

术是一种披着宗教外衣的心理疗法,其治疗的作用很大程度上得益于信仰的力量^[6]。宗教心理学主要研究与超人力相关的空间、实体,或者是对个人、团体和文化来说是很重要的存在体,其相关的经历、关系、信仰、行为和意识。不得不说,本土的道家和西方传入的释家对整个中华民族的思想构建产生了深远的影响,同样渗透到祝由当中。

4. 祝由的适用范围 祝由并不是包治百病的,主要适用于由心理问题引起的躯体不适,类似于现代的癔症性躯体感觉障碍和癔症性躯体运动障碍等疾患,此类疾病更容易受到心理暗示的影响。

作为中国本土的心理治疗方法,祝由是人类早期生命探索的文化智慧形态。祝由术蕴含了丰富的心理学思想,与西方心理学的精神分析法、行为疗法、认知疗法等众多理论和方法存在共通之处。在吸收和借鉴现代心理学完善的理论体系同时,如何更好地发掘我国传统的心理治疗方法,对建立有中国特色的心理学有着十分重要的意义,在发病率日趋增加的社会心理疾病中将发挥不容忽视的作用。

参 考 文 献

- [1] 王睿,王琪,金明顺,等.中药复方抗抑郁研究进展.中国中医基础医学杂志,2016,22(3):440-443
- [2] 刘向.说苑.北京:中华书局,1987
- [3] 袁玮.《五十二病方》祝由疗法浅析.湖南中医学院学报,1988,8(1):38-40
- [4] 丁媛,张如青.从出土文献看中国早期的祝由疗法.中医药文化,2011,3:30-33
- [5] 江雪华,申荷永.“祝由”的文化与心理分析内涵.社会心理学,2006,21(2):237-240
- [6] 苏珊,李兆健.祝由术的心理学角度剖析.中华中医药学刊,2011,29(8):1817-1819
- [7] 汪新建.西方心理疗法的整合趋势及其前瞻.心理科学,2003,26(5):856-859
- [8] 孔燕.心理干预相关研究进展.重庆医学,2013,42(29):3567-3569
- [9] 张素玲,王中茂.从祝由看古代巫术的医疗作用.洛阳师专学报,1997,16(6):84-87
- [10] 张丽君.《五十二病方》祝由之研究.中华医史杂志,1997,27(3):144-147

(收稿日期:2016年9月16日)

• 研究报告 •

红景天苷对高脂饮食诱导的大鼠非酒精性脂肪肝 肝脏脂肪合成和氧化环节的干预作用

李红山^{1,2}, 陈少东³, 应豪¹, 李德周¹

(¹宁波市第二医院, 宁波 315010; ²宁波大学医学院, 宁波 315010; ³厦门大学医学院, 厦门 361102)

摘要: 目的: 基于肝脏脂肪合成和氧化环节, 探讨红景天苷防治非酒精性脂肪肝的作用机制。方法: 采用单纯高脂饮食14周诱导的大鼠非酒精性脂肪肝模型。在造模第9周起, 随机分为模型组、红景天苷组和罗格列酮对照组, 灌胃给药6周。观察肝组织病理变化; 肝组织甘油三酯(TG)、游离脂肪酸(FFA)含量的变化; 肝组织乙酰辅酶A羧化酶(ACCCase)、丙二酰辅酶A(Malonyl CoA)、脂肪酸合成酶(FAS)、肉毒碱棕榈酰转移酶-1(CPT-1)含量的变化; 肝组织ACCCase和CPT-1 mRNA水平的变化。结果: 模型组肝组织出现显著的肝细胞脂肪变性及空泡样变, 肝组织TG、FFA、ACCCase、FAS、Malonyl CoA含量和ACCCase mRNA水平较正常组均显著升高($P<0.01$), CPT-1含量和mRNA水平较正常组显著降低($P<0.01$)。红景天苷组的上述病理改变显著减轻, 肝组织TG、FFA、ACCCase、Malonyl CoA、FAS含量和ACCCase mRNA水平显著低于模型组($P<0.01$), CPT-1含量和mRNA水平显著高于模型组($P<0.01$)。结论: 红景天苷能抑制肝脏脂肪合成, 促进脂肪酸氧化, 这可能是其防治非酒精性脂肪肝的重要机制。

