

# 藏药柳茶提取物对非酒精性脂肪肝病大鼠肝脏脂肪代谢的影响

马晓燕, 王晶宇, 卢岩松, 田青山, 夏苗, 刘昕

马晓燕, 王晶宇, 夏苗, 刘昕, 兰州大学基础医学院病理生理学研究所 甘肃省兰州市 730000

卢岩松, 田青山, 青海省人民医院外科 青海省西宁市 810000  
马晓燕, 兰州大学基础医学院病理生理学在读硕士, 主要从事临床病理生理学研究。

国家首届大学生创新计划基金资助项目, No. 860014

甘肃省中药管理局科技攻关基金资助项目, No. GZK-2008-20  
作者贡献分布: 本研究由马晓燕、王晶宇、夏苗及刘昕共同设计; 实验流程操作由马晓燕、王晶宇及夏苗完成; 数据分析由卢岩松与田青山完成; 本论文写作由马晓燕、夏苗、卢岩松及刘昕完成。

通讯作者: 刘昕, 教授, 730000, 甘肃省兰州市, 兰州大学基础医学院病理生理学研究所。liux@lzu.cn

电话: 0931-4585593

收稿日期: 2010-07-07 修回日期: 2010-08-09

接受日期: 2010-08-17 在线出版日期: 2010-09-18

## Effects of Liucha extract on liver lipid metabolism in rats with nonalcoholic fatty liver disease

Xiao-Yan Ma, Jing-Yu Wang, Yan-Song Lu,  
Qing-Shan Tian, Miao Xia, Xin Liu

Xiao-Yan Ma, Jing-Yu Wang, Miao Xia, Xin Liu, Department of Pathophysiology, Preclinical Medical College, Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China  
Yan-Song Lu, Qing-Shan Tian, Department of Surgery, Qinghai Provincial People's Hospital, Xining 810000, Qinghai Province, China

Supported by: the National University Student Innovative Program of China, No. 860014; and the Key Science and Technology Program of Gansu Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine, No. GZK-2008-20

Correspondence to: Professor Xin Liu, Department of Pathophysiology, Preclinical Medical College, Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China. liux@lzu.cn

Received: 2010-07-07 Revised: 2010-08-13

Accepted: 2010-08-17 Published online: 2010-09-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect of Liucha extract on liver lipid metabolism in rats with nonalcoholic fatty liver disease.

**METHODS:** A rat model of nonalcoholic fatty liver disease was established by feeding rats a high-fat diet for 6 wk. The model rats were divided randomly into four groups: model group and low-, medium- and high-dosage treatment

groups. The treatment groups were intragastrically given different doses of Liucha extract for 8 wk. A normal control group was also run. All rats were killed at week 8. Liver function parameters (ALT, AST) and the contents of fat (CHOL, TG) in liver homogenate were examined. Hepatic morphological changes were observed under a light microscope. The expression of PPAR $\alpha$  and ACO mRNAs and PPAR $\alpha$  protein was measured by RT-PCR and Western blot, respectively.

**RESULTS:** Compared with the model group, liver function was improved in the treatment groups. The levels of ALT and AST were significant lower in the low- and medium-dosage treatment groups than in the model group (29.83 mmol/L  $\pm$  2.78 mmol/L and 25.78 mmol/L  $\pm$  2.63 mmol/L vs 31.90 mmol/L  $\pm$  2.52 mmol/L; 110.53 mmol/L  $\pm$  12.33 mmol/L and 100.45 mmol/L  $\pm$  12.57 mmol/L vs 128.61 mmol/L  $\pm$  16.01 mmol/L; all  $P < 0.05$  or 0.01). The contents of CHOL and TG in liver homogenate were significantly lower in the medium-dosage treatment group than in the model group (0.30 mmol/L  $\pm$  0.02 mmol/L vs 0.47 mmol/L  $\pm$  0.04 mmol/L, 0.75 mmol/L  $\pm$  0.06 mmol/L vs 0.85 mmol/L  $\pm$  0.04 mmol/L, both  $P < 0.01$  or 0.05). Hepatic morphological changes were improved in the treatment groups, particularly prominent in the medium-dosage treatment group. Compared with the model group, the expression of PPAR $\alpha$  and ACO mRNAs was up-regulated in the medium- and high-dosage treatment groups (both  $P < 0.01$ ). In addition, Liucha extract up-regulated the expression of PPAR $\alpha$  protein in a dosage-dependent manner.

**CONCLUSION:** Liucha extract could up-regulate the mRNA expression of PPAR $\alpha$  and ACO, enhance the synthesis of PPAR $\alpha$  protein, promote liver lipid oxidation, and improve liver function in rats with nonalcoholic fatty liver disease.

