

葛根、藤茶、玉米低聚肽复合组方对小鼠慢性酒精性肝损伤的保护作用

罗安玲¹, 陈心馨¹, 郑有丽¹, 汤兴俊², 周勤丽², 刘小杰², 丛峰松¹

(1. 上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240) (2. 岩町(上海)食品有限公司, 上海 200233)

摘要: 研究葛根、藤茶、玉米低聚肽复合组方的解酒功能和保护肝脏活性。通过动物行为学实验, 研究对比葛根、藤茶、玉米低聚肽单独使用及其联合使用的解酒效果, 结果表明, 与模型组比较, 葛根、藤茶、玉米低聚肽复合组方能显著延长小鼠的醉酒时间至(55.14±20.97) min, 缩短醒酒时间至(75.88±23.28) min ($p < 0.05$), 明显改善醉酒小鼠的行为学指标。通过建立小鼠慢性酒精性肝损伤模型, 测定血清及肝组织生化指标, 观察肝组织病理变化以及检测肝组织蛋白表达水平, 研究复合组方的保肝作用, 结果表明, 与模型组比较, 复合组方能够减轻酒精对小鼠肝细胞的损伤, 显著使肝损伤模型小鼠血清中谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)活性及肝组织中丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量分别降低至(17.09±6.26) U/L, (21.41±6.80) U/L和(2.46±0.31) nmol/mg, 肝组织中还原型谷胱甘肽(glutathione reduced, GSH)含量及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性分别增加至(8.80±2.14) nmol/mg和(241.99±35.60) U/mg ($p < 0.05$), 改善肝组织病理形态变化, 下调肝组织中NF- κ B、TNF- α 表达。这表明复合组方具有解酒保肝作用, 其作用机理可能与抗氧化活性、抑制炎症相关信号有关。

关键词: 葛根; 藤茶; 玉米低聚肽; 酒精性肝损伤; 解酒保肝

文章编号: 1673-9078(2019)06-70-76

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.6.010

Protective Effect of a *Pueraria-Ampelopsis grossedentata*-Corn Oligopeptides Composite against Chronic Alcohol-induced Liver Injury in Mice

LUO An-ling¹, CHEN Xin-xin¹, ZHENG You-li¹, TANG Xing-jun², ZHOU Qin-li², LIU Xiao-jie², CONG Feng-song¹

(1. School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

(2. Yanding (Shanghai) Food Co. Ltd, Shanghai 200233, China)

Abstract: The anti-alcohol and hepatoprotective effect of a composite of *pueraria*, *Ampelopsis grossedentata* (AG) and corn oligopeptides (COP) were investigated. The anti-alcohol effects of *pueraria*, AG and COP used alone or in combination on drunk mice were evaluated through animal behavior experiments. The results showed that the *pueraria*-AG-COP composite (PAC composite) could significantly ($p < 0.05$) extend the waking time for drunkenness (up to 55.14±20.97 min) and shorten the period of hangover (to 75.88±23.28 min) while improving significantly the behavioral indices of the drunk mice, as compared with the model group. In the established chronic alcohol-induced liver injury mouse model, the hepatoprotective effect of PAC composite was investigated through measuring the biochemical indices of serum and liver tissues in mice, observing the pathological changes in hepatic tissues and examining the protein expression in liver tissues. Compared with the model group, the PAC composite could alleviate alcohol-induced liver damage in liver-injured mice: reducing significantly ($p < 0.05$) the activities of ALT and AST (to 17.09±6.26 and 21.41±6.80 U/L, respectively) in serum and the content of malondialdehyde (MDA; 2.46±0.31 nmol/mg) in liver tissues, whilst increasing significantly ($p < 0.05$) the content of glutathione (GSH, to 8.80±2.14 nmol/mg) and activity of superoxide dismutase (SOD; to 241.99±35.60 U/mg) in liver tissues. The PAC composite could also combat the pathological changes in liver tissues while down-regulating the protein expression of hepatic NF- κ B and TNF- α in the liver-injured mice. All these results indicated that the

收稿日期: 2018-12-21

作者简介: 罗安玲(1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 功能食品的研究与开发

通讯作者: 丛峰松(1970-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 功能食品的研究与开发

PAC composite exhibited anti-alcohol and hepatoprotective effects through working mechanisms associated with its antioxidant activity and inhibition of the inflammatory-related signaling.

