

# 下瘀血汤对酒精性肝病小鼠肝脏炎症和脂肪变性的改善作用

马文婷<sup>1,2</sup>, 刘旭凌<sup>1,2</sup>, 陶乐<sup>1,2</sup>, 吴柳<sup>1,2</sup>, 杨广越<sup>3</sup>, 张玮<sup>3</sup>, 沈东晓<sup>3</sup>, 张洁<sup>1,2</sup>, 薛冬英<sup>1,2</sup>, 刘成<sup>2,3</sup>, 严萍<sup>1,2</sup> (1.上海中医药大学附属普陀医院 感染科, 上海 200062; 2.上海中医药大学附属普陀医院 肝病实验室, 上海 200062; 3.上海中医药大学附属普陀医院 中心实验室, 上海 200062)

**摘要:** **目的** 观察下瘀血汤对酒精性肝病 (alcoholic liver disease, ALD) 小鼠肝脏炎症和脂肪变性的改善作用, 初步探讨其可能的作用机制。 **方法** 将48只雄性C57BL/6小鼠随机分为对照组、对照美他多辛组、对照下瘀血汤组、酒精组、酒精美他多辛组和酒精下瘀血汤组, 每组各8只。对照组、对照美他多辛组和对照下瘀血汤组造模过程中全程给予液体对照饲料。酒精组、酒精美他多辛组和酒精下瘀血汤组采用4周慢性乙醇喂养加急性乙醇灌胃法造模, 造模第3周第1 d起, 对照下瘀血汤组和酒精下瘀血汤组小鼠以0.4678 g/kg下瘀血汤灌胃, 对照美他多辛组和酒精美他多辛组小鼠以2.857 mg/kg美他多辛灌胃。其余组小鼠以等体积蒸馏水灌胃。第32 d酒精组、酒精美他多辛组和酒精下瘀血汤组小鼠以31.5%乙醇灌胃, 对照组、对照美他多辛组、对照下瘀血汤组小鼠以45%糊精灌胃。9 h后处死小鼠, 留取静脉血和肝脏。计算各组小鼠肝体比值, 检测丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、血清甘油三酯 (triglyceride, TG) 及肝脏TG水平。采用HE染色和油红染色观察肝脏病理形态学变化。采用免疫组织化学法检测中性粒细胞标志物髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 的表达。采用实时荧光定量聚合酶链式反应 (real time polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测肝组织白细胞介素-6 (interleukin 6, IL-6)、白细胞介素1 $\beta$  (interleukin 1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 和单核细胞趋化蛋白1 (monocyte chemotactic protein 1, MCP1) mRNA的相对表达量。采用Western blot和RT-PCR检测脂肪酸合成酶 (fatty acid synthase, FAS)、肉毒碱棕榈酰基转移酶-1 $\alpha$  (carnitine palmitoyltransferase 1 $\alpha$ , CPT-1 $\alpha$ ) 和过氧化物酶体增殖激活受体 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor alpha, PPAR $\alpha$ ) 的表达。 **结果** 与对照组相比, 酒精组小鼠肝体比值[(4.78  $\pm$  0.48) % vs (3.71  $\pm$  0.36) %]、ALT [(44.71  $\pm$  25.37) U/L vs (20.41  $\pm$  7.11) U/L]、血清TG [(4.16  $\pm$  1.27) mmol/L vs (1.44  $\pm$  0.23) mmol/L]和肝脏TG [(27.15  $\pm$  6.43) mmol/g vs (10.74  $\pm$  9.83) mmol/g]均显著升高 ( $P$ 均 $<$  0.05)。与酒精组相比, 酒精美他多辛组和酒精下瘀血汤组小鼠ALT [11.79 (10.17, 24.48) U/L vs (16.76  $\pm$  1.64) U/L vs (44.71  $\pm$  25.37) U/L]、血清TG [(1.89  $\pm$  1.54) mmol/L vs 2.40 (2.39, 2.67) mmol/L vs (4.16  $\pm$  1.27) mmol/L]及肝组织TG [(14.18  $\pm$  5.88) mmol/g vs 19.77 (5.92, 20.90) mmol/g vs (27.15  $\pm$  6.43) mmol/g]水平均显著降低 ( $P$ 均 $<$  0.05), 肝体比值[(4.49  $\pm$  0.43) % vs (4.82  $\pm$  0.14) % vs (4.78  $\pm$  0.48) %]差异无统计学意义 ( $t$ 值分别为1.099、-0.165,  $P$ 值分别为0.283、0.871)。HE和油红染色提示酒精组小鼠肝组织脂肪变性明显。免疫组织化学结果表明酒精组小鼠肝脏MPO阳染较对照组显著增加。与对照组相比, 酒精组小鼠IL-6 (1.95  $\pm$  0.74 vs 1.00

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7380.2021.02.008

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81803232、81673788、81873136、81803898); 上海市卫生健康委员会卫生行业临床研究专项 (202040149); 上海市普陀区卫生系统自主创新科学基金 (ptkws201904); 普陀医院人才类项目 (培英计划2017207A)

通讯作者: 严萍 Email: yanseasea66@163.com

$\pm 0.47$ )、IL-1 $\beta$  ( $2.06 \pm 0.64$  vs  $1.00 \pm 0.26$ ) 和 MCP1 ( $2.98 \pm 1.13$  vs  $0.99 \pm 0.30$ ) 及 FAS [ $2.40 \pm 0.53$  vs  $0.916$  (0.876, 1.221)] mRNA 相对表达量均显著升高 ( $z = -2.242$ ,  $P = 0.025$ ;  $z = -3.695$ ,  $P < 0.001$ ;  $z = -2.867$ ,  $P = 0.004$ ;  $z = -3.838$ ,  $P < 0.001$ ), CPT-1 $\alpha$  ( $0.39 \pm 0.75$  vs  $1.00 \pm 0.22$ ) 和 PPAR $\alpha$  ( $0.27 \pm 0.08$  vs  $1.00 \pm 0.26$ ) mRNA 相对表达量显著降低 ( $z = -4.392$ ,  $P < 0.001$ ;  $z = -4.392$ ,  $P < 0.001$ ); 与酒精组相比, 酒精美他多辛组和酒精下瘀血汤组 IL-6 ( $1.16 \pm 0.42$  vs  $0.93 \pm 0.42$  vs  $1.95 \pm 0.74$ )、IL-1 $\beta$  ( $0.75 \pm 0.19$  vs  $0.59 \pm 0.07$  vs  $2.06 \pm 0.64$ )、MCP1 ( $1.27 \pm 0.25$  vs  $1.23 \pm 0.50$  vs  $2.98 \pm 1.13$ ) 及 FAS ( $1.41 \pm 1.05$  vs  $1.43 \pm 0.30$  vs  $2.40 \pm 0.53$ ) mRNA 相对表达量均显著降低, CPT-1 $\alpha$  [ $0.81$  (0.79, 0.81) vs  $0.72 \pm 0.14$  vs  $0.39 \pm 0.75$ ] 和 PPAR $\alpha$  ( $0.63 \pm 0.30$  vs  $0.69 \pm 0.41$  vs  $0.27 \pm 0.08$ ) mRNA 相对表达量显著升高 ( $P$  均  $< 0.05$ )。Western blot 表明, 与对照组相比, 酒精组小鼠 FAS 蛋白相对表达量 ( $0.56 \pm 0.07$  vs  $0.20 \pm 0.02$ ) 上调 ( $z = -2.309$ ,  $P = 0.021$ ), CPT-1 $\alpha$  蛋白相对表达量 ( $0.24 \pm 0.02$  vs  $1.03 \pm 0.06$ ) 和 PPAR $\alpha$  蛋白相对表达量 ( $0.17 \pm 0.01$  vs  $1.02 \pm 0.08$ ) 下调 ( $P$  均  $< 0.05$ ); 与酒精组相比, 酒精美他多辛组和酒精下瘀血汤组 FAS 蛋白相对表达量 ( $0.31 \pm 0.02$  vs  $0.29 \pm 0.04$  vs  $0.56 \pm 0.07$ ) 均显著降低, CPT-1 $\alpha$  蛋白相对表达量 ( $0.43 \pm 0.01$  vs  $0.65 \pm 0.10$  vs  $0.24 \pm 0.02$ ) 和 PPAR $\alpha$  ( $0.55 \pm 0.07$  vs  $0.39 \pm 0.04$  vs  $0.17 \pm 0.01$ ) 显著升高 ( $P$  均  $< 0.05$ )。结论 下瘀血汤可通过抑制中性粒细胞浸润及炎症反应减轻酒精引起的脂肪生成并促进脂肪酸氧化, 从而发挥保护肝脏的作用。

**关键词:** 下瘀血汤; 酒精性肝病; 炎症; 脂肪变性

### Effects of Xia-yu-xue decoction on improving liver inflammation and steatosis in mice with alcoholic liver disease

Ma Wenting<sup>1,2</sup>, Liu Xuling<sup>1,2</sup>, Tao Le<sup>1,2</sup>, Wu Liu<sup>1,2</sup>, Yang Guangyue<sup>3</sup>, Zhang Wei<sup>3</sup>, Shen Dongxiao<sup>3</sup>, Zhang Jie<sup>1,2</sup>, Xue Dongying<sup>1,2</sup>, Liu Cheng<sup>2,3</sup>, Yan Ping<sup>1,2</sup> (1. Department of Infectious Diseases, Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China; 2. Laboratory of Liver Disease, Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China; 3. Central Laboratory, Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China)