关键词: 红景天苷; 非酒精性脂肪肝; 脂肪合成; 脂肪酸氧化

基金资助: 国家自然科学基金项目(No.81503404), 浙江省自然科学基金项目(No.LY15H270002)

Intervention effect of salidroside on liver fat synthesis and oxidation of non-alcoholic fatty liver in rats induced by high-fat diet

LI Hong-shan^{1,2}, CHEN Shao-dong³, YING Hao¹, LI De-zhou¹

(¹Ningbo No.2 Hospital, Ningbo 315010, China; ²Medical School of Ningbo University, Ningbo 315000, China; ³Medical College of Xiamen University, Xiamen 361102, China)

通讯作者: 应豪, 宁波市海曙区西北街41号宁波市第二医院肝病科, 邮编: 315010, 电话: 0574-87089558, E-mail: yinghao66@126.com

Abstract: Objective: To explore the mechanism of salidroside on non-alcoholic fatty liver disease based on liver fat synthesis and oxidation. Methods: Non-alcoholic fatty liver disease model was induced by high-fat diet for 14 weeks. From the ninth week, the rats were randomly divided into model group, salidroside group and rosiglitazone group, and were given a gavage for six weeks. The observing items including: pathological changes of liver tissue (HE staining); changes of contents of triglycerides (TG) and free fatty acid (FFA) in liver tissue; changes of contents of acetyl-CoA carboxylase (ACCCase), malonyl CoA, fatty acid synthase(FAS) and carnitine palmitoyl transferase-1(CPT-1); changes of mRNA levels of ACCCase and CPT-1 in liver tissue. Results: Hepatocellular steatosis and vacuolar degeneration were observed in the liver tissue of the model group. The contents of TG, FFA, ACCCase, Malonyl CoA, FAS and mRNA level of ACCCase in model group were significantly higher than those of the normal group ($P<0.01$). The content and mRNA level of CPT-1 were significantly lower than those of normal group ($P<0.01$). Hepatic pathological changes in salidroside group were significantly reduced. The contents of TG, FFA, ACCCase, Malonyl CoA, FAS and mRNA level of ACCCase were significantly lower than those of model group ($P<0.01$). The content and mRNA level of CPT-1 were significantly higher than those of model group ($P<0.01$). Conclusion: Salidroside can inhibit liver fat synthesis and promote the oxidation of fatty acid, which may be an important mechanism of salidroside for prevention and treatment of non-alcoholic fatty liver disease.

Key words: Salidroside; Non-alcoholic fatty liver; Fat synthesis; Fatty acid oxidation

Funding: National Natural Science Foundation of China (No.81503404), Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.LY15H270002)

红景天是景天科多年生草本或灌木植物,是珍贵的天然药用植物,亦是药食两用植物,具有抗肿瘤、延缓衰老,调节免疫等多方面的作用^[1-3],有“雪域人参”之美誉。红景天苷为红景天的主要有效成分,前期研究表明,红景天苷具有明显的防治非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)的药效学效应,突出表现在对脂肪代谢的调节方面^[4-5]。然而,红景天苷改善NASH脂肪代谢的机制尚不明确,为此,本研究采用高脂饮食诱导的大鼠非酒精性脂肪肝病模型,围绕肝脏脂肪代谢相关机制,试图观察红景天苷对肝脏脂肪合成和氧化环节的影响,以阐明红景天苷防治NASH的部分作用机制。

材料

1. 动物 清洁级健康雄性SD大鼠32只,体质量100~120g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。动物合格证号: SCXK(沪)2012-0002。宁波大学实验动物中心屏障动物房饲养、造模与观察,自由饮水。

