

茵陈蒿汤改善酒精性肝病大鼠肝脏及小肠病变的组织病理学研究

王磊 王惠娟 吴凯 胡冬青

【摘要】 **目的** 观察茵陈蒿汤对酒精性肝病大鼠肝脏及小肠组织病理的改善作用。**方法** 采用“白酒-吡唑-植物油”混合灌胃法制备大鼠酒精性肝病模型,成模后分别以茵陈蒿汤与双歧杆菌三联活菌胶囊(商品名:培菲康)灌胃治疗 2 周,观察肝与小肠组织病理学改变,测定各组大鼠血清丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase,ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase,AST)、谷氨酰转肽酶(glutamyltranspetidase,GGT)活性及白蛋白(albumin,ALB)浓度,测定各组大鼠肝组织羟脯氨酸(hydroxyproline,Hyp)含量。**结果** 与空白组比较,模型大鼠肝组织出现显著的肝纤维化及肝细胞脂肪变性,小肠绒毛出现明显缺损,腺体萎缩,伴炎细胞浸润,模型大鼠肝组织 Hyp 含量及血清 GGT 活性显著高于空白组($P<0.01$),血清 ALB 浓度显著低于空白组($P<0.01$),但血清 ALT 及 AST 活性与空白组无显著差异($P>0.05$);与模型组比较,茵陈蒿汤组大鼠肝纤维化及肝细胞脂肪变性明显减轻,小肠绒毛较完整,腺体排列较规则,肝组织 Hyp 含量及血清 GGT 活性显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);双歧杆菌组大鼠小肠黏膜损伤显著减轻,但肝组织病理改善不明显,肝组织 Hyp 含量与模型大鼠无显著差异($P>0.05$)。**结论** 茵陈蒿汤能够有效减轻酒精性肝病大鼠肝纤维化与脂肪变性,同时显著改善小肠黏膜损伤。

【关键词】 茵陈蒿汤; 酒精性肝病; 肝纤维化; 肠黏膜损伤; 双歧杆菌三联活菌

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.11.014

Effect of *Yinchenhao* decoction on both hepatic and intestinal histopathology in rats with alcoholic liver disease WANG Lei, WANG Hui-juan, WU Kai, et al. Department of Hepatology, the affiliated hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250011, China

Corresponding author: WANG Lei, E-mail: wanglei.2006@126.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of *Yinchenhao* decoction on both hepatic and intestinal histopathology in rats with alcoholic liver disease. **Methods** Rats model with alcoholic liver disease was established by “Liquor - pyrazole - vegetable oil” mixture gavaging for 12 weeks. After 2 weeks treatment with either *Yinchenhao* decoction or Bifidobacterium, Lactobacillus and Enterococcus Capsules (Bilico), histopathological observation of hepatic and intestinal lesions were conducted by microscopy and serum activities of Alanine aminotransferase (ALT), Aspartate aminotransferase (AST), Glutamyltranspetidase (GGT), ALB concentration and hepatic hydroxyproline (Hyp) content were detected. **Results** Compared to the control group, the model rats showed significant hepatic fibrosis and steatosis accompanied by shorter and sparsely arranged intestinal villi, glandular atrophy and inflammatory cell infiltration. The content of Hyp and activity of serum GGT of model rats was significantly higher than that of the control group ($P<0.01$), while the concentration of serum ALB was significantly lower than the control group ($P<0.01$). However, there was no significant difference in serum ALT and AST activity between the control group and the model group ($P>0.05$). Compared to the model group, hepatic fibrosis

基金项目: 山东省中医药科技发展计划(2007-060);山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(BS2009YY021)

作者单位: 250011 济南,山东中医药大学附属医院肝病科(王磊、胡冬青),病理科(吴凯);山东中医药大学第二临床学院消化内科(王惠娟)

作者简介: 王磊(1973-),博士,副主任医师。研究方向:中医药防治慢性肝病。E-mail: wanglei.2006@126.com

and steatosis in *Yinchenhao* decoction-treated group were significantly reduced with more complete intestinal villi, more regular arranged submucosal glands as well as significantly decreased content of hepatic Hyp and serum GGT activity ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Bilico-treated groups showed obvious improvement only in intestinal mucosal injuries, not in hepatic histopathology and Hyp content. **Conclusions** *Yinchenhao* decoction can effectively alleviate hepatic fibrosis and steatosis as well as the intestinal mucosal injury in rats with alcoholic liver disease.