**Abstract: Objective** To observe the effects of Xia-yu-xue decoction on improving liver inflammation and steatosis in mice with alcoholic liver disease (ALD) and to investigate its possible mechanism. **Methods** A total of 48 male C57/BL6 mice were randomly divided into blank control group, control metadoxine group, control Xia-yu-xue decoction group, alcohol group, alcohol metadoxine group and alcohol Xia-yu-xue decoction group, 8 mice in each group. Mice in control group, control metadoxine group and control Xia-yu-xue decoction group were given liquid control feed throughout the process of modeling. Mice in alcohol group, alcohol metadoxine group and alcohol Xia-yu-xue decoction group were fed with ethanol liquid diet for 4 weeks and gavaged with alcohol. From the 1st day of the 3rd week, mice in control Xia-yu-xue decoction group and the alcohol Xia-yu-xue decoction group were given 0.4678 g/kg of Xia-yu-xue decoction by gavage, mice in control metadoxine group and alcohol metadoxine group were given 2.857 mg/kg of metadoxine by gavage. Mice in other groups were given equal volume of distilled water by gavage. On the 32nd day, mice in alcohol group, alcohol metadoxine group and alcohol Xia-yu-xue decoction group were given 31.5% ethanol by gavage, while mice in control group, control metadoxine group and control Xia-yu-xue decoction group were given 45% dextrin. Then the mice were sacrificed

9 hours later, and venous blood and liver were collected. The ratio of liver to body weight was calculated and levels of serum alanine aminotransferase (ALT), triglyceride (TG) and liver TG contents were detected. The pathological changes of liver were observed by HE staining and oil red staining. Immunohistochemical method was used to detect the expression of myeloperoxidase (MPO), which was a marker of neutrophils in liver tissue. Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect mRNA relative expression levels of interleukin 6 (IL-6), interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and monocytes monocyte chemotactic protein 1 (MCP1) in liver tissue. The expression of fatty acid synthase (FAS), carnitine palmitoyltransferase 1 $\alpha$  (CPT-1 $\alpha$ ) and peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR $\alpha$ ) were detected by RT-PCR and Western blot. **Results** Compared with those of control group, the ratio of liver to body weight [(4.78  $\pm$  0.48)% vs (3.71  $\pm$  0.36)%], the levels of serum ALT [(44.71  $\pm$  25.37) U/L vs (20.41  $\pm$  7.11) U/L], TG [(4.16  $\pm$  1.27) mmol/L vs (1.44  $\pm$  0.23) mmol/L] and liver TG [(27.15  $\pm$  6.43) mmol/g vs (10.74  $\pm$  9.83) mmol/g] of mice in alcohol group increased significantly (all  $P < 0.05$ ). Compared with those of alcohol group, the serum ALT [11.79 (10.17, 24.48) U/L vs (16.76  $\pm$  1.64) U/L vs (44.71  $\pm$  25.37) U/L], serum TG [(1.89  $\pm$  1.54) mmol/L vs 2.40 (2.39, 2.67) mmol/L vs (4.16  $\pm$  1.27) mmol/L] and liver TG [(14.18  $\pm$  5.88) mmol/g vs 19.77 (5.92, 20.90) mmol/g vs (27.15  $\pm$  6.43) mmol/g] levels of mice in alcohol metadoxine group and alcohol Xia-yu-xue decoction group decreased significantly (all  $P < 0.05$ ); there were no significant differences in the ratio of liver to body weight of mice in the three groups [(4.49  $\pm$  0.43)% vs (4.82  $\pm$  0.14)% vs (4.78  $\pm$  0.48)%;  $t = 1.099, -0.165, P = 0.283, 0.871$ ]. HE staining and oil red staining showed that liver fatty degeneration of mice in alcohol group was obvious. The immunohistochemical results showed that the positive staining of MPO of mice in alcohol group was significantly higher than that of control group. Compared with those of control group, mRNA relative expression of IL-6 (1.95  $\pm$  0.74 vs 1.00  $\pm$  0.47), IL-1 $\beta$  (2.06  $\pm$  0.64 vs 1.00  $\pm$  0.26), MCP1 (2.98  $\pm$  1.13 vs 0.99  $\pm$  0.30) and FAS [2.40  $\pm$  0.53 vs 0.916 (0.876, 1.221)] of mice in alcohol group increased significantly ( $z = -2.242, P = 0.025$ ;  $z = -3.695, P < 0.001$ ;  $z = -2.867, P = 0.004$ ;  $z = -3.838, P < 0.001$ ), mRNA relative expression of CPT-1 $\alpha$  (0.39  $\pm$  0.75 vs 1.00  $\pm$  0.22) and PPAR $\alpha$  (0.27  $\pm$  0.08 vs 1.00  $\pm$  0.26) decreased significantly ( $z = -4.392, P < 0.001$ ;  $z = -4.392, P < 0.001$ ). Compared with those of alcohol group, mRNA relative expression of IL-6 (1.16  $\pm$  0.42 vs 0.93  $\pm$  0.42 vs 1.95  $\pm$  0.74), IL-1 $\beta$  (0.75  $\pm$  0.19 vs 0.59  $\pm$  0.07 vs 2.06  $\pm$  0.64), MCP1 (1.27  $\pm$  0.25 vs 1.23  $\pm$  0.50 vs 2.98  $\pm$  1.13) and FAS (1.41  $\pm$  1.05 vs 1.43  $\pm$  0.30 vs 2.40  $\pm$  0.53) of mice in alcohol metadoxine group and alcohol Xia-yu-xue decoction group decreased significantly, mRNA relative expression of CPT-1 $\alpha$  [0.81 (0.79, 0.81) vs 0.72  $\pm$  0.14 vs 0.39  $\pm$  0.75] and PPAR $\alpha$  (0.63  $\pm$  0.30 vs 0.69  $\pm$  0.41 vs 0.27  $\pm$  0.08) increased significantly (all  $P < 0.05$ ). Western blot showed that the FAS protein relative expression up-regulated significantly (0.56  $\pm$  0.07 vs 0.20  $\pm$  0.02;  $z = -2.309, P = 0.021$ ), whereas CPT-1 protein relative expression (0.24  $\pm$  0.02 vs 1.03  $\pm$  0.06) and PPAR $\alpha$  protein relative expression (0.17  $\pm$  0.01 vs 1.02  $\pm$  0.08) decreased significantly of mice in alcohol group compared with those in control group (all  $P < 0.05$ ). Compared with those of alcohol group, FAS protein relative expression of mice in alcohol metadoxine group and alcohol Xia-yu-xue decoction group decreased significantly (0.31  $\pm$  0.02 vs 0.29  $\pm$  0.04 vs 0.56  $\pm$  0.07), protein relative expression of CPT-1 $\alpha$  (0.43  $\pm$  0.01 vs 0.65  $\pm$  0.10 vs 0.24  $\pm$  0.02) and PPAR $\alpha$  (0.55  $\pm$  0.07 vs 0.39  $\pm$  0.04 vs 0.17  $\pm$  0.01) increased significantly (all  $P < 0.05$ ). **Conclusions** Xia-yu-xue decoction can reduce alcohol-induced lipogenesis

and promote fatty acid oxidation by inhibiting neutrophil infiltration and inflammatory reaction, thus playing a protective role in liver.

**Key words:** Xia-yu-xue decoction; Alcoholic liver disease; Inflammation; Steatosis

酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)是因长期大量饮酒导致的肝脏疾病,其病理变化主要表现为单纯性脂肪性肝病、酒精性肝炎、酒精性肝纤维化和肝硬化<sup>[1-3]</sup>。流行病学调查表明,我国饮酒人群比例及ALD发病率均呈上升趋势,ALD已成为我国继病毒性肝病后最主要的慢性肝病之一<sup>[4,5]</sup>。在全球范围内,ALD占肝脏疾病负担的近一半,从2005年到2015年,酒精相关肝硬化和肝癌的发病率分别为9.8%和22.1%<sup>[6]</sup>。中药治疗ALD的主要原则为:实则解酒毒、清湿热、祛痰浊,活血祛瘀、行气导滞;虚则滋肝肾、温脾阳<sup>[7]</sup>,治疗效果较好。下瘀血汤出自《金匮要略》,由大黄、桃仁、地鳖虫组成,主要用于肝硬化的治疗,具有活血逐瘀之功效。有研究表明,下瘀血汤可减轻四氯化碳诱导的肝纤维化,且对胆碱氨基酸缺乏诱导的小鼠非酒精性脂肪性肝炎有抑制作用<sup>[8,9]</sup>。但下瘀血汤对ALD的作用尚无报道,本研究首次通过动物实验验证下瘀血汤对ALD的防治作用及可能的作用机制,以期今后应用中医药手段防治ALD提供依据。

## 1 资料与方法

**1.1 实验动物** 清洁级C57BL/6小鼠48只,雄性,8~10周龄,体质量( $20 \pm 2$ )g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,使用许可证号:SYXK(沪)2018-0032,饲养于上海中医药大学附属普陀医院动物中心。小鼠自由进食、饮水,每笼3~4只,适应环境1周后开始实验。所有实验动物相关操作均经过上海中医药大学附属普陀医院实验动物使用和管理委员会批准。

**1.2 主要仪器** 天平(北京赛多利斯科学仪器公司,型号:SQP QNINTIX313-1CN)、离心机(Eppendorf公司,型号:Eppendorf Centrifuge 5804/5804R)、全自动脱水机(Lecia公司,型号:TP1020)、包埋机(Leica公司,型号:EG1150)、半自动轮转式切片机(Leica公司,型号:RM2235)、全自动染色机(Leica公司,型号:ST5010)、全自动玻璃盖片机(Leica公司,型号:CV5030)、冰冻切片机(Leica公司,型号:CM1950)、超声波细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所,型号:JY92-II)、超微量分光光度计(Berthold Detection Systems,型号:colibri)、普