Key words: *pueraria*; *Ampelopsis grossedentata*; corn oligopeptides; alcohol-induced liver injury; anti-alcohol and hepatoprotective effects

长期过量饮酒会引发酒精性肝病 (Alcoholic liver disease, ALD), 早期表现为脂肪肝, 若持续酗酒会发展为酒精性肝炎、肝纤维化和肝硬化, 甚至最终可能恶化为肝癌^[1], 对人们的身心健康造成严重危害。随着经济发展和生活水平提高, 嗜酒人数逐年增加, ALD 发病率逐年上升^[2], 已成为继病毒性肝炎之后中国第二大肝脏疾病^[3], 是全社会关注的一个重要公共卫生问题。相关研究表明, 葛根^[4-7] (*Pueraria*)、藤茶^[8-12] (*Ampelopsis grossedentata*, AG)、玉米低聚肽^[13-15] (Corn oligopeptides, COP) 具有解酒功能和保护肝脏活性。葛根是中国传统医学中最具代表性的解酒中草药, 已成为历代解酒常用药。藤茶是一种在中国民间流传已久的古茶, 可缓解酒精作用。玉米低聚肽是玉米蛋白质经过酶解技术获得的小分子肽物质, 有促进酒精代谢作用, 可减轻酒精对肝脏的损伤。但是, 这些研究多集中于单一治疗, 局限于单一功能评价手段 (如动物行为学指标或理化指标测定), 缺乏全面和系统的研究, 葛根、藤茶、玉米低聚肽三者联合应用的研究鲜有报道。

本文通过动物行为学实验, 研究葛根、藤茶、玉米低聚肽复合组方 (Compound of *Pueraria*, AG and COP, PAC compound) 的解酒功能; 通过建立小鼠慢性酒精性肝损伤模型, 观察肝组织病理形态变化, 测定血清及肝组织生化指标变化, 检测肝组织内 NF- κ B、TNF- α 的表达水平, 以此探讨复合组方对酒精性肝损伤的保护作用及其相关作用机制, 以期解酒保肝产品的开发应用提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

葛根速溶粉 (葛根素含量 $\geq 8\%$)、藤茶速溶粉 (二氢杨梅素含量 $\geq 50\%$), 黄山华绿园生物科技有限公司; 玉米低聚肽粉 (多肽含量 $\geq 75\%$), 武汉天天好生物制品有限公司; 52 度泸州老窖特曲白酒, 泸州老窖股份有限公司; 多聚甲醛组织固定液、苏木素染液、伊红染液、NF- κ B 抗体、TNF- α 抗体、 β -actin 抗体, 武汉赛维尔生物科技有限公司; 谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) 测定试剂盒、谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) 测定试剂盒、超氧

化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 测定试剂盒、还原型谷胱甘肽 (glutathione reduced, GSH) 测定试剂盒、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 测定试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 南京建成生物工程有限公司。

1.2 仪器与设备

JJ-12J 组织脱水机、JB-P5 石蜡包埋机, 武汉俊杰电子有限公司; RM2016 石蜡切片机, 上海莱卡仪器有限公司; KD-P 展片机, 金华科迪仪器设备有限公司; Nikon E100 光学显微镜, 日本尼康公司; ChemiDoc Touch 成像仪, 美国 Bio-Rad 公司。

1.3 实验动物

BALB/c 雄性小鼠, 体重 18~22 g, 上海杰思捷实验动物有限公司提供, 动物许可证号: SCXX (沪) 2013-0006。

1.4 试验方法

1.4.1 葛根、藤茶、玉米低聚肽单独使用的解酒功能行为学指标测定

100 只小鼠饲养在温度为 25 °C, 湿度为 40%~60%, 光暗交替周期为 12 h 的环境中。适应性饲养 3 d 后, 随机分为 10 组, 每组 10 只, 10 组分别为模型对照组、葛根高剂量组、葛根中剂量组、葛根低剂量组、藤茶高剂量组、藤茶中剂量组、藤茶低剂量组、玉米低聚肽高剂量组、玉米低聚肽中剂量组、玉米低聚肽低剂量组。葛根和藤茶高、中、低剂量组的剂量分别为 300、150、75 mg/kg (以体质量计, 下同), 玉米低聚肽高、中、低剂量组的剂量分别为 1200、600、300 mg/kg。实验前禁食 12 h, 不禁水, 各剂量组均按 15 mL/kg 灌胃相应剂量的葛根、藤茶和玉米低聚肽, 模型对照组灌胃等量蒸馏水。30 min 后, 剂量组和模型对照组分别以 11 mL/kg 剂量灌胃白酒 (本课题组前期实验得到的小鼠最佳致醉剂量, 另有文章发表), 观察小鼠醉酒情况, 记录醉酒时间 (从灌胃到翻正反射消失的时间) 和醒酒时间 (从翻正反射消失到恢复的时间)。灌酒后将小鼠轻轻仰卧, 若保持背部朝下的姿势 30 s 以上, 即翻正反射消失^[16]。

1.4.2 葛根、藤茶、玉米低聚肽联合使用的解

酒功能行为学指标测定

根据前期正交试验的解酒预实验结果,选择葛根高剂量+藤茶高剂量(300+300 mg/kg)、葛根高剂量+玉米低聚肽高剂量(300+1200 mg/kg)、藤茶高剂量+玉米低聚肽高剂量(300+1200 mg/kg)、葛根高剂量+藤茶高剂量+玉米低聚肽高剂量(300+300+1200 mg/kg)进行联合使用的正式实验。50只小鼠适应性饲养3d后,随机分为5组,每组10只,5组分别为模型对照组、I组:葛根+藤茶(300+300 mg/kg)、II组:葛根+玉米低聚肽(300+1200 mg/kg)、III组:藤茶+玉米低聚肽(300+1200 mg/kg)、IV组:葛根+藤茶+玉米低聚肽(300+300+1200 mg/kg)。解酒实验步骤同1.4.1。

