

五汁饮对急性酒精中毒大鼠肝脏的保护机制研究

谢梦洲^{1,2,3,4}, 冯楚雄^{1,2,3}, 朱建平^{1,2,3}, 瞿昊宇^{1,2,3,4}, 肖作为^{3*}, 向茗^{1,2,3}, 吴玉冰³

(1.湖南中医药大学中医诊断研究所,湖南长沙 410208;2.湖南中医药大学中医诊断学湖南省重点实验室,湖南长沙 410208;
3.湖南省药食同源功能性食品工程技术研究中心,湖南长沙 410208;4.数字中医药协同创新中心,湖南长沙 410208)

[摘要] **目的** 研究五汁饮对急性酒精中毒大鼠肝脏的保护作用。**方法** SD大鼠分为5组,分别为空白组、模型组、葛花组、五汁饮低剂量组及高剂量组,每组10只。预防性给药7d后,空白组蒸馏水灌胃,其余各组按照1.5 mL/100 g的52度红星二锅头给予灌胃,每日1次,连续1周,建立急性酒精性肝损伤模型。测定血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)含量;测定肝脏匀浆中谷胱甘肽(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、乙醇脱氢酶(ADH)含量。**结果** 与模型组相比,葛花组、五汁饮高剂量组ALT含量降低($P<0.05$),五汁饮高、低剂量组AST含量降低($P<0.01$);五汁饮高剂量组ADH含量高于模型组($P<0.05$),葛花组、五汁饮低剂量组与模型组没有统计学差异($P>0.05$);葛花组、五汁饮高、低剂量组GSH、SOD含量高于模型组($P<0.01$, $P<0.05$),葛花组、五汁饮高、低剂量组均可显著降低MDA含量($P<0.01$)。**结论** 五汁饮保肝作用可能通过激活ADH加快酒精代谢及SOD、GSH的抗氧化作用来实现。

[关键词] 酒精性肝损伤;五汁饮;抗氧化;乙醇脱氢酶

[中图分类号] R585.5;R575.5

[文献标识码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.06.013

The Protective Mechanism of Wuzhiyin on the Liver of Rats With Acute Alcoholism

XIE Mengzhou^{1,2,3,4}, FENG Chuxiong^{1,2,3}, ZHU Jianping^{1,2,3}, QU Haoyu^{1,2,3,4},

XIAO Zuowei^{3*}, XIANG Ming^{1,2,3}, WU Yubing³

(1. Institute of TCM Diagnostics, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;
2. Hunan Province Key Laboratory of TCM Diagnostics, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Hunan Engineering Research Center of Medicine and Food Homology Functional Food, Changsha, Hunan 410208, China; 4. Collaborative Innovation Center of Digital Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of Wuzhiyin on the liver of rats with acute alcoholism. **Methods** SD rats were divided into 5 groups: blank group, model group, Gehua group, low dose group and high dose group of Wuzhiyin, 10 rats in each group. After 7days preventive administration, the blank group was given a gavage of distilled water and the remaining groups were treated with 1.5 mL/100 g 52% alcohol, once a day for one week, and the model of acute alcoholic liver injury was established. The content of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) were detected and the content of liver homogenate glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA), alcohol dehydrogenase (ADH) were also detected. **Results** Compared with the model group, the content of ALT in Gehua group and high dose Wuzhiyin group was decreased ($P<0.05$). The content of AST in high and low dose of Wuzhiyin group was reduced ($P<0.01$). The content of ADH in the high dose Wuzhiyin group was higher than the model group ($P<0.05$), and there was no significant difference between the model group and the low dose group of Wuzhiyin ($P>0.05$). The content of GSH and SOD in Gehua group, high and low dose of groups was higher than that in model group ($P<0.01$, $P<0.05$). The content of MDA in Gehua group, the high and low dose of Wuzhiyin groups was significantly decreased ($P<0.01$). **Conclusion** The hepatoprotective effect of Wuzhiyin was possibly through activation of ADH to accelerate the metabolism of alcohol and antioxidant.

