

养元饮对酒精性肝损伤大鼠解酒和保肝作用

吴诚¹, 吕著海², 沈存思¹, 农伟虎¹, 许惠琴^{1*}

(1. 南京中医药大学中药药理教研室, 南京 210046; 2. 南京脑科医院神经外科, 南京 210029)

[摘要] 目的: 观察养元饮对酒精性肝损伤大鼠解酒和保肝作用。方法: 通过连续 6 周 ig 食用酒建立酒精性肝损伤大鼠模型, 给酒的同时 ig 给予养元饮。气相色谱法检测血清中乙醇和乙醛含量, 肝脏中乙醇脱氢酶 (ADH) 活力和血清中丙氨酸氨基转移酶 (ALT), 天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 活性使用比色法测定, 取适量肝脏 HE 染色, 在光学显微镜下进行病理学检查。结果: 养元饮中、高剂量能明显降低血清中乙醇和乙醛含量, 其中高剂量可显著提高肝脏中 ADH 水平, 作用优于海王金樽。养元饮同时有降低血中 ALT 和 AST 活性作用。结论: 养元饮主要通过提高 ADH 活性降低乙醇浓度, 同时防止肝脏转氨酶入血从而达到保护肝细胞作用。

[关键词] 养元饮; 解酒; 保肝; 乙醇脱氢酶; 丙氨酸氨基转移酶; 天门冬氨酸氨基转移酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)14-0150-04

Anti-alcoholism and Liver Protection Effects of Yangyuan Yin on Alcoholic Liver Injury in Rats

WU Cheng¹, LV Zhu-hai², SHEN Cun-si¹, NONG Wei-hu¹, XU Hui-qin^{1*}

(1. Department of pharmacology, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;
2. Neurosurgery of Nanjing Brain Hospital, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Yangyuan Yin on decreasing alcohol in blood and protecting liver after drinking alcohol. **Method:** The model of alcoholic liver injury in rats was established by giving alcohol ig for 6 weeks. Meanwhile, Yangyuan Yin was given to the rats in the treatment group. By the end of the 6th week, alcohol content in blood was determined by GC, colorimetry was applied to determine ADH activity in liver and ALT, AST in blood serum. **Result:** Middle and high doses of Yangyuan Yin could significantly reduce the levels of alcohol and acetaldehyde in blood. Actually, the high dose could significantly improve the level of liver ADH, better than that of Haiwangjinzun. Actually, compared to the model, the activity of ALT and AST was decreased by the treatment. **Conclusion:** Yangyuan Yin is able to decrease alcohol in blood after drinking alcohol. The effects may be achieved by increasing the level of liver ADH.

[Key words] Yangyuan Yin; anti-alcoholism; liver protection; alcohol dehydrogenase; alanine aminotransferase; aspartate aminotransferase

酒精性肝损伤是由长期大量饮酒导致的肝脏病变, 初期通常表现为脂肪肝, 进而可发展成酒精性肝

炎、酒精性肝纤维化和酒精性肝硬化, 最终导致肝功能衰竭。中医认为酒性燥烈, 长期多饮伤脾胃, 升降失司, 湿阻中焦, 久则损及肝肾。养元饮主要含有葛花、丹参、高良姜、黄芪 4 味中药。文献证实, 葛花提取物可降低酒后血中乙醇浓度^[1]; 丹参中主要成分丹参酮 II_A、丹参素等具有抗肝纤维化作用^[2]; 《大明本草》记载高良姜有解酒毒, 消宿食之功效; 张杰临床观察发现, 黄芪注射液显著改善酒精性肝炎患者

[收稿日期] 20100326(003)

[第一作者] 吴诚, 在读硕士, 研究方向: 中药药理, Tel: 13809008521, E-mail: wucheng339@qq.com

[通讯作者] * 许惠琴, 博士, 教授, Tel: 025-85811933, E-mail: hqxu309@yahoo.com.cn

的肝功能指标^[3]。本实验以酒精性肝损伤大鼠为研究对象,观察养元饮的解酒保肝作用。

1 材料

1.1 药品及试剂 养元饮,由南京农业大学提供,临用前用蒸馏水配成 0.017 5,0.035,0.07 g·mL⁻¹,经换算约为成人等效用量的 1/2,1,2 倍;海王金樽片,深圳市海王健康科技发展有限公司,批号 20090320。临用时用蒸馏水配成 0.15 g·mL⁻¹(按制剂量计算)的浓度。大鼠用量为 1.5 g·kg⁻¹。经换算约为成人的等效用量。

