

非酒精性脂肪肝大鼠瘦素水平及丹参注射液的预防作用

黄妙珍, 孙丽伟, 付珍春, 朱善济, 王祖武, 任晓华, 陈兆军

■背景资料

大部分临床和实验研究显示, Leptin在非酒精性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎、肝纤维化中表达升高。祖国医学认为脂肪肝由于长期过食肥甘酒酪之物, 长久内伤七情, 肝病之后, 造成肝胆疏泄失调, 脾失健运, 痰湿瘀浊停积胶着于肝, 致使肝络阻滞而发病, 活血祛瘀是基本法则。

黄妙珍, 孙丽伟, 付珍春, 杭州师范学院附属医院消化科 浙江省杭州市 310015
朱善济, 王祖武, 杭州师范学院形态实验室 浙江省杭州市 310036
任晓华, 陈兆军, 杭州师范学院附属医院放射免疫中心 浙江省杭州市 310015
通讯作者: 黄妙珍, 310015, 浙江省杭州市温州路126号, 杭州师范学院附属医院消化科. hmzhope@sina.com
电话: 0571-88303653
收稿日期: 2006-07-25 接受日期: 2006-08-22

Level of leptin in nonalcoholic fatty liver of rats and preventive effects of Salvia miltiorrhiza injection

Miao-Zhen Huang, Li-Wei Sun, Zhen-Chun Fu, Shan-Ji Zhu, Zu-Wu Wang, Xiao-Hua Ren, Zhao-Jun Chen

Miao-Zhen Huang, Li-Wei Sun, Zhen-Chun Fu, Department of Digestive Diseases, the Affiliated Hospital of Hangzhou Normal University, Hangzhou 310015, Zhejiang Province, China
Shan-Ji Zhu, Zu-Wu Wang, Department of Morphous Lab, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, Zhejiang Province, China
Xiao-Hua Ren, Zhao-Jun Chen, Department of Radioimmune Center, the Affiliated Hospital of Hangzhou Normal University, Hangzhou 310015, Zhejiang Province, China
Correspondence to: Miao-Zhen Huang, Department of Digestive, the Affiliated Hospital of Hangzhou Normal University, 126 Wenzhou Road, Hangzhou 310015, Zhejiang Province, China. hmzhope@sina.com
Received: 2006-07-25 Accepted: 2006-08-22

Abstract

AIM: To detect the level of leptin in the nonalcoholic fatty liver of rats and the preventive effects of Salvia miltiorrhiza (SM) injection.

METHODS: Male Sprague Dawley rats were selected randomly and given a fat-rich diet for 8 wk. The rats with fatty livers were randomly divided into model group, high-dose SM group, low-dose SM group and reduced glutathione control group. The serum level of leptin was detected by radioimmunoassay (RIA). The pathological changes in rat livers were observed.

RESULTS: The index of rat nonalcoholic fatty liver was significantly higher than that in nor-

mal rats ($3.09\% \pm 0.24\%$ vs $2.63\% \pm 0.19\%$, $t = 4.61$, $P = 0.00$), while the level of leptin was markedly lower than that in normal rats ($1.83 \pm 0.44 \mu\text{g/L}$ vs $3.04 \pm 0.55 \mu\text{g/L}$, $t = 5.08$, $P = 0.00$). The level of leptin was dramatically elevated while the fat accumulation area in rat livers was decreased after high-dose SM injection as compared with that in model rats (leptin: $2.29 \pm 0.46 \mu\text{g/L}$ vs $1.83 \pm 0.44 \mu\text{g/L}$, $t = 2.33$, $P = 0.03$; area: 1.45 ± 0.93 vs 2.40 ± 0.70 , $t = 2.60$, $P = 0.02$).

CONCLUSION: SM injection can improve fat metabolism by increasing the level of leptin.