[Keywords] alcoholic liver injury; Wuzhiyin; antioxidant; alcohol dehydrogenase

[收稿日期] 2016-03-24

[基金项目] 湖南省教育厅创新平台基金资助(12k083);湖南中医药大学中医诊断学国家重点学科开放基金资助(2014-27)。

[作者简介] 谢梦洲,女,教授,硕士研究生导师,研究方向:常见疾病中医药防治。

[通讯作者] *肖作为,男,讲师, E-mail: 574512660@qq.com。

酒精已成为继病毒性肝炎后导致肝损伤的第二大病因,酒精性肝病是导致肝硬化的主要病因^[1-2]。酒精对肝的损伤主要是其代谢产物乙醛引起的,乙醛易在肝中堆积,通过氧化应激反应导致脂质过氧化、线粒体功能障碍、炎性细胞因子释放^[3],促进肝星状细胞产生胶原导致肝纤维化和肝硬化^[4]。

五汁饮出自吴鞠通《温病条辨》,由鲜梨汁、鲜荸荠汁、鲜芦根汁、鲜麦冬汁和鲜藕汁组成,具有清热养阴、生津止渴的功效。研究表明:梨肉中富含酚类物质绿原酸和表儿茶素,具有良好的抗氧化作用^[5];荸荠富含硒、黄酮、多酚等抗氧化物质,具有抗氧化、抗癌的作用^[6];芦根中的多糖成分具有抗氧化、抗自由基作用,并通过抗氧化作用保护肝细胞、抑制胶原沉积等途径来抑制肝纤维化,改善肝功能,降低肝脂肪化^[7-8];麦冬富含多糖、皂苷及黄酮类成分,其中麦冬多糖具有抗炎、抗心肌缺血、耐缺氧、抗过敏、抗氧化作用^[9-10];莲藕中的多糖物质具有降血糖作用,可提升体内超氧化物歧化酶(SOD)的活性,减少丙二醛(MDA)的生成^[11]。由此可见,五汁饮的组成成分均具有良好的抗氧化、抗自由基作用。目前,五汁饮保肝作用研究甚少,本文通过测定大鼠血清中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)及肝脏组织中MDA、谷胱甘肽(GSH)、SOD、乙醇脱氢酶(ADH)等的变化,研究五汁饮对急性酒精中毒大鼠肝脏的保护作用。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF级SD大鼠50只,雄性,体质量(200±20)g,由湖南中医药大学动物实验中心提供,动物许可证号:SYXK2013(湘)江-0005。

1.2 药物

五汁饮:梨200g、荸荠500g、藕500g、芦根50g、麦冬25g。梨、荸荠、莲藕洗净去皮,榨汁。芦根、麦冬放入锅内,加入2L水,置大火上烧沸5min后,改小火煮30min,过滤,合并梨汁、荸荠汁、藕汁,过滤,滤液浓缩为2.0g生药/mL浓缩液,密封,放入4℃冷藏。

阳性对照药葛花浓缩液:取葛花50g,加入500mL水,置大火上烧沸,改小火煮10min,过滤,重复煎煮1次,合并两次滤液,将滤液浓缩为0.5g生药/mL浓缩液,密封,放入4℃冷藏。

1.3 主要仪器

UV-2600型紫外可见分光光度仪(上海仪器有限公司),水浴锅(深圳市江承仪器有限公司),低温高速离心机(上海安亭科学仪器厂),内切式组织匀浆机(宁波新芝科研仪器研究所),漩涡振荡器(宁波新芝科研仪器研究所),电子分析天平(上海奥豪斯仪器有限公司)。

1.4 主要试剂

52℃红星二锅头(北京红星股份有限公司生产,批号:20141104),生理盐水(广东艾希德药业有限公司,批号:141219201),水合氯醛(天津市大茂化工试剂厂,批号:20140823),乙醇脱氢酶(ADH)测定试剂盒(南京建成生物研究所,批号:20141113),总超氧化物歧化酶(T-SOD)测定试剂盒(南京建成生物研究所,批号:20141118),丙二醛(MDA)测定试剂盒(南京建成生物研究所,批号:20141123),还原型谷胱甘肽(GSH)测定试剂盒(南京建成生物研究所,批号:20141015),蛋白定量测试盒(南京建成生物研究所,批号:20140905)。

