

茶橘片对酒精性肝损伤的保护作用研究

梅雪婷, 罗小菊, 许东晖

(中山大学生命科学学院中药与海洋药物实验室, 广东广州 510275)

摘要: 本论文通过建立小鼠急性酒精性肝损伤、大鼠慢性酒精性肝损伤动物模型, 考察了沙田柚皮和茶叶提取物的配伍制备茶橘片对急性酒精性肝损伤的保护作用。50%乙醇(0.01 mL/g)灌胃小鼠, 每天给予两次, 共 10 d, 可成功建立小鼠急性酒精性肝损伤模型。结果表明: 与模型组比较, 茶橘片(100、300、900 mg/kg)剂量能显著降低血清 TG 含量, 减少肝组织 MDA 的生成, 提高 GSH-ST 的活性, 呈剂量依赖关系 ($p < 0.001$)。采用酒精灌胃(50%乙醇, 4 g/kg), 喂养高脂饲料, 腹腔注射微量 CCl_4 (25% CCl_4 -花生油溶液, 0.1 mL/kg)的方法八周可成功建立慢性酒精性肝损伤大鼠模型。与模型组比较, 茶橘片(70 mg/kg、210 mg/kg、630 mg/kg)可显著降低血清 ALT 水平, 增加血清 ALB 含量, 减少肝组织 MDA 及 CHO 的生成, 增加 SOD 的活性, 呈剂量依赖关系 ($p < 0.001$)。茶橘片由于富含天然黄酮类活性物质能够减轻酒精对脂肪代谢的影响, 对急性酒精性肝损伤起保护作用。

关键词: 酒精性肝病; 沙田柚皮; 茶叶; 保肝作用; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2010)1-49-4

Protective Effects of Tea-Orange Tablets on Alcoholic Hepatic Injury

MEI Xue-ting, LUO Xiao-ju, XU Dong-hui

(Lab. of Chinese Medicine and Marine Drugs, School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou, 510275, China)

Abstract: Tea-Orange Tablets were made from extracts of Satian pomelo and tea. Acute and chronic alcoholic hepatic injury animal models were setup to test the protective effects of tea-orange tablets from pomelo peel and tea extract. Acute alcoholic hepatic injury mice models were setup by oral administration of 50% alcohol twice a day for 10 days. Compared to control group, tea-orange tablets (100 mg/kg, 300 mg/kg and 900 mg/kg) could reduce serum TG and MDA contents, and improve activity of GSH-Px, showing dose dependence ($p < 0.001$). Chronic alcoholic hepatic injury rat models was setup by oral administration of 50% alcohol (4 g/kg, p.o.) and 25% CCl_4 (0.1 mL/kg, i.p.) for 8 weeks. Oral administration of tea-orange tablets (70, 210 and 630mg/kg) could significantly reduce contents of ALT, MDA and CHO, and improve contents of ALB and activity of SOD ($p < 0.001$). Tea-orange tablets were in rich of flavones material and had protective effects to acute and chronic alcoholic hepatic injury.

Key words: alcoholic hepatic injury; peel of pomelo; tea; hepatoprotective effect; antioxidant

酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)是由于长期大量饮酒所致的肝脏疾病。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。严重酗酒时可诱发广泛肝细胞坏死甚至急性肝功能衰竭^[1]。我国由酒精所致肝损害的发病率亦呈逐年上升趋势, 调查显示: 1991年为4.20%, 1995年为17.5%, 到1996年则为21.3%, 酒精已成为我国继病毒性肝炎后导致肝损害的第二大病因^[2]。2008年, 我国酒精性肝病的患病率为12.8%, 其中酒精性肝硬化为3.3%, 酒精性脂肪肝为5.0%, 酒精性肝炎为1.7%, 轻症酒精性肝损害为6.8%。显示 ALD

收稿日期: 2009-8-12

通讯作者: 许东晖, 男, 副教授, 博士, 博士生导师, 从事中药与海洋药物的开发研究

在人群中属多发病和常见病, 不容忽视。

沙田柚是广西、广东等省份的岭南特产, 每年1~3月是沙田柚大量上市的季节, 人们在食用柚子的果肉后, 往往把柚皮一丢了之, 这很可惜。因为柚皮含有柚皮甙、新橙皮甙等黄酮类活性物质和挥发油, 具有抗炎、抗病毒、抗癌、抗突变、抗过敏、抗溃疡、镇痛、调节血压活、降胆固醇、改善局部微循环和营养供给, 及暖胃、化痰、润化喉咙等药理作用。

