

解酒饮保护小鼠急性酒精性肝损伤的研究

庞晓军^{1,2}, 洪燕坪²(1.钦州市第二人民医院, 广西 钦州 535000; 2.广西医科大学药学院, 广西 南宁 530021)

摘要: 目的 探讨解酒饮对小鼠急性酒精性肝损伤的保护作用。方法 将小鼠随机分为正常对照组、联苯双酯组(11.7 mg·kg⁻¹)、模型对照组和解酒饮低、中、高剂量(6.25, 12.5, 25 g·kg⁻¹)组6组, 每组10只, 每天1次, 连续14 d灌服给药。末次给药后1 h, 除正常对照组外按12 mL·kg⁻¹剂量一次性灌胃给予56°北京红星二锅头造模。12 h后处死小鼠取血标本和肝组织标本, 比较各组的肝脏指数, 并对肝组织进行组织形态学检查, 测定血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)的活性水平。**结果** 解酒饮可显著降低酒精诱导的急性肝损伤小鼠的血清 ALT、AST 水平, 可减少肝中脂肪空泡, 减轻炎症表现, 急性肝损伤肝脏指数明显改善。**结论** 解酒饮对小鼠急性酒精性肝损伤有一定的保护作用。

关键词: 肝疾病; 解酒饮; 酒精; 急性肝损伤

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2017)11-1526-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.11.005

引用本文: 庞晓军, 洪燕坪. 解酒饮保护小鼠急性酒精性肝损伤的研究[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(11): 1526-1529.

Study on Acute Alcohol Liver Injury Induced by Jiejiu Oral Liquid in Mice

PANG Xiaojun^{1,2}, HONG Yanping²(1.Qinzhou Second People's Hospital, Guangxi, Qinzhou 535000, China; 2.School of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the protective effect of Jiejiu Oral Liquid on acute alcoholic liver injury in mice. **METHODS** The mice were randomly divided into 6 groups, 10 rats in each group: normal group, bifendate group (11.7 mg·kg⁻¹), model group and low, medium, high dose(6.25, 12.5, 25 g·kg⁻¹) group. Mice were administered 1 times a day for 14 d. Except for the normal control mice were given 56 degrees of Beijing Red Star Erguotou according to 12 mL·kg⁻¹ single dose by intragastric administration. Twelve hours later, the mice were killed to take blood samples and liver tissue specimens. Then compared the liver index, histological examination of liver tissue, serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activity level. **RESULTS** The serum ALT, AST, the fatty vacuoles in liver and the inflammatory symptoms were significantly reduced in alcohol induced acute liver injury mice, liver index was significantly improved in acute liver injury. **CONCLUSION** Jiejiu Oral Liquid has a protective effect on acute alcoholic liver injury in mice.

KEY WORDS: liver diseases; Jiejiu oral liquid; alcohol; acute liver injury

酒精是常见的肝脏毒物之一。近年来, 随着人们生活水平的日益提高, 酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)的发病率有逐年上升的趋向, 并已成为严重影响人们健康的肝病, 是世界各国共同面临的健康问题^[1]。当人饮酒后, 经过消化道吸收的酒精通过血液运输, 到达肝脏, 然后经过肝脏的分解解毒, 排出体外。所以长期饮酒会增加肝脏负担, 损伤肝脏, 不仅会引发肝脏脂肪代谢紊乱, 而且还会造成肝脏炎症细胞因子的含量上升, 发生肝脂肪病变, 炎症反应, 导致酒精性肝病, 肝纤维化, 甚至肝硬化等疾病。所以, 研制出解酒保肝的药物有着重要的临床意义。本研究一种复方解酒制剂, 以枳椇子、葛根、党参等为原料配方的解酒饮。解酒饮是本课题组的

