

葛根护肝胶囊对酒精性肝损伤小鼠保护作用的研究

杨荣艳

沈阳药科大学 辽宁沈阳 110015

【摘要】目的 探讨保健食品葛根护肝胶囊内容物对酒精性肝损伤的保护作用。**方法** ICR 小鼠设 5 个实验组, 分别是: 空白对照组、肝损伤模型组、葛根护肝胶囊内容物低、中、高剂量组 (0.2、0.4、1.2g/kg.BW, 临用前以 1% 羧甲基纤维素配制相应浓度); 每日灌胃 1 次, 灌胃体积均为 0.2ml/10g.BW, 空白对照组、肝损伤模型组仅给予 1% 羧甲基纤维素溶液, 30d 后, 检测肝组织中还原型谷胱甘肽 (GSH)、甘油三酯 (TG)、丙二醛 (MDA) 含量, 另取部分肝组织进行病理学观察。**结果** 与空白组相比, 肝损伤模型对照组的 MDA、TG 含量升高, 而 GSH 含量降低, 差异均有显著性 ($P<0.05$)。与肝损伤模型组相比较, 葛根护肝胶囊高剂量组的 TG 和 MDA 含量明显降低, GSH 含量明显升高, 肝脏脂肪变程度明显降低, 差异有显著性 ($P<0.05$)。**结论** 保健食品葛根护肝胶囊对酒精性肝损伤小鼠具有保护作用。

【关键词】 保健食品; 酒精性肝损伤; 氧化应激; 谷胱甘肽; 甘油三酯; 丙二醛

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 2095-7165 (2020) 06-091-02

1 研究背景

随着社会的发展和变迁, 人们的生活水平有了很大的飞跃和提高, 摄入酒和含酒精的饮料成了现代人生活的一部分, 酒文化的盛行, 也给人们的肝脏健康敲响了警钟, 酒虽号称百药之长, 少量饮用能舒筋活络, 但其体湿性热有毒, 过量摄入酒精, 对人体肝脏健康造成压力, 导致酒精性肝损伤。若人体禀赋不足、脾胃虚弱, 继而感受湿热毒气, 气、血、痰、湿、热等相互搏结, 更易罹患酒精性肝损伤。

为此, 我们开发了一款解酒的保健食品, 该产品是以葛根、黄芪、枳椇子、五味子、蜂胶、绿茶提取物为原料加工制成, 组方符合中医药治疗酒精性肝病的准则和现代科学对酒精性肝损伤的认识, 本实验针对此款保健食品的解酒护肝作用进行了研究。

2 材料与方法

2.1 受试样品

葛根护肝胶囊, 由吉林某保健食品公司生产, 以葛根 450g、黄芪 300g、枳椇子 200g、五味子 150g、蜂胶粉 50g、绿茶提取物 50g, 经提取、混合后, 制成 1000 粒胶囊, 每粒重 0.4g。推荐剂量为成人 (体重以 60kg 计) 每次 3 粒, 每日 2 次。

2.2 实验动物和实验环境

SPF 级 ICR 种雄性小鼠 50 只, 体重 18g ~ 22g, 于屏障动物房内饲养并开展实验, 温度 22°C ~ 23°C, 湿度 54% ~ 58%。

2.3 剂量选择与受试物给予方式

按照人体推荐剂量的 5、10、30 倍计算, 预设置葛根护肝胶囊内容物低中高三个剂量组, 分别为 0.20、0.40、1.20g/kg.BW, 同时设置空白对照组和单纯肝损伤模型对照组, 灌胃给药; 低中高剂量组的受试物溶液配制方法为: 分别取葛根护肝胶囊内容物 2.00g、4.00g、12.00g 加 1% 羧甲基纤维素至 200ml。

2.4 主要仪器与试剂

BECKMAN COULTER AU680 全自动生化分析仪、722 可见分光光度计、加样器、离心机、恒温水浴锅、组织匀浆器、混悬器、载玻片、盖玻片、尼康 YS100 显微镜 丙二醛(MDA)测试盒、还原型谷胱甘肽(GSH)测试盒, 甘油三酯 (TG) 测试盒、苏丹 III 染色剂。