Key Words: Nonalcoholic fatty liver; Leptin; Salvia miltiorrhiza injection; Rats

Huang MZ, Sun LW, Fu ZC, Zhu SJ, Wang ZW, Ren XH, Chen ZJ. Level of leptin in nonalcoholic fatty liver of rats and preventive effects of Salvia miltiorrhiza injection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(29):2876-2879

摘要

目的: 探讨脂肪肝大鼠瘦素水平的变化及丹参注射液的影响。

方法: ♂ SD大鼠随机分为5组, 其中1组为正常组, 服用普通饲料, ip生理盐水; 余4组用高脂饲料建立脂肪肝模型后, 随机分为模型组、大剂量治疗组、小剂量治疗组、对照组, 分别ip生理盐水、大、小剂量丹参注射液、古拉啉溶液。8 wk后取血处死大鼠, 测定血清瘦素等, 观察脂肪肝病理变化。

结果: 脂肪肝模型大鼠肝指数较正常组升高 ($3.09\% \pm 0.24\%$ vs $2.63\% \pm 0.19\%$, $t = 4.61$, $P = 0.00$), 而血清瘦素水平较正常组低下 ($1.83 \pm 0.44 \mu\text{g/L}$ vs $3.04 \pm 0.55 \mu\text{g/L}$, $t = 5.08$, $P = 0.00$), 大剂量丹参注射液提高模型组大鼠血清瘦素水平 ($2.29 \pm 0.46 \mu\text{g/L}$ vs $1.83 \pm 0.44 \mu\text{g/L}$, $t = 2.33$, $P = 0.03$)。大剂量丹参治疗后脂肪肝大鼠肝组织脂肪沉着面积减少 (1.45 ± 0.93 vs 2.40 ± 0.70 , $t = 2.60$, $P = 0.02$)。

结论: 丹参注射液改善脂肪代谢可能通过提高瘦素水平而实现。

关键词: 脂肪肝; 瘦素; 丹参注射液; 大鼠

黄妙珍, 孙丽伟, 付珍春, 朱善济, 王祖武, 任晓华, 陈兆军. 非酒精性脂肪肝大鼠瘦素水平及丹参注射液的预防作用. 世界华人消化杂志 2006;14(29):2876-2879

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2876.asp>

0 引言

随着经济的发展和水平的提高, 非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver, NAFL)的发病率在发达国家乃至发展中国家均达到相当高的水平. 脂肪肝与其他慢性肝病一样可通过细胞因子、肝星状细胞的激活机制进展为脂肪性肝炎、肝纤维化, 是隐源性肝硬化的重要原因. 一旦发展为肝硬化, 其预后与一般的门脉性肝硬化相同^[1]. 脂质代谢异常是脂肪肝发生、发展的主要特征. NAFL除饮食控制、体育锻炼外, 发展到一定程度需要药物治疗, 相比于西药, 中医中药治疗具有明显优势. 根据脂肪肝多有血瘀的特点, 本实验选择具有活血祛瘀的丹参注射液, 从NAFL的瘦素(leptin)水平进行实验研究.

1 材料和方法

1.1 材料 SD大鼠60只, ♂, 清洁级, 体质量180-220 g. 由浙江省实验动物中心提供, 大鼠分笼喂养. 大鼠正常喂养1 wk后随机分为5组. 胆固醇为河南郑州生物技术有限公司产品, 胆盐为杭州微生物试剂厂产品. 丹参注射液由正大青春宝药业有限公司提供, 注射用还原型谷胱甘肽钠由积华药业有限公司提供, 瘦素试剂盒购自北方生物技术研究所.

1.2 方法

1.2.1 造模方法 造模方法参考文献[2]. 第1组为正常饮食对照组(正常组), 食普通饲料; 第2-5组为脂肪肝组(食高脂饲料, 即基础饲料77.5%, 猪油8%, 胆固醇4%, 胆盐0.5%, 蛋黄粉10%, 饲料加工成粉末状有利于服用和吸收). 其中第2组为高脂饮食组(模型组); 第3, 4组为丹参注射液治疗大、小剂量治疗组(治疗组); 第5组为为还原型谷胱甘肽对照组(对照组).