原创组方, 在前期研究的实验结果显示解酒饮 25 g·kg⁻¹ 组具有显著的预防醉酒作用和醒酒作用^[2]。从而减轻酒精在体内的堆积, 解酒饮还具有保护小鼠急性四氯化碳肝损伤的作用^[3]。本实验是课题组对酒精所致小鼠急性肝损伤的预防和治疗的实验研究, 为解酒饮的临床应用提供实验依据, 进一步开发解酒饮为解酒保肝药物或保健食品。

1 材料

1.1 动物

动物 SPF 级健康♂昆明种小鼠 60 只, 体质量 18~22 g, 饲养环境温度(23±2)℃, 湿度为 40%~60%, 由广西医科大学动物中心提供, 实验动物中心使用合格证号: SCXK 桂 2014-0002。动物被放置在室温 18~22 ℃, 相对湿度 65%的环境

作者简介: 庞晓军, 男, 硕士, 教授, 主任药师, 副主任营养师, 主管微生物技师

Tel: (0777)2873282

E-mail: pangxjun@163.com

中, 试验前先适应性喂养 1 周。

1.2 受试药品

解酒饮: 由枳椇子、葛根、党参、陈皮、枸杞子、葛花、山楂、甘草、女贞子组成, 中药材由南宁市科雪博研生物科技有限公司提供, 经过广西医科大学药学院庞晓军教授鉴定均为正品, 人体推荐日服量 $1.25\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

联苯双酯滴丸(万邦德制药集团股份有限公司, 批号: A02141148)。人体推荐日服量 $45\text{ mg}\cdot(70\text{ kg})^{-1}$ [3]。

1.3 主要仪器

EL204 电子分析天平(上海特勒-托利多仪器有限公司); RE-5210A 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); 7060 型日立全自动生化分析仪(日本日立公司); CKX-41 型显微镜(日本奥林巴斯株式会社)。

1.4 主要试剂

56 °北京红星二锅头(批号: 2014061301, 北京红星股份有限公司); ALT 测定试剂盒(批号: 603479)、AST 测定试剂盒(批号: 602451)均购自日本和光纯药工业株式会社。

2 方法

2.1 药物的制备

解酒饮的制备: 由枳椇子、葛根、党参、陈皮、枸杞子、葛花、山楂、甘草、女贞子组成。将解酒饮原药材加 8 倍量的蒸馏水浸泡 0.5 h, 让药材水饱和后, 用文火煮沸 1 h 后过滤, 过滤的解酒饮药渣再加同量蒸馏水煮沸 1 h, 再过滤。2 次滤液合并, 在 80 °C 水浴上减压浓缩至相当于含生药 $1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的解酒饮流浸膏, 放置冰箱待用。

联苯双酯的制备: 将联苯双酯滴丸(规格: 1.5 mg)研磨成粉末, 用蒸馏水超声溶解, 配制成浓度为 $0.48\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 药物混悬液, 放入 4 °C 冰箱保存, 用时摇匀使用。

2.2 急性酒精肝损伤模型的建立

2.2.1 动物分组 健康的昆明种小鼠, ♂, 60 只, 体质量 18~22 g, 适应性地喂养 1 周后, 随机分为模型对照组、正常对照组、解酒饮高剂量组、解酒饮中剂量组、解酒饮低剂量组和联苯双酯组, 每组 10 只。

2.2.2 给药、造模及标本采集 按每只小鼠体质量, 给予高剂量组小鼠灌服 $25\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量的解酒饮, 中剂量组小鼠灌服 $12.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量的解酒饮, 低剂量组小鼠灌服 $6.25\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量的解酒饮。联苯双酯阳性对照组灌服 $11.7\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量的联苯双酯

混悬液, 相当于临床人日服量 45 mg 的 18.2 倍 [4]。模型对照组和正常对照组灌服同体积的蒸馏水。每天 1 次, 连续给药 14 d。最后一次给药后 1 h, 除正常对照组灌胃给予等体积蒸馏水外, 其余各组按 $12\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量一次性灌胃给予 56°北京红星二锅头造模 [5]。模型建立后小鼠禁食不禁水, 12 h 后处死小鼠取血标本和肝组织标本。