2.5 实验方法

2.5.1 动物处理

受试物低中高剂量组按照上述剂量灌胃受试物, 空白对照组、模型对照组给予等体积 1% 羧甲基纤维素溶液, 灌胃体积均为 0.2ml/10g·bw, 每日 1 次, 连续 30 天。第 30 天灌胃结束后, 各剂量组和模型对照组灌胃给予 50% 乙醇 (12ml/kg.bw), 造成急性酒精性肝损伤模型, 空白对照组灌胃给予 1% 羧甲基纤维素, 禁食 16 小时后, 处死动物, 进行相关指标检测及病理组织学检查。

2.5.2 指标检测

取部分肝脏组织, 生理盐水制成 10% 的肝匀浆, 分别检测 GSH、MDA 和 TG 的含量。

2.5.3 病理组织学检查

从肝左叶中部选取合适的横切面进行取材, 冰冻切片, 以苏丹 III 染色。镜检时从肝脏的一端视野开始记录细胞的病理变化, 用 40 倍物镜连续观察整个组织切片, 观察脂滴在肝脏的分布、范围和面积, 并按以下标准进行评分: 0 分, 肝细胞内脂滴散在、稀少; 1 分, 含脂滴的肝细胞不超过 1/4; 2 分, 含脂滴的肝细胞不超过 1/2; 3 分, 含脂滴的肝细胞不超过 3/4; 4 分, 肝组织几乎被脂滴代替。

2.6 实验数据统计

各剂量组与模型对照组比较用 Spss 软件进行统计分析, 先检验方差齐性, 方差不齐, 则用单因素 ANOVA 方差分析进行总体比较, 发现差异再用 Dunnett 法进行多个剂量组与一个对照组均数间的两两比较, 方差不齐则对原始数据进行适当的变量转换, 满足方差齐的条件后, 再进行统计; 若变量转换后方差仍不齐, 则选择秩和检验方法统计, 发现总体比较有差异, 则采用不要求方差齐性的 Tamhane's T2 检验进行两两比较。模型对照组与空白对照组比较采用 t 检验。

2.7 结果判定

肝组织中丙二醛 (MDA)、还原型谷胱甘肽 (GSH)、甘油三酯 (TG) 三项检测指标结果阳性, 或肝组织中丙二醛 (MDA)、还原型谷胱甘肽 (GSH)、甘油三酯 (TG) 三项指标中任两项指标阳性和病理检测结果阳性, 可判定受试样品对化学性肝损伤具有辅助保护功能。

3 结果

3.1 葛根护肝胶囊对肝组织中 MDA、GSH、TG 含量的影响

由表 1 可见, 与空白组相比, 模型对照组的 MDA、TG 含量均升高, GSH 含量降低, 差异均有显著性 ($P<0.01$)。而与模型组相比, 高剂量组的 TG 和 MDA 含量明显降低, GSH 含量明显升高, 差异有显著性 ($P<0.05$)。

表 1: 葛根护肝胶囊内容物对小鼠肝匀浆中 MDA、GSH、TG 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量组 (g/kg.BW)	MDA (nmol/mgprot)	GSH (mg/gprot)	TG (mmol/g 肝组织)
空白对照	0	1.84±0.31	11.0±1.09	0.0099±0.0021
模型对照	0	3.99±0.40 ^{△△}	5.22±0.51 ^{△△}	0.0192±0.0031 ^{△△}
低剂量	0.2	2.82±0.34	9.31±0.82	0.0172±0.0034
中剂量	0.4	2.08±0.37	9.77.14±0.71	0.0163±0.0038
高剂量	1.2	1.92±0.25*	10.28±0.98*	0.0139±0.0036*

注: △△表示与空白对照组比较 $P<0.01$; *表示与模型对照组比较 $P<0.05$

3.2 葛根护肝胶囊对肝组织病理的影响

由表 2 可见,与空白组相比,模型对照组肝脏脂肪变性的程度升高,差异有显著性 ($P<0.05$);与模型对照组相比,高剂量组肝脏脂肪变性的程度明显降低,差异有显著性 ($P<0.05$)。