1.5 动物分组与处理

实验动物按照随机数字表法分成空白对照组、模型组、五汁饮低剂量组、五汁饮高剂量组、葛花组,每组10只。适应性喂养1周后,各组大鼠禁食10h,不禁水,预防性给药7d:空白组、模型组给予蒸馏水灌胃,五汁饮低剂量组、高剂量组以五汁饮灌胃,给药剂量分别为23.0g/kg、46.0g/kg,葛花组给予葛花水煎液0.15g/kg。各组给药容量为10mL/kg。给药30min后,空白对照组予以蒸馏水灌胃,其余各组按照1.5mL/100g52℃红星二锅头给予灌胃,每天1次,连续1周。末次给药2h后进行标本采集。

1.6 标本采集

用10%水合氯醛40mg/kg腹腔注射麻醉大鼠,打开腹腔,腹主动脉取血,静置,3000r/min离心,取血清,送至湖南中医药大学附属第一医院检测ALT、AST。取血后处死动物,在肝左叶取部分肝组织,准确称取肝脏0.5g,按照重量体积比(g:mL)1:9的比例加入生理盐水,制备成10%的匀浆,离心后取上清液,按照试剂盒说明书测ADH、SOD、MDA、GSH的含量。

1.7 统计学分析

采用SPSS 21.0软件包处理统计分析。计量资

料数据采用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,并在满足正态分布和方差齐性基础上,多组间均数比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况观察

正常组大鼠毛色有光泽,灵活好动,针刺刺激四肢末端反应灵敏,大小便正常。模型组在灌胃白酒后出现身体瘫软,步姿不稳,后腹拖地爬行,活动减少的现象,针刺刺激四肢末端反应不灵敏,严重者翻正反射消失。随着灌胃次数增多,模型组出现食欲下降、饮食减少、毛色晦暗或变黄、毛发凌乱、大便溏泻且异味较重、体质量减轻等表现。葛花组、五汁饮高、低剂量组大鼠灌胃后反应不明显,偶见大鼠出现身体瘫软、步姿改变、活动量减少的现象。

2.2 各组大鼠 ALT、AST 含量测定结果

与空白组比较分析,模型组 ALT、AST 的含量显著升高($P<0.01, P<0.01$),提示酒精对肝脏具有损伤作用。与模型组比较分析,葛花组、五汁饮高剂量组 ALT 含量显著降低($P<0.05$),五汁饮高、低剂量组 AST 显著降低($P<0.01$)。提示五汁饮具有改善肝功能的作用。见表 1。

表 1 各组大鼠血清中 ALT、AST 含量结果表 ($\bar{x}\pm s, U/L$)

组别	n	ALT	AST
空白组	10	31.40±10.16	136.00±16.81
模型组	10	70.90±25.66**	242.30±42.12**
葛花组	10	53.22±17.27*#	200.30±38.65***
五汁饮高剂量组	10	53.90±17.13***	154.40±34.14**
五汁饮低剂量组	10	60.40±19.33**	192.60±49.62***
F 值	-	7.116	12.59
P 值	-	$P<0.01$	$P<0.01$

注:与空白组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组相比,# $P<0.05$,### $P<0.01$ 。

2.3 各组大鼠肝脏匀浆 ADH 含量测定结果

与空白组进行对比分析,模型组 ADH 含量增加($P<0.05$),葛花组、五汁饮高、低剂量组含量显著增加($P<0.01$),各组的 ADH 含量都不同水平的增加,提示喝酒能激活 ADH 的表达。与模型组比较分析,五汁饮高剂量组 ADH 含量高于模型组($P<0.05$),而葛花组、五汁饮低剂量组没有统计学差异($P>0.05$),提示五汁饮高剂量组比葛花组、五汁饮低剂量组更能有效地激活 ADH 表达,从而促进肝脏中乙醇的分解代谢。见表 2。

表 2 大鼠肝脏匀浆中 ADH 的含量 ($\bar{x}\pm s, U/mgprot$)