1.4.3 葛根、藤茶、玉米低聚肽复合组方对小鼠慢性酒精性肝损伤的影响

1.4.3.1 小鼠慢性酒精性肝损伤模型的建立

参考刘雪姣^[15]的方法,通过灌胃酒精剂量的梯度递增进行建模。60只小鼠适应性饲养3d后,随机分为4组,每组15只,4组分别为正常对照组、模型对照组、酒精给药组、单独给药组。每日灌胃一次,酒精给药组和单独给药组分别以15 mL/kg体积灌胃葛根、藤茶、玉米低聚肽复合组方溶液,剂量为葛根高剂量+藤茶高剂量+玉米低聚肽高剂量(300+300+1200 mg/kg),模型对照组灌胃等量蒸馏水。给药30 min后,单独给药组不灌胃白酒,酒精给药组和模型对照组分别以9 mL/kg剂量灌胃白酒,连续灌胃2周。2周后,将白酒灌胃剂量调整为10 mL/kg,连续灌胃2周。2周后,再将白酒灌胃剂量调整为11 mL/kg,连续灌胃4周。灌胃周期共8周,末次灌胃后,小鼠禁食不禁水12 h后,摘眼球取血,分离血清待测,并脱颈椎处

死小鼠,取肝待测。

1.4.3.2 生化指标的测定

摘小鼠眼球取血,常温下静置15 min,分离血清,按照试剂盒说明书分别测定血清中ALT和AST活性。取小鼠部分肝脏,置于冷生理盐水中制成10%肝匀浆,按照试剂盒说明书分别测定肝匀浆组织中MDA、GSH含量及SOD活性。

1.4.3.3 组织病理学检查

取小鼠部分肝脏,经多聚甲醛固定液固定,石蜡包埋,制成肝组织病理切片,作HE染色,显微镜下200倍和400倍镜检观察,拍照分析。

1.4.3.4 肝组织中NF- κ B、TNF- α 表达水平的检测

以 β -actin作为内参蛋白进行蛋白免疫印迹实验。取小鼠部分肝脏,加入裂解液,充分匀浆后置于冰上裂解30 min,然后提取肝组织总蛋白。制胶,上样,进行SDS-PAGE电泳分离后,将蛋白转移至PVDF膜上,用脱脂奶粉封闭2 h,加入一抗于4℃孵育过夜后,用TBST缓冲液漂洗3次,再加入二抗,室温孵育1.5 h,用TBST缓冲液漂洗3次,通过化学发光方法检测肝组织中NF- κ B、TNF- α 的表达水平。

1.4.4 数据处理

数据以“均值 \pm 标准差”表示。采用SPSS Statistics 22.0软件进行数据分析,组间显著性比较采用单因素方差分析。 $p < 0.05$ 时有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 葛根、藤茶、玉米低聚肽单独使用对醉酒

小鼠行为学指标的影响

表1 葛根、藤茶、玉米低聚肽单独使用对醉酒小鼠行为学指标的影响

Table 1 Effect of Pueraria, AG and COP on behavioral indicators of drunk mice

组别	剂量/(mg/kg)	醉酒时间/min	醒酒时间/min
模型对照组	0	23.96 \pm 9.49	132.29 \pm 35.41
葛根高剂量组	300	44.07 \pm 13.09*	91.95 \pm 25.35*
葛根中剂量组	150	36.40 \pm 10.73	101.51 \pm 30.99
葛根低剂量组	75	29.39 \pm 11.25	110.78 \pm 28.88
藤茶高剂量组	300	43.11 \pm 16.22*	93.75 \pm 26.41*
藤茶中剂量组	150	35.98 \pm 12.50	119.61 \pm 28.57
藤茶低剂量组	75	28.88 \pm 10.43	128.79 \pm 34.50
玉米低聚肽高剂量组	1200	52.16 \pm 19.26**	88.47 \pm 27.26*
玉米低聚肽中剂量组	600	46.21 \pm 16.09**	99.10 \pm 23.76
玉米低聚肽低剂量组	300	34.47 \pm 14.04	106.89 \pm 26.75

