

保肝颗粒对小鼠急性酒精性肝损伤的保护作用

张英莉, 范颖, 訾慧, 卢健, 刘丽, 李军, 梁茂新*

(辽宁中医药大学基础医学院, 沈阳 110032)

[摘要] **目的:**研究保肝颗粒对小鼠急性酒精性肝损伤的保护作用。**方法:**将实验小鼠随机分为正常组、模型组、护肝片组、力克组、保肝颗粒高、中、低剂量组。护肝片组 *ig* 给予 $0.7 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 力克组为 $1.18 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 保肝颗粒高、中、低分别为 $12.9, 6.45, 3.225 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 正常组和模型组 *ig* 给予等体积的生理盐水。每天分别 *ig* 给药 1 次, 连续 30 d, 末次给药 1 h 后, 除正常组外, 每组分别 *ig* 50% 乙醇 $0.012 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$, 造成急性肝损伤模型, 禁食不禁水 24 h 之后, 杀鼠取材, 检测小鼠血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT), 天冬氨酸氨基转移酶 (AST), 总胆红素 (TBIL), 甘油三酯 (TG), 高密度脂蛋白 (HDL), 低密度脂蛋白 (LDL) 及肝脏组织石蜡切片 HE 染色观察组织病理学改变。**结果:**与正常组比较, 模型组 ALT, AST, TBIL, TG 和 LDL 水平明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$), HDL 含量明显降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 保肝颗粒高、中、低剂量组血清 ALT, AST, TBIL, TG, LDL 水平明显降低 ($P < 0.01, P < 0.05$), HDL 水平升高 ($P < 0.01, P < 0.05$)。病理观察显示, 保肝颗粒高、中、低剂量组肝细胞的形态、结构、水肿和炎性浸润有不同程度的改善。**结论:**保肝颗粒对小鼠血清中 ALT, AST, TG 和 LDL 的含量抑制明显, 但对 TBIL 的含量抑制不明确, 能有效促进 HDL 生成, 改善肝细胞水肿及炎性浸润, 从而能达到对酒精性肝损伤的保护。

[关键词] 保肝颗粒; 急性酒精性肝损伤; 肝功能; 脂代谢; 药效学

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)12-0108-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015120108

Protective Effects of Baogan Granules on Acute Alcohol-induced Liver Injury in Mice ZHANG Ying-li, FAN Ying, ZI Hui, LU Jian, LIU Li, LI Jun, LIANG Mao-xin* (*School of Basic Medicine, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China*)

[Abstract] **Objective:** To observe the protective effect of Baogan granules on acute alcoholic-induced liver injury in mice. **Method:** The experimental mice were randomly divided into the normal group, the model group, the Hugaan tablet group ($0.7 \text{ g}\cdot\text{kg}\cdot\text{d}^{-1}$), the Like group ($1.18 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), the high-, medium-, and low-dose Baogan granules groups ($12.9, 6.45, 3.225 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$). The mice in the normal and model groups received an equal volume of saline. All mice received 30-day oral administration of the corresponding medicines. The acute liver injury model was induced in mice by feeding 50% alcohol at $0.012 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ 1 h later after the last administration. The serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartic transaminase (AST), total bilirubin (TBIL), triglyceride (TG), high-density lipoprotein (HDL) and low-density lipoprotein (LDL) were detected. Histopathological changes of liver tissue were observed by using the HE staining. **Result:** Compared with the model control group, the levels of ALT, AST, TBIL, TG and LDL increased, the level of HDL decreased in the model group ($P < 0.05, P < 0.01$). Compared with model group, the levels of ALT, AST, TBIL, TG and LDL decreased, the level of HDL increased in the high-, medium-, and low-dose Baogan granules groups ($P < 0.05, P < 0.01$). Pathological results showed that the liver cell morphology, structure, edema and inflammatory infiltration had different degrees of improvement in the Baogan granules groups. **Conclusion:** Baogan granules could obviously inhibit the serum levels of ALT, AST, TG and LDL; promote the HDL generation in mice. However, its effect on TBI is unclear. Moreover, it could protect the alcoholic-induced liver injury by improving liver edema and inflammatory cell infiltration.