我国是茶业出口大国, 拥有世界上最大的种植面积和位居第二的产量茶叶。研制茶叶特色高附加值新产品具有广阔的开发前景。本研究利用广东梅州五华县万重山生产的绿色无公害茶叶、沙田柚皮提取物制备茶橘片, 开展抗酒精性肝损伤的药理学研究。

1 实验材料

1.1 试验材料

茶橘片, 广东中大绿原生物科技有限公司生产, 主要由梅州沙田柚皮及茶叶提取物按 3:1 比例制备而成。

昆明小鼠, Sprague-Dawley(SD)大鼠, 由广东省医学实验动物中心提供, SPF 级, 阳性对照药: 硫普罗宁, 商品名凯西莱, 河南省新谊药业股份有限公司生产, 批准文号: 国药准字 H41020799。

1.2 实验环境

中山大学生命科学学院中药与海洋药物实验室, 实验环境合格证: GB14925-2001 SPF 环境, 粤监证字 2004C009 号。

2 实验方法

2.1 对酒精致小鼠急性肝损伤的保护作用

选择健康昆明小鼠 60 只, 雌雄兼用, 体重 20 ± 2 g, 随机分成 6 组, 正常对照组、模型组、阳性对照组、茶橘片低剂量组、中剂量组和高剂量组, 每组 10 只。从开始实验之日起, 给药剂量按表 1 所示。每天给予相应药物 1 次, 正常对照组、模型组给予等体积的生理盐水, 共给药 21 d。给药第 11 天后开始造模, 除正常对照组外其余各组灌胃给予 50% 乙醇 0.01 mL/g, 正常对照组给予等量的生理盐水, 每天 2 次, 共 10 d。10 d 后, 摘眼球取血, 测定血清中甘油三酯 (TG) 含量; 制备 10% 肝组织匀浆, -75 °C 保存备用, 测定肝组织匀浆中的丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽硫转移酶 (GSH-ST) 含量。

2.2 对酒精致大鼠慢性肝损伤的保护作用

选择健康 SD 大鼠 60 只, 雄性, 体重 220 ± 20 g, 随机分成 6 组, 正常对照组、模型组、阳性对照组、茶橘片低剂量组、中剂量组和高剂量组, 每组 10 只, 每组 10 只。除正常对照组外, 其余实验组喂养高脂饲料; 每天灌胃 50% 乙醇 4 g/kg, 换算公式为: 酒精重量(g)=白酒体积(mL)×白酒酒精含量×酒精密度(0.8 g/mL); 每周两次腹腔注射 25% CCl₄-花生油溶液 0.1 mL/kg, 实验时间共 8 周。从开始实验之日起, 按表 2 剂量, 每天灌胃给予相应药物 1 次, 正常对照组及模型组给予等量的生理盐水。第 56 天给药后, 禁食, 不禁水。24 h 后, 麻醉动物, 颈总动脉取血; 测定血清中的谷草转氨酶 (ALT)、CHO, 白蛋白 (ALB) 含

量; 制备 10% 肝组织匀浆, 测定肝组织匀浆中的 MDA, 超氧化物歧化酶 (SOD) 含量。

3 实验结果

3.1 茶橘片对急性酒精性肝损伤小鼠血清 MDA、TG、GSH-ST 含量的影响

表 1 结果表明: 50% 乙醇 (0.01 mL/g) 灌胃小鼠, 每天给予两次, 共 10 d, 可成功建立小鼠急性酒精性肝损伤模型。与模型组比较, 茶橘片 (100 mg/kg、300 mg/kg、900 mg/kg) 能显著降低血清 TG 含量 ($p < 0.001$), 减少肝组织 MDA 的生成 ($p < 0.001$), 提高 GSH-ST 的活性 ($p < 0.001$), 呈剂量依赖关系, 提示茶橘片对小鼠急性酒精性肝损伤具有明显的保护作用。