2.3 观察指标和测量方法

2.3.1 肝脏指数的计算 采血后处死小鼠, 剖腹取肝组织。用生理盐水漂洗除去积血, 擦拭后称重。肝脏指数=[肝脏质量(g)/体质量(g)] $\times 100\%$ 。

2.3.2 ALT、AST 活性的测定 采用摘眼球法取小鼠血液样品, 静置 2 h 后, 4 °C 温度下转速为 $3\,000\sim 4\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心, 10 min 后, 吸取上清液, 用日立全自动生化分析仪测定 ALT、AST 活性值。

2.3.3 病理组织学观察及评分 将损伤最严重的肝组织部位剪下来, 立即固定于 10% 中性缓冲甲醛。70%, 80%, 90%, 100% 乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋后切片, 常规脱蜡, HE 染色, 中性树胶封片。显微镜下观察肝脏的病理组织学的变化, 并选取不同的视野进行照相。用半定量的方法, 根据肝脏病变程度进行肝脏组织切片病理学评估 [6-7], 评分标准见表 1。

表 1 小鼠急性肝损伤病理切片评分标准($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

Tab. 1 Standard for evaluation on acute liver injury in mice($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

病 变	1 分	2 分	3 分	4 分
脂肪变性	$\leq 1/4$	1/4~1/2	1/2~3/4	$\leq 3/4$
炎性坏死	病灶=1	病灶 ≤ 2		
病变总积分=脂肪病变积分+炎性坏死积分				

2.4 统计学处理

统计实验数据, 均采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析, 先进行方差齐性检验, 各组方差齐用 LSD 进行统计, 若方差不齐, 用 Tamhaneg T2 进行统计。 $P<0.05$ 则在统计学上有差异性, 对 $P<0.01$ 表示在统计学上有显著性差异。

3 结果

3.1 解酒饮对酒精致急性肝损伤小鼠的形态学观察

正常对照组的小鼠肝脏从外观上观察, 其颜色呈红褐色, 明亮有光泽并且肝膜光滑。与正常对照组比较, 模型对照组小鼠肝脏体积增大, 颜色发黄, 包膜张力增强, 与周围组织黏连, 可见局部黄色变

性灶。联苯双酯组和解酒饮各剂量组的小鼠肝脏颜色较正常组浅，较模型组深，局部无黄白色变性灶，切面无明显油腻感且尚有光泽。见图 1。

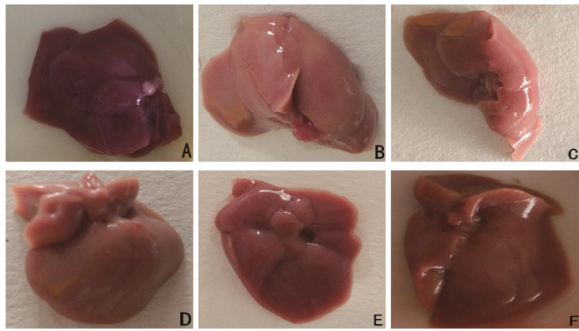


图 1 解酒饮对酒精致急性肝损伤小鼠的形态学观察
A—正常组，B—模型组，C—联苯双酯组，D—解酒饮低剂量组，E—解酒饮中剂量组，F—解酒饮高剂量组。

Fig. 1 Effects of Jiejiu oral liquid on acute hepatic injury histomorphological

A—normal group, B—model group, C—bifendate group, D—low dose group, E—middle dose group, F—high dose group.