表 2: 黄芪枳椇子胶囊内各物对小鼠肝脏组织病理学检查结果
($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量组 (g/kg, BW)	脂肪染色评分 (分)
空白对照	0	0.20±0.42
模型对照	0	3.20±0.53 ^{△△}
低剂量	0.2	3.00±0.56
中剂量	0.4	2.30±0.52
高剂量	1.2	2.00±0.41*

注: △△表示与阴性对照组比较 $P<0.01$; *表示与模型对照组比较 $P<0.05$

4 讨论

摄入酒精过量,积累于体内,会诱导大量活性氧生成,这些活性氧会诱导肝细胞膜发生脂质过氧化反应,进而改变其流动性和通透性,细胞内生物活性物质的结构和功能也将因此受到破坏,最终导致肝细胞损伤,脂质过氧化作用是酒精性肝损伤(ALD)的发病机制之一^[1]。

谷胱甘肽(GSH)是肝细胞内存在的内源性抗氧化反应物质,具有清除异常自由基的作用,从而使肝细胞免于受到损害。研究表明,GSH能根据机体的需要,调节细胞内氧化还原反应,且具有解毒功能。^{[2][3]}长期饮酒者肝细胞内GSH含量明显降低,线粒体严重受损,氧自由基增多,由于抗氧化物质活性和含量降低,来不及消耗多余的氧自由基,从而加剧氧化应激反应^[4]。肝组织中GSH含量和活性,能一定程度上反映肝脏健康情况。

丙二醛(MDA)是自由基脂质过氧化反应的最终产物之一。^[5]肝脏MDA的含量可以反映肝脏脂质过氧化的程度,也是常用的了解肝脏健康的指标。

本研究结果显示,与空白组相比,模型组小鼠肝脏组织中GSH活性和含量明显降低,MDA明显升高。实验结果与前期查询到的文献论述相符,说明本次实验造模成功。与模型组相比,葛根护肝胶囊高剂量组能显著提高小鼠肝组织GSH含量和活性、显著降低肝组织中MDA含量。说明葛根护肝胶囊可以缓解氧化应激对酒精性肝损伤小鼠肝脏的损伤。

甘油三酯(TG)是存在于血液和肝脏中重要的内源性脂类物质,其合成、分解、代谢都依赖于肝脏,分解产物能提供维持生理运转的能量,研究表明^[6],摄入大量酒精可导致TG的代谢途径遭到破坏,使得过多的TG堆积于肝脏中,造成脂质代谢异常,引起肝脏中TG含量的显著上升。

本研究结果显示,模型组肝组织中TG含量与空白组相比显著升高,说明乙醇灌胃对肝脏造成了损害,导致TG在肝脏内沉积,符合文献报道,造模成功。与模型组比较,葛根护肝胶囊高剂量组肝组织中TG含量显著降低,表明本品对酒精性肝损伤小鼠肝脏具有保护作用。其原因可能是该方减少肝脏摄取游离脂肪酸、促进线粒体氧化、加速TG转运效率等。

生理状态下,机体内的脂质代谢保持一种稳定的平衡状态,当脂质代谢的重要器官受到损害时,平衡状态被打破,就会出现脂质异常代谢。当长期大剂量饮酒时,肝脏不断受到酒精的刺激,可造成肝细胞线粒体功能受损,肝组织内脂肪大量堆积,最终引起肝脂肪变性^[7]。

本实验采用50%乙醇灌胃,染色结果显示模型组出现脂肪沉积,表明成功建立模型。与模型组相比,葛根护肝胶囊高剂量组小鼠肝组织脂肪

变性评分降低,葛根护肝胶囊具有减轻酒精性肝损伤脂肪变程度的作用。

本配方是以葛根、黄芪、枳椇子、五味子、蜂胶、绿茶提取物为原料制成的保健食品,中医理论认为,酒为湿邪,配方中,枳椇子、葛根为中医常用的解酒毒药物,枳椇子利尿,葛根升阳;黄芪则兼具升阳利尿的作用,且能补气扶正,缓解了酒邪对人体正气的损耗,三原料联合使用,在解酒毒的同时,兼顾了湿易困脾的特点,升发脾之清气,促使湿热下行,兼可扶正,酒毒可解,此外,酒为阳邪,饮酒过量伤阴津,五味子在配方中的作用有二:1、五味子的生津作用,可有效缓解酒对阴津的伤耗,2、五味子的收敛作用,防止因黄芪、枳椇子利水太过对机体津液的伤耗,配伍增强功效的同时,在配方中对其他原料也起到制衡的作用。葛根、黄芪、枳椇子、五味子配伍使用,符合中医对酒邪的处理原则即“从脾论治”为主,扶正、解毒、化湿为补。