表 1 茶橘片对急性酒精性肝损伤小鼠血清 MDA、TG、GSH-ST 含量的影响 ($\bar{x} \pm SD$, $n=10$)

Table 1 The effect of tea-orange tablets on serum MDA, TG and GSH-ST levels of acute alcoholic hepatic injury mouse models ($\bar{x} \pm SD$, $n=10$)

组别	剂量 (mg/kg)	MDA (nmol/mg)	TG (mmol/l)	GSH-ST (U/mg)
正常对照组	NS	4.15±1.42 ^{***}	1.59±0.45 [*]	7.65±1.05 ^{***}
模型组	NS	6.95±1.53	3.65±0.52	4.59±1.12
低剂量组	100	4.57±1.63 ^{**}	1.96±0.40 ^{***}	6.52±1.26 ^{***}
中剂量组	300	4.26±1.60 ^{***}	1.78±0.41 ^{***}	7.91±1.35 ^{***}
高剂量组	900	4.13±1.53 ^{***}	1.63±0.52 ^{***}	8.42±1.20 ^{***}
凯西莱组	50	5.21±1.72 ^{***}	2.26±0.58 ^{***}	7.50±1.30 ^{***}

注: 与模型组比较, ^{**} $p < 0.01$, ^{***} $p < 0.001$

3.2 茶橘片对慢性酒精性肝损伤大鼠血清 ALT、CHO、ALB、MDA 和 SOD 含量的影响

通过建立大鼠慢性酒精性肝损伤动物模型, 考察茶橘片对慢性酒精性肝损伤的保护作用。表 2 结果表明: 采用酒精灌胃 (50% 乙醇, 4 g/kg), 喂养高脂饲料, 腹腔注射微量 CCl₄ (25% CCl₄-花生油溶液, 0.1 mL/kg) 的方法 8 周可成功建立慢性酒精性肝损伤大鼠模型。与模型组比较, 茶橘片 (70、210、630 mg/kg) 可显著降低血清 ALT 水平 ($p < 0.001$), 增加血清 ALB 含量 ($p < 0.001$), 减少肝组织 MDA 及 CHO 的生成 ($p < 0.001$), 增加 SOD 的活性 ($p < 0.001$), 提示茶橘片对大鼠慢性酒精性肝损伤具有明显的保护作用。

表2 茶橘片对慢性酒精性肝损伤大鼠血清ALT、CHO、ALB、MDA和SOD含量的影响($\bar{x} \pm SD$, n=10)

Table 2 The effect of tea-orange tablets on serum ALT, CHO, ALB, MDA and SOD levels of chronic alcoholic hepatic injury rat models

$(\bar{x} \pm SD, n=10)$						
组别	剂量(mg/kg)	ALT(U/L)	CHO(mg/dL)	ALB(g/L)	MDA(nmol/mg)	SOD(U/mL)
正常对照组	NS	159.2±15.2 ^{***}	1.55±0.23 ^{***}	39.22±3.76 ^{***}	2.73±0.41 ^{***}	26.42±3.52 ^{***}
模型组	NS	868.2±35.9	3.86±0.42	25.25±1.63	4.63±0.98	11.29±2.41
低剂量组	70	263.4±23.2 ^{**}	2.65±0.50 ^{***}	32.47±2.56 ^{***}	2.96±0.53 ^{***}	17.64±2.95 ^{***}
中剂量组	210	219.6±22.4 ^{**}	2.14±0.55 ^{***}	38.05±3.22 ^{***}	2.61±0.35 ^{***}	20.18±3.12 ^{***}
高剂量组	630	189.4±19.2 ^{***}	1.89±0.48 ^{***}	41.23±3.45 ^{***}	2.38±0.47 ^{***}	24.65±3.25 ^{***}
凯西莱组	54	281.6±16.2 ^{***}	2.31±0.30 ^{**}	33.54±3.27 ^{***}	2.82±0.55 ^{***}	16.93±2.26 ^{***}