3.2 解酒饮对酒精致小鼠急性肝损伤肝脏指数的影响

与正常对照组比较，模型对照组小鼠肝脏指数明显增高($P<0.01$)。与模型对照组比较，解酒饮高剂量组可明显降低肝损伤小鼠肝脏指数($P<0.01$)。结果见表 2。

表 2 解酒饮对酒精致小鼠急性肝损伤肝脏指数的影响
($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Effect of Jiejiu oral liquid on liver index of liver in mice($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	肝脏指数
正常对照组	—	$3.94 \pm 0.22^{2)}$
模型对照组	—	$4.82 \pm 0.33^{1)}$
联苯双酯组	0.011 7	$4.50 \pm 0.23^{1)3)}$
解酒饮低剂量组	6.25	$4.51 \pm 0.31^{1)3)}$
解酒饮中剂量组	12.5	$4.46 \pm 0.37^{1)3)}$
解酒饮高剂量组	25	$4.15 \pm 0.32^{2)}$

注：与正常对照组相比， $^{1)}P<0.01$ ；与模型组比较， $^{2)}P<0.01$ ， $^{3)}P<0.05$ 。
Notes: Compared with the normal group, $^{1)}P<0.01$ ；compared with model group, $^{2)}P<0.01$ ， $^{3)}P<0.05$ 。

3.3 解酒饮对酒精致小鼠急性肝损伤生化指标 ALT、AST 的影响

通过生化仪测出数据显示，与正常对照组比，模型对照组小鼠血清中 ALT、AST 的值明显升高($P<0.01$ 或 $P<0.05$)；说明该方法造模成功。与模型对照组对比，解酒饮中、高剂量组和联苯双酯组的血清 ALT、AST 值明显下降($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。解酒饮低剂量组 ALT、AST 活性降低但无统计学差异。结果见表 3。

表 3 解酒饮对酒精致小鼠急性肝损伤 ALT、AST 生化指标的影响($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Effect of Jiejiu oral liquid on the activity of ALT, AST in hepatic injury caused by alcohol($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	ALT/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	AST/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$
正常对照组	—	$30.50 \pm 6.43^{3)}$	$95.80 \pm 10.09^{4)}$
模型对照组	—	$51.00 \pm 12.51^{1)}$	$119.70 \pm 25.10^{2)}$
联苯双酯组	0.011 7	$31.60 \pm 9.94^{3)}$	$99.40 \pm 13.31^{4)}$
解酒饮			
低剂量组	6.25	$43.80 \pm 11.33^{1)}$	107.30 ± 13.73
中剂量组	12.5	$39.30 \pm 9.73^{4)}$	$100.40 \pm 25.41^{4)}$
高剂量组	25	$36.20 \pm 8.42^{3)}$	$99.50 \pm 31.26^{4)}$

注：与正常对照组相比， $^{1)}P<0.01$ ， $^{2)}P<0.05$ ；与模型组比较， $^{3)}P<0.01$ ， $^{4)}P<0.05$ 。

Notes: Compared with the normal group, $^{1)}P<0.01$ ， $^{2)}P<0.05$ ；compared with model group, $^{3)}P<0.01$ ， $^{4)}P<0.05$ 。

3.4 解酒饮对肝组织病理组织学改变的影响

从肝组织病理切片看，正常对照组小鼠肝细胞完整，肝小叶结构正常。模型对照组小鼠肝细胞脂肪变性坏死，炎症细胞浸润。解酒饮各剂量组用药后肝中脂肪空泡减少，其炎症表现减轻。见图 2。小鼠急性酒精性肝损伤病理切片检查总积分结果见表 4，解酒饮各剂量组对急性酒精性肝损伤病理切片检查总积分明显优于模型对照组。

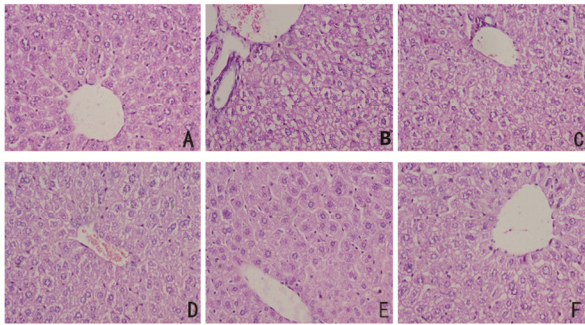


图 2 解酒饮对肝组织病理组织学的改变的影响(HE, 400×)
A—正常对照组；B—模型对照组；C—联苯双酯组；D—解酒饮低剂量组；E—解酒饮中剂量组；F—解酒饮高剂量组。