[收稿日期] 20140915(012)

[基金项目] 辽宁省科技厅星火计划项目(2012215018)

[第一作者] 张英莉, 硕士, 从事中药小复方筛选与优化方法研究, Tel:13840252042, E-mail:286397140@qq.com

[通讯作者] * 梁茂新, 教授, 博士生导师, 从事中药小复方筛选与优化方法研究, Tel:024-31207370, E-mail:lmxin@126.com

[**Key words**] Baogan granules; acute alcoholic-induced liver injury; liver function; lipid metabolism; pharmacodynamics

酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)是由于长期大量的饮酒所导致的肝脏疾病^[1]。随着膳食结构和生活方式的改变,我国由酒精所导致的肝损伤的发病率呈逐年上升趋势,目前酒精所带来的肝损害已仅次于病毒性肝炎,居第2位,其危害已得到人们的重视。目前化学药治疗酒精性肝病,主要有糖皮质激素、己酮可可碱、英夫利昔等,这些药物仅能改善患者的生存率或生存期,糖皮质激素则容易诱发全身不同部位的感染。中药改善酒精性肝损伤有一定疗效,药物不良反应相应不甚明显。但诸如首乌、泽泻以及含蒽醌类物质中药在酒精性肝病使用中存在的安全隐患,也给人们敲响了警钟。本文利用中药小复方优选技术平台^[2]筛选出由药食两用的葛根、五味子等组成中药小复方保肝颗粒,拟通过药效学研究考察其对急性酒精性肝损伤的保护作用,进而为后续开发提供可靠的实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级昆明种小鼠,雄性,18~22 g,共105只,购自辽宁长生生物技术有限公司,合格证号SCXK(辽)2010-0001

1.2 药物及试剂 实验药物保肝颗粒方由葛根、五味子等组成,组方药材购自辽宁贵今生物医药有限公司,批号20130901,按药物制剂标准将生药材制成颗粒剂备用;护肝片(黑龙江葵花药业股份有限公司,批号201312007),力克(辽宁力克制药有限公司,批号20140121);56%红星二锅头白酒(北京红星股份有限公司生产,批号20131029),配置成50%白酒备用;丙氨酸氨基转移酶(ALT,批号1113051),天冬氨酸氨基转移酶(AST,批号CH0105202),甘油三酯(TG,批号1213061),总胆红素(TBIL,批号1013061),高密度脂蛋白(HDL,批号CH0105161),低密度脂蛋白(LDL,批号CH0105162),检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.3 仪器 ALC-210.3型电子天平(德国Acculab公司),TGL20M-II型台式高速大容量冷冻离心机,TBA-40FR型全自动生化仪(日本东芝公司),DW-HL38型-80℃冰箱(中科美菱公司),RM2235型石蜡切片机(德国莱卡公司),BX51型显微镜(日本Olympus公司)。

2 方法

2.1 分组与给药 将105只小鼠适应性喂养,按体

重随机分成7组,即正常组,模型组,护肝片组,力克组,保肝颗粒高、中、低剂量组,每组15只。根据药理实验,动物给药折算方法(按成人60 kg)计算^[3],护肝片组给药量为 $0.7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,力克组为 $1.18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,保肝颗粒高、中、低分别为 $12.9, 6.45, 3.225 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,正常组和模型组每天ig给予生理盐水。每天分别ig给药1次,体积均为0.2 mL,连续30 d,末次给药1 h后,除正常组外,每组分别ig 50%乙醇, $0.012 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 相当于 $4800 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,造成急性肝损伤模型^[4]。

2.2 小鼠血清生化及肝脏指数指标测定 小鼠禁食不禁水24 h后,每只小鼠眼球取血,立即脱颈处死取肝脏放入生理盐水将血洗净,用滤纸吸干表面水分再称重。将血静置一段时间后用低温离心机 $2500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min制备血清,按ALT,AST, TBIL, TG, HDL, LDL试剂盒说明用生化仪进行分析。用称得的肝重进行肝脏指数计算。

肝脏指数 = 肝脏质量/体重

2.3 病理组织学检测 取相同部位的肝组织,多聚甲醛固定,石蜡切片机制备 $5 \mu\text{m}$ 的组织石蜡切片,进行HE染色。显微镜400倍镜下观察肝组织炎症情况。