**Key Words:** Liucha extract; Rat; Nonalcoholic fatty liver disease

## ■背景资料

非酒精性脂肪性肝病是一种与脂肪代谢紊乱相关的常见病, 亚太地区发病率高达20%-30%, 从早期单纯性脂肪肝最终可形成肝硬化甚至肝癌, 严重影响着人们的生活质量和社会经济发展。

## ■同行评议者

李康, 副教授, 广东药学院药科学院药物分析教研室

## ■ 研发前沿

非酒精性脂肪性肝病的治疗关系到生活方式、饮食结构,他以药物治疗改善症状及防治并发症为重点,但生活方式及饮食结构的改变与整个社会的工业化有很大关系,因此,现在治疗NAFLD仍主要依靠药物治疗.中药因其多靶点、不良反应小、肝脏负担轻的优点备受青睐.

Ma XY, Wang JY, Lu YS, Tian QS, Xia M, Liu X. Effects of Liucha extract on liver lipid metabolism in rats with non-alcoholic fatty liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(26): 2739-2744

## 摘要

**目的:** 研究柳茶提取物对非酒精性脂肪肝病大鼠肝脏脂肪代谢的影响.

**方法:** 高脂饲料饲养SD大鼠, 6 wk后建立非酒精性脂肪肝病模型. 随机分为4组: 模型组、柳茶提取物低、中、高剂量组, 另设正常对照组. 分别给相应干预8 wk后处死, 测血丙氨酸转氨酶(ALT)、天门冬氨酸转氨酶(AST)水平及肝匀浆脂肪含量; 制作肝组织切片在光镜下观察形态变化; 实时荧光定量RT-PCR法测肝脏脂肪代谢关键酶PPAR $\alpha$ 、ACO mRNA表达量, Western blot检测PPAR $\alpha$ 蛋白表达水平.

**结果:** 与模型组相比, 柳茶提取物各剂量组肝功能有不同程度好转, 与模型组比较, 柳茶提取物低、中剂量组ALT、AST水平均明显降低, 有统计学差异( $29.83 \text{ mmol/L} \pm 2.78 \text{ mmol/L}$ ,  $25.78 \text{ mmol/L} \pm 2.63 \text{ mmol/L}$  vs  $31.90 \text{ mmol/L} \pm 2.52 \text{ mmol/L}$ ;  $110.53 \text{ mmol/L} \pm 12.33 \text{ mmol/L}$ ,  $100.45 \text{ mmol/L} \pm 12.57 \text{ mmol/L}$  vs  $128.61 \text{ mmol/L} \pm 16.01 \text{ mmol/L}$ ,  $P < 0.05$ 或 $0.01$ ); 肝匀浆中柳茶提取物中剂量组胆固醇(CHOL)及三酰甘油(TG)含量均较模型组明显下降, 差异具有统计学意义( $0.30 \text{ mmol/L} \pm 0.02 \text{ mmol/L}$  vs  $0.47 \text{ mmol/L} \pm 0.04 \text{ mmol/L}$ ,  $0.75 \text{ mmol/L} \pm 0.06 \text{ mmol/L}$  vs  $0.85 \text{ mmol/L} \pm 0.04 \text{ mmol/L}$ ,  $P < 0.01$ 或 $0.05$ ). 肝细胞形态学改善以柳茶提取物中剂量组表现最为显著, 肝细胞内脂滴消失, 无炎性细胞浸润及细胞坏死, 胞质疏松, 肝窦增宽; 与模型组相比, 柳茶提取物中、高剂量组PPAR $\alpha$ 、ACO mRNA表达量增加(均 $P < 0.01$ ); 柳茶组PPAR $\alpha$ 蛋白与模型组相比有不同程度的增加, 且与柳茶剂量呈正相关, 剂量越大, PPAR $\alpha$ 蛋白的表达量也越大.

**结论:** 柳茶提取物可上调脂肪代谢关键酶PPAR $\alpha$ 、ACO mRNA水平, 促进PPAR $\alpha$ 蛋白合成, 增强非酒精性脂肪肝病大鼠肝脏脂肪酸氧化, 改善肝功能.

**关键词:** 柳茶提取物; 大鼠; 非酒精性脂肪肝病

马晓燕, 王晶宇, 卢岩松, 田青山, 夏苗, 刘昕. 藏药柳茶提取物对非酒精性脂肪肝病大鼠肝脏脂肪代谢的影响. *世界华人消化杂志* 2010; 18(26): 2739-2744