食用酒(红星二锅头,乙醇浓度为 55%),北京红星股份有限公司,批号 20090219。

乙醇脱氢酶(ADH)测试盒,批号 20090629;考马斯亮蓝蛋白测试盒,批号 20090629;丙氨酸氨基转移酶(ALT)测试盒批号 20090718;天门冬氨酸氨基转移酶(AST)测试盒,批号 20090718,以上试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.2 动物 清洁级 SD 大鼠,上海斯莱克实验动物有限责任公司,许可证号 SCXK(沪)2007-0005。

1.3 仪器 气相色谱柱 20% PEG20M(100~120 目),2 m×2 mm,南京伽诺仪器仪表有限公司;SP-1000 气相色谱仪,北京北分瑞利仪器有限公司;T18 匀浆机,德国 IKA 公司;x340 Power wave(酶标仪),BIO-TEK INSTRUMENTS. INC。

2 方法

2.1 样本制备 取 SD 大鼠,体重 190~220 g,雌雄各半,按体重随机分成 6 组,即:空白对照组、模型组(仅给酒不给药)、海王金樽组(1.5 g·kg⁻¹)、养元饮低剂量组(0.175 g·kg⁻¹)、养元饮中剂量组(0.35 g·kg⁻¹)、养元饮高剂量组(0.70 g·kg⁻¹)。用实验动物颗粒饲料喂养、自由饮水,适应性饲养 3 d。

大鼠禁食(不禁水)6 h,各组分别 ig 食用酒 7.5 mL·kg⁻¹,30 min 后按上述剂量 ig 给药。持续给酒、给药 6 周。于末次给药后 1 h 和 12 h,大鼠眼眶采血^[4]。血液静置 30 min 后以 3 500 r·min⁻¹离心 10 min,取上层血清测定乙醇、乙醛浓度和 ALT,AST 活力。

末次给药后 12 h 采血结束后,脱颈椎处死大鼠,取出肝脏,用生理盐水冲洗并用滤纸吸净。精密切取 1 g,剪碎加生理盐水,匀浆后以 3 500 r·min⁻¹离心 5 min,取上清液制成 10% 肝匀浆上清液,测定乙醇脱氢酶(ADH)活性。实验结束后将肝脏固定

于 10% 福尔马林溶液内,常规取材,脱水,石蜡包埋,制片,HE 染色,在光学显微镜下进行病理学检查。

2.2 血清中乙醇浓度测定

2.2.1 色谱条件 柱箱温度 100 °C,检测器温度 150 °C,进样器温度 120 °C,载气量 1 kg·cm⁻³,选用氢火焰离子化检测器(FID)。

2.2.2 标准曲线的制定 分别取 10,20,40,80,120,200 μL 乙醇配成 0.1,0.20,0.4,0.8,1.2,2.0 μL·mL⁻¹的标准溶液。取 1 μL 注入气相色谱仪,读取峰面积。以乙醇浓度为横坐标,峰面积为纵坐标作图,用 EXCEL 软件统计出标准曲线:Y = 345.0X + 248.0(r = 0.99)。同法制得乙醛标准曲线:Y = 480.0X + 35.42(r = 0.93)。

2.2.3 样品测定 取 1 μL 2.1 制备好的血清注入气相色谱仪中,读取峰面积,依据标准曲线计算出乙醇含量[μL·(100 mL)⁻¹]。同法得出血清中乙醛含量[μL·(100 mL)⁻¹]。

2.3 肝脏中 ADH 活性 按考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒说明书和组织中乙醇脱氢酶(ADH)测定试剂盒说明书计算出 ADH 活力值。

2.4 血清中 ALT 和 AST 含量 按丙氨酸氨基转移酶测定试剂盒(赖氏法)说明书和天门冬氨酸氨基转移酶测定试剂盒(赖氏法)说明书测定血清中 ALT,AST 含量。