2. 药物与试剂 红景天苷,规格: 98%,购自南京泽郎生物科技有限公司,批号: ZL141220122,配制成浓度为0.866mg/mL的混浊液。罗格列酮: 成都恒瑞制药有限公司,批号: 150109,配成浓度为0.08mg/mL的悬浊液。高脂饲料购自上海普路腾生物科技有限公司。游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)(批号: 20151030),甘油三酯(triglyceride, TG)(批号: 20151029)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。肝组织乙酰辅酶A羧化酶(acetyl-coa carboxylase, ACCCase)(批号: 201511)、丙二酰辅酶A(malonyl CoA)(批号: 201510)、脂肪酸合成酶(FAS)(批号: 201510)、肉毒碱棕榈酰转移酶-1(carnitine palmitoyl transferase-1, CPT-1)(批号: 201510),均购自上海源叶生物科技有限公司。RNA抽提试剂盒: TakaRa公司,批号: AK9108。反转录试剂: TakaRa公司,批号: RR036A。定量PCR试剂: TakaRa公司,批号: DRR820A。PCR引物由上海涵悦生物科技有限公司设

计,上海生工生物技术有限公司合成。引物序列见表1。

表1 目的基因引物序列

基因名称	序列(5' - 3')
CPT-1	上游: CTT CCC CTT ACT GGT TCC
	下游: ACT CTC CCG CTG TTG TCC
ACCCase	上游: TTT GTG ATG ACT TTG AGG GA
	下游: GGA GAG GAA CTG AAC TGT GC

3. 仪器 德国eppendorf离心机,购自上海拜力生物科技有限公司。美国PRO200匀浆器,购自上海博谊生物科技有限公司。CYTATION3酶标仪, BioTek公司。7900 HT荧光定量PCR仪(ABI, USA)。

方法

1. 模型制备 采用雄性SD大鼠,以高脂饲料(10%猪油+2%胆固醇+88%基础饲料)喂养14周建立NASH肝模型,正常对照组大鼠饲以正常饲料^[6]。

2. 分组与用药 SD雄性大鼠32只,自造模之日起,按随机数字表法随机分为正常组8只、造模组24只,在造模第9周起,将造模组大鼠按随机数字表法随机分为模型组、红景天苷组及罗格列酮组各8只,红景天苷组及罗格列酮组按照0.5mL/100g鼠重分别灌胃给予相应药液,正常组与模型组灌用等剂量的饮用水。持续6周。

3. 标本留取 造模和用药周期完成,禁食12h后,用2%戊巴比妥钠3mL/kg腹腔注射麻醉,打开腹腔。经下腔静脉采血,3 000r/min离心15min后吸取血清,-70℃低温保存。切取1小块肝叶组织,置入10%福尔马林缓冲液中固定,另取肝组织分装于离心管中,-70℃低温保存。

4. 检测指标 ①肝组织TG、FFA含量,按生化试剂盒操作检测;②肝组织ACCCase、Malonyl CoA、FAS、CPT-1含量,ELISA

检测;③肝组织ACCCase、CPT-1 mRNA水平: 每组大鼠各随机抽取5个样本, 定量PCR法检测: RNA提取按抽提试剂盒进行, 反转录按反转录试剂盒操作。PCR扩增条件为: 95℃, 5s; 40个循环, 95℃, 5s; 60℃, 30s; ④肝组织常规HE染色, 并依据《非酒精性脂肪性肝病诊疗指南》^[7], 光镜下判定各个样本的肝脂肪变性程度(F0-F4)。

5. 统计学方法 使用SPSS 16.0软件包对数据进行统计学分析。计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示。组间比较采用单因素方差分析 q 检验。用Ridit分析进行等级资料的检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1. 各组大鼠肝组织病理变化 HE染色结果显示: 模型组大鼠肝细胞出现明显的脂肪变性, 胞浆较疏松, 内可见较多脂肪空泡聚集, 部分细胞可见细胞核偏移, 伴有轻度的炎细胞浸润和散在的点灶状坏死。红景天苷组和罗格列酮组的上述表现明显减轻。Ridit分析结果显示: 与正常组比较, 模型组肝脏脂肪变性程度显著升高($P < 0.01$), 红景天苷组及罗格列酮组脂肪变性程度较模型组显著降低($P < 0.05$)。见表2, 图1。

