

化橘红水提物对酒精诱导的急性肝损伤保护作用

吴道顺¹, 王梦晨¹, 张雪涟¹, 郭一飞¹, 董政起¹, 王艳慧², 罗云^{1*}, 孙晓波^{1*}

(1. 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193;

2. 广州市香雪制药股份有限公司, 广州 510663)

[摘要] 目的:探究化橘红水提物对酒精诱导急性肝损伤小鼠的药效学作用,为化橘红解酒保肝作用的开发应用提供数据支撑。方法:利用高效液相色谱法(HPLC)确定化橘红水提物的主要成分。根据体质量将60只Balb/c小鼠随机分为6个组:正常组、模型组、化橘红提取物低、中、高剂量组(0.5、1.0、2.0 g·kg⁻¹)及海王金樽片组(2.0 g·kg⁻¹)。正常组及模型组给予等体积0.5%羧甲基纤维素钠溶液灌胃。每天灌胃给药1次,连续给药14 d。给药结束前1 d,小鼠禁食不禁水12 h,除正常组外其他各组按体质量灌胃56°白酒(13 mL·kg⁻¹),2 h后摘眼球取血。解剖获得肝脏,称其湿重。全自动生化仪检测丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)及乙醇脱氢酶(ADH)的表达水平;苏木素-伊红(HE)染色检测小鼠肝脏组织病理变化;原位末端标记法(TUNEL)/DAB双染法观察阳性细胞数的比例判断细胞凋亡情况;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测凋亡相关蛋白表达情况。结果:化橘红水提物HPLC特征图谱显示主要成分是野漆树苷和柚皮苷。与正常组比较,模型组小鼠肝体比显著增加($P<0.01$),肝脏损伤酶ALT和AST的表达明显增加($P<0.05$, $P<0.01$),乙醇脱氢酶(ADH)表达水平明显降低($P<0.05$),肝小叶结构显模糊,肝组织呈现不同程度的病理改变,细胞胞浆显著疏松、水肿,脂肪变性较严重,TUNEL阳性率显著增加($P<0.01$),B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)表达显著降低($P<0.01$),Bcl-2相关X蛋白(Bax)和胱天蛋白酶-3(Caspase-3)显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,化橘红水提物中剂量组能明显降低肝体比($P<0.05$),化橘红水提物各剂量组能明显降低小鼠血清中ALT、AST活性($P<0.05$, $P<0.01$),且能明显上调ADH的表达水平($P<0.05$),能够明显改善由酒精引起的细胞胞浆疏松、水肿、脂肪变性的病理特征,明显降低肝细胞TUNEL阳性率($P<0.05$, $P<0.01$),提升抗凋亡蛋白Bcl-2的表达($P<0.05$),降低促凋亡蛋白Bax和Caspase-3的表达水平($P<0.01$)。结论:化橘红水提物通过调节ALT、AST、ADH的表达水平、改善肝脏脂肪病变和肝细胞凋亡,保护急性肝损伤。

[关键词] 化橘红水提物;酒精性急性肝损伤;酶表达;肝细胞凋亡;肝保护

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)19-0042-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221190

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220411.1617.003.html>

[网络出版日期] 2022-04-12 18:49

Protective Effect of Water Extract of Citri Grandis Exocarpium on Alcohol-induced Acute Liver Injury

WU Daoshun¹, WANG Mengchen¹, ZHANG Xuelian¹, GUO Yifei¹, DONG Zhengqi¹,

WANG Yanhui², LUO Yun^{1*}, SUN Xiaobo^{1*}

(1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China; 2. Guangzhou Xiangxue Pharmaceutical Co. Ltd., Guangzhou 510663, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the pharmacodynamic effect of the water extract of Citri Grandis exocarpium (WEC) on mice with alcohol-induced acute liver injury and provide data support for the development of this medicinal for anti-alcoholism and liver protection. **Method:** The main components of WEC

[收稿日期] 2022-02-09

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2018YFC1706704)

[第一作者] 吴道顺,在读博士,从事中药药理学研究,E-mail:wudaoshun17@163.com

[通信作者] *罗云,博士,副研究员,从事中药药理方向研究,E-mail:ly20040423@126.com;