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2739.asp>

## 0 引言

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)以肝细胞大泡性脂肪变为特征, 是一个从单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎到肝硬化乃至肝癌的病理过程<sup>[1-4]</sup>, 超质量或肥胖可成为其诱因<sup>[5,6]</sup>. 许多研究结果显示NAFLD患者存在明显的脂代谢紊乱和胰岛素抵抗<sup>[7-9]</sup>及内脏脂肪的相对增高, 细胞凋亡在其发病中有正负双向调节作用<sup>[10-12]</sup>. 肝脏脂质代谢是一个复杂的过程, 肝细胞中脂肪合成和排出不平衡是形成脂肪肝的主要原因. 高山植物柳茶分布于青海、四川、云南、甘肃等省, 以蔷薇科植物窄叶鲜卑花[Sibiraea. angustata (Rchd.) Hand-Mazz]的嫩枝及叶入药, 民间用于治疗消化不良、胃脘胀痛等病症. 研究证明该药具有调节机体脂肪代谢的功效<sup>[13,14]</sup>. 本实验观察了柳茶干预后NAFLD大鼠肝功能、肝细胞形态及脂质成分的变化, 以验证柳茶的治疗作用, 同时检测肝脏脂肪代谢关键酶过氧化物酶体增殖物激活受体 $\alpha$ (peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$ , PPAR $\alpha$ )、酰基辅酶A氧化酶(Acyl-CoA oxidase, ACO)mRNA水平及PPAR $\alpha$ 蛋白的表达, 以探讨其作用机制.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 清洁级SD幼鼠60只, 体重80-90 g, 雌雄各半, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供. 优质藏药柳茶, 采自甘肃省甘南地区, 醇沉水法提取后制成浸膏. 临用时以生理盐水配成水溶液. Olympus AU5400全自动生化分析仪; Biophotometer生物分光光度计(德国Eppendorf); S•HH•W<sub>21</sub> 600三用电热恒温水浴箱(上海跃进); BP 121 S电子天平; GeneAmp PCR System 2400(美国PE公司); Rotor gene 3000荧光定量PCR仪(澳洲Corbett); DYY-8C电泳仪(北京六一); DHG-9070A电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏); TGL-16G冷冻离心机(上海安亭); Forma-86C ULT Freezer(美国Thermo); DY89-I型电动玻璃匀浆机(宁波新芝); XW-80型旋涡混合器(上海); 153 BR65516蛋白转膜仪; 552BR034248蛋白电泳仪(美国Bio-Rad); BCD-181D美菱无氟冰箱; UV Transilluminator FL310生物机能实验系统(索尼); X-I型暗盒(河南蔚光). TRIzol总RNA提取试剂及TIANScript cDNA合成试剂盒购自北京天根生化科技公司; TaKaRa Ex Taq HS购自大连宝生物工程有限公司; Hot Start Fluorescent

PCR Core Kit购自BBI公司产品; RIPA蛋白裂解液及BCA蛋白定量试剂盒购自武汉博士德公司; PPAR $\alpha$ 兔抗大鼠多克隆抗体为美国Abcam产品;  $\beta$ -actin兔抗大鼠多克隆抗体及羊抗兔IgG抗体为北京博奥康公司产品. PCR引物由上海生工生物工程技术有限公司合成.

## 1.2 方法

1.2.1 动物造模和分组: 所有大鼠分笼饲养于温度 $20\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、湿度36%-43%的动物房内, 每笼2只, 自由饮水. 随机取10只大鼠作为正常对照组, 以普通饲料(兰州大学实验动物中心提供)饲养, 其余以高脂饲料(含普通饲料70%, 蛋黄粉12%, 猪油10%, 酪蛋白7%, 胆盐0.3%, 食盐0.2%, 酵母粉0.5%)不限量饲养. 6 wk后高脂大鼠平均体重360 g, 高于正常组20%, 随机取其中3只做肝脏病理切片, 镜下均见轻度脂肪变, 证明造模成功. 遂以随机数字表法将剩余动物分为非酒精性脂肪肝病模型组、柳茶提取物低、中、高剂量组, 分别以生理盐水4 mL/d, 柳茶提取物1.05 g/(kg·d), 柳茶提取物2.1 g/(kg·d)和柳茶提取物4.2 g/(kg·d)灌胃(柳茶提取物于4 mL生理盐水中充分搅拌溶解), 正常对照组以生理盐水4 mL/d灌胃, 持续8 wk.

1.2.2 柳茶提取物制备: 柳茶经兰州大学药学院药用植物研究所鉴定, 依次用石油醚、乙醚除去脂溶性杂质; 加10倍量的水 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 提取3次; 合并水提液, 过滤;  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴减压浓缩至适量, 加入5倍量95%的乙醇纯析, 静置过夜, 离心过滤, 置真空冷冻干燥得柳茶粗提物<sup>[15,16]</sup>.