通PCR仪(Bio-RAD公司,型号:T100)、实时荧光定量PCR仪(ABI公司,型号:VIA 7 DX)、荧光显微镜(Olympus公司,型号:BX43)、电泳仪(Bio-Rad, PowerPacTM Basic 041BR127719)、化学发光凝胶成像分析系统(上海培清科技有限公司,JS-1060)。

**1.3 实验饲料与药物** 饲料购自南通特洛菲饲料科技有限公司,分为对照液体饲料(货号:TP-4030B)和酒精液体饲料(货号:TP-4030C),临用前参照说明书配制。下瘀血汤所含的大黄、桃仁、地鳖虫均购自上海华宇药业有限公司。下瘀血汤由上海中医药大学附属曙光医院一次性制备后冷冻保存。制备方法:取大黄2.0 kg、桃仁2.0 kg、地鳖虫1.2 kg,制成粗粉末后分别加8倍量20%乙醇浸泡1 h,混合后加20%乙醇回流提取30 min,过滤后收集滤液;药渣再加6倍量20%乙醇回流提取1 h,收集滤液,合并2次滤液。真空干燥后重量为0.585 kg,每克含生药8.889 g。美他多辛片购自山东齐都药业有限公司,0.5 g/片,12片/盒。

**1.4 实验试剂** 丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)及甘油三酯(triglyceride, TG)检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所(货号分别为C009-2、A110-2)。无水酒精购自Sigma公司(货号:24102-1L)。TRIzol Reagent(货号:9109)、High-Capacity cDNA反转录试剂盒(货号:RR037A)及SYBR Reagent(货号:RA420)购自TaKaRa公司。油红购自国药集团化学试剂有限公司(货号:20161128)。SABC免疫组化试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司(货号:SA1020)。BCA蛋白定量试剂盒购自Thermo Scientific公司(货号:23227)。PVDF膜购自Merck Millipore公司(货号:IPVH00010)。中性粒细胞标志物髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)抗体购自Abcam公司(货号:ab208670),脂肪酸代谢因子脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, FAS)抗体购自Abcam公司(货号:ab128870),肉毒碱棕榈酰基转移酶-1 $\alpha$ (carnitine palmitoyltransferase 1 $\alpha$ , CPT-1 $\alpha$ )抗体购自Abcam公司(货号:ab234111),过氧化物酶体增殖激活受体 $\alpha$ (peroxisome proliferator-activated

receptor alpha, PPAR $\alpha$ ) 购自Abcam公司(货号: ab215270), GAPDH抗体购自Bioworld公司(货号: AP0063)。

### 1.5 方法

**1.5.1 动物造模和给药** C57BL/6雄性小鼠适应喂养1周后随机分为6组, 分别为对照组、对照美他多辛组和对照下瘀血汤组、酒精组、酒精美他多辛组和酒精下瘀血汤组, 每组各8只。对照组、对照美他多辛组和对照下瘀血汤组造模过程中全程给予液体对照饲料。酒精组、酒精美他多辛组和酒精下瘀血汤组采用4周慢性乙醇喂养加急性乙醇灌胃法<sup>[10]</sup>, 先给予小鼠对照液体饲料适应3 d, 随后予酒精饲料, 酒精饲料按2:1、1:1、1:2比例混匀喂养3 d, 之后进入完全酒精饲料喂养期(共4周)。造模第3周第1 d起, 下瘀血汤组按70 kg成人体质量临床用量的10倍量, 即0.4678 g/kg下瘀血汤灌胃, 临用前用10 ml蒸馏水稀释, 以10 ml/kg剂量灌胃, 每日1次; 美他多辛组按70 kg成人体质量临床用量的10倍量, 即2.857 mg/kg美他多辛灌胃, 临用前用蒸馏水稀释, 以10 ml/kg体质量的剂量灌胃, 每日1次。其余对照组及酒精组予以等体积蒸馏水灌胃。第32 d上午8时灌胃(酒精组以31.5%乙醇灌胃, 剂量为每千克体重5 g乙醇; 对照组以45%糊精灌胃, 剂量为每千克体重9 g糊精)。9 h后处死小鼠。

**1.5.2 样本采集和处理** 实验结束后, 用2%戊巴比妥钠(2 ml/kg)腹腔注射麻醉, 称取体质量后仰卧位固定, 打开腹腔, 经下腔静脉取血, 摘取肝脏, 称重后于肝脏右叶切取1.0 cm × 0.8 cm × 0.3 cm组织2块, 分别予10%中性甲醛固定和冰冻包埋, 其余肝组织冻存于-80 °C超低温冰箱保存。所采血液静置1 h后3000 r/min离心15 min(离心半径6.5 cm), 取血清后于-80 °C保存待用。

**1.5.3 生物化学指标检测** 根据相应试剂盒说明书, 检测各组小鼠血清中ALT和TG水平以及肝脏TG水平。

**1.5.4 肝组织病理观察** ①苏木精-伊红(HE)染色: 肝组织用10%中性福尔马林固定后, 自动脱水机逐级脱水, 包埋后4  $\mu$ m切片, 石蜡切片置于全自动染色机进行HE染色, 封片后观察肝脏病理学改变。②油红染色: 采用冰冻切片机对冰冻组织切片, 利用油红对冰冻切片进行染色, 油红-O与dd-H<sub>2</sub>O按3:2配比稀释, 60%异丙醇清洗, 油红O染色15 min, 晾干, 纯水清洗, 苏木素染核15 s, 甘油明胶封片, 镜检, 观察肝脏脂肪性病变程度。③MPO免疫组织化学染色: 石蜡切片常规脱蜡至水, 微波修复抗原, 用3%过氧化氢室温孵育15 min, PBS清

洗3次, 每次5 min; 再用5% BSA室温封闭30 min, MPO一抗孵育1 h, PBS清洗3次, 每次5 min; 滴加生物素标记的山羊抗兔IgG 37 °C孵育30 min, PBS清洗3次, 每次5 min; 滴加SABC试剂, 37 °C孵育20 min, PBS清洗3次。DAB显色, 蒸馏水清洗, 苏木素复染15 s, 无水乙醇、二甲苯脱水后封片, 观察MPO阳染情况。

**1.5.5 小鼠肝脏目的基因的表达** 采用实时荧光定量聚合酶链式反应(real time polymerase chain reaction, RT-PCR)检测小鼠肝脏目的基因的表达。称取小鼠肝组织约50 mg, 采用Trizol法提取总RNA, 用核酸定量分析仪测定总RNA的浓度和纯度。参照逆转录试剂盒说明书进行逆转录, 合成cDNA。用cDNA为模板对18 s rRNA, 对目的基因白细胞介素6(interleukin 6, IL-6)、白细胞介素1 $\beta$ (interleukin 1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、单核细胞趋化蛋白1(monocyte chemotactic protein 1, MCP1)及FAS、CPT-1 $\alpha$ 、PPAR $\alpha$ 进行PCR扩增, 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成, 序列见表1。反应条件: 95 °C 10 min, 95 °C 15 s 45个循环, 60 °C 1 min。

**1.5.6 Western blot检测蛋白表达** 取0.1 mg小鼠肝组织加入含蛋白酶抑制剂的RIPA中匀浆, 4 °C 12000 r/min离心15 min(离心半径6.5 cm), 取上清液进行蛋白定量, 变性后取20  $\mu$ g样品, 用12% SDS-PAGE电泳, 230 mA转膜1 h至PVDF膜, 用5% BSA封闭40 min; 加一抗4 °C摇床过夜, 二抗室温孵育45 min, ECL显影。采用Gel-ProAnalyzer软件分析Western blot目标条带的灰度值。

**1.6 统计学处理** 采用SPSS 16.0软件进行统计学分析。肝体比值、肝组织油红染色阳性面积百分比、IL-1 $\beta$  mRNA相对表达量、MCP1 mRNA相对表达量、PPAR $\alpha$  mRNA相对表达量、FAS蛋白相对表达量、

表1 RT-PCR 引物序列

引物名称	序列
18s rRNA	上游: 5'-GTAACCCGTTGAACCCCAATT-3' 下游: 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'
MCP-1	上游: 5'-ATTGGGATCATCTTGCTGGT-3' 下游: 5'-CCTGCTGTTACAGTTGCC-3'
IL-1 $\beta$	上游: 5'-AGGTCAAAGGTTTGAAGCA-3' 下游: 5'-TGAAGCAGCTATGGCAACTG-3'
IL-6	上游: 5'-ACCAGAGGAAATTTCAATAGGC-3' 下游: 5'-TGATGCACTTGACAGAAAACAC-3'
FAN	上游: 5'-GGAGGTGGTGATAGCCGGTAT-3' 下游: 5'-TGGGTAATCCATAGAGCCAG-3'
CPT-1 $\alpha$	上游: 5'-CTCCGCCTGAGCCATGAAG-3' 下游: 5'-CACCAGTGATGATGCCATTCT-3'
PPAR $\alpha$	上游: 5'-AGAGCCCCATCTGTCTCTC-3' 下游: 5'-ACTGGTAGTCTGCAAAACCAA-3'