*孙晓波,博士,研究员,从事中药药理方向研究,E-mail:sun_xiaobo163@163.com

were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). Sixty Balb/c mice were randomized into 6 groups: control group (equal volume of 0.5% carboxymethyl cellulose sodium solution), model group (equal volume of 0.5% carboxymethyl cellulose sodium solution), low-, medium-, and high-dose WEC groups (0.5, 1.0, 2.0 g·kg⁻¹), and Haiwang Jinzun tablet positive control group (2.0 g·kg⁻¹). The administration lasted 14 days. One day before the end of the administration, mice were fasted for 12 h with free access to water. The mice, except the control group, were given 56° Chinese liquor (13 mL·kg⁻¹). After 2 h, blood was taken from eyeballs and the liver was dissected and weighed. Automatic biochemical analyzer was employed to detect the expression of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and alcohol dehydrogenase (ADH). The pathological changes of liver tissues were observed based on hematoxylin-eosin (HE) staining, and apoptosis of hepatocytes based on TUNEL/DAB staining. The expression of proteins related to apoptosis was detected by Western blot. **Result:** According to the HPLC fingerprint, the main components of WEC were rhoifolin and naringin. Compared with the control group, the model group showed increase in liver/body weight ratio ($P<0.01$) and the expression of ALT and AST ($P<0.05$, $P<0.01$), decrease in the expression of ADH ($P<0.05$), blurred structure of hepatic lobules, pathological changes of liver tissue, loose cytoplasm with edema, severe steatosis, rise of the TUNEL-positive rate ($P<0.01$), reduction in expression of Bcl-2 ($P<0.01$), and increase in Bax and Caspase-3 ($P<0.01$). Compared with the model group, medium-dose WEC lowered liver/body weight ratio ($P<0.05$). All doses of WEC depressed the activity of ALT and AST ($P<0.05$, $P<0.01$), up-regulated the expression of ADH ($P<0.05$), significantly improved the pathological features of alcohol-induced cytoplasmic porosity, edema, and steatosis, down-regulated the TUNEL-positive rate ($P<0.05$, $P<0.01$), enhanced the expression of Bcl-2 ($P<0.05$), and decreased Bax and Caspase-3 ($P<0.01$). **Conclusion:** WEC regulates the expression of ALT, AST, and ADH and improves hepatic steatosis and hepatocyte apoptosis to fight against acute liver injury.

[Keywords] water extract of Citri Grandis Exocarpium; alcohol-induced acute liver injury; enzyme expression level; hepatocyte apoptosis; hepatic protection

酒精性肝病(ALD)是全世界慢性肝脏疾病发生的主要因素之一,近年来发病率呈现上升的趋势^[1]。急性酒精性肝损伤是ALD产生的初期表现,酒精及其代谢产物会导致肝脏脂质代谢发生紊乱、氧化应激及造成细胞凋亡等损伤^[2]。如不加以有效防治,ALD可进一步转变为酒精性肝炎、肝脏纤维化以及肝硬化,严重的可发展为肝癌。

化橘红又名化州橘红,是芸香科植物化州柚或柚的未成熟或近成熟的干燥外层果皮。化橘红是主产于广东化州或广西陆州的道地中药材,其中化州产质量最佳,且主要有黄酮类、香豆素类、挥发油类、多糖类等成分^[3]。化橘红具有理气宽中,燥湿化痰的功效。已有研究表明其具有强力的化痰止咳效果,同时在抗炎、抗氧化及免疫调节等方面也有显著的表现^[4]。杨澄等^[5]报道化橘红能够抑制心肌肥厚、减少心肌损伤,进而改善大鼠糖尿病心肌病的发生发展。钟芳芳等^[6]证明化橘红多糖能够通过抗氧化、抗炎减缓 β 淀粉样蛋白致小鼠老年性痴呆。董晶等^[7]还发现化橘红主要活性成分柚皮苷与水合