【Key Words】 *Yinchenhao* decoction; Alcoholic liver disease; Liver fibrosis; Intestinal mucosal injury; Bifidobacterium, Lactobacillus and Enterococcus Capsules

酒精性肝病是由于长期大量饮酒所致的肝脏疾病,初期通常表现为脂肪肝,进而可发展成酒精性肝炎、酒精性肝纤维化和酒精性肝硬化^[1]。长期酒精摄入不仅造成肝细胞损伤,还能破坏肠上皮屏障,使肠道通透性增加,导致肠源性内毒素血症,进一步加重肝损伤^[2]。茵陈蒿汤是中医清利湿热的代表方剂,也是现代中医临床治疗酒精性肝病的常用方剂,本文从病理形态学角度探讨茵陈蒿汤对酒精性肝病大鼠肝脏及小肠组织病理的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 健康雄性 Wistar 大鼠, SPF 级, 体质量(180±15)g, 购自山东大学实验动物中心, 动物合格证号: SCXK(鲁)20090001。于山东中医药大学附属医院中心实验室饲养, 普通颗粒饲料喂养, 自由进食和饮水。动物实验室条件: 温度: (25±2)℃, 湿度: 50%~75%。

1.1.2 材料与试剂 56 度鑫帝牌北京二锅头白酒(北京鑫帝酒业公司白酒分公司)、玉米油(山东三星玉米产业科技有限公司)均购自超市, 吡啶(Sigma-Aldrich 公司, 批号: BCBB5422V), 谷氨酰转肽酶(glutamyltranspetidase, GGT)检测试剂盒(南京建成生物公司, 批号: 20100117)。

1.1.3 实验药物 茵陈蒿汤(茵陈蒿 12 g、栀子 9 g、大黄 9 g)及对照药物双歧杆菌三联活菌胶囊(商品名: 培菲康, 上海信谊药厂有限公司, 以下简称双歧杆菌, 批号: 03/20100814)均购自山东中医药大学附属医院, 茵陈蒿汤由山东中医药大学附属药剂科制备成水煎灭菌溶液备用, 双歧杆菌三联活菌胶囊临用前制备混悬液。

1.2 模型制备

大鼠适应性饲养 1 周后随机分为 2 组: 空白对照组(6 只)与模型组(44 只), 模型组采用改良的白酒—吡啶—植物油灌胃法^[3], 即: 二锅头白酒 10 mL/(kg·d)+玉米油 2 mL/(kg·d)+吡啶

25 mg/(kg·d)混合物每天灌胃 1 次, 共 12 周。于实验第 8 周末、第 10 周末分别处死模型组大鼠各 3 只检查肝纤维化成模情况。

1.3 动物分组及干预

模型组大鼠于实验第 13 周随机分为模型对照组 7 只、茵陈蒿汤组 8 只、双歧杆菌组 7 只, 茵陈蒿汤组及双歧杆菌组灌胃量为 10 mL/(kg·d), 给药 2 周; 模型对照组按 10 mL/(kg·d)每天灌胃生理盐水 1 次。各组大鼠均灌胃 2 周。

1.4 样本采集

实验结束后, 各组大鼠按 2 mL/kg 体重剂量腹腔注射 2% 戊巴比妥钠, 麻醉后仰卧位固定, 打开腹腔, 经下腔静脉放血后摘取肝脏, 于肝右叶中部切取 1.0 cm×1.0 cm 大小肝组织 2 块, 4% 中性甲醛溶液固定 24~48 小时, 制备石蜡包埋肝组织病理切片。同时于回盲部向上 2 cm 处切取 1.5 cm 小肠, 生理盐水冲洗后沿长轴剖开, 4% 中性甲醛溶液固定, 制备石蜡包埋病理切片。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 大鼠一般情况 包括动物精神状态、活动情况、皮毛光泽度、进食量、体重等。