注:“*”表示与模型对照组相比, $p < 0.05$;“**”表示与模型对照组相比, $p < 0.01$ 。

葛根、藤茶、玉米低聚肽单独使用时,醉酒小鼠行为学指标的测定结果见表1。与模型对照组(醉酒

时间为 23.96 ± 9.49 min, 醒酒时间为 132.29 ± 35.41 min) 相比, 葛根高剂量组小鼠的醉酒时间 (44.07 ± 13.09 min) 明显延长了 83.93% ($p < 0.05$), 醒酒时间 (91.95 ± 25.35 min) 明显缩短了 30.49% ($p < 0.05$); 与模型对照组相比, 藤茶高剂量组小鼠的醉酒时间 (43.11 ± 16.22 min) 明显延长了 79.92% ($p < 0.05$), 醒酒时间 (93.75 ± 26.41 min) 明显缩短了 29.13% ($p < 0.05$); 与模型对照组相比, 玉米低聚肽高剂量组小鼠的醉酒时间 (52.16 ± 19.26 min) 显著延长了 1.18 倍 ($p < 0.01$), 醒酒时间 (88.47 ± 27.26 min) 明显缩短了 33.12% ($p < 0.05$); 与模型对照组相比, 玉米低聚肽中剂量组小鼠的醉酒时间 (46.21 ± 16.09 min) 显著延长了 92.86% ($p < 0.01$), 醒酒时间 (99.10 ± 23.76 min) 缩短 (差异无统计学意义); 与模型对照组相比, 葛根中、低剂量组, 藤茶中、低剂量组和玉米低聚肽低剂量组小鼠的醉酒时间延长, 醒酒时间缩短, 差异无统计学意义。表明高剂量葛根、藤茶和玉米低聚肽能明显延长小鼠的醉酒时间, 缩短醒酒时间, 可改善醉酒小鼠的行为学指标, 有较好的解酒功能, 这与朱振元等探究结果一致^[6]。

2.2 葛根、藤茶、玉米低聚肽联合使用对醉酒小鼠行为学指标的影响

选择 I 组-葛根高剂量+藤茶高剂量 (300+300

表 2 葛根、藤茶、玉米低聚肽联合使用对醉酒小鼠行为学指标的影响

Table 2 Effect of combination of *Pueraria*, AG and COP on behavioral indicators of drunk mice

组别	葛根剂量/(mg/kg)	藤茶剂量/(mg/kg)	玉米低聚肽剂量/(mg/kg)	醉酒时间/ min	醒酒时间/ min
模型对照组	0	0	0	26.47 ± 0.41	139.79 ± 39.89
I 组	300	300	0	$45.75 \pm 15.79^*$	$89.97 \pm 28.02^{**}$
II 组	300	0	1200	$46.84 \pm 7.73^*$	$90.74 \pm 25.76^{**}$
III 组	0	300	1200	$51.92 \pm 21.61^*$	$85.56 \pm 21.71^{**}$
IV 组	300	300	1200	$55.14 \pm 20.97^{**}$	$75.88 \pm 23.28^{**}$

注: “*”表示与模型对照组相比, $p < 0.05$; “**”表示与模型对照组相比, $p < 0.01$ 。

2.3 葛根、藤茶、玉米低聚肽复合组方对小鼠慢性酒精性肝损伤的影响

2.3.1 血清中 ALT 和 AST 活性的变化

正常肝细胞内 ALT、AST 主要分布在线粒体和细胞质中, 当酒精诱导肝细胞发生损伤后, 胞内的 ALT、AST 会透过细胞膜流入血液中, 导致血清中 ALT、AST 活性升高, 因此血清中 ALT、AST 的活性高低可以反映肝细胞损伤程度的大小^[17]。葛根、藤茶、玉米低聚肽复合组方对慢性酒精性肝损伤小鼠血清中 ALT、

mg/kg)、II 组-葛根高剂量+玉米低聚肽高剂量 (300+1200 mg/kg)、III 组-藤茶高剂量+玉米低聚肽高剂量 (300+1200 mg/kg)、IV 组-葛根高剂量+藤茶高剂量+玉米低聚肽高剂量 (300+300+1200 mg/kg) 作为解酒正式实验的剂量组, 醉酒小鼠行为学指标的测定结果见表 2。与模型对照组 (醉酒时间为 26.47 ± 0.41 min, 醒酒时间为 139.79 ± 39.89 min) 相比, IV 组小鼠的醉酒时间 (55.14 ± 20.97 min) 显著延长了 1.08 倍 ($p < 0.01$), 醒酒时间 (75.88 ± 23.28 min) 显著缩短了 45.72% ($p < 0.01$); 与模型对照组相比, I 组、II 组和 III 组小鼠的醉酒时间 (45.75 ± 15.79 min、 46.84 ± 7.73 min、 51.92 ± 21.61 min) 分别明显延长了 72.84%、76.96%、96.15% ($p < 0.05$), 醒酒时间 (89.97 ± 28.02 min、 90.74 ± 25.76 min、 85.56 ± 21.71 min) 分别显著缩短了 35.64%、35.09%、38.79% ($p < 0.01$)。与葛根、藤茶、玉米低聚肽单独使用比较, 葛根、藤茶、玉米低聚肽三者联合使用时小鼠的醉酒时间延长, 醒酒时间缩短。表明葛根、藤茶、玉米低聚肽三者联合应用能显著延长小鼠的醉酒时间, 缩短醒酒时间, 可改善醉酒小鼠的行为学指标, 有很好的解酒功能, 这与朱振元等探究结果一致^[6]。选择葛根、藤茶、玉米低聚肽复合组方: 剂量为葛根+藤茶+玉米低聚肽 (300+300+1200 mg/kg) 进行后续实验, 研究其对小鼠慢性酒精性肝损伤的保护作用。