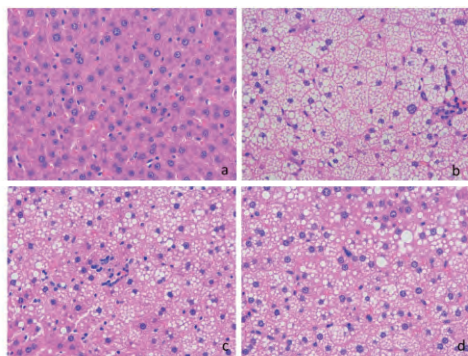


图1 各组大鼠肝组织病理变化(HE×400)

注: a. 正常组; b. 模型组; c. 红景天苷组; d. 罗格列酮组。

表2 各组大鼠肝组织病理HE染色脂肪变性比较($n=8$, 只)

组别	脂肪变性程度分级				
	F0	F1	F2	F3	F4
正常组	8	0	0	0	0
模型组 ^{**}	0	0	0	5	3
红景天苷组 [△]	0	1	4	3	0
罗格列酮组 [△]	0	0	3	4	1
Ridit值	0.1250	0.2656	0.3906	0.6875	0.9375

注: 与正常组比较, ^{**} $P < 0.01$; 与模型组比较, [△] $P < 0.05$ 。

2. 各组大鼠肝组织TG、FFA含量比较 见表3。模型组大鼠的肝组织TG、FFA含量较正常组均显著升高($P < 0.01$), 红景天苷组及罗格列酮组肝组织TG、FFA含量较模型组均显著降低($P < 0.01$), 红景天苷组与罗格列酮组间肝组织TG、FFA含量比较无显著差异。

表3 各组大鼠肝组织TG及FFA含量比较($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	肝组织TG (mg/g)	肝组织FFA (umol/gprot)
正常组	22.03 ± 4.38	139.40 ± 13.69
模型组	139.48 ± 25.02 ^{**}	668.77 ± 69.47 ^{**}
红景天苷组	88.43 ± 16.04 ^{△△}	438.27 ± 29.93 ^{△△}
罗格列酮组	103.30 ± 19.13 ^{△△}	409.82 ± 37.29 ^{△△}

注: 与正常组比较, ^{**} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{△△} $P < 0.01$ 。

3. 各组大鼠肝组织ACCCase、FAS含量比较 见表4。与正常组比较, 模型组大鼠肝组织ACCCase、FAS含量均显著升高($P < 0.01$)。红景天苷组的肝组织ACCCase、FAS含量较模型组均显著降低($P < 0.01$), 且与罗格列酮组比较也显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$), 罗格列酮组肝组织仅FAS含量较模型组显著降低($P < 0.01$)。

表4 各组大鼠肝组织ACCCase及FAS含量比较($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	ACCCase (pmol/g)	FAS (nmol/g)
正常组	1 080.59 ± 96.68	57.56 ± 3.18
模型组	2 203.98 ± 194.12 ^{**}	137.09 ± 16.78 ^{**}
红景天苷组	1 550.53 ± 100.19 ^{△△}	98.15 ± 16.00 ^{△△}
罗格列酮组	2 023.14 ± 265.66 ^{▲▲}	111.54 ± 9.95 ^{△△▲▲}

注: 与正常组比较, ^{**} $P < 0.01$; 与模型组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$; 与红景天苷组比较, [▲] $P < 0.05$, ^{▲▲} $P < 0.01$ 。下表同。