1.2.2 给药方法 治疗组大鼠每天丹参注射液3.3 mL/kg ip(用生理盐水稀释至5 mL, 按5 mL/kg注射, 以成人60 kg用20 mL计算, 剂量相当于成人20倍)、1.65 mL/kg ip(用生理盐水稀释至5 mL, 按5 mL/kg注射, 剂量相当于成人10倍); 对照组每天还原型谷胱甘肽溶液10 mL/kg ip(0.2 g溶于5 mL生理盐水, 按5 mL/kg注射, 以成

表1 肝小叶内脂肪沉着判断标准

结果	计分	肝小叶内含脂滴细胞数/总细胞数比值
-	0	偶见或无
+	1	<1/3
++	2	1/3-2/3
+++	3	>2/3

人60 kg用1.2 g计算, 剂量相当于成人20倍); 正常组和模型组ip等量生理盐水, 连续8 wk.

1.2.3 观察指标及测定方法 实验期间每周称体质量1次, 观察食欲行为、粪便、毛发及动物死亡情况. 第8周后各大鼠禁食不禁水16 h, 腹腔动脉取血, 按常规制备血清, 处死大鼠, 取出肝脏, 观察肝脏外观, 称湿质量, 在同一部位剪取肝脏, 用40 g/L的甲醛固定, 观察病理变化. 放射免疫法测定血清leptin, 按试剂盒规范操作. 脂肪肝变性程度参考文献[3], 肝小叶内脂肪沉着判断标准见表1.

统计学处理 应用SPSS 10.0统计软件包进行统计, 计量资料mean±SD表示, 各组间均数的比较采用t检验.

2 结果

2.1 一般情况 实验期间各组大鼠活动度及毛发变化不大, 大便正常. 实验结束有效动物数分别为10, 10, 11, 11, 8只. 高脂饮食大鼠第3周开始体质量上升较正常组大鼠缓慢而实验结束肝湿质量增加. 肉眼观正常组肝表面颜色普遍暗红, 色泽鲜亮, 中等硬度, 切面略有颗粒感, 无油腻感. 模型组大鼠多数肝脏表面颜色发黄, 肝脏体积明显增大, 包膜紧张, 部分肝脏呈奶黄色, 切面油腻, 有油滴, 无颗粒感. 大剂量治疗组大鼠肝脏较正常组偏大, 大部分颜色红润, 个别淡黄色, 切面略有颗粒感, 无油腻感. 小剂量治疗组和对照组大鼠部分肝脏肥厚, 红黄相间, 个别大鼠切面油腻, 有油滴. 肝湿质量及肝指数(肝湿质量/体质量×100%)变化见表2.

2.2 各组大鼠血清leptin变化 实验结果显示, 各脂肪肝大鼠血清leptin水平反较正常组低下($P<0.05$), 模型组下降更明显($P<0.01$), 用大剂量药物治疗后血清leptin水平提高($P<0.05$), 具体见表2.

2.3 各组大鼠肝组织病理变化 镜下见肝小叶基本清楚, 中央静脉明显. 肝细胞脂肪变出现在小叶周围. 脂肪空泡可分为中小两种, 少见大泡.

■应用要点

本实验结果提示leptin在非酒精性脂肪性肝中表达低下, 中药丹参注射液有提高leptin的作用, 这为我们对瘦素的认识和中药的应用提供了新的内容.

■同行评价

本文探讨脂肪肝大鼠瘦素水平的变化及丹参注射液对其的影响,有一定临床应用前景.

表 2 各组大鼠肝湿质量、肝指数、血清leptin及肝组织病理变化(mean ± SD)

分组	n	大鼠体质量 (g)	肝湿质量 (g)	肝指数 (%)	leptin (μg/L)	肝脂肪细胞沉着面积计分
正常组	10	415.00 ± 44.33	10.94 ± 1.66	2.63 ± 0.19	3.04 ± 0.55	0
模型组	10	382.70 ± 16.17 ^a	11.82 ± 1.21	3.09 ± 0.24 ^b	1.83 ± 0.44 ^b	2.4 ± 0.70 ^b
大剂量治疗组	11	370.36 ± 39.95 ^a	11.07 ± 1.67	2.99 ± 0.30 ^b	2.29 ± 0.46 ^{bc}	1.45 ± 0.93 ^{bc}
小剂量治疗组	11	375.27 ± 34.57 ^a	12.17 ± 1.80	3.23 ± 0.27 ^b	1.83 ± 0.64 ^b	1.73 ± 1.19 ^b
对照组	8	373.38 ± 31.90 ^a	11.83 ± 1.42	3.17 ± 0.23 ^b	1.95 ± 0.42 ^b	2.13 ± 0.99 ^b

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 正常组; ^cP<0.05 vs 模型组.