AST 活性的影响见图 1。与正常组: ALT 活性为 (12.76 ± 4.62) U/L, AST 活性为 (15.12 ± 2.91) U/L 相比, 模型组小鼠血清中 ALT、AST 活性 (23.52 ± 7.47) U/L, (28.08 ± 7.36) U/L 分别明显升高了 84.33%、85.71% ($p < 0.05$), 说明酒精诱导肝细胞产生了一定程度的损伤, 造模成功。与模型组相比, 酒精给药组中 ALT、AST 活性 (17.09 ± 6.26) U/L, (21.41 ± 6.80) U/L 分别明显降低了 27.34%、23.75% ($p < 0.05$), 表明复合组方可以抑制其活性。提示复合组方可通过抑制血清中 ALT、AST 的活性来减轻酒精所诱导的肝损伤, 达到保护肝脏的效果, 这与 Guo 等探究结果一致^[17]。单独给药组中

ALT、AST 活性与正常组比较无显著性差异($p>0.05$)。

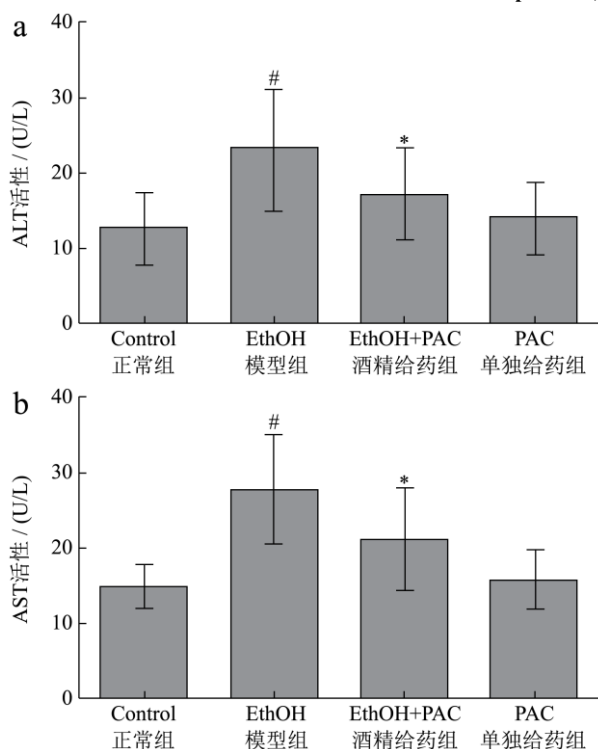


图1 葛根、藤茶、玉米低聚肽复合组方对慢性酒精性肝损伤小鼠血清中 ALT、AST 活性的影响

Fig.1 Effect of PAC compound on ALT and AST activity in chronic alcohol-induced hepatic injury mice serum

注：“#”表示与正常组相比， $p<0.05$ ；“*”表示与模型组相比， $p<0.05$ 。

2.3.2 肝组织中 MDA、GSH 含量及 SOD 活性的变化

酒精诱发肝细胞氧化损伤的过程中，会有大量活性氧自由基产生，引起肝细胞膜的脂质过氧化，从而导致过氧化反应终产物 MDA 含量增加，并且加快可清除自由基的抗氧化物质 GSH 和 SOD 的消耗，导致 GSH 含量减少、SOD 活性降低，因此肝组织中 MDA、GSH 含量及 SOD 活性的高低可以反映肝细胞氧化损伤程度的大小^[17]。葛根、藤茶、玉米低聚肽复合组方对慢性酒精性肝损伤小鼠肝组织中 MDA、GSH 含量及 SOD 活性的影响见图 2。与正常组：MDA 含量为 (1.40±0.20) nmol/mg 相比，模型组小鼠肝组织中 MDA 含量 (3.52±0.45) nmol/mg 明显增加了 1.51 倍 ($p<0.05$)，说明酒精诱导肝细胞产生了一定程度的损伤；与模型组相比，酒精给药组中 MDA 含量 (2.46±0.31) nmol/mg 明显减少了 30.11% ($p<0.05$)，表明复合组方抑制了肝细胞脂质过氧化。与正常组：GSH 含量为 (9.72±2.69) nmol/mg，SOD 活性为 (271.61±28.60) U/mg 相比，模型组中 GSH 含量 (6.49±1.71) nmol/mg 和 SOD 活性 (204.30±27.33)