4. 各组大鼠肝组织Malonyl CoA、CPT-1含量比较 见表5。与正常组比较, 模型组大鼠的肝组织Malonyl CoA含量显著升高($P < 0.01$), CPT-1含量显著降低($P < 0.01$)。红景天苷组的肝组织Malonyl CoA含量较模型组显著降低($P < 0.01$), CPT-1含量较模型组显著升高($P < 0.01$)。罗格列酮组肝组织CPT-1含量较模型组显著升高($P < 0.01$)。

表5 各组大鼠肝组织Malonyl CoA及CPT-1含量比较($\bar{x} \pm s$, $n=8$, U/g)

组别	Malonyl CoA	CPT-1
正常组	23.96 ± 7.39	783.53 ± 84.53
模型组	66.04 ± 11.08 ^{**}	388.11 ± 51.58 ^{**}
红景天苷组	41.84 ± 9.66 ^{△△}	581.08 ± 80.45 ^{△△}
罗格列酮组	67.18 ± 14.79	625.12 ± 47.79 ^{△△}

表6 各组大鼠肝组织ACCCase及CPT-1 mRNA水平的变化($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	ACCCase	CPT-1
正常组	1.02 ± 0.21	1.01 ± 0.19
模型组	2.26 ± 0.31 ^{**}	0.46 ± 0.08 ^{**}
红景天苷组	1.79 ± 0.22 ^{△△}	0.83 ± 0.13 ^{△△}
罗格列酮组	1.89 ± 0.26 [△]	0.71 ± 0.15 [△]

5. 各组大鼠肝组织ACCCase、CPT-1 mRNA水平比较 见表6。与正常组比较, 模型组的肝组织ACCCase mRNA水平显著升高($P<0.01$), CPT-1 mRNA水平显著降低($P<0.01$)。红景天苷组、罗格列酮组的肝组织ACCCase mRNA水平较模型组均显著降低($P<0.01$, $P<0.05$), CPT-1含量均显著升高($P<0.01$, $P<0.05$)。

讨论

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是指排除过量饮酒和其他明确的致病因素所致的肝细胞内脂质沉积, 是一种与胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)和遗传易感性密切相关的代谢应激性肝损伤^[8], 包括从单纯的脂肪肝及其演变的NASH、肝硬化和肝细胞癌^[9]。目前, NAFLD已成为西方国家肝脏酶学异常和慢性肝病的最常见原因^[10], 在我国, 由于生活水平的提高, 近年来发病率呈快速上升趋势^[11], 已成为仅次于病毒性肝炎的第二大肝病。更为重要的是, NAFLD具有低龄化趋势、慢性进展经过、可诱发心血管事件和肝细胞癌等特点^[12], 日益显示出其临床治疗的重要性, 积极有效的早期防治NAFLD, 具有重要意义。

目前, 西方医学对NAFLD尚缺乏有效的治疗手段, 而中医药治疗NAFLD有一定的优势, 其临床治疗的有效性和安全性已逐步得到认可, 成为我国治疗NAFLD的重要手段。红景天苷作为中药红景天的主要有效成分, 具有良好的降脂和护肝作用^[4]。本研究结果表明, 红景天苷能明显降低肝组织脂肪含量, 改善肝脏病理变化, 显示出良好的抑制NASH大鼠肝脏脂肪沉积的药效学效应。

尽管目前NAFLD的发病机制尚未完全明确, 但肝细胞脂肪代谢功能异常, 肝脏脂肪含量过度升高是NAFLD最本质的病理改变。导致肝脏脂质沉积的机制较为复杂, 肝脏脂肪代谢失衡是肝脏脂质沉积进而形成脂肪肝的主要启动因素之一^[13]。ACCCase是脂肪酸合成的限速酶, 在脂肪代谢中起着极其重要的作用, 该酶的激活可增加Malonyl-CoA的含量^[14], Malonyl-CoA不仅是脂肪酸合成的关键物质, 而且能抑制CPT-1的活性, 进而加重高葡萄糖/脂肪酸诱导的胰岛β细胞糖脂毒性^[15]。