1.2.3 样本制备及检测: (1)肝功能检测: 取大鼠股动脉血5 mL,  $3\ 000\text{ r/min}$ 离心3 min, 测上清液丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)水平. (2)肝匀浆脂肪含量测定: 取肝组织0.15 g, 加1.5 mL生理盐水, 冰浴下制成10%肝匀浆,  $3\ 000\text{ r/min}$ 离心15 min, 取上清液测胆固醇(cholesterol, CHOL)、三酰甘油(triacylglycerol, TG)含量. (3)肝组织形态学检测: 取肝右叶中部组织以40 g/L甲醛固定, 石蜡包埋, 制成4  $\mu\text{m}$ 切片, HE染色, 光镜下观察肝组织形态学变化. (4)PPAR $\alpha$ 、ACO mRNA表达的检测: 取肝右叶中部组织约0.1 g, 以TRIzol提取总RNA, 0.1%无RNase水100  $\mu\text{L}$ 溶解. 取1  $\mu\text{L}$  RNA样品, 加99  $\mu\text{L}$ 无RNase水, 生物分光光度计测 $A_{260}$ 、 $A_{280}$ , 计算RNA浓度. 按TIANScript cDNA合成试剂盒说明取1  $\mu\text{L}$ (4  $\mu\text{g}$ )RNA样品, 逆转录为cDNA,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

保存. 按TaKaRa Ex Taq HS试剂说明, 取cDNA 0.5  $\mu\text{L}$ , 上下游引物各0.4  $\mu\text{mol/L}$ , Taq酶12.5  $\mu\text{L}$ , 补ddH $_2\text{O}$ 至总体积25  $\mu\text{L}$ , 以普通PCR测各组大鼠PPAR $\alpha$ 、ACO引物特异性, 其反应参数为 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性3 min,  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min, 30个循环取PCR反应产物电泳, 测各目的基因引物特异性. 电泳条件: TBE电泳缓冲液, 1.9%琼脂糖凝胶, 恒压110 V, 30 min. 然后采用SYBR Green实时荧光定量PCR法, 按试剂盒说明设置反应参数:  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性4 min,  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s, 40个循环, 测各基因mRNA的表达. 每个样本设3个平行. 熔解曲线程序:  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  45 s,  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  5 s, 从 $67\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 自动绘制熔解曲线图. (5)PPAR $\alpha$ 蛋白表达水平检测: 按BCA蛋白定量试剂盒说明配制BCA定量工作液, 稀释标准品, 分光光度计测 $A_{562}$ , 绘制标准曲线. 取肝组织0.3 g加入3 mL RIPE裂解液及1 mmol/L PMSE, 冰浴下以电动匀浆器充分裂解,  $12\ 000\text{ r/min}$ 离心5 min; 取上清液加BCA工作液,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 min后测 $A_{562}$ , 计算蛋白浓度; 余以溴酚蓝上样缓冲液稀释5倍,  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性5 min,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存. 取各组蛋白各60  $\mu\text{g}$ 于SDS-PAGE电泳缓冲液中电泳(5%浓缩胶80 V, 12%分离胶100 V)3 h, 100 V恒压转膜1 h, 5% TBST脱脂奶粉封闭1 h后稀释一抗,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床杂交过夜, 0.05% TBST洗涤2次, 每次5 min; TBS洗涤5 min, 同法杂交二抗2 h后洗涤, ECL发光液室温孵育3 min后X片曝光显影, 扫描图片.

**统计学处理** 实验结果以SPSS11.0软件处理, 数据用mean $\pm$ SD表示. 组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA).  $P<0.05$ 表示差异有统计学意义.

## 2 结果

2.1 肝功能检测 脂肪肝模型组ALT、AST较正常对照组均有显著升高( $P<0.05$ ); 给予柳茶干预后, 与模型组比较, 柳茶提取物低、中剂量组ALT、AST水平均明显降低, 有统计学差异( $P<0.05$ 或0.01), 柳茶提取物高剂量组则无明显差异(表1).

2.2 肝脂检测 脂肪肝模型组肝匀浆CHOL、TG较正常对照组均有显著上升( $P<0.05$ ); 经柳茶干预后, 肝匀浆中柳茶提取物中剂量组CHOL及TG含量均较模型组明显下降, 差异具有统计学意义( $P<0.01$ 或0.05, 表1).

2.3 肝脏病理改变 切片光镜下可见正常对照组肝细胞形态大小均匀一致, 中央静脉周围无炎

### ■创新盘点

本文以过氧化物酶体脂肪酸氧化相关基因的表达与肝脏形态功能的变化为重点研究对象, 同时讨论了疾病过程中氧化与抗氧化之间的动态平衡.