Fig. 2 Effects of Jiejiu oral liquid on acute hepatic injury histomorphological(HE, 400×)

A—normal group; B—model group; C—bifendate group; D—low dose group; E—middle dose group; F—high dose group.

4 讨论

从中医学的角度来看，酒为湿邪，过量酒精摄入人体是导致湿热之邪蕴积，脾胃损伤，湿热内生，熏蒸肝胆，浊阴不降气，脾失痰湿，气机不畅而致胃痞，肝火炽盛^[8]。治疗大法应以行气活血、清热利湿、解毒清肝为主。在过去几年中，多种的单味中草药、复方中药制剂已被证明能有有效的预防和治疗酒精性肝损伤，使用天然来源的

表 4 小鼠急性酒精性肝损伤病理切片检查总积分($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 4 Effects of Jiejiu oral liquid on acute hepatic injury histomorphological($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	病理检查总积分
正常组	10	$0 \pm 0^{(3)}$
模型组	—	$13.20 \pm 2.2^{(1)}$
联苯双酯组	0.011 7	$6.10 \pm 1.37^{(1)(2)}$
解酒饮低剂量组	6.25	$8.50 \pm 1.58^{(1)(2)}$
解酒饮中剂量组	12.5	$5.80 \pm 1.03^{(1)(2)}$
解酒饮高剂量组	25	$4.80 \pm 0.79^{(1)(2)}$

注：与正常对照组相比，¹⁾ $P < 0.01$ ；与模型对照组比较，²⁾ $P < 0.01$ 。

Notes: Compared with the normal group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with model group, ³⁾ $P < 0.01$.

中草药及中药方剂防治酒精性肝损伤具有不良反应小、资源广泛、价格便宜、疗效显著等优点。中医认为枳椇子具有和胃化湿、益气健脾，滋养补血之功效，其药理作用包括解酒利尿、护肝、抗致突变和抗肿瘤等作用^[9]。中医认为葛花具有解酒醒脾、化毒护胃、清热养颜之功能，有研究发现葛花能减少肝脂质过氧化和促乙醇代谢的作用^[10]。中医认为性甘的葛根，具有生津退热，解肌止渴之功。据研究，葛根单体成分葛根素能维护肝脏正常功能及对肝损伤有预防作用^[11]。具有泻火解毒和疏散表寒的甘草，其黄酮类成分能通过抗氧化作用保护正常细胞免受氧化损伤^[12]。药理作用显示，女贞子可以滋补肝肾，用于补气舒肝、通经和血^[13]。根据中医理论，解酒饮具有醒脾养肝益胃、解酒毒、祛烦渴、理气止呕和升清阳而止头痛的功效。

酒精能造成肝脏损伤，血清 AST 和 ALT 活性被认为是肝损伤最敏感的生物标志物，被广泛应用于评价肝损伤^[14]。脂肪肝或饮酒会导致 ALT 的升高。肝细胞损害程度与血清中 AST 活性成正比关系，维护正常的肝脏功能是保护肝细胞的关键所在。测定血清中 ALT 和 AST 水平可以用来协助诊断疾病和观察预后。本实验选择酒精复制急性肝损伤的动物模型^[15]，按 $12 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃给予 56°北京红星二锅头，12 h 后，从生化指标结果分析，中、高剂量的解酒饮能抑制酒精引发的小鼠 ALT、AST 活性的提高。这提示，对急性酒精致肝功损伤，解酒饮中、高剂量组具有保护作用。