CPT-1 $\alpha$ 蛋白相对表达量和PPAR $\alpha$ 蛋白相对表达量计量资料,符合正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较时,若方差齐则采用方差分析,多重比较采用LSD- $t$ 检验,若方差不齐则采用Kruskal-Wallis检验,进一步两两比较采用Mann-Whitney  $U$ 检验;非正态分布的数据以 $M(p_{25}, p_{75})$ 表示,多组间比较采用Kruskal-Wallis检验,进一步两两比较采用Mann-Whitney  $U$ 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 小鼠肝体比值和生物化学指标** 与对照组相比,酒精组小鼠肝体比值显著升高( $t = -4.182, P < 0.001$ );与酒精组相比,酒精美他多辛组与酒精下瘀血汤组小鼠肝体比值差异无统计学意义( $t$ 值分别为1.099、-0.165,  $P$ 值分别为0.283、0.871)。与对照组相比,酒精组小鼠ALT、血清TG和肝组织TG水平显著升高( $z$ 值分别为-2.008、-3.008、-2.242,  $P$ 值分别为0.045、0.003、0.025)。与酒精组相比,酒精美他多辛组和酒精下瘀血汤组ALT、血清TG及肝组织TG水平均显著降低( $P$ 均 $<$

0.05),见表2。

**2.2 小鼠肝组织HE染色** HE染色示:对照组小鼠肝细胞以中央静脉为中心,向外周呈放射状排列,汇管区少量炎细胞浸润及空泡样变性(图1A);对照美他多辛与对照下瘀血汤组小鼠肝小叶结构同对照组无显著差异,仅有少许空泡样变性(图1B、1C)。酒精组小鼠肝细胞肿胀呈圆形,体积显著增大,胞质内充满脂肪空泡,部分细胞可见细胞核偏向胞膜,汇管区炎细胞浸润明显(图1D)。酒精美他多辛组和酒精下瘀血汤组小鼠肝细胞排列有序,肝小叶结构正常,炎症细胞显著减少或消失,空泡样变性减少(图1E、1F)。

**2.3 小鼠肝组织油红染色** 对照组、对照美他多辛组、对照下瘀血汤组中可见油红O着色,而酒精组脂滴显著增多,大小不一,酒精美他多辛组和酒精下瘀血汤脂滴较酒精组脂滴减少,见图2。对照组、对照美他多辛组、对照下瘀血汤组、酒精组、酒精美他多辛组和酒精下瘀血汤小鼠肝组织油红染色阳性面积百分比差异有统计学意义( $F =$

表2 各组小鼠肝体比值和生物化学指标

组别	肝体比值 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )	ALT (U/L)	血清TG (mmol/L)	肝组织TG (mmol/g)
对照组	3.71 $\pm$ 0.36	20.41 $\pm$ 7.11	1.44 $\pm$ 0.23	10.74 $\pm$ 9.83
对照美他多辛组	4.28 $\pm$ 0.61	15.25 $\pm$ 3.10	1.34 $\pm$ 0.42	11.51 $\pm$ 7.91
对照下瘀血汤组	4.29 $\pm$ 0.52	19.70 $\pm$ 3.16	1.75 $\pm$ 0.85	8.65 $\pm$ 6.25
统计量值	$F = 2.457$	$F = 1.224$	$F = 0.729$	$F = 0.124$
$P$ 值	0.131	0.331	0.503	0.884
酒精组	4.78 $\pm$ 0.48	44.71 $\pm$ 25.37	4.16 $\pm$ 1.27	27.15 $\pm$ 6.43
酒精美他多辛组	4.49 $\pm$ 0.43	11.79 (10.17, 24.48)	1.89 $\pm$ 1.54	14.18 $\pm$ 5.88
酒精下瘀血汤组	4.82 $\pm$ 0.14	16.76 $\pm$ 1.64	2.40 (2.39, 2.67)	19.77 (5.92, 20.90)
统计量值	$F = 1.034$	$\chi^2 = 8.143$	$\chi^2 = 7.818$	$\chi^2 = 8.160$
$P$ 值	0.383	0.017	0.020	0.017

注:ALT、血清TG和肝组织TG中符合正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,不符合的以 $M(p_{25}, p_{75})$ 表示;对照组、对照美他多辛组和对照下瘀血汤组3组间比较采用方差分析,进一步两两比较采用LSD- $t$ 检验,其中对照组与对照美他多辛组相比,肝体比值 $t = -2.006, P = 0.056$ , ALT  $t = 1.504, P = 0.161$ , 血清TG  $t = 0.321, P = 0.754$ , 肝组织TG  $t = -0.141, P = 0.890$ , 对照组与对照下瘀血汤相比,肝体比值 $t = -2.048, P = 0.054$ , ALT  $t = 0.208, P = 0.839$ , 血清TG  $t = -0.968, P = 0.352$ , 肝组织TG  $t = 3.817, P = 0.710$ , 对照美他多辛组与对照下瘀血汤组相比,肝体比值 $t = -0.022, P = 0.983$ , ALT  $t = -1.184, P = 0.261$ , 血清TG  $t = -1.142, P = 0.276$ , 肝组织TG  $t = 0.477, P = 0.642$ ;

酒精组、酒精美他多辛组和酒精下瘀血汤组3组间比较,肝体比值采用方差分析,进一步两两比较采用LSD- $t$ 检验,3组间ALT、血清TG和肝组织TG比较均采用Kruskal-Wallis检验,检验统计量为 $\chi^2$ ,进一步两两比较均采用Mann-Whitney  $U$ 检验,其中酒精组与酒精美他多辛组相比,肝体比值 $t = 1.099, P = 0.283$ , ALT  $z = -2.193, P = 0.028$ , 血清TG  $z = -2.013, P = 0.044$ , 肝组织TG  $z = -2.556, P = 0.011$ , 酒精组与酒精下瘀血汤相比,肝体比值 $t = -0.165, P = 0.871$ , ALT  $z = -2.449, P = 0.014$ , 血清TG  $z = -2.590, P = 0.010$ , 肝组织TG  $z = -2.132, P = 0.033$ , 酒精美他多辛组与酒精下瘀血汤组相比肝体比值 $t = -1.174, P = 0.263$ , ALT  $z = -1.470, P = 0.142$ , 血清TG  $z = -1.501, P = 0.133$ , 肝组织TG  $z = -0.49, P = 0.624$ ;

6组间整体比较,肝体比值采用方差分析, $F = 4.69, P = 0.004$ , ALT、血清TG和肝组织TG比较均采用Kruskal-Wallis检验,检验统计量为 $\chi^2$ , ALT  $\chi^2 = 12.531, P = 0.028$ , 血清TG  $\chi^2 = 17.224, P = 0.004$ , 肝组织TG  $\chi^2 = 12.619, P = 0.027$ , 进一步两两比较,肝体比值采用LSD- $t$ 检验,ALT,血清TG,肝组织TG采用Mann-Whitney  $U$ 检验,对照组与酒精组相比,肝体比值 $t = -4.182, P < 0.001$ , ALT  $z = -2.008, P = 0.045$ , 血清TG  $z = -3.008, P = 0.003$ , 肝组织TG  $z = -2.242, P = 0.025$ , 对照美他多辛组与酒精美他多辛组比较,肝体比值 $t = -0.751, P = 0.460$ , ALT  $z = -0.980, P = 0.327$ , 血清TG  $z = -0.498, P = 0.618$ , 肝组织TG  $z = -0.980, P = 0.327$ , 对照下瘀血汤与酒精下瘀血汤组比较,肝体比值 $t = -1.711, P = 0.100$ , ALT  $z = -1.155, P = 0.248$ , 血清TG  $z = -1.183, P = 0.237$ , 肝组织TG  $z = -1.155, P = 0.248$ 。



17.828,  $P < 0.001$ ), 其中酒精组显著高于对照组、酒精美他多辛组和酒精下瘀血汤组( $t$ 值分别为-7.593、3.531、3.764,  $P$ 均 $< 0.05$ ), 见表3。

2.4 小鼠肝组织中炎症因子的表达 与对照组相比, 酒精组小鼠IL-6、IL-1 $\beta$ 和MCP1 mRNA相对表达量均显著升高( $z = -2.242$ ,  $P = 0.025$ ;  $z = -3.695$ ,

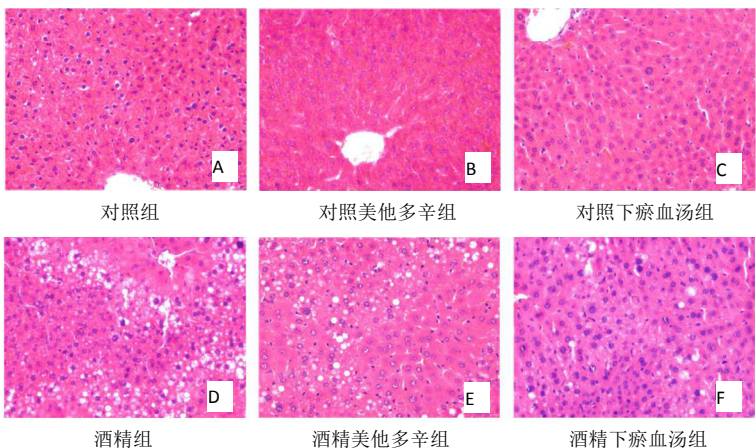


图1 各组小鼠肝组织病理学变化(HE染色,  $\times 400$ )

注: A为对照组, B为对照美他多辛组, C为对照下瘀血汤组, 这3组肝细胞可见少许空泡样变, 有少量炎细胞浸润; D为酒精组, 肝细胞内充满脂肪空泡, 大量炎细胞浸润; E、F分别为酒精美他多辛组、酒精下瘀血汤组, 与酒精组相比, 肝细胞散在脂肪空泡, 炎性细胞浸润减少