## ■应用要点

非酒精性脂肪性肝病在发展中国家发病率颇高,而藏药柳茶在西北地区资源丰富,提取加工方法已成熟,有望在这一多发病的早期治疗中发挥独到的作用。

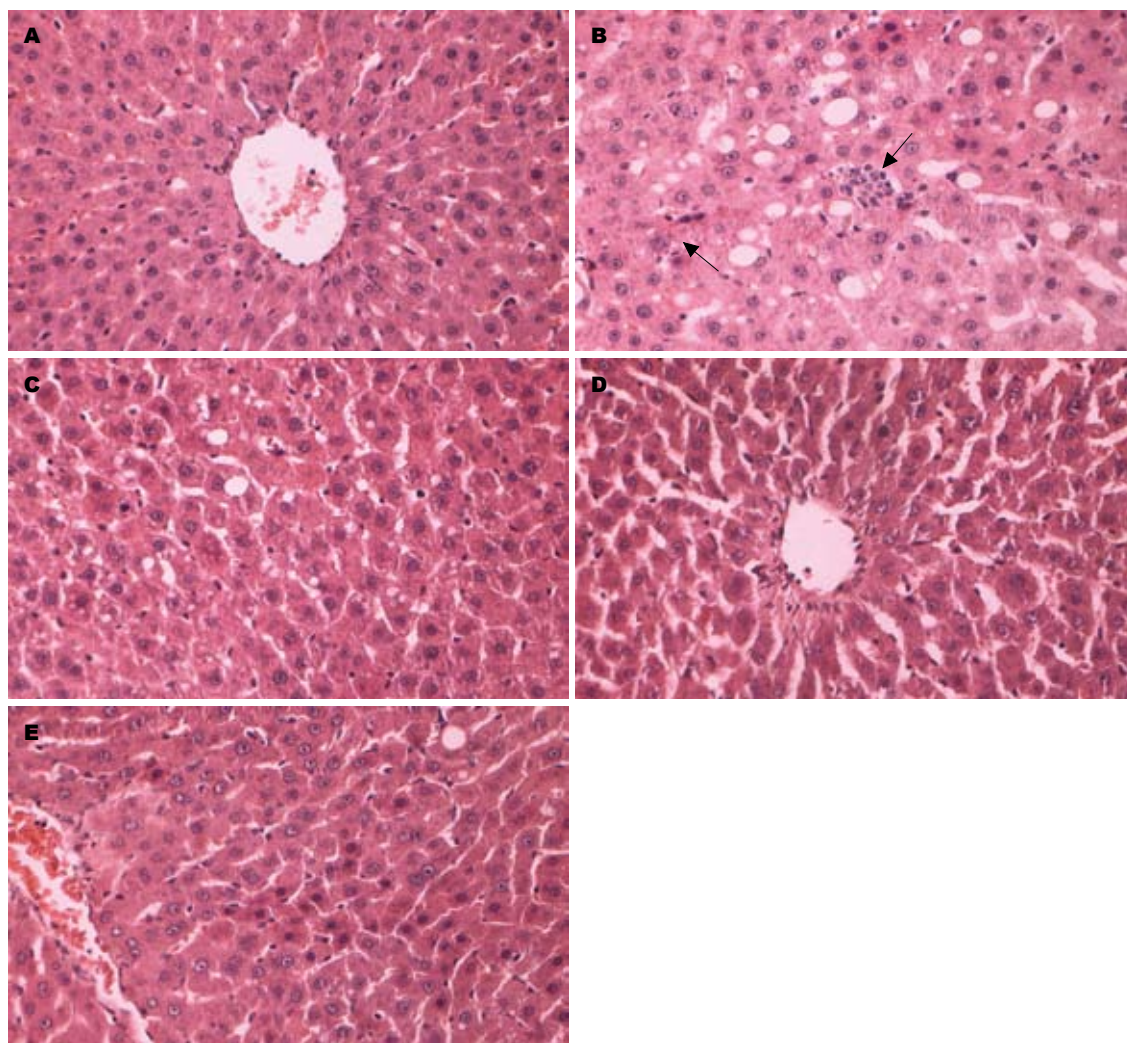


图1 肝组织形态学的变化(×400). A: 正常对照组; B: 模型组; C: 柳茶提取物低剂量组; D: 柳茶提取物中剂量组; E: 柳茶提取物高剂量组。

表1 各组大鼠血清中ALT、AST水平和肝组织匀浆中CHOL和TG水平的变化 (mean ± SD, mmol/L)

分组	ALT	AST	CHOL	TG
正常对照组	25.16 ± 2.32	109.72 ± 15.83	0.35 ± 0.05	0.69 ± 0.03
模型组	31.90 ± 2.52 <sup>a</sup>	128.61 ± 16.01 <sup>a</sup>	0.47 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.85 ± 0.04 <sup>a</sup>
柳茶提取物低剂量组	29.83 ± 2.78 <sup>c</sup>	110.53 ± 12.33 <sup>c</sup>	0.35 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.77 ± 0.02
柳茶提取物中剂量组	25.78 ± 2.63 <sup>d</sup>	100.45 ± 12.57 <sup>d</sup>	0.30 ± 0.02 <sup>d</sup>	0.75 ± 0.06 <sup>c</sup>
柳茶提取物高剂量组	30.62 ± 7.69	121.72 ± 26.67	0.33 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.77 ± 0.10

