引起肝细胞凋亡^[10]。因此内毒素血

症和内毒素介导的肝细胞损害在酒精性肝病的发病机理中发挥了关键性作用^[11]。聂娇等^[12]也发现在小鼠酒精性肝病造模过程中肠粘膜通透性增加,从而加剧了肝脏的损伤程度。而方志红等^[13]研究发现健脾理气活血方在大鼠体内能够通过降低肠粘膜通透性,从而影响内毒素渗漏而对酒精性肝损伤发挥干预作用。而国内尚未见有关黄连解毒汤是否能够通过抑制肠粘膜通透性而发挥抗内毒素作用,从而对酒精性肝病发挥干预作用的报道。

因此本实验应用黄连解毒汤对酒精中毒小鼠干预 6 周观察其抗酒精性肝损伤的作用,各组小鼠体重增长量和肝指数以及生化指标结果显示:黄连解毒汤各剂量组结果与模型对照组相比,小鼠体重增长量显著增加($P < 0.05$),肝指数显著降低($P < 0.05$),血清 ALT、AST 和 TG 含量均显著降低($P < 0.05$),说明了黄连解毒汤能够显著改善酒精中毒小鼠的食欲,增强肠道营养吸收功能,能够显著降低血清转氨酶的浓度,具有较强的修复酒精性肝脏损伤的效应;同时黄连解毒汤各组能够显著降低血清 TG 的含量,此结果与其具有抗血脂的结果相一致^[14]。而肝脏病理学检查是判断肝脏损伤的金标准^[15],本实验肝脏病理学结果显示三种剂量的黄连解毒汤对酒精性肝损伤均具有显著地改善作用,但不具有显著的剂量依从性,与生化指标的剂量依从性不具有一致性,可能是由于肝脏病理改变与生化指标变化的灵敏度不同造成的。由于肠道革兰氏阴性杆菌多存在于大肠部位,因此本实验选择观察结肠通透性的病理学改变,结肠病理学结果显示模型对照组小鼠结肠粘膜上皮细胞与固有层间距增宽,腺体结构破坏,说明了酒精进入体内蓄积可诱

发肠粘膜的损伤,而黄连解毒汤从低剂量到高剂量对肠粘膜具有递增的改善和保护作用,可推断黄连解毒汤通过降低肠粘膜的通透性而影响了内毒素的吸收,对酒精性肝损伤出现的脂肪变性具有抑制和减缓发展的作用,从而发挥抗酒精性肝损伤的效应,而血清内毒素的测定以及黄连解毒汤对酒精性脂肪肝的其它作用机制还有待进一步深入研究和证实。

综上所述,本实验初步验证了黄连解毒汤可显著通过降低肠粘膜通透性从而可能会影响内毒素的吸收,对小鼠酒精性肝损伤具有一定的预防保护作用,为今后深入研究黄连解毒汤及其有效成分的药理学作用,以及在临床上治疗 ALD 疾病具有十分重要的意义。

参考文献:

- [1] 李爱华,赵刚. 酒精性肝病发病机制的研究进展 [J]. 吉林医学, 2010, 31(17): 2670-2672.
- [2] 郭萌,李冠民,黄清泉. 细菌内毒素研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2009, 17(5): 397-401.
- [3] 李守超,袁丁,王洪武. 肝脏免疫系统在酒精性肝损伤中的作用启示 [J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(4): 748-750.
- [4] 唐晓玲,唐敏. 黄连解毒汤临床研究进展 [J]. 实用中西医结合临床, 2010, 10(5): 90-91.
- [5] 张鹏晖,张建亭. 黄连解毒汤药理作用研究进展 [J]. 浙江中医杂志, 2012, 47(6): 458-460.
- [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] 丁晓东. 酒精性肝病肝损伤的信号通路 [J]. 肝脏, 2012, 17(4): 269-271.
- [9] Enomoto N, Takei Y, Yamashina S, et al. Anti-inflammatory strategies in alcoholic steatohepatitis [J]. Gastroenterol Hepatol, 2007, 22(Suppl1): 559.
- [10] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组. 中国酒精性肝病诊疗指南(2010 年 1 月修订) [M]. 现代医药卫生, 2011, 27(6): 801-803.
- [11] Cohen JL, Nagy LE. Pathogenesis of alcoholic liver disease: interactions between parenchymal and non-parenchymal cells [J]. Dig Dis, 2011, 12(1): 3-9.
- [12] 聂娇,李鑫,徐有青. 内毒素在酒精性肝病肠损伤中的作用 [J]. 实用肝脏病杂志, 2012, 15(3): 206-208.
- [13] 方志红,胡义扬,崔剑巍,等. 大鼠酒精性肝损伤与肠内毒素渗漏的关系及健脾理气活血方的干预作用 [J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26(9): 813-817.
- [14] 宋珏,路通,谢林,等. 黄连解毒汤抗氧化作用的血清药理学研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(4): 118-122.
- [15] 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研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2010, 20(3): 373-376.

[修回日期]2014-12-09

(上接第 29 页)

- 17(7): 633-635.
- [4] 袁丽粉,杜勤,陆平,等. 高血压合并动脉粥样硬化大鼠模型的建立 [J]. 实用医学杂志, 2011, 27(23): 4197-4199.
- [5] 秦秋华,蒋伟哲,施晓霞,等. 肾性高血压大鼠模型制备方法的改进 [J]. 广西医科大学学报, 2011, 28(5): 671-673.
- [6] 王文靖,潘毅,杨涛. 两肾一夹型高血压大鼠模型的改良及评价 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(1): 203-205.
- [7] 杨小慢,陆德琴,李贤玉. 双肾双夹大鼠肾血管性高血压模型的制作 [J]. 心脑血管病防治, 2009, 9(5): 341-343.
- [8] 刘晓宇,姚茹,吴大方. 长期高脂、高糖、高盐饮食对大鼠热和机械痛阈的影响 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2012, 17(4): 412-416.
- [9] 王海燕,肾脏病学 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2008: 1665.
- [10] 孙旭,边云飞,刘改珍,等. P-选择素对血管紧张素 II 诱导的高血压致血管重构的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2013, 11(4): 452-454.
- [11] 梁伟,丁国华,贾俊亚,等. 血管紧张素 II 灌注大鼠模型肾小球足细胞损伤观察 [J]. 实用医学杂志, 2006(5): 497-500.
- [12] Wolf G, Ritz E. Combination therapy with ACE inhibitors and angiotensin II receptor blockers to halt progression of chronic renal disease: pathophysiology and indications [J]. Kidney Int, 2005, 67: 799-812.

[修回日期]2014-12-15