肝细胞因脂肪变而肿大,同时也由于肝细胞水肿(与脂肪空泡同时出现于同一肝细胞)而呈空泡状,肝血窦常狭窄、闭塞.汇管区常见少量炎症细胞浸润,主要为单核和淋巴细胞.小叶内炎症细胞不多见,主要也为单核和淋巴细胞,罕见有中性白细胞.肝细胞内有坏死灶出现,多少不一,量少者常可看到正常肝血窦.结果提示模型组肝脂肪沉着面积明显,大剂量丹参治疗后沉着面积减少(表2).

3 讨论

正常肝脏的脂质含量为4%-7%,其中甘油三酯占一半.当某些致病因子使这种调控系统受损,输入肝脏的脂质及游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)过多而肝脏脂蛋白合成代谢发生障碍,FFA氧化又不足时,脂肪就会在肝脏沉积,发生脂肪肝.leptin属于蛋白质激素,主要由脂肪细胞产生,最初发现其参与机体代谢调节,控制机体脂肪量.leptin又称脂肪抑制素,在正常机体中,作为减肥激素,在保持体质量和体脂稳定方面起重要作用.但临床观察大部分显示leptin在NAFL、肥胖、非酒精性脂肪性肝炎患者中血清水平升高^[4-6];少数文献报道leptin与人类非酒精性脂肪性肝病、非酒精性脂肪性肝炎无关或低下^[7-9].动物实验均提示leptin在NAFL、肝纤维化、非酒精性脂肪性肝炎中表达增高,在促进炎症、促进肝纤维化中起主要作用^[10-12].本研究显示leptin在NAFL大鼠模型中表达低下,表2提示脂肪肝模型大鼠虽然肝湿质量和肝指数上升,但总体质量并未升高,反而较正常组降低,这可能由于脂肪肝大鼠因脂肪代谢紊乱,营养物质吸收利用障碍所致.leptin能利用脂肪,若脂肪利用障碍,则易在局部堆积,由于脂肪肝大鼠leptin水平低下,以致不能充分代谢脂肪,出现肝指数升高.这可能为NAFL的预防、诊断和治疗提供新

的途径.

祖国医学认为脂肪肝由于长期过食肥甘酒酪之物,长久内伤七情,肝病之后,造成肝胆疏泄失调,脾失健运,痰湿瘀浊停积胶着于肝,致使肝络阻滞而发病.活血祛瘀是基本法则.丹参为唇形科多年生草本植物丹参*Salvia miltiorrhiza Bge.*的根,是活血化瘀的代表药.实验研究显示,丹参具有抑制炎症反应,减轻肝细胞的变性坏死,促进肝细胞的再生,清除对肝脏有害的自由基,改善和加强肝脏的微循环,增加和加强肝内血管床的数量和质量,减轻瘀血缺血状态,减低脂质的过氧化反应^[13-15].还原型谷胱甘肽为天然的活性物质,为各种肝病治疗的基础用药,他可直接补充肝病患者内源性谷胱甘肽的缺乏,调节体内瘦素和肿瘤坏死因子等表达,防御动物脂肪性肝炎的肝损伤达^[16-17].本实验研究显示,丹参注射液在降低肝指数、改善脂肪沉着、提高瘦素水平方面优于还原型谷胱甘肽.丹参注射液改善症状可能通过提高leptin水平、改善脂质代谢而实现.