2.5 肝脏病理组织学检查 检查内容包括:肝脏有无肝细胞脂变、坏死;肝小叶及门管区有无炎症,肝组织内有无纤维组织增生。

2.6 数据处理 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 显示,用 t-test 检验法,统计软件采用微软 Excel 软件。P < 0.05 有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠血清中乙醇和乙醛浓度的影响 表 1 可见,海王金樽组和养元饮中、高剂量均可显著性降低酒精性肝损伤模型大鼠末次给酒 1 h 后血中乙醇含量(P < 0.05 或 P < 0.01)。并且,养元饮中、高剂量能降低 12 h 后乙醇和乙醛含量(P < 0.05)。

3.2 对大鼠肝脏中 ADH 活力的影响 表 2 可见,与空白对照组大鼠相比,模型组能抑制肝脏 ADH 活性(P < 0.01),海王金樽和养元饮高剂量能明显提高模型大鼠的 ADH 活性(P < 0.05 或 P < 0.01)。

表 1 养元饮对酒精性肝损伤大鼠血清中乙醇和乙醛浓度的影响 ($\bar{x} \pm s$) $\mu\text{L} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$

组别	剂量 $/\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	n	末次 12 h		
			乙醇	乙醇	乙醛
模型	-	8	593.2 ± 161.3	10.9 ± 4.6	5.7 ± 2.1
海王金樽	1.5	8	422.0 ± 172.2 ¹⁾	5.6 ± 5.6 ¹⁾	3.3 ± 2.8
养元饮	0.175	10	510.6 ± 164.2	9.2 ± 3.8	3.5 ± 2.5
	0.35	12	402.6 ± 139.3 ²⁾	5.1 ± 2.5 ²⁾	3.0 ± 2.6 ¹⁾
	0.70	9	295.2 ± 73.7 ²⁾	4.1 ± 1.0 ²⁾	2.8 ± 2.8 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同。)

表 2 养元饮对酒精性肝损伤大鼠肝脏 ADH 活力的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 $/\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	n	ADH $/\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$
空白对照	-	8	5.44 ± 1.83 ²⁾
模型	-	8	2.87 ± 1.42
海王金樽	1.5	8	4.72 ± 2.00 ¹⁾
养元饮	0.175	10	3.91 ± 1.51
	0.35	12	4.89 ± 2.77
	0.70	9	5.15 ± 1.60 ²⁾

3.3 对大鼠血清中 ALT 和 AST 活力的影响 表 3 可见,与空白对照组大鼠相比,模型组血清中 ALT 和 AST 活性升高 ($P < 0.05$),海王金樽和养元饮高剂量能明显降低该 2 个指标活性 ($P < 0.05$)。

表 3 养元饮对酒精性肝损伤大鼠血清 ALT, AST 活力的影响 ($\bar{x} \pm s$) $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	剂量 $/\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	n	ALT	AST
空白对照	-	8	26.0 ± 6.4 ¹⁾	30.0 ± 6.9 ¹⁾
模型	-	8	53.4 ± 21.8	44.3 ± 12.6
海王金樽	1.5	8	34.1 ± 10.8 ¹⁾	32.2 ± 4.5 ¹⁾
养元饮	0.175	10	37.0 ± 10.4	37.6 ± 16.6
	0.35	12	35.5 ± 14.0	38.3 ± 14.6
	0.70	9	21.5 ± 12.9 ¹⁾	29.5 ± 11.8 ¹⁾

3.4 肝脏病理组织学检查 图 1 可见,空白对照组肝小叶结构清晰,肝细胞内无明显脂变或坏死,肝小叶内及门管区无明显纤维组织增生,无炎细胞浸润;模型组肝细胞内出现轻度脂变,门管区轻度扩大、纤维结缔组织轻度增多,增生的纤维组织未向外延伸形成纤维隔;海王金樽组肝脏脂变及纤维化程度与模型组相似,肝细胞内可见极少量脂滴空泡、门管区轻度扩大、成纤维细胞增多,门管区无炎细胞浸润;养元饮高剂量组肝脏纤维化程度较模型组减轻,肝