U/mg 分别明显降低了 33.23%、24.78% ($p<0.05$)，说明酒精诱导肝细胞产生了一定程度的损伤；与模型组相比，酒精给药组中 GSH 含量 (8.80±2.14) nmol/mg 和 SOD 活性 (241.99±35.60) U/mg 分别明显升高了 35.59%、18.45% ($p<0.05$)，表明复合组方可抑制酒精引起的抗氧化物质的消耗。综上所述，复合组方可通过降低肝组织中 MDA 含量、提高 GSH 含量和 SOD 活性来减轻酒精对肝脏造成的损伤，达到保护肝脏的效果，其保肝作用机制与抗氧化、抑制脂质过氧化、清除自由基能力有关，这与 Guo 等探究结果一致^[17]。单独给药组中 MDA、GSH 含量及 SOD 活性与正常组比较无显著性差异 ($p>0.05$)。

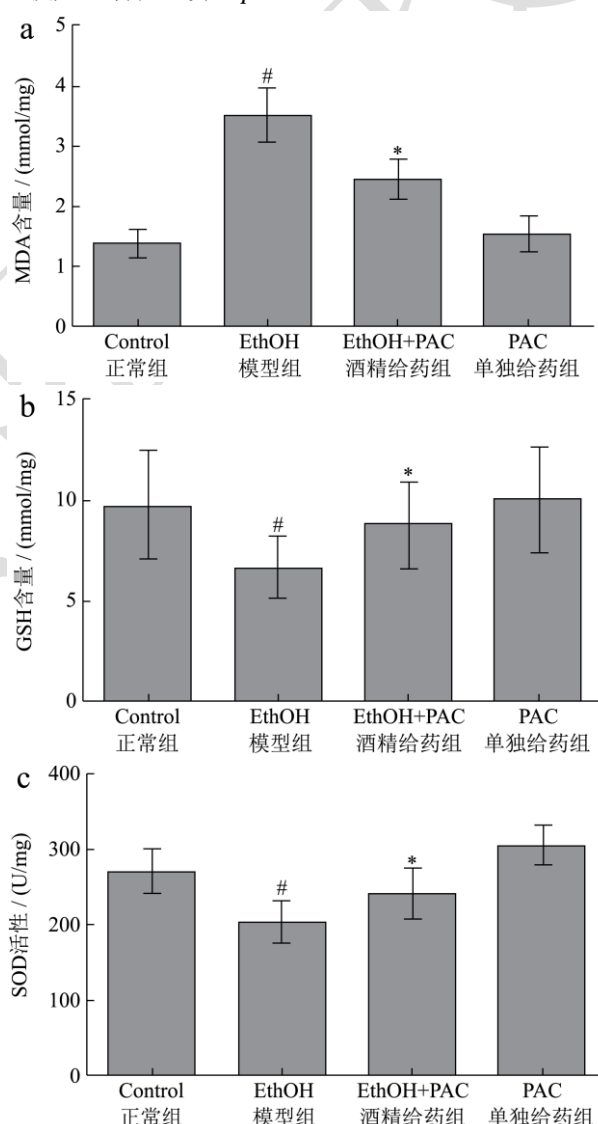


图2 葛根、藤茶、玉米低聚肽复合组方对慢性酒精性肝损伤小鼠肝组织中 MDA、GSH 含量及 SOD 活性的影响

Fig.2 Effect of PAC compound on MDA, GSH and SOD activity in chronic alcohol-induced hepatic injury mice liver

注：“#”表示与正常组相比， $p<0.05$ ；“*”表示与模型组相比， $p<0.05$ 。

2.3.3 肝组织病理形态变化

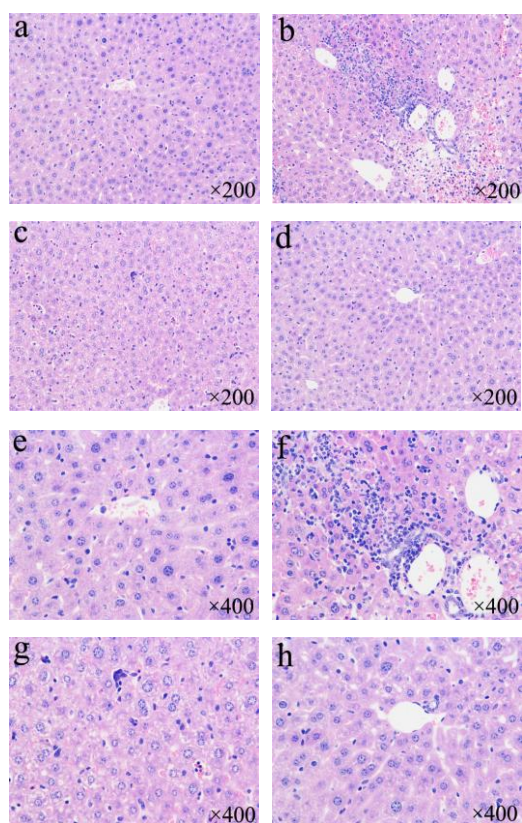


图3 小鼠肝脏组织切片 (HE 染色)