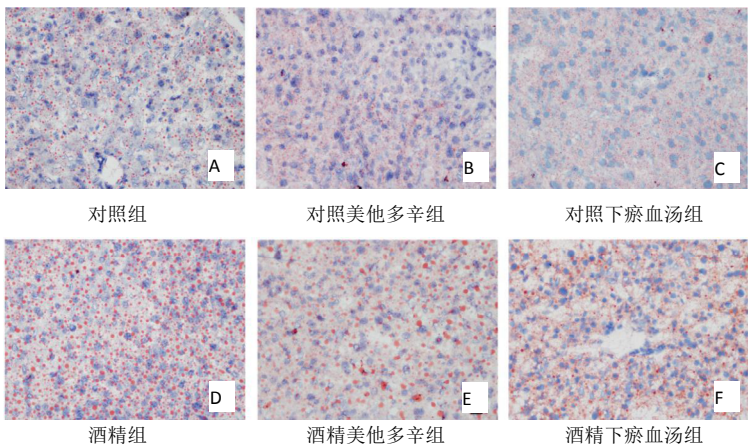


图2 各组小鼠肝组织油红染色( $\times 400$ )

注: A、B、C分别为对照组、对照美他多辛组、对照下瘀血汤组, 3组肝组织可见少量脂滴; D为酒精组, 肝组织可见大量脂滴; E、F分别为酒精美他多辛组、酒精下瘀血汤组, 肝组织脂滴密度较酒精组显著降低

表3 各组小鼠肝组织油红染色阳性面积( $\bar{x} \pm s$ , %)

组别	面积	组别	面积
对照组	7.64 $\pm$ 2.99	酒精组	21.17 $\pm$ 1.79
对照美他多辛组	8.32 $\pm$ 1.21	酒精美他多辛组	14.88 $\pm$ 1.60
对照下瘀血汤组	8.54 $\pm$ 4.18	酒精下瘀血汤组	14.46 $\pm$ 2.11
$F$ 值	0.094	$F$ 值	16.588
$P$ 值	0.911	$P$ 值	0.001

注: 对照组、对照美他多辛组和对照下瘀血汤组3组间比较采用方差分析, 进一步两两比较采用LSD- $t$ 检验, 其中对照组与对照美他多辛组相比 $t = -0.379$ ,  $P = 0.709$ , 对照组与对照下瘀血汤相比,  $t = -0.503$ ,  $P = 0.621$ , 对照美他多辛组与对照下瘀血汤组相比 $t = -0.124$ ,  $P = 0.903$ ;

酒精组、酒精美他多辛组和酒精下瘀血汤组3组间比较采用方差分析, 进一步两两比较采用LSD- $t$ 检验, 其中酒精组与酒精美他多辛组相比 $t = 3.531$ ,  $P = 0.002$ , 酒精组与酒精下瘀血汤相比 $t = 3.764$ ,  $P = 0.001$ , 酒精美他多辛组与酒精下瘀血汤组相比 $t = 0.234$ ,  $P = 0.818$ ;

6组间整体比较采用方差分析 $F = 17.828$ ,  $P < 0.001$ , 进一步两两比较采用LSD- $t$ 检验, 对照组与酒精组相比 $t = -7.539$ ,  $P < 0.001$ , 对照美他多辛组与酒精美他多辛组比较 $t = -3.683$ ,  $P = 0.002$ , 对照下瘀血汤与酒精下瘀血汤组比较 $t = -3.326$ ,  $P = 0.004$ 。

$P < 0.001$ ;  $z = -2.867$ ,  $P < 0.004$ ), 与酒精组相比, 酒精美他多辛组和酒精下瘀血汤组IL-6、IL-1 $\beta$ 、MCP1 mRNA相对表达量均显著降低 ( $P$ 均 $< 0.05$ ), 见表4。

2.5 各组小鼠MPO的表达 免疫组织化学染色示: 对

照组、对照美他多辛组和对照下瘀血汤组小鼠肝组织中MPO蛋白表达量少, 酒精组MPO蛋白表达升高, 与酒精组相比, 酒精美他多辛组和酒精下瘀血汤组小鼠肝组织MPO蛋白表达降低, 见图3。

2.6 各组小鼠肝组织中脂肪代谢因子的表达 RT-PCR和

表4 各组小鼠肝组织炎症因子 mRNA 相对表达量

组别	IL-6	IL-1 $\beta$	MCP1
对照组	1.00 $\pm$ 0.47	1.00 $\pm$ 0.26	0.99 $\pm$ 0.30
对照美他多辛组	0.77 $\pm$ 0.51	0.96 $\pm$ 0.13	0.86 $\pm$ 0.18
对照下瘀血汤组	1.16 (0.67, 1.20)	0.91 $\pm$ 0.30	0.68 $\pm$ 0.06
统计量值	$\chi^2 = 1.263$	$F = 0.053$	$\chi^2 = 4.987$
P值	0.532	0.948	0.083
酒精组	1.95 $\pm$ 0.74	2.06 $\pm$ 0.64	2.98 $\pm$ 1.13
酒精美他多辛组	1.16 $\pm$ 0.42	0.75 $\pm$ 0.19	1.27 $\pm$ 0.25
酒精下瘀血汤组	0.93 $\pm$ 0.42	0.59 $\pm$ 0.07	1.23 $\pm$ 0.50
统计量值	$\chi^2 = 6.351$	$\chi^2 = 17.845$	$\chi^2 = 8.129$
P值	0.042	$< 0.001$	0.017

注: IL-1 $\beta$ 、MCP1 和 IL-6 中符合正态分布的数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 不符合的以  $M(p_{25}, p_{75})$  表示; 对照组、对照美他多辛组和对照下瘀血汤组 3 组间比较, 因 IL-6 mRNA 相对表达量数据不符合正态分布, MCP1 mRNA 相对表达量数据方差不齐, 采用 Kruskal-Wallis 检验, 检验统计量为  $\chi^2$ , 进一步两两比较采用 Mann-Whitney  $U$  检验, IL-1 $\beta$  mRNA 相对表达量采用方差分析, 进一步两两比较采用 LSD- $t$  检验, 对照组与对照美他多辛组相比, IL-6 mRNA 相对表达量  $z = -0.961$ ,  $P = 0.337$ , IL-1 $\beta$  mRNA 相对表达量  $t = 0.238$ ,  $P = 0.815$ , MCP1 mRNA 相对表达量  $z = -0.943$ ,  $P = 0.346$ ; 对照组与对照下瘀血汤组相比, IL-6 mRNA 相对表达量  $z = 0.000$ ,  $P = 1.000$ ; IL-1 $\beta$  mRNA 相对表达量  $t = 0.275$ ,  $P = 0.787$ ; MCP1 mRNA 相对表达量  $z = -2.009$ ,  $P = 0.045$ ; 对照美他多辛组与对照下瘀血汤组相比, IL-6 mRNA 相对表达量  $z = -0.961$ ,  $P = 0.337$ ; IL-1 $\beta$  mRNA 相对表达量  $t = -0.010$ ,  $P = 0.796$ ; MCP1 mRNA 相对表达量  $z = -1.610$ ,  $P = 0.107$ ;

酒精组、酒精美他多辛组和酒精下瘀血汤组 3 组间比较, 因方差不齐, 均采用 Kruskal-Wallis 检验, 检验统计量为  $\chi^2$ , 进一步两两比较采用 Mann-Whitney  $U$  检验, 酒精组与酒精美他多辛组相比, IL-6 mRNA 相对表达量  $z = -1.922$ ,  $P = 0.045$ ; IL-1 $\beta$  mRNA 相对表达量  $z = -3.278$ ,  $P = 0.001$ ; MCP1 mRNA 相对表达量  $z = -2.556$ ,  $P = 0.011$ , 酒精组与酒精下瘀血汤组相比, IL-6 mRNA 相对表达量  $z = -2.242$ ,  $P = 0.025$ , IL-1 $\beta$  mRNA 相对表达量  $z = -3.372$ ,  $P = 0.001$ ; MCP1 mRNA 相对表达量  $z = -2.373$ ,  $P = 0.018$ , 酒精美他多辛组与酒精下瘀血汤组相比, IL-6 mRNA 相对表达量  $z = -0.801$ ,  $P = 0.423$ ; IL-1 $\beta$  mRNA 相对表达量  $z = -1.922$ ,  $P = 0.055$ , MCP1 mRNA 相对表达量  $z = -0.320$ ,  $P = 0.749$ ;

6 组间整体比较, 因 IL-6 mRNA 相对表达量数据不符合正态分布, IL-1 $\beta$  和 MCP1 mRNA 相对表达量数据方差不齐, 均采用 Kruskal-Wallis 检验, 检验统计量为  $\chi^2$ , IL-6 mRNA 相对表达量  $\chi^2 = 11.58$ ,  $P = 0.041$ , IL-1 $\beta$  mRNA 相对表达量  $\chi^2 = 30.514$ ,  $P < 0.001$ , MCP1 mRNA 相对表达量  $\chi^2 = 22.810$ ,  $P < 0.001$ , 进一步两两比较采用 Mann-Whitney  $U$  检验, 对照组与酒精组相比, IL-6 mRNA 相对表达量  $z = -2.242$ ,  $P = 0.025$ , IL-1 $\beta$  mRNA 相对表达量  $z = -3.695$ ,  $P < 0.001$ , MCP1 mRNA 相对表达量  $z = -2.867$ ,  $P = 0.004$ , 对照美他多辛组与酒精美他多辛组相比, IL-6 mRNA 相对表达量  $z = -1.441$ ,  $P = 0.150$ , IL-1 $\beta$  mRNA 相对表达量  $z = -1.549$ ,  $P = 0.121$ , MCP1 mRNA 相对表达量  $z = -2.402$ ,  $P = 0.016$ , 对照下瘀血汤与酒精下瘀血汤组相比, IL-6 mRNA 相对表达量  $z = -0.320$ ,  $P = 0.749$ , IL-1 $\beta$  mRNA 相对表达量  $z = -2.402$ ,  $P = 0.016$ , MCP1 mRNA 相对表达量  $z = -2.898$ ,  $P = 0.004$ 。