橘皮内酯具有显著的促平滑肌细胞增殖作用。本研究采用水提法获得化橘红水提物,并建立体内动物模型观察其对急性酒精性肝损伤的保护效果。

1 材料

1.1 药物 化橘红提取物(广州市香雪制药股份有限公司,批号20200101A);海王金樽片(海王健康科技发展有限公司,批号20191202)。

1.2 试剂 甲醇(北京化工厂,批号20160902);氯化钠注射液(山东华鲁制药有限公司,批号E17030305);多聚甲醛(北京索莱宝科技有限公司,批号20210908);羧甲基纤维素钠(美国Sigma-Aldrich公司,批号DCBC0696V);磷酸盐缓冲液(PBS)(无锡傲锐东源生物科技有限公司,批号ZLI-9062);56°红星二锅头(北京红星股份有限公司,批号20190305);一次性使用无菌溶药注射器1、2、5、10 mL(江苏治宇医疗器材有限公司);免疫组化笔(北京中杉金桥生物技术有限公司);天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、乙醇脱氢酶(ADH)试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司)

司,批号分别为210921、210991、201091);原位末端标记法(TUNEL)试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号110919201221);兔抗B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、兔抗Bcl-2相关X蛋白(Bax)、兔抗胱天蛋白酶-3(Caspase-3)、兔抗 β -肌动蛋白(β -actin)(英国Abcam公司,批号分别为ab182858、ab182733、ab44976、ab115777);山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(H+L)二抗[柏奥易杰(北京)科技有限公司,批号80910101];苏木素染色液、伊红染色液(无锡傲锐东源生物科技有限公司,批号分别为19041201、19040921)。

1.3 仪器 Waters e2695-2998型高效液相色谱仪(DAD检测器,美国Waters公司),MX5型1/100万电子分析天平、MS204S型1/1万电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公司),R215型旋转蒸发仪(瑞士Buchi公司),YP1001N型电子天平(上海菁海仪器有限公司),湿盒(上海协力塑料制品厂),EG720 EAU-SS型微波炉(美的集团),RM2245型石蜡切片机、Aperio SC2型数字幻灯片图像采集及分析系统(德国Leica公司),AU480型全自动生化分析仪(贝克曼库尔特株式会社),Heraeus Multifuge X1R台式高速冷冻离心机(美国Thermo Fisher Scientific公司)。

1.4 动物 60只Balb/c小鼠,雌雄各半,体质量18~20 g,购买自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2016-0006,饲养于中国医学科学院药用植物研究所SPF级动物房[许可证号SYXK(京)2017-0020]。动物实验屏障主要环境指标:室温(22±1)℃,日温差≤4℃,相对湿度60%。所有动物均由培训合格的人员进行饲养管理,整个饲养过程中保持动物饮食活动自由。本实验所用动物及相关处置应符合动物福利的要求,实验开展前要经过中国医学科学院/北京协和医学院药用植物研究所实验动物管理与动物福利委员会(IACUC)的审查批准(批准号SLXD-20200514001)。

2 方法

2.1 化橘红水提物的制备 取化橘红药材1 000 g,加水回流提取2次,第1次加入纯化水10 L回流提取3 h,第2次加入水8 L回流提取2 h,2次提取液分别用2层240目绢布滤过,合并滤液,滤液采用旋转蒸发器减压浓缩,于80℃浓缩至相对密度1.128 g·mL⁻¹(80℃热测),即得化橘红提取物,称质量共1 056.93 g(每1 g提取物含化橘红药材0.946 g)。

2.2 化橘红水提物特征图谱

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取野漆树苷对照品5 mg(折干),置于25 mL棕色容量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,获得200 mg·L⁻¹的野漆树苷对照品母液。精密称取柚皮苷对照品16 mg,于10 mL棕色容量瓶中,精密加入野漆树苷对照品母液2.5 mL,加甲醇定容至刻度,即得混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取化橘红水提物约2.5 g,精密称定,加入25 mL超纯水稀释,称定质量,然后取2.0 g稀释液至10 mL容量瓶中,精密称定,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得化橘红提取物供试品溶液。

2.2.3 液相色谱(HPLC)色谱条件 Thermo Acclaim™ 120 C₁₈色谱柱,流动相A为0.1%乙酸-水溶液,流动相B为0.1%乙酸-乙腈溶液,按表1中的规定进行梯度洗脱,流速0.6 mL·min⁻¹,柱温30℃,进样体积各10 μ L,检测波长320 nm。