4 参考文献

- 1 James O, Day C. Non-alcoholic steatohepatitis: another disease of affluence. *Lancet* 1999; 353: 1634-1636
- 2 钟岚, 范建高, 王国良, 吴伟清, 史祺. 肥胖、高脂血症性脂肪性肝炎模型的建立. *实验动物科学与管理* 2000; 17: 16-20
- 3 Diehl AM, Goodman Z, Ishak KG. Alcohollike liver disease in nonalcoholics. A clinical and histologic comparison with alcohol-induced liver injury. *Gastroenterology* 1988; 95: 1056-1062
- 4 Pagano C, Soardo G, Pilon C, Milocco C, Basan L, Milan G, Donnini D, Faggian D, Mussap M, Plebani M, Avellini C, Federspil G, Sechi LA, Vettor R. Increased serum resistin in nonalcoholic fatty liver disease is related to liver disease severity and not to insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 1081-1086
- 5 Valtuena S, Numeroso F, Ardigo D, Pedrazzoni M, Franzini L, Piatti PM, Monti L, Zavaroni I. Relation-

- ship between leptin, insulin, body composition and liver steatosis in non-diabetic moderate drinkers with normal transaminase levels. *Eur J Endocrinol* 2005; 153: 283-290
- 6 Javor ED, Ghany MG, Cochran EK, Oral EA, DePaoli AM, Premkumar A, Kleiner DE, Gorden P. Leptin reverses nonalcoholic steatohepatitis in patients with severe lipodystrophy. *Hepatology* 2005; 41: 753-760
 - 7 Angulo P, Alba LM, Petrovic LM, Adams LA, Lindor KD, Jensen MD. Leptin, insulin resistance, and liver fibrosis in human nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2004; 41: 943-949
 - 8 Chalasani N, Crabb DW, Cummings OW, Kwo PY, Asghar A, Pandya PK, Conside RV. Does leptin play a role in the pathogenesis of human nonalcoholic steatohepatitis? *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 2771-2776
 - 9 Liangpunsakul S, Chalasani N. Relationship between unexplained elevations in alanine aminotransferase and serum leptin in U.S. adults: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Clin Gastroenterol* 2004; 38: 891-897
 - 10 Balasubramanian V, Nalini N. Effect of hyperleptinaemia on chronic ethanol-induced hepatotoxicity in mice. *Fundam Clin Pharmacol* 2006; 20: 129-136
 - 11 Gauthier MS, Favier R, Lavoie JM. Time course of the development of non-alcoholic hepatic steatosis in response to high-fat diet-induced obesity in rats. *Br J Nutr* 2006; 95: 273-281
 - 12 赵文霞, 段荣章, 苗明三, 李建国, 叶放. 赤芍对大鼠脂肪肝模型胰岛素抵抗及瘦素影响的实验研究. *四川中医* 2005; 23: 33-34
 - 13 赵浩亮, 武小勇, 李士骏, 陈孝平, 裘法祖. 氧自由基在肝脏保存再灌注损伤中的作用及丹参的保护作用. *中华实验外科杂志* 2000; 17: 237-238
 - 14 丁钢, 王宝仁, 陈乐明. 丹参素、熊去氧胆酸、辛伐他汀对脂肪肝鼠肝脏功能的影响. *江苏医药* 2005; 31: 787-789
 - 15 叶龙彬, 奚涛, 陈峰, 王瑜. 丹参酮 II A 对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用. *中国药科大学学报* 2004; 35: 267-270
 - 16 余小虎, 朱金水, 邱夏地, 顾国妹. 还原型谷胱甘肽对酒精性肝炎患者血清TNF- α 、瘦素的影响. *实用肝脏病杂志* 2005; 8: 140-142
 - 17 Oz HS, Im HJ, Chen TS, de Villiers WJ, McClain CJ. Glutathione-enhancing agents protect against steatohepatitis in a dietary model. *J Biochem Mol Toxicol* 2006; 20: 39-47

电编 张敏 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

中国学术期刊综合引证报告(2006)

本刊讯 根据《中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)》2005年6182种统计刊源析出的214万条中国期刊引文数据库及CNKI“中国期刊网”中心网站2005-01/12全文下载记录(1.5亿篇次)的大样本数据统计分析得到:世界华人消化杂志[标准刊号: ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R; 类目名称: 医药科学\临床科学\呼吸及消化系统疾病(YK5.2.3)]总被引频次为2471, 影响因子为0.661, 5年影响因子为0.644, 即年指标为0.079, 他引总引比为0.73, 被引期刊数为491, 被引半衰期为4.6, 2005载文量为768, 基金论文比为0.44, Web即年下载率为0.6. [中国学术期刊(光盘版)电子杂志社; 中国科学文献计量评价研究中心].