注:与模型组比较, *** $p < 0.001$

4 讨论

流行病学调查显示酒精性肝病在人群中属多发病和常见病。目前对于酒精性肝病尚无理想的治疗药物。目前国内外关于急性酒精性肝损伤模型的造模方法主要有两种:①用56度白酒灌胃,每次7 mL/kg,每日2次,共10 d;②腹腔注射一定浓度的乙醇,每次20 mL/kg,每日2次,共10 d^[4]。赵静波等^[5]研究发现制作大鼠急性酒精性肝损伤模型,灌胃法优于腹腔注射法,后者死亡率高,且不符合人类饮酒习惯。本实验以50%乙醇(0.01 mL/g)灌胃小鼠,每天给予两次,共10 d,成功建立小鼠急性酒精性肝损伤模型。

脂质过氧化是酒精性肝损伤的一个重要机制。酒精在肝脏代谢中产生很多活性氧自由基(ROS),包括 O_2^- 、 H_2O_2 、OH $^-$ 及 $C_2H_5O^+$ 和 $C_2H_5OH^{+6}$ 。活性氧(ROS)是一类含有未配对电子的氧原子或氧原子团,会攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸,引起脂质过氧化,并产生脂质过氧化产物^[7]。谷胱甘肽(GSH)是一种低分子清除剂,是谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)的底物,对脂自由基及脂质过氧化自由基等具有较强的清除作用^[8,9]。乙醇的代谢物乙醛能与谷胱甘肽及其半胱氨酸的-SH基迅速结合形成复合物,降低细胞内GSH的浓度,使机体内源性抗氧化能力减弱,肝内自由基及脂质过氧化物进一步堆积,进一步损伤肝细胞^[10]。

丙二醛(MDA)是脂质过氧化反应的终产物,MDA含量可以间接的反映出机体细胞受自由基攻击的程度,MDA的增加表明组织细胞脂质过氧化物量的增加^[10]。谷胱甘肽硫转移酶(GSH-ST)在体内具有清除体内脂质过氧化物作用,它可催化GSH与乙醛结合,形成无毒化合物排出体外,阻止其进一步氧化生成的氧自由基对肝脏的损伤。本实验显示:茶橘片可通过抑制脂质过氧化、减少MDA的生成,诱导GSH-ST活性,增强肝脏清除自由基的能力,对急性酒精性肝

损伤起治疗作用。

本实验采用酒精灌胃(50%乙醇,4 g/kg),喂养高脂饲料,结合腹腔注射微量 CCl_4 (25% CCl_4 -花生油溶液,0.1 mL/kg)复合因素建立慢性酒精性肝损伤大鼠模型,以酒精为主导因素,高脂饲料,微量 CCl_4 起协同作用,成功建立大鼠慢性酒精性肝损伤模型。血清转氨酶活性被认为是肝细胞损害的敏感指标。谷草转氨酶(ALT)主要分布与肝脏、肾脏和肌肉,血清中的ALT主要来自胞浆,当肝脏受损时,此酶可释放入血,致使血中酶活性浓度增加,血清中ALT活性的升高在一定程度上反映了肝细胞损害的程度^[11]。乙醇代谢过程中可产生大量活性氧自由基(ROS),当ROS的量超出机体抗氧化系统的清除能力时,发生氧应激,ROS氧化细胞膜上饱和脂肪酸,导致脂质过氧化,使肝细胞膜结构受损,通透性发生改变,胞浆内ALT向肝血窦逸出,进入血流,导致血清ALT活性增加。本研究提示茶橘片能阻止自由基对肝细胞膜中不饱和脂肪酸的氧化损伤,保护肝细胞,减少了ALT的释放,主要是茶橘片中的茶多酚、柚皮甙、新橙皮甙等黄酮类化合物起抗氧化、保护肝脏免受酒精损伤作用。

参考文献

- [1] 郑征雄.柑橘皮中柚皮苷的研究价值及发展前景[J].大众科学,2007,(9):11-14.
- [2] 赵可,李弼民.酒精性肝病的研究进展.实用临床医学[J],2006,7(12):194-197.
- [3] 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病组.酒精性肝病诊断标准[J].中华肝脏病杂志,2003,(11):72.
- [4] 赵敏,黄俊明,杨杏芬,等.四氯化碳肝损伤与酒精性肝损伤模型的比较[J].中国公共卫生,2004,20(11):1343-1345.

(下转第65页)