表1 流动相洗脱顺序

Table 1 Mobile phase elution procedure

t/min	流动相A/%	流动相B/%
0	95	5
20	78	22
50	58	42
70	0	100
75	0	100
78	95	5

2.3 实验分组、造模及给药 将60只Balb/c小鼠随机分为6组,每组10只,分别为正常组、模型组、化橘红水提物低、中、高剂量组(中药低、中、高剂量组,0.5、1.0、2.0 g·kg⁻¹)、海王金樽片组(2.0 g·kg⁻¹),所有药物均溶解在0.5%羧甲基纤维素钠。根据2020年版《中华人民共和国药典》一部^[8]规定,化橘红用法用量为3~6 g。人均体质量按60 kg计算,化橘红给药剂量为0.05~0.10 g·kg⁻¹。参考《药理实验方法学》^[9]中人和动物间体表面积折算公式得到相应的等效剂量,则小鼠给药剂量为0.46~0.91 g·kg⁻¹,以剂量范围下限0.5 g·kg⁻¹为低剂量,组间以2倍剂量递增,1.0 g·kg⁻¹为中剂量,2.0 g·kg⁻¹为高剂量。各组分别口服给药,正常组与模型组给予0.5%羧甲基纤维素钠,每天灌胃给药1次,连续给药14 d。参照文献[10-11]方法,模型制备前禁食不禁水12 h,除正常组外其他各组按体质量给予56°红星二锅头

(13 mL·kg⁻¹,灌胃),2 h后摘眼球取血,3 000 r·min⁻¹离心15 min(离心半径10 cm),取上清液,保存于-80 °C冰箱以备用。解剖获得肝脏并称其湿重,计算肝体比。

2.4 血清中ALT、AST和ADH测定 按照试剂盒说明书在全自动生化仪下检测ALT、AST和ADH的表达水平。

2.5 苏木素-伊红(HE)染色观察肝脏组织病理变化 获取肝脏组织,多聚甲醛固定,制作石蜡切片,HE染色,数字玻片图像扫描及分析系统捕获和分析图像。

2.6 TUNEL/DAB双染法观察阳性细胞数的比例判断细胞凋亡情况 将石蜡切片在62 °C下加热60 min而脱蜡。然后在室温下将脱蜡切片在二甲苯浴中浸泡2次,每次10 min。将组织切片转移到以下溶液中连续水化5 min:100%乙醇2次,95%、90%、85%、70%乙醇和双蒸水。按照试剂盒说明书进行蛋白酶K处理和抗原修复。然后,将切片与TdT酶和dUTP在37 °C下孵育2 h,用PBS洗涤;细胞核用DAB染色。通过数字载玻片图像扫描和分析系统捕获和分析图像。

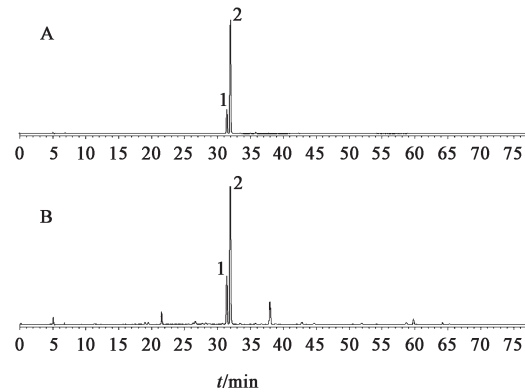
2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达水平 提取各组肝脏组织总蛋白,BCA蛋白定量、Loading buffer煮样;SDS凝胶电泳分离,转膜,脱脂奶粉封闭,加入Bcl-2一抗(1:500)、Bax一抗(1:500)、Caspase-3(1:500)、β-actin(1:500),4 °C过夜。TBST洗3次(15 min/次),随后加入兔抗免疫球蛋白(Ig)G二抗(1:1 000)室温孵育1 h。TBST洗3次(15 min/次),加入化学发光液孵育5 min后显