1.5.2 血清肝功能检测 采用全自动生化仪检测大鼠血清丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)活性及白蛋白(albumin, ALB)浓度, 手工法检测血清谷氨酰转肽酶(glutamyltranspetidase, GGT)活性。

1.5.3 肝组织羟脯氨酸(hydroxyproline, Hyp)含量检测 采用改良的 Jamall 氏方法^[4]。

1.5.4 肝组织病理学 采取两种染色方法观察大鼠肝组织病理学变化: (1) HE 染色: 主要观察肝细胞脂肪变、肝纤维化及炎细胞浸润等; (2) Masson 三色染色: 观察肝纤维化情况。

1.5.5 小肠组织病理学 HE 染色观察各组大鼠小肠组织病理学改变, 主要包括小肠绒毛缺损、黏膜下腺体排列及炎细胞浸润等。

表 1 各组大鼠血清肝功能比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	ALT(U/L)	AST(U/L)	ALB(g/L)	GGT(U/L)
空白组	6	77.8±9.9	150.2±17.6	23.9±1.3	17.38±4.71
模型组	7	103.0±53.8	170.7±69.8	19.7±1.6 ^a	60.47±16.39 ^a
茵陈蒿汤组	8	83.1±21.4	167.5±45.4	23.0±3.4 ^b	23.58±10.05 ^b
双歧杆菌组	7	90.9±29.8	160.0±53.0	24.3±1.7 ^a	55.77±19.31

注:与空白组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

1.6 统计方法

计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,数据符合正态分布,方差齐,故采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

空白组大鼠毛发光泽,体质量增加,活动自如,食量及大便正常,无死亡。模型组大鼠造模期间饮食逐渐减少,皮毛疏松无光泽,易激惹,大便稀溏,小便黄,后期体质量下降,精神不振。

2.2 各组大鼠血清 ALT、AST、GGT 活性及 ALB 含量比较

生化检测显示,各组大鼠血清 ALT、AST 活性无显著差异。与空白组比较,模型组大鼠血清 GGT 活性显著升高($P<0.01$),同时血清 ALB 浓度显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,茵陈蒿汤组大鼠血清 GGT 活性显著降低($P<0.05$),茵陈蒿汤组及双歧杆菌组大鼠血清 ALB 浓度显著升高($P<0.05$),见表 1。

2.3 各组大鼠肝组织羟脯氨酸含量比较

与空白组比较,模型组、茵陈蒿汤组、双歧杆菌组大鼠肝组织羟脯氨酸含量显著增高($P<0.01$);与模型组比较,茵陈蒿汤组大鼠肝组织羟脯氨酸含量显著降低($P<0.01$),而与双歧杆菌组之间差异无统计学意义,见表 2。

表 2 各组大鼠肝组织羟脯氨酸含量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	肝重(mg)	Hyp($\mu\text{g/g}$ 湿肝)
空白组	6	102.00±1.89	164.32±13.37
模型组	7	101.14±2.19	633.79±114.86 ^a
茵陈蒿汤组	8	100.67±2.42	485.72±64.72 ^{ab}
双歧杆菌组	7	101.17±1.60	625.80±133.35 ^a