脏无明显脂变,门管区无炎细胞浸润。其中养元饮高剂量组能显著性抑制肝纤维化。

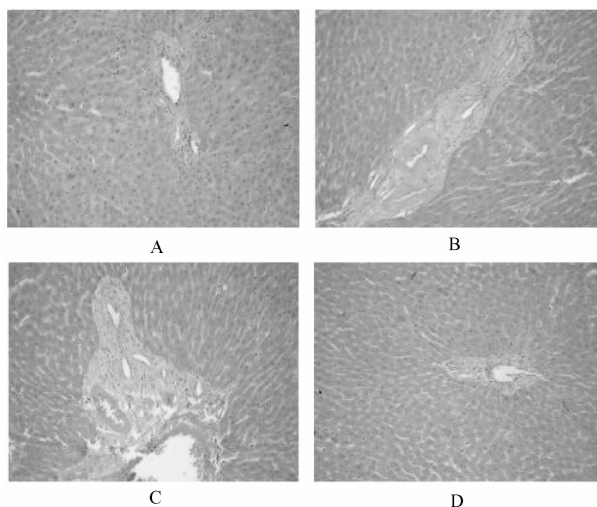


图 1 肝脏病理组织学检查 (HE, ×200)

A. 空白对照组; B. 模型组; C 海王金樽 1.5 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; D. 养元饮 0.70 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组

4 讨论

ADH 在乙醇代谢过程中起着关键作用,其主要分布在肝脏,其他组织中也有少量分布。主要反应为:乙醇经 ADH 代谢产生乙醛,乙醛脱氢酶 (ALDH) 将乙醛分解成 CO_2 和水。本实验结果显示养元饮明显提高大鼠肝脏中 ADH 水平,能够加速乙醇在肝脏部位的分解。而乙醛堆积同样会导致机体产生恶心、昏迷等酒后中毒症状,即为乙醛代谢障碍引起急性中毒症^[5]。血清检测结果显示,养元饮可显著性降低大鼠饮酒后 12 h 血中乙醛的浓度。该解酒作用可能通过共同提高 ADH 和 ALDH 水平发挥作用,因此,有必要了解养元饮对酒精性肝损伤模型大鼠的 ALDH 影响,对阐明该复方解酒作用机制有重要意义。

ALT 和 AST 主要存在于肝细胞浆内,当肝细胞及其线粒体受损时,细胞内转氨酶进入血液,引起血中 ALT,AST 升高。正常肝内转氨酶含量约为血中的 100 倍,肝脏实质性损害时,1% 的肝细胞坏死就可使血清转氨酶活性增加 1 倍^[6]。因此,转氨酶升高是肝细胞损害的敏感标志。本实验养元饮明显降低模型大鼠血中转氨酶水平,减少肝脏中 ALT 和 AST 进血,表明该复方可保护肝细胞受损;。从病理切片可见,养元饮组大鼠脂变有减少趋势,但并不明显,可能与其持续性摄入酒精有关。肝纤维化是酒精性肝损伤初期表现,其最终表现为肝硬化,病理组

织观察显示模型组动物肝纤维化清晰可见,养元饮干预后肝纤维化明显降低,可能与阻断星状细胞活化所致胶原蛋白的合成有密切关系^[7]。

综上所述,养元饮能提高 ADH 水平和抑制血中转氨酶含量,具有较好的解酒保肝作用,具有良好的市场开发前景。

[参考文献]

[1] 李萍,钟赣生. 葛花对酒后血中乙醇浓度和肝中乙醇脱氢酶活性的影响[J]. 科技导报, 2009,27(23): 82.
[2] 孙瑞芳,刘立新. 丹参及其单体治疗肝纤维化的研究进展[J]. 中国药物与临床, 2009,9(2):88.
[3] 张杰. 黄芪注射液治疗酒精性肝炎的疗效观察[J].

中国现代临床医学杂志, 2006,5(5):51.

[4] 徐慧明,杨牧祥. 解酒护肝饮对酒精性肝病大鼠肝功能损伤的保护作用[J]. 上海中医药大学学报, 2007,21(5):59.
[5] 李杨,鞠玉林,齐林,等. 中药复方熊胆解酒汁对小鼠酒精性肝胃损伤的影响[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(2):608.
[6] 金静敏,贾少谦,高留泉,等. 丹葛解酒茶对小鼠酒精性肝损伤血清 ALT,AST 的影响[J]. 内蒙古中医药, 2004,(5):47.
[7] 张宇,陈韶华,张幸国,等. 茶多酚治疗慢性酒精性肝损伤的实验研究[J]. 中华肝脏病杂志, 2005,13(2):125.

[责任编辑 聂淑琴]