影。获得条带并利用Gel Pro Analyzer分析灰度值。

2.8 统计学方法 各组数据均用 $\bar{x}\pm s$ 表示,各组间比较用Graphpad Prism 7.0进行方差分析(ANOVA),Tukey法进行两两比较, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 化橘红提取物HPLC特征图谱 结果表明化橘红水提物的主要成分为野漆树苷(Peak 1)和柚皮苷(Peak 2)。见图1。



注:A.混合对照品溶液;B.化橘红水提物;1.野漆树苷;2.柚皮苷

图1 化橘红水提物HPLC特征图谱

Fig. 1 HPLC characteristic chromatogram of water extract of citri grandis exocarpium (WEC)

3.2 对急性肝损伤小鼠体质量和肝体比的影响

连续给药14 d后,各组小鼠体质量差异无统计学意义。与正常组小鼠比较,模型组小鼠肝体比显著增加($P<0.01$);与模型组比较,中药中剂量组及海王金樽片组能够显著降低肝体比($P<0.05$)。见表2。

表2 化橘红水提取物对急性肝损伤小鼠体质量和肝体比的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of WEC on body weight and ratio of liver/weight in acute liver injury mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	小鼠体质量/g					肝体比/%
		0 d	3 d	6 d	9 d	12 d	
正常组		19.81±1.82	20.96±1.22	21.14±1.08	20.64±1.12	19.22±1.06	4.22±0.19
模型组		20.17±0.48	20.41±0.74	20.26±0.70	20.65±0.62	19.65±0.77	5.07±0.46 ²⁾
中药低剂量组	0.5	20.06±0.75	20.26±0.96	20.04±1.62	20.42±1.58	19.19±1.46	4.72±0.21
中药中剂量组	1.0	20.24±0.86	20.35±1.02	20.10±1.05	20.46±0.77	19.06±0.79	4.60±0.20 ³⁾
中药高剂量组	2.0	20.01±0.54	20.16±0.65	19.17±2.09	20.30±0.60	19.04±0.70	4.70±0.15
海王金樽片组	2.0	20.08±1.01	20.78±1.28	20.72±1.02	21.30±1.14	20.06±1.12	4.62±0.18 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表3-表5同)

3.3 对急性肝损伤小鼠肝损伤酶和ADH的影响 连续灌胃给药14 d后,与正常组比较,模型组小鼠肝脏损伤酶AST和ALT的表达明显增加($P<$

$0.05, P<0.01$),ADH表达水平明显降低($P<0.05$);与模型组相比,给予中药(低、中、高剂量)及金樽片后能够明显降低AST和ALT的表达水平($P<0.05$,

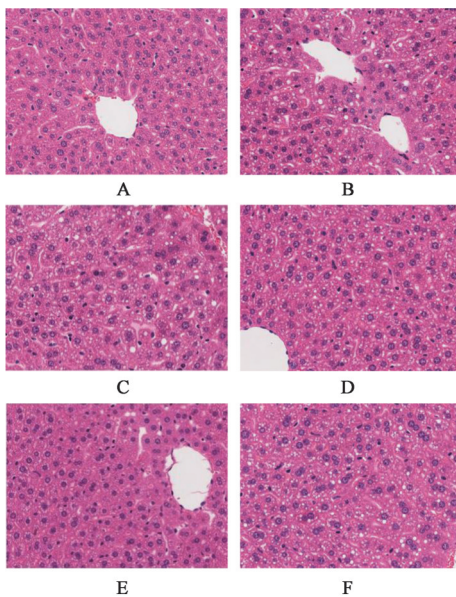
$P<0.01$), 并且明显增加乙醇脱氢酶(ADH)表达水平($P<0.05$)。见表3。

表3 化橘红水提物对急性肝损伤小鼠AST、ALT和ADH的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of WEC on AST, ALT and ADH in acute liver injury mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	AST	ALT	ADH $U\cdot L^{-1}$
正常组		76.40±12.66	28.90±2.83	1.89±0.53
模型组		103.97±24.64 ¹⁾	41.52±8.46 ²⁾	1.14±0.13 ¹⁾
中药低剂量组	0.5	78.39±17.47 ³⁾	32.48±4.45 ³⁾	1.44±0.29 ³⁾
中药中剂量组	1.0	78.74±14.44 ³⁾	31.75±1.75 ⁴⁾	1.33±0.17 ³⁾
中药高剂量组	2.0	78.02±18.26 ³⁾	31.23±4.63 ³⁾	1.72±0.46 ³⁾
海王金樽片组	2.0	75.39±10.86 ³⁾	34.69±5.81 ³⁾	1.42±0.23 ³⁾