组织病理学检查显示，正常组小鼠肝细胞完整，肝小叶结构正常。模型组小鼠肝细胞脂肪变性坏死，少量的炎症细胞浸润。解酒饮各剂量组用药后肝中脂肪空泡减少，其炎症表现不明显。其中高剂量组解酒饮的肝脏组织结构最接近正常

组的肝脏结构。从病理组织形态学观察来看，解酒饮对酒精致急性肝损伤具有一定保护作用，尤其以高剂量组解酒饮疗效最佳。这表明解酒饮对酒精致急性肝损伤有防治作用。

由此可见，解酒饮在急性酒精性肝损伤的防治上有一定的作用，解酒饮可抑制 ALT、AST 的活性升高，改善小鼠病理性损伤，从而防治酒精性肝损伤。其作用机制还有待进一步探讨。

REFERENCES

- [1] ZHAO Y X, TAO M X, CHENG G Y, et al Effects of polysaccharides from *termitomyces albuminosus* on pathological liver ultrastructure and gene expression in mice with alcoholic liver injury [J]. Food Sci(食品科学), 2015, 36(5): 195-199.
- [2] PANG X J, FU C H, LIN Q Y. Pharmacological study of an antidipsotropic Chinese herbal mixture in mice: Jiejiuying [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2004, 13(12): 1341-1343.
- [3] HONG Y P, PANG X J. Study on acute liver injury induced by Jiejiu oral liquid in mice [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(3): 352-357.
- [4] SUN R, ZHAO Z Y, WANG P, et al. The effect of Zhiganqing granule (脂肝清颗粒) on fatty liver models in rats [J]. Pharm Clin Chin Mater Med(中药药理与临床), 2005, 21(3): 56-59.
- [5] ZHANG X D, YAN N N, WANG G Q, et al. Study on protective effects of vitamin c injection on acute ethanol-induced liver injury in mice [J]. J Changzhi Med College(长治医学院学报), 2015, 29(4): 245-248.
- [6] NANJI A A, MENDENHALL C L, FRENCH S W. Beef fat prevents alcoholic liver disease in the rat [J]. Alcohol Clin Exp Res, 1989, 13(1): 15-19.
- [7] 戈娜. 海兔素改善大鼠酒精性肝损伤的效果及其机制研究[D]. 山东: 青岛大学. 2014.
- [8] ZHAN Z Y, SUN M Y. Traditional Chinese medicine treatment and research progress of alcoholic liver disease [J]. J Sichuan Tradit Chin Med(四川中医), 2014, 32(10): 182-186.
- [9] 戈娜. 枳椇子和水飞蓟配伍对酒精性肝损伤大鼠肝细胞线粒体的保护作用巧机制探讨[D]. 黑龙江: 黑龙江中医药大学. 2016.
- [10] 王萌萌. 复方醇提物对预防小鼠急性中毒的药效学研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学. 2013.
- [11] JI H, GUO X, YIN P. The preventive action of puerarin on alcoholic liver injury [J]. Med Recapitulate(医学综述), 2016, 22(15): 3048-3055.
- [12] FANG S Q, LENG K, DUAN J A, et al. Flavonoids and their anti-oxidant activities of the herb residues of *Glycyrrhiza glabra* L [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2015, 37(11): 2443-2448.
- [13] ZHANG M F, SHEN Y Q. Research advances on hepatoprotective effects of *Ligustri Lucidi Fructus* and its. Drug Eval Res(药物评价研究), 2014, 37(3): 280-284.
- [14] ZHANG L L, PENG Y. Establishment of acute hepatic injury model in mice and correlation analysis of serum biochemical parameters [J]. China Pharm(中国药师), 2015, 18(9): 1460-1463.
- [15] ZHANG Q, CHEN H, PENG S L, et al. Progress study of animal models of acute hepatic injury [J]. J Jilin Med College(吉林医药学院学报), 2011, 32(4): 216-220.

收稿日期: 2017-04-07

(本文责编: 李艳芳)