2.4 统计学分析 采用SPSS 17.0统计软件进行统计,结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析LSD法进行比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对小鼠体重的影响 与初始体重比较,14 d后正常组,模型组,护肝片组,力克组,保肝颗粒高、中、低剂量组小鼠体重分别增加了47.89%, 37.44%, 35.31%, 37.82%, 28.65%, 34.29%, 39.09%, 组间比较未见统计学差异,表明保肝颗粒对小鼠的进食与体重无明显影响。

3.2 对肝损伤小鼠肝脏指数的影响 模型组比正常组有所降低,与模型组比较,护肝片组与力克组都有所增长,保肝颗粒高、中、低剂量组分别增加了12.68%, 6.46%和5.02%,但无统计学意义,表明保肝颗粒对小鼠的肝脏质量大小无明显影响。

3.3 对血清生化指标的影响

3.3.1 对急性肝损伤小鼠血清ALT,AST,TBIL的影响 与正常组比较,模型组AST,ALT,TBIL水平

明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与模型组比较, 护肝片组与保肝颗粒高、中剂量组显著降低 ALT, AST 水平 ($P < 0.01$), 其次是力克组与低剂量组明显降低 ALT, AST 水平 ($P < 0.05, P < 0.01$)。TBIL 水平都

有所降低, 仅护肝片组有明显统计学差异 ($P < 0.05$), 其余组无统计学差异。表明保肝颗粒对小鼠血清 ALT 和 AST 水平的抑制有不同程度的影响, 但对 TBIL 的影响不明显。见表 1。

表 1 保肝颗粒对小鼠血清 ALT, AST, TBIL 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of Baogan Granules on ALT, AST, TBIL of mice serum ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	TBIL/μmol·L ⁻¹
正常	-	13	35.52 ± 12.60	114.52 ± 19.92	0.58 ± 0.36
模型	-	13	51.09 ± 21.35 ²⁾	140.19 ± 36.11 ¹⁾	1.41 ± 0.51 ²⁾
护肝片	0.7	12	35.45 ± 11.45 ⁴⁾	101.52 ± 11.63 ⁴⁾	0.88 ± 0.47 ³⁾
力克	1.18	13	38.02 ± 13.36 ³⁾	116.51 ± 49.53 ³⁾	1.24 ± 0.90
保肝颗粒	12.9	14	34.29 ± 12.24 ⁴⁾	106.94 ± 23.10 ⁴⁾	1.02 ± 0.39
	6.45	14	33.01 ± 11.16 ⁴⁾	107.15 ± 14.88 ⁴⁾	1.38 ± 0.85
	3.225	12	38.05 ± 11.37 ³⁾	108.68 ± 12.99 ⁴⁾	1.00 ± 0.39

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 2 同)。

3.3.2 对急性肝损伤小鼠血清 TG, HDL, LDL 的影响 与正常组比较, 模型组的 TG 和 LDL 水平显著升高 ($P < 0.01$), TG 结果, 与模型组比较, 护肝片组、力克组、保肝颗粒高、中、低剂量组的值均下降, 与护肝片组比, 高剂量组和中剂量组有统计学意义。LDL 结果, 护肝片组、力克组、高、中、低剂量组均, 下

降明显。模型组的 HDL 比正常组降低, 与模型组相比, 护肝片组、力克组、高、中、低剂量组均有所回升 ($P < 0.05, P < 0.01$)。表明保肝颗粒能抑制小鼠血清 TG 和 LDL 含量, 对小鼠血清 HDL 含量有促进生成的作用。见表 2。

3.4 对肝损伤小鼠肝组织病理学的影响 正常组

表 2 保肝颗粒对小鼠血清 TG, HDL, LDL 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of Baogan Granules on TG, HDL, LDL of mice serum ($\bar{x} \pm s$)