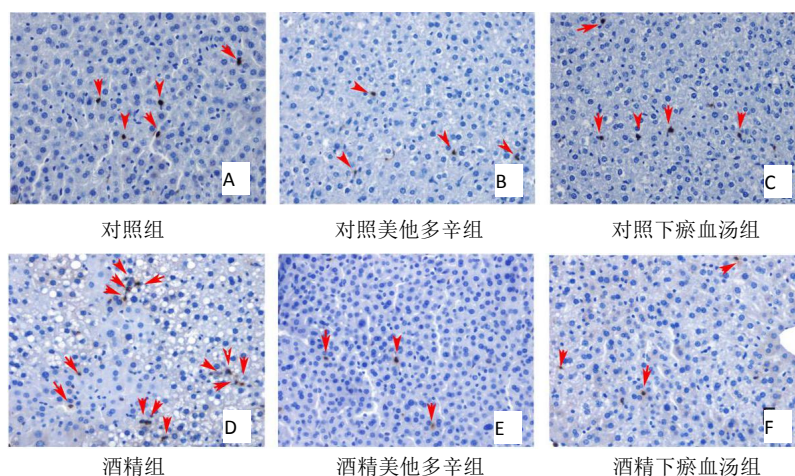


图3 各组小鼠肝组织 MPO 的免疫组织化学染色 (DAB 显色,  $\times 400$ )

注: A 为对照组, B 为对照美他多辛组, C 为对照下瘀血汤组, D 为酒精组, E 为酒精美他多辛组, F 为酒精下瘀血汤组; 红色箭头为 MPO



Western blot结果表明，与对照组相比，酒精组小鼠 FAS mRNA相对表达量及蛋白水平显著升高（ $P$ 均 $< 0.001$ ），酒精美他多辛组和酒精下瘀血汤组较酒精组显著降低（ $P$ 均 $< 0.05$ ）；酒精组小鼠CPT-1 $\alpha$ 、

PPAR $\alpha$  mRNA相对表达量及蛋白水平较对照组显著降低（ $P$ 均 $< 0.05$ ），酒精美他多辛组和酒精下瘀血汤组较酒精组显著升高（ $P$ 均 $< 0.05$ ）。见图4、表5、表6。

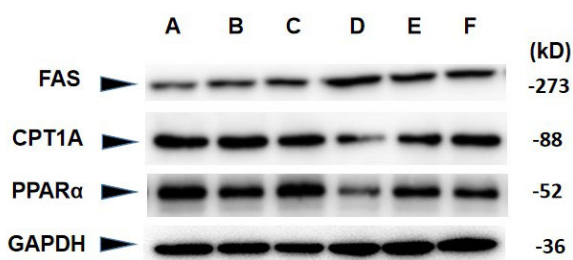


图4 Western blot 检测各组小鼠肝组织 FAS、CPT1 $\alpha$  和 PPAR $\alpha$  的表达  
注：A 为对照组，B 为对照美他多辛组，C 为对照下瘀血汤组，D 为酒精组，E 为酒精美他多辛组，F 为酒精下瘀血汤组

表 5 各组小鼠肝组织 FAS、CPT1 $\alpha$  和 PPAR $\alpha$  mRNA 相对表达量

组别	FAS	CPT-1 $\alpha$	PPAR $\alpha$
对照组	0.916 (0.876, 1.221)	1.00 $\pm$ 0.22	1.00 $\pm$ 0.26
对照美他多辛组	0.85 $\pm$ 0.15	0.86 $\pm$ 0.10	1.00 $\pm$ 0.27
对照下瘀血汤组	1.067 (0.414, 1.918)	0.56 $\pm$ 0.08	0.74 $\pm$ 0.29
统计量值	$\chi^2 = 0.659$	$\chi^2 = 13.805$	$F = 1.257$
$P$ 值	0.719	0.001	0.306
酒精组	2.40 $\pm$ 0.53	0.39 $\pm$ 0.75	0.27 $\pm$ 0.08
酒精美他多辛组	1.41 $\pm$ 1.05	0.81 (0.79, 0.81)	0.63 $\pm$ 0.30
酒精下瘀血汤组	1.43 $\pm$ 0.30	0.72 $\pm$ 0.14	0.69 $\pm$ 0.41
统计量值	$\chi^2 = 18.405$	$\chi^2 = 19.815$	$\chi^2 = 16.800$
$P$ 值	$< 0.001$	$< 0.001$	$< 0.001$

注：FAS、CPT-1 $\alpha$  和 PPAR $\alpha$  mRNA 相对表达量中符合正态分布的数据以  $\bar{x} \pm s$  表示，不符合的以  $M (p_{25}, p_{75})$  表示；对照组、对照美他多辛组和对照下瘀血汤组 3 组间比较，因 FAS mRNA 相对表达量数据不符合正态分布，CPT-1 $\alpha$  mRNA 相对表达量数据方差不齐，采用 Kruskal-Wallis 检验，检验统计量为  $\chi^2$ ，进一步两两比较采用 Mann-Whitney  $U$  检验，PPAR $\alpha$  mRNA 相对表达量采用方差分析，进一步两两比较采用 LSD- $t$  检验，对照组与对照美他多辛组相比，FAS mRNA 相对表达量  $z = -1.202$ ， $P = 0.229$ ，CPT-1 $\alpha$  mRNA 相对表达量  $z = -1.218$ ， $P = 0.223$ ，PPAR $\alpha$  mRNA 相对表达量  $t = -0.013$ ， $P = 0.990$ ，对照组与对照下瘀血汤相比，FAS mRNA 相对表达量  $z = 0.000$ ， $P < 0.001$ ，CPT-1 $\alpha$  mRNA 相对表达量  $z = -3.372$ ， $P = 0.001$ ，PPAR $\alpha$  mRNA 相对表达量  $t = 1.502$ ， $P = 0.149$ ；对照美他多辛组与对照下瘀血汤组相比，FAS mRNA 相对表达量  $z = 0.000$ ， $P < 0.001$ ，CPT-1 $\alpha$  mRNA 相对表达量  $z = -2.882$ ， $P = 0.004$ ，PPAR $\alpha$  mRNA 相对表达量  $t = 1.33$ ， $P = 0.198$ ；

酒精组、酒精美他多辛组和酒精下瘀血汤组 3 组间比较，因 CPT-1 $\alpha$  mRNA 相对表达量数据不符合正态分布，FAS 和 PPAR $\alpha$  mRNA 相对表达量数据方差不齐，均采用 Kruskal-Wallis 检验，检验统计量为  $\chi^2$ ，进一步两两比较采用 Mann-Whitney  $U$  检验，酒精组与酒精美他多辛组相比，FAS mRNA 相对表达量  $z = -3.372$ ， $P = 0.001$ ，CPT-1 $\alpha$  mRNA 相对表达量  $z = 3.503$ ， $P < 0.001$ ，PPAR $\alpha$  mRNA 相对表达量  $z = -3.425$ ， $P = 0.001$ ，酒精组与酒精下瘀血汤相比，FAS mRNA 相对表达量  $z = -3.091$ ， $P = 0.002$ ，CPT-1 $\alpha$  mRNA 相对表达量  $z = -3.503$ ， $P < 0.001$ ，PPAR $\alpha$  mRNA 相对表达量  $z = -3.114$ ， $P = 0.002$ ，酒精美他多辛组与酒精下瘀血汤组相比，FAS mRNA 相对表达量  $z = -2.882$ ， $P = 0.004$ ，CPT-1 $\alpha$  mRNA 相对表达量  $z = -1.601$ ， $P = 0.109$ ，PPAR $\alpha$  mRNA 相对表达量  $z = -0.320$ ， $P = 0.749$ ；

6 组间整体比较，因 FAS 和 CPT-1 $\alpha$  mRNA 相对表达量数据不符合正态分布，PPAR $\alpha$  mRNA 相对表达量数据方差不齐，均采用 Kruskal-Wallis 检验，检验统计量为  $\chi^2$ ，FAS、CPT-1 $\alpha$  和 PPAR $\alpha$  mRNA 相对表达量  $\chi^2$  值分别为：28.58、40.649、35.53， $P$  均 $< 0.001$ ，进一步两两比较采用 Mann-Whitney  $U$  检验，对照组与酒精组比较，FAS mRNA 相对表达量  $z = -3.838$ ， $P < 0.001$ ，CPT-1 $\alpha$  mRNA 相对表达量  $z = -4.392$ ， $P < 0.001$ ，PPAR $\alpha$  mRNA 相对表达量  $z = -4.392$ ， $P < 0.001$ ，对照美他多辛组与酒精美他多辛组比较，FAS mRNA 相对表达量  $z = -2.324$ ， $P = 0.020$ ，CPT-1 $\alpha$  mRNA 相对表达量  $z = -0.961$ ， $P = 0.337$ ，PPAR $\alpha$  mRNA 相对表达量  $z = -2.082$ ， $P = 0.037$ ，对照下瘀血汤与酒精下瘀血汤组比较，FAS mRNA 相对表达量  $z = -0.160$ ， $P = 0.873$ ，CPT-1 $\alpha$  mRNA 相对表达量  $z = -1.922$ ， $P = 0.055$ ，PPAR $\alpha$  mRNA 相对表达量  $z = -0.801$ ， $P = 0.423$ 。