组别	n	ADH
空白组	10	5.77±2.50
模型组	10	9.06±2.09*
葛花组	10	9.99±2.77**
五汁饮高剂量组	10	12.38±4.28**#
五汁饮低剂量组	10	10.64±3.64**
F 值	-	5.812
P 值	-	$P<0.01$

注:与空白组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组相比,# $P<0.05$ 。

2.4 各组大鼠肝脏匀浆中 GSH、SOD、MDA 含量测定结果

与空白组对比,模型组 GSH、SOD 含量低于空白组($P<0.01, P<0.05$),MDA 含量高于空白组($P<0.01$),葛花组、五汁饮高、低剂量组的 GSH、SOD、MDA 含量与空白组没有统计学差异($P>0.05$),提示模型组体内具有氧化损伤。与模型组对比,葛花组 GSH、SOD 含量高于模型组($P<0.01, P<0.05$),五汁饮高、低剂量组均能显著提高 GSH、SOD 含量($P<0.01$),葛花组、五汁饮高、低剂量组均可显著降低 MDA 含量($P<0.01$),提示葛花、五汁饮能提升体内抗氧化水平。见表 3。

表 3 大鼠肝脏匀浆中 GSH、SOD、MDA 含量 ($n=10, \bar{x}\pm s$)

组别	GSH($\mu\text{mol/L}$)	SOD(U/mgprot)	MDA(nmol/mgprot)
空白组	11.27±2.11	142.81±60.13	1.23±0.41
模型组	6.21±2.16**	89.44±44.87*	2.07±0.35**
葛花组	11.74±4.53##	145.53±49.98#	1.24±2.56##
五汁饮高剂量组	13.52±3.66###	157.39±49.29##	1.42±0.37##
五汁饮低剂量组	12.51±4.51###	157.08±68.45##	1.51±0.41##
F 值	6.254	2.590	6.423
P 值	$P<0.01$	$P<0.05$	$P<0.01$

注:与空白组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

3 讨论

AST、ALT 是存在于肝脏中重要的转氨酶,临床上用于检查肝功能,其数值的高低可反映肝脏是否受到损害,当肝细胞受到损伤,出现炎症、坏死时,肝中的 ALT、AST 就会释放到血液中,使血液中 ALT、AST 的水平升高^[12-13]。一般认为,ALT 比 AST 更能灵敏地反映肝脏是否有损伤,一旦肝脏存在损伤,ALT 水平会升高,而肝脏损伤到一定程度,才会引起 AST 升高。本实验中,大鼠以 52 度红星二锅头灌胃后,各组的 ALT 水平均高于空白组,除五汁饮高剂量组

外,其余各组 AST 水平均高于空白组,说明酒精对肝脏具有损伤作用急性酒精性肝损伤模型制备成功。与模型组进行比较分析可知,五汁饮都降低 ALT、AST 水平,且高剂量降低效果更加突出,说明五汁饮可以对抗酒精对肝脏的损伤,减少肝脏的炎症反应,具有改善肝功能,保护肝脏的作用。

MDA 是脂质过氧化的产物之一,MDA 水平的高低可反映体内脂质过氧化程度以及细胞受自由基攻击的程度的高低。机体 SOD、GSH 水平的高低,反映机体抗氧化抗自由基能力的强弱。本实验中,模型组的 GSH、SOD 水平降低,而 MDA 水平升高,说明摄入酒精后体内出现氧化损伤,自由基增多,脂质过氧化物增多,SOD、GSH 在抗氧化、抗自由基的过程中损耗多,因而处于低水平状态。五汁饮高低剂量组 SOD、GSH 水平升高,MDA 水平降低,说明五汁饮能提升体内抗氧化能力,具有良好的抗氧化、抗自由基、减少脂质过氧化的作用。

五汁饮有清热养阴生津的功效,江凌圳等^[14]运用大肠杆菌内毒素制备高热伤阴动物模型探究五汁饮清热养阴,生津的药理学依据,发现五汁饮具有良好的解热作用,并能拮抗内毒素所致红细胞膜 ATP 酶活力降低,减轻发热动物伤津、伤阴的程度。五汁饮在现代医学中有新的运用,临床上以五汁饮为主方进行加减,运用食疗的方法治疗痤疮、小儿暑热症^[15]。本课题组在研究中发现五汁饮具有良好的解酒、保肝护胃的作用,可降低大鼠酒后血中乙醇的浓度^[16],减少急性酒精性肝、胃的病理损伤^[17]。