现代研究表明,蜂胶可通过增强肝组织清除氧自由基的能力,降低肝组织脂质过氧化反应而对慢性酒精性肝损伤产生保护作用^[8],绿茶对CYP450酶家族中诱导酒精性肝损伤发生的酶CYP2E1具有明显抑制作用,其主要成分多酚类物质具有较好的清除自由基的作用^[9],故能缓解酒精性肝损伤。可见两原料对酒精性肝损伤均具有保护作用,作用相对缓和,并富含多糖、多酚等对人体有益的营养物质,适用于保健食品,可长期服用。

5 小结

本品组方前进行了大量的文献查阅,组方综合考虑传统中医和现代科学对酒精性肝损伤的认识,并结合保健食品注册申报相关法律法规,最终确定了本品配方和用量,组方无配伍禁忌,前期配方论证工作和本实验研究结果均支持葛根护肝胶囊各原料配伍及其日用量具有辅助保护化学性肝损伤的作用。

[参考文献]

- [1] 厉有名, 范建高, 王炳元, 等. 酒精性肝病诊疗指南[J]. 临床肝胆病杂志, 2010, 26(03):229-232.
- [2] Ceriello A. Hyperglycaemia: the bridge between non-enzymatic glycation and oxidative stress in the pathogenesis of diabetic complications. Diabetes, Nutrition & Metabolism, 1999, 12(1):42-6.
- [3] Penninckx M. A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 26(9-10): 737-742.
- [4] Parola M, Robino G. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis[J]. Journal of hepatology, 2001, 35(2): 297-306.
- [5] Hartley D P, Kroll D J, Petersen D R. Prooxidant-initiated lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes: detection of 4-hydroxynonenal and malondialdehyde-protein adducts[J]. Chemical Research of Toxicology, 1997, 10(8):895-905.
- [6] 曾民德. 脂肪肝. 中华消化杂志, 1999, 19(3):120.
- [7] 郑纪宁, 郑淑芳, 李玉红, 等. 酒精性肝病的大鼠肝细胞超微结构的电镜学研究[J]. 承德医学院学报, 2000(04):115-118.
- [8] 陈小困. 蜂胶对慢性酒精性肝损伤的保护作用及其机制研究[J]. 健康研究, 2009, 29(02):89-91.
- [9] Kuo-Hsin CHEN, Ping-Chia LI, Wei-Hsiang LIN, et al. Depression by a Green Tea Extract of Alcohol-Induced Oxidative Stress and Lipogenesis in Rat Liver. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2011, 75(9):1668-1676.

(上接第 90 页)

素含量,保障国民饮酒健康。

[参考文献]

- [1] 闫吉昌, 马长海, 于明明, 辛若竹. 三种国标方法测定酒中甜蜜素的比较与方法改进[J]. 酿酒科技, 2019(12):54-59.
- [2] 张子臣, 朱爱国, 徐薇, 刘建洋. 食品中甜蜜素的应用及检测方法的比较[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(05):1261-1267.
- [3] 邵彪, 周小兰, 王琳琳, 刘飞, 陈刚. 甜蜜素的电喷雾串联

质谱行为及其在酒类分析检测中的应用研究[J]. 中国食品添加剂, 2018(06):166-172.

- [4] 李颖. 气相色谱技术检测食品中甜蜜素的实验条件改进和优化[J]. 食品安全导刊, 2017(36):60.
- [5] 罗凯. 气相色谱技术检测食品中甜蜜素成分的方法[J]. 广东化工, 2017, 44(02):121-122.
- [6] 廖劲松, 巫景铭, 洪瑞泽. 酒中甜蜜素检测方法研究进展[J]. 酿酒, 2011, 38(02):11-14.