表6 各组小鼠肝组织 FAS、CPT1 $\alpha$  和 PPAR $\alpha$  蛋白相对表达量 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	FAS	CPT-1 $\alpha$	PPAR $\alpha$
对照组	0.20 $\pm$ 0.02	1.03 $\pm$ 0.06	1.02 $\pm$ 0.08
对照美他多辛组	0.23 $\pm$ 0.002	0.95 $\pm$ 0.07	0.87 $\pm$ 0.10
对照下瘀血汤组	0.22 $\pm$ 0.002	0.93 $\pm$ 0.02	0.94 $\pm$ 0.02
统计量值	$\chi^2 = 4.950$	$F = 3.269$	$\chi^2 = 4.769$
P值	0.086	0.086	0.092
酒精组	0.56 $\pm$ 0.07	0.24 $\pm$ 0.02	0.17 $\pm$ 0.01
酒精美他多辛组	0.31 $\pm$ 0.02	0.43 $\pm$ 0.01	0.55 $\pm$ 0.07
酒精下瘀血汤组	0.29 $\pm$ 0.04	0.65 $\pm$ 0.10	0.39 $\pm$ 0.04
统计量值	$F = 37.567$	$\chi^2 = 9.846$	$F = 70.914$
P值	< 0.001	0.007	< 0.001

注:以 GADPH 为内参;对照组、对照美他多辛组和对照下瘀血汤组 3 组间比较, FAS、PPAR $\alpha$  相对表达量因方差不齐, 采用 Kruskal-Wallis 检验, 检验统计量为  $\chi^2$ , 进一步两两比较采用 Mann-Whitney U 检验, CPT-1 $\alpha$  相对表达量采用方差分析, 进一步两两比较采用 LSD- $t$  检验, 对照组与对照美他多辛组相比, FAS 相对表达量  $z = -1.732$ ,  $P = 0.083$ , CPT-1 $\alpha$  相对表达量  $t = 2.06$ ,  $P = 0.07$ , PPAR $\alpha$  相对表达量  $z = -2.021$ ,  $P = 0.053$ , 对照组与对照下瘀血汤组相比, FAS 相对表达量  $z = -1.307$ ,  $P = 0.191$ , CPT-1 $\alpha$  相对表达量  $t = 2.34$ ,  $P = 0.054$ , PPAR $\alpha$  相对表达量  $z = -1.443$ ,  $P = 0.149$ , 对照美他多辛组与对照下瘀血汤组相比, FAS 相对表达量  $z = -1.732$ ,  $P = 0.083$ , CPT-1 $\alpha$  相对表达量  $t = 0.287$ ,  $P = 0.781$ , PPAR $\alpha$  相对表达量  $z = -0.866$ ,  $P = 0.486$ ;

酒精组、酒精美他多辛组和酒精下瘀血汤组 3 组间比较, FAS、PPAR $\alpha$  相对表达量采用方差分析, 进一步两两比较采用 LSD- $t$  检验, CPT-1 $\alpha$  相对表达量因方差不齐采用 Kruskal-Wallis 检验, 检验统计量为  $\chi^2$ , 进一步两两比较采用 Mann-Whitney U 检验, 酒精组与酒精美他多辛组相比, FAS 相对表达量  $t = 7.159$ ,  $P < 0.001$ ; CPT-1 $\alpha$  相对表达量  $z = -2.309$ ,  $P = 0.021$ , PPAR $\alpha$  相对表达量  $t = -11.870$ ,  $P < 0.001$ , 酒精组与酒精下瘀血汤组相比, FAS 相对表达量  $t = 7.811$ ,  $P < 0.001$ , CPT-1 $\alpha$  相对表达量  $z = -2.309$ ,  $P = 0.021$ , PPAR $\alpha$  相对表达量  $t = -6.767$ ,  $P < 0.001$ , 酒精美他多辛组与酒精下瘀血汤组相比, FAS 相对表达量  $t = 0.652$ ,  $P = 0.531$ , CPT-1 $\alpha$  相对表达量  $z = -2.309$ ,  $P = 0.021$ , PPAR $\alpha$  相对表达量  $t = 5.103$ ,  $P = 0.001$ ;

6 组间整体比较均采用 Kruskal-Wallis 检验, 检验统计量为  $\chi^2$ , 进一步两两比较采用 Mann-Whitney U 检验, FAS、CPT-1 $\alpha$  和 PPAR $\alpha$  相对表达量  $\chi^2$  值分别为 20.651、21.170、21.080,  $P$  值分别为 0.001、0.001、0.0061, 对照组与酒精组相比, FAS、CPT-1 $\alpha$  和 PPAR $\alpha$  相对表达量  $z$  值均为 -2.309,  $P$  值均为 0.021, 对照美他多辛组与酒精美他多辛组相比, FAS、CPT-1 $\alpha$  和 PPAR $\alpha$  相对表达量  $z$  值均为 -2.309,  $P$  值均为 0.021, 对照下瘀血汤与酒精下瘀血汤组相比, FAS、CPT-1 $\alpha$  和 PPAR $\alpha$  相对表达量  $z$  值均为 -2.309,  $P$  值均为 0.021。

### 3 讨论

ALD是由于长期大量饮酒导致肝细胞代谢紊乱, 以脂肪聚集、肝脏炎症和肝损伤为特征, 饮酒量和饮酒时间与肝损伤程度呈正相关<sup>[1]</sup>。目前, 除戒酒外, 治疗ALD确切有效的治疗方法及药物较少, 但中医药在治疗ALD方面取得了较好的疗效。张压西等<sup>[12]</sup>研究表明茵苈清肝汤可促进乙醇代谢, 减少乙醇吸收。牛春红等<sup>[13]</sup>研究表明, ALD患者采用苈叶保肝饮治疗后, 肝功能和血脂水平均有改善, 治疗效果较好。还有研究表明, 白芍对酒精性肝损伤肝阴虚证有明显保护作用, 可使肝细胞功能与代谢恢复平衡, 增强肝组织中乙醇代谢关键酶及抗氧化酶活性, 同时抑制脂质过氧化反应, 减少脂质沉积<sup>[14]</sup>; 葛根素能拮抗酒后小鼠体内的氧化反应, 减少嗜酒大鼠对酒精的摄入, 改善酒精中毒神经系统症状, 改善肝损伤<sup>[15]</sup>; 丹参含有丰富的丹酚酸A, 丹酚酸A能改善慢性酒精诱导的肝功能损伤和肝脏脂滴聚集<sup>[16]</sup>。

中医虽无ALD之病名, 但《金匱要略·黄疸病脉证并治》中记载的酒疸与ALD类似, 历代医家对其病机也有论述, 王天舒等<sup>[17]</sup>认为湿热酒毒内蕴,

易伤肝胆, 损伤脾胃, 而致气机郁滞、血脉瘀阻, 结于胁下。贾庆宇<sup>[18]</sup>认为病机是湿热内蕴、阻滞气机、肝络阻塞、胃腑壅滞、湿独内生、气血痰瘀互结于胁下, “痰、瘀、食、脂、气”积滞是其病理特点。史亚祥等<sup>[19]</sup>对1235例酒精性脂肪性肝病患者的研究表明, 临床常见证型包括脾虚湿痰型、湿热内结型、肝郁气滞型、气滞血瘀型、痰瘀互结型及阴虚热结型, 其认为脾虚痰瘀为主要病理机制, 可采用扶脾活血化池法治疗。严桐等<sup>[20]</sup>根据现有数据库资料进行挖掘, 研究酒精性脂肪性肝病的中医证候分布及用药规律, 结果表明, 痰、淤、湿、气滞是酒精性脂肪性肝病的病性; 肝、脾是酒精性脂肪性肝病的病位, 虚症和实证夹杂是酒精性脂肪性肝病的主要证型, 基本的治疗原则是攻补兼施。下瘀血汤由大黄、桃仁及蟅虫(土鳖虫)组成, 是活血化瘀的经典方剂, 姜春华教授将其首次用于治疗肝脏疾病, 其治疗血吸虫肝硬化的临床疗效确切<sup>[21]</sup>, 但下瘀血汤在ALD治疗中的作用尚无报道。既往研究表明美他多辛可有效治疗急性酒精中毒并改善慢性酒精中毒后的肝功能<sup>[22]</sup>, 本研究以美他多辛为阳性对照药物, 采用4周慢性酒精喂养加急性灌胃建

造酒精性肝病模型,从肝脏病理学改变、肝损伤、肝脏炎症及脂肪酸代谢指标探讨下瘀血汤对ALD模型小鼠的保护作用。结果表明:酒精组小鼠肝重指数和血清ALT水平显著增高,血清及肝组织TG水平较对照组显著升高;与酒精组相比,酒精美他多辛组和酒精下瘀血汤组ALT、血清TG及肝组织TG水平均显著降低。肝组织病理形态学及油红染色结果说明模型复制成功。所有用药组小鼠肝细胞脂肪变均得到不同程度的改善,提示下瘀血汤能够改善ALD模型小鼠的肝脏病理损伤。