注:与空白组比较,^a $P<0.01$,与模型组比较,^b $P<0.01$ 。

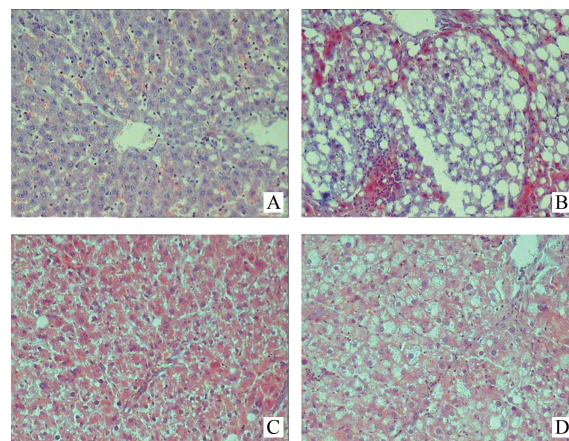
2.4 肝组织病理

HE 染色观察,空白组大鼠肝小叶结构清晰,肝

细胞索呈放射状整齐排列,肝窦无扩张,无明显炎细胞浸润。模型组大鼠肝细胞索排列紊乱,肝细胞可见明显的大泡性脂肪变性,汇管区较多炎细胞浸润,汇管区胶原纤维显著增生并向小叶内延伸,部分小叶内可见粗大的纤维间隔形成。茵陈蒿汤组大鼠肝细胞脂肪变性明显减轻,肝细胞索排列较整齐,小叶内散在肝细胞脂肪变性,汇管区及小叶内无明显的纤维间隔。双歧杆菌组大鼠肝细胞脂肪变性及纤维化较模型组有所减轻,但肝细胞索仍排列紊乱,见图 1。Masson 染色观察,正常大鼠肝组织仅在汇管区及中央静脉周围可见少量蓝色的 I 型胶原,模型大鼠肝组织有较多粗大的胶原纤维自汇管区向小叶内延伸,部分形成桥接样的纤维间隔。茵陈蒿汤组大鼠肝组织蓝色的胶原纤维较模型组明显减少,无桥接样纤维间隔;双歧杆菌组肝组织胶原纤维较为纤细,但桥接样间隔仍较明显,见图 2。

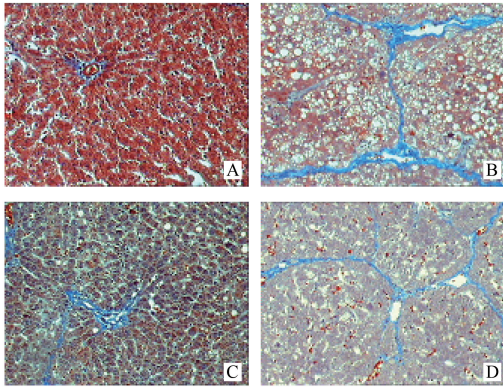
2.5 小肠病理

HE 染色观察,空白组大鼠小肠绒毛排列整齐,无缺损,黏膜下腺体大小一致,无腺体增生,无明显炎细胞浸润。模型大鼠小肠绒毛变短,排列稀疏,黏膜下腺体萎缩,伴炎细胞浸润。茵陈蒿汤组大鼠小肠绒毛较完整,缺损不明显,黏膜下腺体排列较规则。双歧杆菌组大鼠小肠绒毛排列较整齐,黏膜下腺体较规则,无明显炎细胞浸润,见图 3。



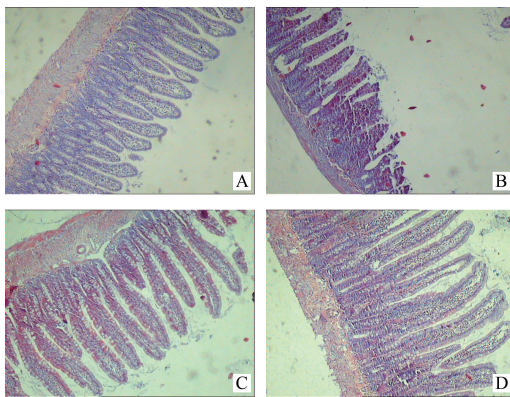
A 空白组 B 模型组 C 茵陈蒿汤组 D 双歧杆菌组

图 1 各组大鼠肝组织病理(HE×100)



A 空白组 B 模型组 C 茵陈蒿汤组 D 双歧杆菌组

图 2 各组大鼠肝组织病理 (Masson 染色×100)



A 空白组 B 模型组 C 茵陈蒿汤组 D 双歧杆菌组

图 3 各组大鼠小肠组织病理 (HE×100)