3.4 对急性肝损伤小鼠肝组织病变的影响 正常组小鼠肝小叶结构清晰,肝细胞索排列整齐,肝细胞结构基本正常。与正常组比较,模型组肝小叶结构显模糊,肝组织呈现不同程度的病理改变,细胞浆显著疏松、水肿,脂肪变性较严重;与模型组比较,中药低、中、高剂量组及海王金樽片组均可见肝组织病理学改变明显改善,肝细胞脂肪变性显著减轻,肝细胞索排列相对整齐。见图2。



注:A.正常组;B.模型组;C.中药低剂量组;D.中药中剂量组;E.中药高剂量组;F.海王金樽片组(图3和图4同)

图2 化橘红水提物对急性肝损伤小鼠肝脏组织病理学的影响(HE, $\times 200$)

Fig. 2 Effect of WEC on pathological changes of liver tissues in acute liver injury mice (HE, $\times 200$)

3.5 对急性肝损伤小鼠肝细胞凋亡的影响 TUNEL染色检测肝细胞凋亡情况,正常组小鼠肝

细胞排列整齐,细胞核清晰。与正常组比较,模型组肝细胞核破坏严重,棕黄褐色颗粒增多,细胞大量凋亡,肝细胞TUNEL阳性率显著增加($P<0.01$);与模型组比较,中药各剂量组及海王金樽片组均能不同程度减轻细胞凋亡,均可明显降低肝细胞TUNEL阳性率($P<0.05, P<0.01$)。Western blot结果检测凋亡相关蛋白水平,与正常组比较,模型组的Bcl-2表达显著降低($P<0.01$),Bax和Caspase-3显著升高($P<0.01$);与模型组比较,化橘红水提物各剂量组均能够明显提升抗凋亡蛋白Bcl-2的表达($P<0.05$),显著降低促凋亡蛋白Bax和Caspase-3的表达水平($P<0.01$)。见图3和表4、图4和表5。

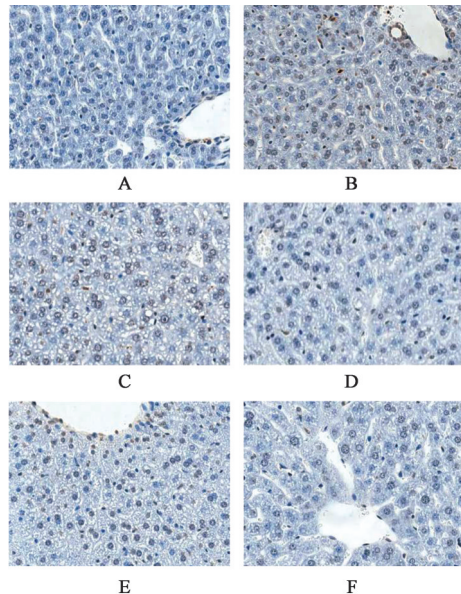


图3 化橘红水提物对急性肝损伤小鼠肝组织细胞TUNEL阳性表达的影响(TUNEL, $\times 200$)

Fig. 3 Effect of WEC on TUNEL positive expression in mice hepatocyte in acute liver injury mice (TUNEL, $\times 200$)

表4 化橘红水提物对急性肝损伤小鼠肝组织细胞TUNEL阳性率的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effect of WEC on TUNEL positive rate of mice hepatocyte in acute liver injury mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	TUNEL阳性率/%
正常组		2.14±0.30
模型组		35.31±2.21 ²⁾
中药低剂量组	0.5	28.49±1.38 ³⁾
中药中剂量组	1.0	18.65±1.44 ⁴⁾
中药高剂量组	2.0	15.57±1.92 ⁴⁾
海王金樽片组	2.0	14.82±2.65 ⁴⁾