Fig.3 HE staining of mouse hepatic tissues

注: a、e: 正常组 (Control); b、f: 模型组 (EthOH); c、g: 酒精给药组 (EthOH+PAC); d、h: 单独给药组 (PAC)。

图3中, 正常组和单独给药组小鼠肝组织肝索结构清晰, 肝窦未见扩张充血, 肝细胞圆润饱满, 组织无明显异常。模型组小鼠有明显的肝损伤特征, 肝细胞广泛水肿, 细胞肿胀, 胞浆疏松淡染, 胞质内可见圆形空泡, 有大量炎性细胞浸润。酒精给药组部分肝细胞肿胀, 胞浆疏松淡染, 炎性细胞数量较模型对照组明显减少, 酒精给药组肝损伤程度发生了明显的减轻, 表明复合组方可明显减轻酒精对肝脏造成的损伤, 进一步证实了复合组方对小鼠慢性酒精性肝损伤的保护作用。

2.3.4 肝组织中 NF-κB、TNF-α 表达水平的变化

长期过量饮酒会导致肠道通透性增加, 血清内毒素水平升高, 而内毒素可与肝脏内 Kupffer 细胞表面的特异性受体 CD14 结合, 激活核转录因子 NF-κB, 释放内源性致炎因子 TNF-α, 进而诱导肝细胞的坏死、凋亡, 促使肝组织发生炎症反应和纤维化, 加重肝细胞损伤。因此肝组织内 NF-κB、TNF-α 蛋白表达水平的高低可以反映肝细胞损伤程度及炎症反应程度的大小^[18-20]。采用 Western Blot 法检测肝组织中 NF-κB、

TNF-α 的表达变化, 结果见图4。由图4可知, 单独给药组小鼠肝组织中 NF-κB、TNF-α 的表达水平与正常组比较无显著性差异。与正常组相比, 模型组 NF-κB、TNF-α 的表达水平明显升高, 表明模型组小鼠的肝组织发生了严重的炎症反应, 酒精对肝脏造成了严重的损伤。与模型组相比, 酒精给药组 NF-κB、TNF-α 的表达水平明显降低, 表明酒精给药组小鼠的肝组织炎症反应程度及肝损伤程度有明显的减轻。提示复合组方可通过下调 NF-κB、TNF-α 的表达来抑制肝细胞内的炎症反应, 达到减轻酒精性肝损伤、保护肝脏的效果, 这与 Li 等探究结果一致^[18-20]。

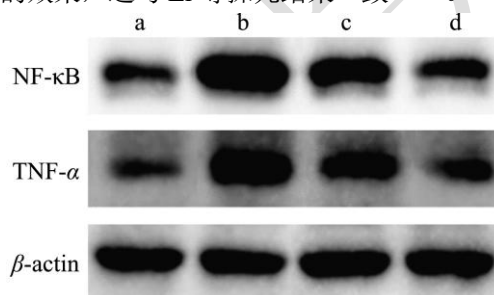


图4 葛根、藤茶、玉米低聚肽复合组方对慢性酒精性肝损伤小鼠肝组织中 NF-κB、TNF-α 蛋白表达的影响

Fig.4 Effect of PAC compound on expression of NF-κB and TNF-α protein in chronic alcohol-induced hepatic injury mice liver

注: a: 正常组 (Control); b: 模型组 (EthOH); c: 酒精给药组 (EthOH+PAC); d: 单独给药组 (PAC)。

3 结论

本研究对比了葛根、藤茶、玉米低聚肽单独使用及其联合使用对醉酒小鼠行为学指标的影响, 发现葛根、藤茶、玉米低聚肽复合组方能显著延长醉酒时间, 缩短醒酒时间, 明显改善醉酒小鼠的行为学指标, 有良好的解酒功能。通过建立小鼠慢性酒精性肝损伤模型, 研究复合组方对模型小鼠肝损伤的保护作用, 结果表明, 复合组方能够减轻小鼠酒精性肝损伤程度。给予复合组方后的醉酒模型小鼠血清中 ALT、AST 活性及肝组织中 MDA 含量均明显降低, 肝组织中 GSH 含量及 SOD 活性均明显升高, 肝组织病理形态变化得到改善, 肝组织中 NF-κB、TNF-α 蛋白表达水平明显降低。因此提示, 复合组方的保护肝脏作用机理可能与其抗氧化活性、清除氧自由基、抑制脂质过氧化、抑制炎症相关信号通路有关。此外, 单独给药组与正常组比较未发现实质性病理改变, 表明复合组方无明显副作用。本研究从动物行为学指标检测、生化指标测定、组织病理学检查及蛋白表达水平检测这四个层面探讨了葛根、藤茶、玉米低聚肽复合组方的解