目前认为急性酒精性肝损伤是乙醇及其代谢产物乙醛引起的。乙醇不仅能损害线粒体的功能,还能使线粒体 MDA 增加,GSH 水平下降,线粒体形态异常;乙醛可导致脂质过氧化,破坏细胞膜,促进肝损伤,从而使肝细胞受损^[18]。本实验中,五汁饮通过提高 ADH 活性,加快酒精代谢,并通过 SOD、GSH 的抗氧化、抗自由作用,降低脂质过氧化,减少自由基对机体的损伤,从而起到保肝、护肝的作用。

参考文献:

- [1] Wang F, Chen HZ, Lv X, et al. SIRT1 as a novel potential treatment target for vascular aging and age-related vascular diseases[J]. *Curr Mol Med*,2013,13(1):155-164.
- [2] Verdin L, Ilirschev MD, Fnlcy LW, et al. Sirtuin regulation of mitochondria:energy production, apoptosis and signaling[J]. *Trends Biochem Sci*,2010,35(12):669-675.
- [3] Levene AP, Goldin RD. The epidemiology, pathogenesis and histopathology of fatty liver disease[J]. *Histopathol*, 2012,61(2):141-152.
- [4] 刘国红,李 丽,李 锦,等.酒精性肝病发病机制的研究进展[J].*现代预防医学*,2009,36(22):4 355-4 356.
- [5] 李丽梅,赵 哲,何近刚,等.不同品种梨果实酚类物质和抗氧化性能分析[J].*食品科学*,2014,35(17):83-88.
- [6] 赵广河,陈振林.荸荠活性成分与功能作用研究进展[J].*食品研究与开发*,2011,32(9):235-239.
- [7] 李立华,张国升,戴 敏,等.芦根多糖对四氯化碳致肝纤维化大鼠的保肝作用[J].*安徽中医学院学报*,2005,24(2):24-26.
- [8] 李立华,张国升.芦根多糖保肝作用及抗肝纤维化的研究[J].*安徽中医学院学报*,2007,26(5):32-34.
- [9] 范 俊,张 旭.麦冬多糖药理研究进展[J].*中医药学刊*.2006,4(24):626.
- [10] 王昭晶,罗巖辉.麦冬水溶性多糖 DPB 的分离纯化及抗氧化活性研究[J].*长春中医药大学*,2008,24(3):254-255.
- [11] 罗登宏,周桃英,袁 仲,等.莲藕多糖的降血糖活性及对体内抗氧化能力的影响[J].2011,39(6):3 334-3 335,3 385.
- [12] 赵云霞,陶明焯,陆文娟,等.鸡枞菌多糖对小鼠急性酒精性肝损伤的保护作用[J].*食品科学*,2014,35(19):260-265.
- [13] 王允亮,诸葛丽,续 畅,等.调肝解毒方对非酒精性脂肪性肝炎大鼠肝组织抗氧化能力的影响[J].*吉林中医药*,2012,22(10):1 042-1 045.
- [14] 江凌圳,徐 珊,王 英,等.五汁饮对温病高热伤阴作用的实验研究[J].*中华中医药学刊*,2007,25(3):531-533.
- [15] 廖莉思.五汁饮新用[J].*江西中医药*,2013,44(2):48-49.
- [16] 瞿昊宇,冯楚雄,朱建平,等.GC 法检测五汁饮对大鼠酒后血中乙醇浓度影响的实验研究[J].*湖南中医杂志*,2016,32(3):171-174.
- [17] 冯楚雄,朱建平,瞿昊宇,等.五汁饮对酒精性肝、胃组织形态学的影响[J].*湖南中医药大学学报*,2015,35(12):49-52.
- [18] 陈雪龙.实验性肝损伤动物模型的研究进展[J].*实验动物科学*,2012,25(3):47-49.

(本文编辑 匡静之)