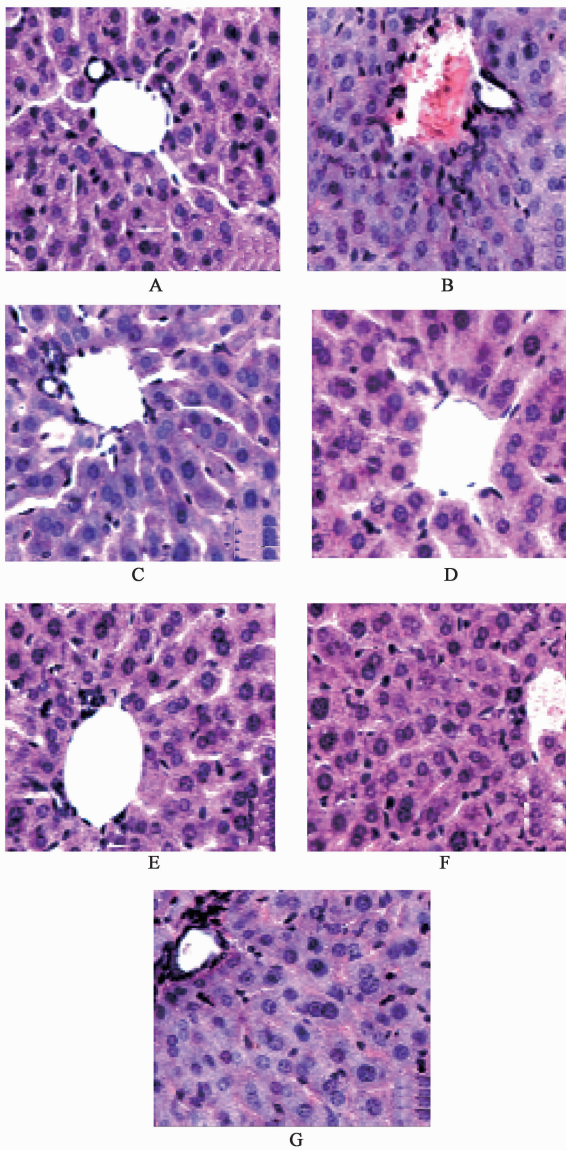
组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	TG/mmol·L ⁻¹	HDL/mmol·L ⁻¹	LDL/mmol·L ⁻¹
正常	-	13	1.65 ± 0.40	1.30 ± 0.15	0.22 ± 0.05
模型	-	13	2.14 ± 0.48 ²⁾	1.03 ± 0.14 ²⁾	0.39 ± 0.08 ²⁾
护肝片	0.7	12	1.86 ± 0.36 ³⁾	1.30 ± 0.25 ⁴⁾	0.25 ± 0.06 ⁴⁾
力克	1.18	13	1.62 ± 0.26 ⁴⁾	1.32 ± 0.16 ⁴⁾	0.26 ± 0.08 ⁴⁾
保肝颗粒	12.9	14	1.58 ± 0.33 ⁴⁾	1.22 ± 0.18 ⁴⁾	0.26 ± 0.08 ⁴⁾
	6.45	14	1.48 ± 0.25 ⁴⁾	1.23 ± 0.13 ⁴⁾	0.28 ± 0.09 ⁴⁾
	3.225	12	1.43 ± 0.37 ⁴⁾	1.17 ± 0.12 ³⁾	0.26 ± 0.08 ⁴⁾

可见肝脏组织结构正常, 肝细胞排列规整, 肝细胞大小均匀, 中央静脉大小正常, 肝细胞形态结构清晰, 核膜完整, 核仁清晰可见。模型组中央静脉和肝细胞形态、结构变形明显, 肝细胞排列层次紊乱, 肝细胞肿胀, 细胞核变大, 肝细胞界限不清晰, 有的部位核仁消失肝血窦变小、有充血, 并可见大量成团的炎性细胞浸润, 表明造模有意义。与模型组比较, 护肝片组和力克组有所改善, 可见到肝细胞膜, 肝细胞水肿现象减轻, 仍可见浸润的炎性细胞。保肝颗粒高、中、低剂量组, 可见肝细胞组织形态、结构, 与模型组比较有所改善, 肝细胞排列层次较规则, 肝细胞大小

较均匀, 形态、结构有所恢复, 有的部位仍可见肝细胞水肿及浸润的炎性细胞。见图 1。

4 讨论

酒精性肝病中医无此病名, 但历代的中医文献中, 对饮酒造成的危害已有记载, 如胁痛、伤酒、酒疸、酒癖、酒臌、酒胀等。中医学认为, 长期或偶有大量饮酒可致酒毒湿热之邪内蕴不解, 伤及脾胃, 阻滞中焦气机; 肝气疏泄失常, 犯及脾胃, 均可导致脾虚水谷之精不得运化, 机体得不到充养, 久之酿成本虚标实之证, 病位主要在脾、胃和肝。据此建立针对湿热病机且对酒精性肝病有保护作用的中药小复