3 讨论

本研究结果显示,模型大鼠血清 GGT 活性显著升高,同时血清 ALB 浓度显著降低,但血清 ALT、AST 活性与空白组大鼠比较并无显著性差异,提示肝细胞的炎症、坏死并非该模型成模后的主要病变。预实验时发现,酒精度数较高(60°)或灌胃量较大时,大鼠血清 ALT、AST 活性可出现明显升高,但前期死亡率极高,病理检测发现肝细胞坏死明显,不会形成稳定的脂肪变及后期的肝纤维化。因此,若想提高酒精性肝病模型制备成功率,应该采用较低度数的白酒、较少灌胃量及灌胃次数、适当延长造模时间。大鼠血清 GGT 活性显著升高、同时血清 ALB 浓度显著降低提示造模较成功,单纯血清 ALT、AST 活性升高并非酒精性脂肪肝、肝纤维化的必备条件。结合肝组织病理学观察也可以发现,本模型复制的酒精性肝病突出的特点是肝细胞脂肪变伴有纤维化,小叶内的炎细胞浸润及肝细胞坏死并不明显。

本研究证实,“白酒—吡啶—植物油”混合灌胃法制备的酒精性肝病大鼠不仅存在肝脏病变,同时

还存在明显的小肠黏膜病理学改变,主要表现为小肠绒毛明显变短,排列稀疏,黏膜下腺体萎缩,伴炎细胞浸润。双歧杆菌三联活菌胶囊为复方制剂,其组份为长型双歧杆菌、嗜酸乳杆菌和粪肠球菌,主要治疗因肠道菌群失调引起的急慢性腹泻、便秘,以及辅助治疗慢性肝病内毒素血症。有研究表明,双歧杆菌三联活菌胶囊能够改善肝硬化大鼠的肝脏及小肠黏膜的组织损伤^[5],因此本研究以该药为对照药,结果发现,双歧杆菌三联活菌胶囊能够较好地改善酒精性肝病小肠损伤,与既往研究结果一致^[5-6],但双歧杆菌三联活菌胶囊对肝纤维化及肝细胞脂肪变的治疗作用不明显。

茵陈蒿汤是中医清利肝胆湿热的代表方,现代中医临床广泛用于治疗酒精性与非酒精性肝病。前期研究发现,茵陈蒿汤对大鼠肝纤维化具有较好的治疗作用^[7]。本研究首次发现,茵陈蒿汤不仅能够减轻酒精性肝病大鼠肝细胞脂肪变及肝纤维化,还能较好地改善酒精造成的小肠黏膜损伤。肝组织羟脯氨酸测定是评价肝纤维化的金标准,综合肝组织羟脯氨酸含量检测判定,茵陈蒿汤干预“白酒—吡啶—植物油”混合灌胃法制备大鼠酒精性肝病的整体疗效优于双歧杆菌三联活菌胶囊,提示茵陈蒿汤对酒精性肝病具有多环节的作用特点,通过肠道通透性、血浆内毒素等环节的动态研究,有望进一步揭示茵陈蒿汤对酒精性肝病的作用机制,明确其具体的作用靶点。

参 考 文 献

- [1] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组. 酒精性肝病诊疗指南(2010年修订版)[J]. 中华肝病杂志, 2010, 18(3):167-170.
- [2] Rao RK, Seth A, Sheth P. Recent advances in alcoholic liver disease. I. Role of intestinal permeability and endotoxemia in alcoholic liver disease [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004, 286(6):881-884.
- [3] 王磊,季光,郑培永,等. 大鼠酒精性肝纤维化复合模型的建立[J]. 中西医结合学报, 2006, 4(3):281-284.
- [4] 王磊,刘平,慕永平,等. 二甲基亚硝胺大鼠肝纤维化中医方证研究[J]. 中医杂志, 2006, 47(12):929-932.
- [5] 卜淑蕊,关志明,闫柱. 调整肠道菌群对肝硬化大鼠肝组织学的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2001, 13(2):83-84.
- [6] 范妮,田宇彬,孔心涓,等. 益生菌对肝硬化患者肠黏膜通透性的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(36):3745-3748.
- [7] 王磊,刘平,慕永平,等. 清热利湿与益气古典方剂逆转二甲基亚硝胺大鼠肝硬化的细胞生物学基础研究[J]. 自然科学进展, 2007, 17(8):1026-1035.

(收稿日期: 2014-06-27)

(本文编辑: 董历华)