<sup>a</sup>P<0.05 vs 正常对照组; <sup>c</sup>P<0.05, <sup>d</sup>P<0.01 vs 模型组。

性细胞浸润(图1A)。非酒精性脂肪肝模型组肝细胞发生脂肪变,胞质内见大量脂滴,以大泡性为主,肝细胞浊肿,染色较淡,可见点状坏死,周围炎性细胞浸润,肝窦狭窄(图1B)。柳茶提取物低剂量组肝细胞内脂滴减少,以大、小泡性混杂为主,炎性细胞浸润减轻,肝细胞仍有点状坏死(图1C)。柳茶提取物中剂量组肝细胞内脂滴消

失,无炎性细胞浸润及细胞坏死,胞质疏松,肝窦增宽(图1D)。柳茶提取物高剂量组肝细胞脂肪变减轻,无炎性细胞浸润,但肝细胞发生广泛嗜酸性变(图1E)。

2.4 PPAR $\alpha$ 、ACO mRNA表达的检测 琼脂糖凝胶电泳示各基因扩增为单一条带,大小与预计相符,PPAR $\alpha$ 、ACO、 $\beta$ -actin分别为350、



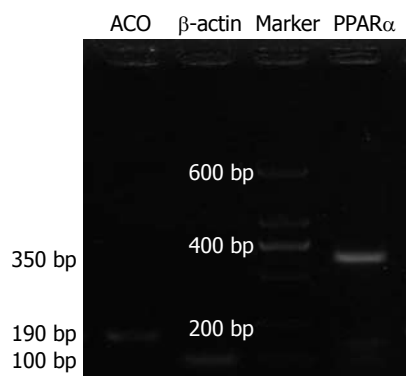


图2 RT-PCR示PPAR $\alpha$ 、ACO、 $\beta$ -actin扩增产物。

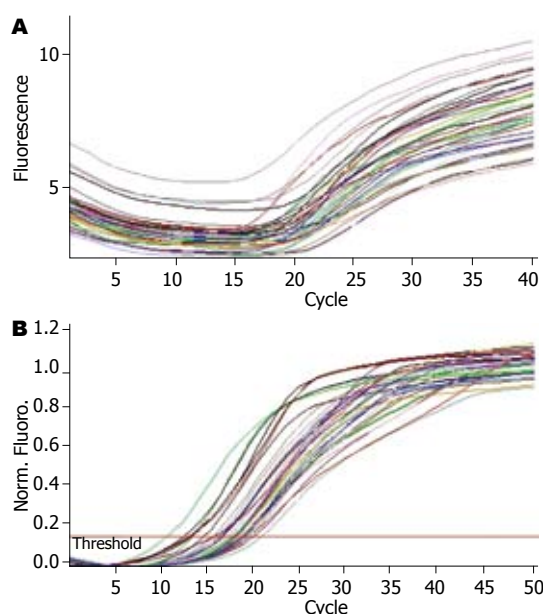


图3 SYBR Green实时荧光定量PCR扩增曲线。

190、100 bp(图2); SYBR Green实时荧光定量PCR扩增曲线平滑, 各基因均有明显的指数扩增期(图3)。设正常对照组各基因mRNA表达量为1, 模型组PPAR $\alpha$  mRNA表达量为其 $1.64 \pm 0.61$ 倍, ACO mRNA表达量为其 $1.10 \pm 0.17$ 倍。柳茶提取物低、中、高剂量组PPAR $\alpha$  mRNA表达量分别为正常对照组的 $3.05 \pm 0.94$ 倍、 $16.97 \pm 0.21$ 倍、 $19.91 \pm 3.70$ 倍, 与模型组相比, 中、高剂量组差异显著( $P < 0.01$ ), 低剂量组差异无统计学意义。ACO mRNA的表达量分别为正常对照组的 $5.12 \pm 0.50$ 倍、 $6.83 \pm 1.37$ 倍、 $16.67 \pm 1.86$ 倍, 与模型组相比, 中、高剂量组差异显著( $P < 0.01$ ), 低剂量组差异无统计学意义(图4)。

**2.5 Western blot检测PPAR $\alpha$ 蛋白表达** 柳茶组PPAR $\alpha$ 蛋白表达量与模型组相比有不同程度的增加, 且与柳茶剂量呈正相关, 剂量越大, PPAR $\alpha$ 蛋白的表达量也越大(图5)。

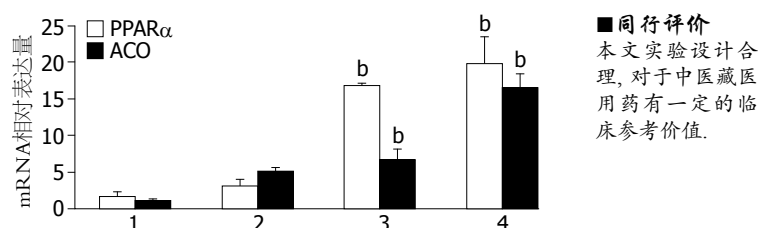


图4 PPAR $\alpha$ 、ACO mRNA相对表达量。1: 模型组; 2: 柳茶低剂量组; 3: 柳茶中剂量组; 4: 柳茶高剂量组。<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 模型组。