4 讨论

过量饮酒是慢性肝病和早死亡的主要原因之

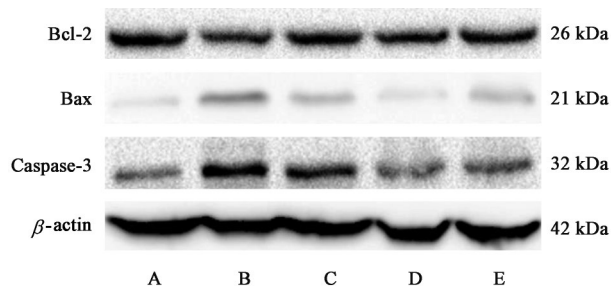


图4 小鼠肝组织细胞凋亡相关 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of apoptosis-related protein expression of Bcl-2, Bax and Caspase-3 in mice hepatocyte

表5 化橘红水提物对急性肝损伤小鼠肝组织细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 及 Caspase-3 表达影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of WEC on Bcl-2, Bax and Caspase-3 expression of mice hepatocyte apoptosis in acute liver injury mice ($\bar{x} \pm s, n=3$) %

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	Bcl-2 /β-actin	Bax /β-actin	Caspase-3 /β-actin
正常组		100.00±5.01	100.50±8.02	100.01±9.08
模型组		46.58±2.20 ²⁾	590.90±15.50 ²⁾	647.69±20.83 ²⁾
中药低剂量组	0.5	77.46±5.10 ³⁾	235.26±10.03 ⁴⁾	302.22±8.06 ⁴⁾
中药中剂量组	1.0	74.38±6.40 ³⁾	154.60±11.46 ⁴⁾	188.53±12.32 ⁴⁾
中药高剂量组	2.0	70.62±3.12 ³⁾	277.52±15.82 ⁴⁾	178.06±13.17 ⁴⁾

—^[12]。全世界约有20亿人饮酒,超过7500万人被诊断为酒精使用障碍,并有罹患酒精相关肝病的风险^[13]。近年来,急性酒精性肝炎的发病率和死亡率呈递增的趋势。重度酒精性肝炎患者的30d平均死亡率可能高达17%~50%^[14]。目前,皮质类固醇仍然是治疗酒精性肝炎的主要药物,使用皮质类固醇有许多禁忌症,如感染、肠胃出血、胰腺炎和病毒性肝炎^[15]。此外,荟萃分析表明糖皮质激素治疗急性肝炎的疗效时间有限,仅能降低28d内的死亡风险,但不能降低未来6个月内死亡风险^[16]。因此,临床急需开发新的药物来应对急性酒精性肝病的治疗。

化橘红常用于咳嗽痰多,食积伤酒,呕恶痞闷^[8]。其主要含有柚皮苷、野漆树苷、水合橘皮内酯、橘皮内酯和多糖等成分。现代研究表明化橘红具有抗氧化、抗炎、抗细胞焦亡,治疗老年痴呆、糖尿病心肌病等功效^[4,6,17]。本研究首先采用HPLC分析了化橘红水提物的特征图谱,发现主要成分有野漆树苷和柚皮苷。进一步利用具有肝损伤临床特征的小鼠酒精急性肝损伤模型^[18],结果发现化橘红水提物可明显改善肝脏脂肪变性等病理学变化。

肝脏是酒精代谢的场所,通过乙醇脱氢酶将酒精代谢成乙醛,并进一步通过乙醛脱氢酶变为乙酸^[19]。本研究证实了化橘红水提物能够显著增加ADH的表达水平,表明能够促进酒精代谢。AST和ALT是临床肝损伤检测的金指标^[20],本研究结果显示化橘红水提物能够显著降低AST和ALT的表达水平,表明其能够改善酒精引起的急性肝损伤。

肝细胞凋亡是酒精性肝损伤的主要病理特征^[21]。已有文献表明柚皮苷能够通过减轻脂质积累,减少氧化应激和细胞凋亡,从而改善酒精性肝损伤^[22]。本研究结果表明化橘红水提物能够显著降低酒精引起的肝细胞凋亡。

综上所述,化橘红水提物对酒精诱导导致的小鼠急性肝损伤具有保护作用,其作用机制可能与增加乙醇脱氢酶、减少肝损伤酶、抑制肝细胞凋亡有关。该研究为进一步探索化橘红解酒保肝作用的活性成分打下坚实基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] SINGAL A K, BATALLER R, AHN J, et al. ACG clinical guideline: Alcoholic liver disease [J]. Am J Gastroenterol, 2018, 113(2): 175-194.