酒功能及保肝作用, 可为今后进一步研究复合组方的解酒保肝作用机制提供实验基础, 为解酒保肝产品的开发应用提供科学依据。

参考文献

- [1] 肖达民,李丹青,吴艳华.酒精性肝病的中医临床研究进展[J].中药新药与临床药理,2018,29(1):118-122
XIAO Da-min, LI Dan-qing, WU Yan-hua. Progress in the clinical study of chinese medicine of alcoholic liver disease [J]. Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology, 2018, 29(1): 118-122
- [2] 侯羽菲,陈吉.酒精性肝病治疗的新进展[J].世界最新医学信息文摘,2018,18(72):156-159
HOU Yu-fei, CHEN Ji. New progress in the treatment of alcoholic liver disease [J]. World Latest Medicine Information, 2018, 18(72): 156-159
- [3] 张译文,李昱锦,胡冰芳,等.三种小鼠酒精性肝病短期模型的评价[J].药学报,2018,53(2):236-243
ZHANG Yi-wen, LI Yu-jin, HU Bing-fang, et al. Evaluation on three short-term animal models of alcoholic liver disease [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2018, 53(2): 236-243
- [4] Chen X, Li R, Liang T, et al. Puerarin improves metabolic function leading to hepatoprotective effects in chronic alcohol-induced liver injury in rats [J]. Phytomedicine, 2013, 20(10): 849-852
- [5] Wei S Y, Chen Y, Xu X Y. Progress on the pharmacological research of puerarin: A review [J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2014, 12(6): 407-414
- [6] 朱振元,薛婧,刘晓翠,等.葛根素及葛根异黄酮对小鼠急性醉酒预防和解酒效果的研究[J].食品科学,2014,35(15):247-250
ZHU Zhen-yuan, XUE Jing, LIU Xiao-cui, et al. Puerarin and isoflavones from kudzu root (*Pueraria lobata* ohwi) prevent acute drunkenness and relieve alcoholism in mice [J]. Food Science, 2014, 35(15): 247-250
- [7] 赵月蓉,侯碧玉,张莉,等.葛根素对实验性肝损伤的治疗作用研究进展[J].中国新药杂志,2017,26(9):1005-1010
ZHAO Yue-rong, HOU Bi-yu, ZHANG Li, et al. Research progress of puerarin in the treatment of experimental liver injury [J]. Chinese Journal of New Drugs, 2017, 26(9): 1005-1010
- [8] Shen Y, Lindemeyer A K, Gonzalez C, et al. Dihydromyricetin as a novel anti-alcohol intoxication medication [J]. The Journal of Neuroscience, 2012, 32(1): 390-401
- [9] Qiu P, Dong Y, Li B, et al. Dihydromyricetin modulates p62 and autophagy crosstalk with the Keap-1/Nrf2 pathway to alleviate ethanol-induced hepatic injury [J]. Toxicology Letters, 2017, 274: 31-41
- [10] Li H, Li Q, Liu Z, et al. The versatile effects of dihydromyricetin in health [J]. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2017, 6: 1-10
- [11] 吴咖,陈红霞,黄仁彬,等.相思藤茶水提物的解酒作用[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(4):187-189
WU Ka, CHEN Hong-xia, HUANG Ren-bin, et al. Effect of xiangsi tengcha on dispelling alcoholic intoxication [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2012, 18(4): 187-189
- [12] 谭沙,罗静,李建新,等.藤茶研究进展[J].安徽农业科学,2015,43(31):71-73
TAN Sha, LUO Jing, LI Jian-xin, et al. Research progress of vine tea [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2015, 43(31): 71-73
- [13] Zhang F, Zhang J, Li Y. Corn oligopeptides protect against early alcoholic liver injury in rats [J]. Food and Chemical Toxicology, 2012, 50(6): 2149-2154
- [14] Li H M, Guo P, Hu X, et al. Preparation of corn (*Zea mays*) peptides and their protective effect against alcohol-induced acute hepatic injury in NH mice [J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2007, 47(3): 169-174
- [15] 刘雪皎.玉米低聚肽保肝作用的研究[D].镇江:江苏大学,2016
LIU Xue-jiao. Study of corn oligopeptide on hepatoprotective effect [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2016
- [16] 潘兴昌,曾瑜,刘文颖,等.玉米低聚肽和姜黄素对小鼠的醒酒功能研究[J].食品与发酵工业,2016,42(11):25-34
PAN Xing-chang, ZENG Yu, LIU Wen-ying, et al. Effects of corn oligo-peptides and curcumin on antialcoholism in mice [J]. Food and Fermentation Industries, 2016, 42(11): 25-34
- [17] Guo Y, Zhao Q, Cao L, et al. Hepatoprotective effect of Gan Kang Yuan against chronic liver injury induced by alcohol [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2017, 208: 1-7
- [18] Li R, Xu L, Liang T, et al. Puerarin mediates hepatoprotection against CCl₄-induced hepatic fibrosis rats through attenuation of inflammation response and amelioration of metabolic function [J]. Food and Chemical Toxicology, 2013, 52: 69-75

(下转第 69 页)