**同行评价**  
本文实验设计合理, 对于中医藏医用药有一定的临床参考价值。

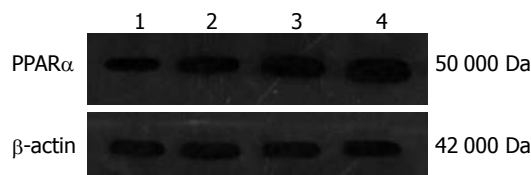


图5 Western blot示PPAR $\alpha$ 蛋白的表达。1: 模型组; 2: 柳茶低剂量组; 3: 柳茶中剂量组; 4: 柳茶高剂量组。

### 3 讨论

近年来, 随着生活水平的提高, NAFLD逐渐成为一种常见病、多发病, 仅亚太地区其发病率即高达20%-30%, 严重影响着人们的生活质量。在临床上他表现为一个渐进性发展过程, 从早期单纯性脂肪肝发展至脂肪性肝炎, 最终可形成肝硬化甚至肝癌, 治疗需兼顾改变生活方式、饮食结构、药物治疗改善症状及防治并发症<sup>[17-19]</sup>, 早期诊断和早期治疗尤为重要。实验通过摄食高脂饲料构建了NAFLD动物模型, 循环中大量增多的游离脂肪酸经门静脉入肝, 使肝脏脂代谢负担加重而氧化不足, 同时由于饮食结构的不平衡使载脂蛋白合成减少, 脂肪输出障碍而沉积于肝脏, 镜下可见肝细胞脂肪变, 肝组织匀浆脂肪含量增加。脂肪的蓄积, 尤其是线粒体内的脂肪蓄积可通过TNF- $\alpha$ 导致肝细胞损伤, ALT、AST等释放入血, 肝功能下降。实验以藏药柳茶作为干预措施, 观察了柳茶提取物干预后动物血中ALT、AST的含量、肝细胞形态结构及肝组织脂质水平的变化, 论证了该药对NAFLD早期病变的影响。

PPAR $\alpha$ 在脂肪酸的氧化过程中处于中心地位, 主要表达于肝脏, 能够被其配体如脂肪酸或氯贝特类降脂药活化, 活化后的PPAR $\alpha$ 与X受体形成二聚体, 结合到具有PPAR $\alpha$ 反应元件的下游基因的启动区诱导其表达。这些下游基因范围很广, 其中包括过氧化物酶体脂肪酸氧化限速酶ACO和微粒体脂肪酸- $\omega$ 羟基化关键酶CYP4A1<sup>[20,21]</sup>。实验检测了大鼠肝脏脂肪酸氧化关

键酶PPAR $\alpha$ 、ACO mRNA及PPAR $\alpha$ 蛋白表达的变化,发现经柳茶作用后NAFLD动物PPAR $\alpha$ 、ACO表达增强,加强了过氧化物酶体 $\beta$ 氧化作用,使用于TG、CHOL合成的底物减少,因而肝匀浆脂质含量下降,细胞内脂滴变小或消失.随着细胞损害减轻,肝功能改善,血ALT、AST含量降低.脂质沉积的减少与肝功能的改善可互为因果形成良性循环<sup>[22]</sup>.同时,PPAR $\alpha$ 活化引起的ACO、CYP4A1表达上调又可成为活性氧簇ROS的重要来源,使肝细胞遭到氧化损害,这也许可以解释柳茶提取物高剂量组PPAR $\alpha$ 表达增强的同时,肝细胞脂肪化减轻而又出现嗜酸性变,肝功能改善不如低、中剂量组明显.但由于PPAR $\alpha$ 所介导的信号转导是多途径的,他又可通过增加抗氧化酶如触酶、谷氨酸S转移酶等的活性,抑制脂质过氧化以及使其次级生物效应,从另一方面缓解肝脂质沉积和肝细胞损害<sup>[23-27]</sup>.在人体内,PPAR $\alpha$ 的表达远低于啮齿类,脂质过氧化造成的肝功能受损是可以在很大程度上得以避免的<sup>[28]</sup>.

柳茶在西北地区资源丰富,其免疫调节作用和降脂作用已被证实<sup>[29]</sup>.如能在增强机体免疫功能的基础上发挥降脂护肝的功效,将在NAFLD的早期治疗、减轻肝脏脂肪代谢紊乱和肝细胞损害、阻止病程进展上具有一定的应用前景.