[2] KOURKOUNPETIS T, SOOD G. Pathogenesis of alcoholic liver disease: An update [J]. Clin Liver Dis, 2019, 23(1): 71-80.

[3] 莫小路, 蔡岳文, 曾庆钱. 中药化橘红的研究进展 [J]. 食品与药品, 2007, 6: 39-41.

[4] 王艳慧. 化橘红的研究进展 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2017, 19(6): 1076-1082.

[5] 杨澄, 刘历威. 化橘红对糖尿病心肌病心肌细胞 TGF-β₁/Smad 信号通路的干预作用 [J]. 分子影像学杂志, 2017, 40(2): 170-174.

[6] 钟芳芳, 严鸣光, 郭建军, 等. 化橘红多糖对 Aβ₂₅₋₃₅ 致小鼠老年性痴呆模型的保护作用及机制研究 [J]. 热带医学杂志, 2019, 19(12): 1480-1484.

[7] 董晶, 肖移生, 陈海芳, 等. 化橘红中主要活性成分对豚鼠气管平滑肌细胞增殖的影响 [J]. 井冈山大学学报: 自然科学版, 2015, 36(1): 88-90, 106.

[8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 76-77.

[9] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 202-203.

[10] 王新财, 杨和. 葡萄籽原花青素对酒精性肝损伤小鼠的保护作用 [J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(7): 1054-1057.

- [11] 张岳,赵天倚,王欢,等. 麦角甾酮对小鼠急性酒精性肝损伤及肠道菌群群落组成的影响[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(21):2561-2569.
- [12] GBD 2016 ALCOHOL COLLABORATORS. Alcohol use and burden for 195 countries and territories, 1990-2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 [J]. Lancet, 2018, 392(10152): 1015-1035.
- [13] ASRANI S K, DEVARBHAVI H, EATON J, et al. Burden of liver diseases in the world [J]. J Hepatol, 2019, 70(1):151-171.
- [14] THURSZ M R, RICHARDSON P, ALLISON M, et al. Prednisolone or pentoxifylline for alcoholic hepatitis [J]. N Engl J Med, 2015, 372(17):1619-1628.
- [15] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组. 酒精性肝病防治指南(2018年更新版)[J]. 实用肝脏病杂志, 2018, 21(2):170-176.
- [16] LOUVET A, THURSZ M R, KIM D J, et al. Corticosteroids reduce risk of death within 28 days for patients with severe alcoholic hepatitis, compared with pentoxifylline or placebo—a meta-analysis of individual data from controlled trials [J]. Gastroenterology, 2018, 155(2):458-468.
- [17] 钟楚楚,吴孟华,余品皓,等. 橘红与化橘红采制、炮制及功效的古今演变探析[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(18):4865-4874.
- [18] YANG C, HE X, ZHAO J, et al. Hepatoprotection by Ginsenoside Rg₁ in alcoholic liver disease [J]. Int Immunopharmacol, 2021, 92:107327.
- [19] LE DARÉ B, LAGENTE V, GICQUEL T. Ethanol and its metabolites: Update on toxicity, benefits, and focus on immunomodulatory effects [J]. Drug Metab Rev, 2019, 51(4):545-561.
- [20] VASIKASIN V, ROJDUMRONGRATTANA T, CHUERBOONCHAI W, et al. Effect of standard dose paracetamol versus placebo as antipyretic therapy on liver injury in adult dengue infection: A multicentre randomised controlled trial [J]. Lancet Glob Health, 2019, 7(5):e664-e670.
- [21] NAMACHIVAYAM A, VALSALA GOPALAKRISHNAN A. A review on molecular mechanism of alcoholic liver disease [J]. Life Sci, 2021, 274:119328.
- [22] ZHOU C, LAI Y, HUANG P, et al. Naringin attenuates alcoholic liver injury by reducing lipid accumulation and oxidative stress [J]. Life Sci, 2019, 216:305-312.

[责任编辑 周冰冰]