A. 正常组; B. 模型组; C. 护肝片 $0.7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; D. 力克 $1.18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; E. 保肝颗粒 $12.9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$; F. 保肝颗粒 $6.45 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$; G. 保肝颗粒 $3.225 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$

图 1 保肝颗粒对肝组织形态的影响(HE, $\times 400$)

Fig.1 Effects of Baogan Granules on morphology of liver tissue (HE, $\times 400$)

方——保肝颗粒,由葛根、五味子等组成。方中葛根善“解酒毒,身热赤,酒黄”(《本草拾遗》);五味子主“益气”,“补不足”(《本草经》),也能“止渴,除烦热,解酒毒”(《日华子本草》),诸药合用,共奏清热除湿、止渴解酒之功。

本实验从小鼠血清中 ALT, AST, TBIL, TG, HDL 和 LDL 六项指标与肝组织病理的改变,观察了保肝颗粒对小鼠急性酒精性肝损伤的影响,研究表明,保肝颗粒能明显抑制小鼠血清 ALT, AST, TG 和 LDL 含量的升高;对小鼠血清 TBIL 含量的影响尚不

明确;保肝颗粒能促进 HDL 在血液中的生成。组织形态学方面,保肝颗粒能不同程度的改善肝细胞的形态结构、水肿和炎性浸润。总之,保肝颗粒对小鼠血清 ALT, AST, TG 和 LDL 的含量抑制明显,但对 TBIL 的含量抑制不显著,能有效的促进 HDL 的生成,从而能发挥对酒精性肝损伤的保护作用。

研究表明,ALT 主要存在于肝细胞浆内,AST 并分布于肝线粒体内和细胞浆中,乙醇进入体内,其代谢过程生成活性氧,活性氧可将细胞卵磷脂中的多价不饱和脂肪酸过氧化生成自由基,导致细胞膜脆化,通透性亢进,活性氧又有对脂质高亲和性的特点,既损害线粒体又损害细胞膜,从而使转氨酶流进血内,导致血中转氨酶升高^[5]。正常肝脏内转氨酶的含量约是血中的 100 倍,当肝脏受到损害时,只要有 1% 的肝细胞死亡,就可使血清中转氨酶活性增加 1 倍^[6]。因此转氨酶是肝脏受损的敏感指标,也是酒精性肝损伤的最敏感标志。近来研究发现,酒精是通过抑制肝细胞膜 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶的活性及改变质膜的组成和流动性,从而影响跨膜离子梯度和电位差,导致肝细胞 Na^+ 依赖性胆盐摄取过程受损,进而破坏胆汁的正常分泌,引起 TBIL 血中含量升高^[7]。

综上所述,医学界对酒精性肝病的研究取得了一定的成绩,但其发病机制尚不明确,本实验表明保肝颗粒对酒精性肝损伤有影响,可以起到保护作用,其保护靶向可能是该药对酒精性肝损伤的多靶点、多层次的整体综合调控有关。

[参考文献]

- [1] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学会. 酒精性肝病诊疗指南[J]. 中国肝脏病杂志, 2010, 4(2): 49-53.
- [2] 梁茂新, 黄会生. 软著登字第 0002781 号:《普济方》数据库管理系统[P]. 1998.
- [3] 田维毅, 王庆学, 王文佳, 等. 葛根散对急性酒精性肝损伤小鼠肝微粒体 CYP450 含量及 CYP2E1 活性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(4): 184-186.
- [4] 黄雨三. 保健食品检验与评价技术规范实施手册. 第四卷[S]. 北京: 中科多媒体电子出版社, 2003: 711.
- [5] 江正辉, 王泰玲. 酒精性肝病[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2001: 239.
- [6] 梁扩寰, 李绍白. 肝脏病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 208.
- [7] 王丽霞, 赵钢, 段志军. 酒精性肝病 218 例临床分析[J]. 临床肝胆病杂志, 2012, 28(1): 44-47.

[责任编辑 周冰冰]