#### 4 参考文献

- 1 袁新明, 袁建蔚. 脂肪性肝病防治的研究进展. 世界华人消化杂志 2009; 17: 3573-3578
- 2 Qureshi K, Abrams GA. Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3540-3553
- 3 Tarantino G, Saldalamacchia G, Conca P, Arena A. Non-alcoholic fatty liver disease: further expression of the metabolic syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 293-303
- 4 钱林, 胡小宣. 非酒精性脂肪肝分子发病机制的研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16: 2848-2852
- 5 亚太地区非酒精性脂肪性肝病工作组. 非酒精性脂肪性肝病诊断与治疗推荐意见(2006年11月修订). 中华全科医师杂志 2007; 6: 229-230
- 6 范建高. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南. 临床肝胆病杂志 2010; 26: 120-124
- 7 蔡葵, 何玉怡. 非酒精性脂肪肝与脂代谢紊乱及胰岛素抵抗的关系. 江西医学检验 2006; 24: 335-336
- 8 刘迎利, 闫自强. 脂代谢异常与脂肪肝相关性分析. 实用医技杂志 2004; 11: 496-497
- 9 Choi SS, Diehl AM. Hepatic triglyceride synthesis and nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Lipidol* 2008; 19: 295-300
- 10 陈少东, 胡义扬. 非酒精性脂肪性肝病与肝细胞凋亡调控机制的研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16: 1327-1331
- 11 李鹏, 李昌平. 细胞凋亡在非酒精性脂肪性肝病中的作用. 世界华人消化杂志 2008; 16: 2253-2258
- 12 Zanone MM, Burchio S, Quadri R, Pietropaolo M, Sacchetti C, Rabbone I, Chiandussi L, Cerutti F, Peakman M. Autonomic function and autoantibodies to autonomic nervous structures, glutamic acid decarboxylase and islet tyrosine phosphatase in adolescent patients with IDDM. *J Neuroimmunol* 1998; 87: 1-10
- 13 汪晓立, 郭继明, 杨兵勋. 柳茶调节脂类代谢作用的研究. 中草药 1995; 26: 473-475, 504
- 14 王佳冰, 柴成奎, 陈平, 李兴梅, 夏苗, 马小燕, 刘昕. 藏药柳茶提取物对单纯性肥胖大鼠脂质代谢的影响. 中药新药与临床药理 2010; 21: 148-149, 176
- 15 段博文, 李运, 刘昕, 杨永建. 柳茶多糖对小鼠免疫功能的影响. 中国中药杂志 2010; 35: 1466-1469
- 16 石磊, 张冬梅, 齐洁, 李建银, 杨永建. 柳茶多糖的分离纯化及气相色谱-质谱分析. 时珍国医国药 2009; 20: 2191-2192
- 17 范建高. 脂肪性肝病的治疗现状及展望. 药品评价 2007; 4: 65-67
- 18 范建高. 非酒精性脂肪性肝病的自然史及其诊治对策. 中国实用内科杂志 2009; 29: 393-395
- 19 范建高, 蔡晓波. 亚太地区非酒精性脂肪性肝病诊断与治疗共识简介. 药品评价 2007; 4: 80-81
- 20 Ng VY, Huang Y, Reddy LM, Falck JR, Lin ET, Kroetz DL. Cytochrome P450 eicosanoids are activators of peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Drug Metab Dispos* 2007; 35: 1126-1134
- 21 Yeon JE, Choi KM, Baik SH, Kim KO, Lim HJ, Park KH, Kim JY, Park JJ, Kim JS, Bak YT, Byun KS, Lee CH. Reduced expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha may have an important role in the development of non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 799-804
- 22 田艳, 范竹萍, 邱德凯, 丁佳, 刘俊平, 高艳敏. 脂肪变性对肝细胞胆固醇代谢的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16: 1031-1036
- 23 尹蓉, 王沁, 富翠芹. 姜黄素对酒精诱导的大鼠脂质过氧化反应的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16: 1383-1387
- 24 Duplus E, Forest C. Is there a single mechanism for fatty acid regulation of gene transcription? *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 893-901
- 25 Gonzalez FJ, Shah YM. PPARalpha: mechanism of species differences and hepatocarcinogenesis of peroxisome proliferators. *Toxicology* 2008; 246: 2-8
- 26 徐磊, 厉有名. 过氧化物酶体增殖物激活受体 $\alpha$ 在脂肪性肝病发病机制中的作用. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 715-717
- 27 Nishimura J, Dewa Y, Okamura T, Murguruma M, Jin M, Saegusa Y, Umemura T, Mitsumori K. Possible involvement of oxidative stress in fenofibrate-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Arch Toxicol* 2008; 82: 641-654
- 28 Kane CD, Francone OL, Stevens KA. Differential regulation of the cynomolgus, human, and rat acyl-CoA oxidase promoters by PPARalpha. *Gene* 2006; 380: 84-94
- 29 雒戛, 刘昕. 柳茶对荷瘤小鼠脾淋巴细胞产生IL-2和TNF- $\alpha$ 的影响. 中药药理与临床 2007; 23: 42-43

编辑 曹丽鸥 电编 何基才