CPT-1是存在于线粒体内膜的一类酰基转移酶。可逆地催化从酰基辅酶A将酰基转移至L-肉毒碱的反应, 在转运脂肪酸通过线粒体内膜的过程中起着非常重要的作用。CPT-1是脂肪酸氧化的关键酶, 在脂肪细胞中的表达明显降低, 而上调CPT-1的活性则可增加脂肪酸氧化, 减轻肝细胞脂肪变性^[16]。

该研究结果表明, 红景天苷能明显抑制肝组织ACCCase和Malonyl-CoA的表达, 促进肝组织CPT-1的基因表达和蛋白含量, 进而抑制肝脏脂肪合成, 促进脂肪酸氧化, 这可能是红景天苷防治非酒精性脂肪肝的重要机制之一。

参考文献

[1] 柴雅晴, 赵国华, 王仁久, 等. 大株红景天的化学成分及体外抗

肿瘤转移活性研究. 中国中药杂志, 2015, 40(2): 258-263

- [2] 叶刚, 杨锐, 杨怀铭. 云南红景天对衰老模型大鼠的抗衰老作用. 中国老年医学杂志, 2014, 34(10): 3960-3962
- [3] 左占广, 朱彩霞, 鲁东立, 等. 红景天提高黑腹果蝇肠道免疫功能研究. 中草药, 2014, 45(5): 691-694
- [4] 陈少东, 周海虹, 赵正晓, 等. 红景天苷对非酒精性脂肪性肝炎的降脂保肝作用研究. 中华中医药杂志, 2013, 28(9): 2071-2073
- [5] 李红山, 朱德东, 应豪, 等. 姜黄素-红景天苷组合对单纯高脂饮食诱导大鼠脂肪肝的干预作用. 中药材, 2015, 38(5): 1027-1029
- [6] 李红山, 朱德东, 郑南红, 等. 基于均匀设计的防治非酒精性脂肪肝中药有效组分复方研究. 中华中医药学刊, 2014, 32(10): 2497-2500
- [7] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学会. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南. 中华肝脏病杂志, 2010, 18(3): 163-166
- [8] 中华医学会内分泌学会肝病与代谢学组. 非酒精性脂肪性肝病与相关代谢紊乱诊疗共识. 中华内分泌代谢杂志, 2010, 26(7): 531-534
- [9] Moore J B. Non-alcoholic fatty liver disease: the hepatic consequence of obesity and the metabolic syndrome. Proc Nutr Soc, 2010, 69(2): 211-220
- [10] Targher G, Day C P, Bonora E. Risk of cardiovascular disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease. New England Journal of Medicine, 2010, 363(14): 1341-1350
- [11] Yan J, Xie W, Ou W N, et al. Epidemiological survey and risk factor analysis of fatty liver disease of adult residents, Beijing, China. J Gastroenterol Hepatol, 2013, 28(10): 1654-1659
- [12] 胡义扬. 中医药治疗非酒精性脂肪性肝病优势与展望. 世界中医药, 2015, 10(2): 149-152
- [13] Baranova A, Tran T P, Binerdinc A, et al. Systematic review: association of polycystic ovary syndrome with metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease. Aliment Pharmacol Ther, 2011, 33(7): 801-814
- [14] 李洁琼, 郑世学, 喻子牛, 等. 乙酰辅酶A羧化酶: 脂肪酸代谢的关键酶及其基因克隆研究进展. 应用与环境生物学报, 2011, 17(5): 153-158
- [15] Lee J H, Jung I R, Choi S E, et al. Toxicity generated through inhibition of pyruvate carboxylase and carnitine palmitoyl transferase-1 is similar to high glucose/palmitate-induced glucolipotoxicity in INS-1 beta cells. Mol Cell Endocrinol, 2014, 383(1-2): 48-59
- [16] 王涛, 陈东风. 多烯磷脂酰胆碱通过过氧化物酶体增殖物激活受体α/肉碱棕榈酰基转移酶1A通路影响肝细胞脂肪变性. 中华肝脏病杂志, 2016, 24(4): 291-296

(收稿日期: 2016年8月19日)