大量证据表明,肝脏炎症在ALD发病机制中发挥关键作用。饮酒可增加肠道通透性,从而导致肝内病原体相关分子模式及损伤相关分子模式增加<sup>[23,24]</sup>,进而激活核因子 $\kappa$ B并刺激肝巨噬细胞和其他先天免疫细胞中的炎症反应<sup>[25]</sup>。本研究表明酒精喂养的小鼠促炎性细胞因子IL-1 $\beta$ 、IL-6和趋化因子MCP-1表达水平升高,与文献报道在ALD患者和动物实验中结果一致<sup>[26]</sup>。在人类ALD中存在中性粒细胞浸润,MPO是中性粒细胞标志物,MPO表达亦能反映肝脏炎症程度<sup>[27]</sup>,免疫组织化学检测MPO蛋白的表达结果表明,酒精组MPO表达最高,提示中性粒细胞渗入肝组织是早期ALD小鼠和人类局部炎症的特征,而下瘀血汤能够显著抑制MPO的表达及炎症因子IL-1 $\beta$ 、IL-6和MCP-1的表达,表明下瘀血汤通过抑制肝脏炎症来发挥保护作用。

酒精可引起肝脏脂肪聚集,通过增加脂肪酸的合成和降低脂肪酸氧化来改变脂质代谢;脂肪酸是甘油三酯合成的原材料之一,肝脏脂肪酸的合成和分解影响肝脏甘油三酯的含量<sup>[1]</sup>。FAS是脂肪酸合成的关键酶,CPT-1 $\alpha$ 是反映脂肪分解的重要指标,是脂肪酸 $\beta$ 氧化重要的限速酶。酒精可导致PPAR $\alpha$ 介导的脂肪酸氧化及CPT-1 $\alpha$ 异常,脂肪酸合成减少<sup>[28,29]</sup>,与本实验结果一致。下瘀血汤能够减少脂肪酸合成及加速脂肪酸氧化,进而降低酒精喂养小鼠的肝脏甘油三酯水平。

综上,对于ALD小鼠,下瘀血汤可通过降低肝细胞脂质、减少肝脏中性粒细胞浸润和炎症来发挥保护肝脏作用,为下瘀血汤的临床应用提供了实验基础,但具体机制仍待进一步深入研究。

## 参考文献

- [1] OHASHI K, PIMIENTA M, SEKI E. Alcoholic liver disease: a current molecular and clinical perspective[J]. *Liver Res*, 2018, 2(4): 161-172.
- [2] HEO M J, KIM T H, YOU J S, et al. Alcohol dysregulates miR-148a in hepatocytes through FoxO1, facilitating pyroptosis via TXNIP overexpression[J]. *Gut*, 2019, 68(4): 708-720.
- [3] LEE B P, MEHTA N, PLATT L, et al. Outcomes of early liver transplantation for patients with severe alcoholic hepatitis[J]. *Gastroenterology*, 2018, 155(2): 422-430, e1.
- [4] 翟庆慧, 宋芳娇, 徐天娇, 等. 156例重症酒精性肝病患者营养现况调查[J/CD]. *中国肝脏病杂志(电子版)*, 2020, 12(1): 44-49.
- [5] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组, 中国医师协会脂肪性肝病专家委员会. 酒精性肝病防治指南(2018更新版)[J]. *中华肝脏病杂志*, 2018, 26(3): 188-194.
- [6] WU J, MENG Q H. Current understanding of the metabolism of micronutrients in chronic alcoholic liver disease[J]. *World J Gastroenterol*, 2020, 26(31): 4567-4578.
- [7] 罗晨, 杨嘉恩, 梁惠卿. 酒精性肝病中西医结合研究进展[J]. *医学信息*, 2018, 31(15): 16-19, 24.
- [8] MA W, TAO L, ZHANG W, et al. Xia-Yu-Xue decoction inhibits intestinal epithelial cell apoptosis in CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44(1): 333-344.
- [9] 吴柳, 张洁, 马文婷, 等. 下瘀血汤对胆碱蛋氨酸缺乏诱导的小鼠非酒精性脂肪性肝炎的抑制作用[J/CD]. *中国肝脏病杂志(电子版)*, 2018, 10(3): 48-55.
- [10] BERTOLA A, MATHEWS S, KI S H, et al. Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model)[J]. *Nat Protoc*, 2013, 8(3): 627-637.
- [11] European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines: management of alcohol-related liver disease[J]. *J Hepatol*, 2018, 69(1): 154-181.
- [12] 张压西, 王奕. 茵陈蒿汤对酒精性肝病模型大鼠乙醇代谢的影响[J]. *中医药学报*, 2013, 41(2): 12-15.
- [13] 牛春红, 刘斌焰, 邢艳霞. 芪叶保肝饮治疗酒精性肝病的远期疗效随访[J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(6): 1382-1384.
- [14] 贾岚, 王蕾蕾, 孟颀, 等. 白芍对酒精性肝损伤肝阴虚证的保护功效和机制[J]. *北京中医药大学学报*, 2020, 43(3): 203-211.
- [15] 张林松, 徐卫东, 石继伟, 等. 葛根素与葛根多肽对小鼠酒精性肝损伤的治疗作用研究[J]. *江苏中医药*, 2018, 50(2): 76-78.
- [16] SHI X, ZHAO Y, DING C, et al. Salvianolic acid A alleviates chronic ethanol-induced liver injury via promotion of beta-catenin nuclear accumulation by restoring SIRT1 in rats[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2018, 350: 21-31.
- [17] 王天舒, 刘文康. 解酒保肝汤治疗酒精性脂肪肝临床观察[J]. *中国中西医结合杂志*, 1995, 15(7): 439-440.
- [18] 贾庆宇. 肝胃同治法治疗酒精性脂肪肝的理论及临床探讨[J]. *医学理论与实践*, 2010, 23(8): 954-955.
- [19] 史亚祥, 薛博瑜. 扶脾活血化浊法治疗酒精性脂肪肝的中医病因学探讨[J]. *中国中医急症*, 2009, 18(1): 65-67.
- [20] 严桐, 郑婷婷, 易婷, 等. 基于文献数据挖掘的酒精性脂肪肝中医证候分布特点[J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37(10): 2503-2506.
- [21] 戴克敏. 姜春华运用下瘀血汤的经验[J]. *山西中医*, 2012, 28(1): 4-6.
- [22] DI MICELI M, GRONIER B. Pharmacology, systematic review and recent clinical trials of metadoxine[J]. *Rev Recent Clin Trials*, 2018, 13(2): 114-125.
- [23] SZABO G. Gut-liver axis beyond the microbiome: how the fungal mycobiome contributes to alcoholic liver disease[J]. *Hepatology*, 2018, 68(6): 2426-2428.
- [24] 王中涛, 胡荣华, 熊勇. 非酒精性脂肪性肝病治疗进展[J/CD]. *中国肝脏病杂志(电子版)*, 2018, 10(4): 48-53.
- [25] YOU Y, LI W Z, ZHANG S, et al. SNX10 mediates alcohol-induced liver injury and steatosis by regulating the activation of chaperone-

- mediated autophagy[J]. J Hepatol,2018,69(1):129-141.
- [26] WANG M, SHEN G, XU L, et al. IL-1 receptor like 1 protects against alcoholic liver injury by limiting NF-κB activation in hepatic macrophages[J]. J Hepatol,2017,S0168-8278(17):32263-32268.
- [27] VAN DEN BROEK M A, SHIRI-SVERDLOV R, SCHREURS J J, et al. Liver manipulation during liver surgery in humans is associated with hepatocellular damage and hepatic inflammation[J]. Liver Int,2013,33(4):633-641.
- [28] CHEN H, SHEN F, SHERBAN A, et al. DEP domain-containing mTOR-interacting protein suppresses lipogenesis and ameliorates hepatic steatosis and acute-on-chronic liver injury in alcoholic liver disease[J]. Hepatology,2018,68(2):496-514.
- [29] 朱达, 孙凤霞, 李晓玲, 等. 健脾疏肝丸对非酒精性脂肪性肝病大鼠肝X受体α-固醇调节元件结合蛋白-1-脂肪酸合成酶信号转导通路的影响[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版),2020,12(2):60-67.
- 收稿日期: 2020-09-01

马文婷, 刘旭凌, 陶乐, 等. 下瘀血汤对酒精性肝病小鼠肝脏炎症和脂肪变性的改善作用[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2021,13(2):40-51.

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 本刊对来稿参考文献格式的要求

本刊执行 GB/T 7714-2015《信息与文献 参考文献著录规则》。采用顺序编码制著录, 依照其在文中出现的先后顺序用阿拉伯数字标出, 并将序号置于方括号中, 排列于文后。内部刊物、未发表资料(不包括已被接受的待发表资料)、个人通信等请勿作为文献引用, 确需引用时, 可将其在正文相应处注明。日文汉字请按日文规定书写, 勿与我国汉字及简化字混淆。同一文献作者不超过3人全部著录; 超过3人可以只著录前3人, 后依文种加表示“等”的文字。作者姓名一律姓氏在前、名字在后, 外国人的名字采用首字母缩写形式, 缩写名后不加缩写点; 不同作者姓名之间用“,”隔开, 不用“和”、“and”等连词。请于文献题名项后增加标注文献类型标志项目, 示例如下:

[1] 陈登原. 国史旧闻 [M]. 北京: 中华书局, 2000:29.

[2] 袁训来, 陈哲, 肖书海, 等. 蓝田生物群: 一个认识多细胞生物起源和早期演化的新窗口 [J]. 科学通报, 2012,55(34):3219.

[3] 余建斌. 我们的科技一直在追赶: 访中国工程院院长周济 [N/OL]. 人民日报, 2013-01-12(2). [2013-03-20]. [http://paper.people.com.cn/rmrb/html/2013-01/12/nw.D110000renmrb\\_20130112\\_5-02.htm](http://paper.people.com.cn/rmrb/html/2013-01/12/nw.D110000renmrb_20130112_5-02.htm).

本刊编辑部