

刺五加注射液对小鼠急性酒精性肝损伤的保护作用

董清清^{1,2}, 李晓明¹, 储菲¹, 吴成柱¹, 赵素荣¹, 刘浩¹

[摘要] 目的: 观察刺五加注射液对小鼠酒精性肝损伤的保护作用。方法: 昆明种雄性小鼠 60 只(18~22 g), 随机分为正常组、模型组、硫普罗宁阳性药对照组和刺五加高、中、低剂量组(200 mg/kg、100 mg/kg、50 mg/kg), 每组各 10 只。采用 50% 乙醇 12 ml·kg⁻¹·d⁻¹ 连续灌胃 10 d, 制备小鼠酒精性肝损伤模型。测定血清中天门冬氨酸氨基转移酶、丙氨酸氨基转移酶及三酰甘油(TG)水平; 肝组织丙二醛、还原型谷胱甘肽含量, 计算肝脏指数, 并观察肝脏病理变化。结果: 小鼠酒精性肝损伤模型构建成功。除刺五加低剂量组 TG 水平与模型组差异无统计学意义($P > 0.05$)外, 与模型组比较, 刺五加注射液均能够降低血清中天门冬氨酸氨基转移酶、丙氨酸氨基转移酶和 TG 水平($P < 0.05 \sim P < 0.01$); 抑制小鼠肝组织丙二醛含量的升高, 提高肝脏中还原型谷胱甘肽含量($P < 0.05 \sim P < 0.01$); 减轻肝脏病理组织损伤; 刺五加高、中剂量组均能降低小鼠肝脏指数($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。结论: 刺五加注射液对小鼠酒精性肝损伤具有保护作用, 其作用机制可能与抑制氧化应激有关。

[关键词] 肝疾病; 酒精性; 氧化应激; 刺五加注射液

[中图分类号] R 575 **[文献标志码]** A **DOI:** 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2015.04.001

Protective effect of *Acanthopanax senticosus* injection on the acute alcoholic hepatic injury in miceDONG Qing-qing^{1,2}, Li Xiao-ming¹, CHU Fei¹, WU Cheng-zhu¹, ZHAO Su-rong¹, LIU Hao¹,

(1. Department of Pharmacy, Anhui Engineering Technology Research Center of Biochemical Pharmaceuticals,

Bengbu Medical College, Bengbu Anhui, 233030; 2. Department of Internal Medicine,

The Second Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the protective effects of *Acanthopanax senticosus* injection on the acute alcoholic hepatic injury in mice. **Methods:** Sixty Kunming male mice (18 to 22g) were randomly divided into the normal group, model group, Tiopronin positive control group, and *Acanthopanax senticosus* injection high, medium and low dose group (200 mg/kg, 100 mg/kg and 50 mg/kg) (10 mice each group). The alcoholic hepatic injury model of mice was established by intragastric administration with 12 ml/kg/d of 50% alcohol for 10 days. The levels of serum aspartate transaminase (AST), alanine transferase (ALT), Triglyceride (TG), liver tissue malondialdehyde (MDA) and Glutathione in all groups were detected. Liver index and hepatic pathological changes in all mice were calculated and observed, respectively. **Results:** The alcoholic hepatic injury model of mice was successfully established. *Acanthopanax senticosus* injection could reduce the levels of AST, ALT and TG, inhibit the increase of liver MDA, improve the content of reduced glutathione in liver ($P < 0.05 \sim P < 0.01$), decrease the liver index and alleviate the liver tissue injury ($P < 0.05$ and $P < 0.01$).

Conclusions: *Acanthopanax senticosus* injection can protect the alcoholic hepatic injury of mice, and the mechanism of which may be related to the suppressing oxidative stress.

[Key words] alcohol-induced liver injury; oxidative stress; *Acanthopanax senticosus* injection

酒精性肝病是由于长期酗酒所致的酒精中毒性肝脏疾病, 包括脂肪肝、酒精性肝炎、酒精性肝硬化、肝癌^[1]。该病在西方国家多见, 80%~90% 的肝硬化是由饮酒过度所致。随着我国酒类制品的消耗量不断增加, 临床上酒精性肝病有逐年增多的趋势, 然

而目前临床上缺乏有效的治疗药物^[2]。刺五加注射液为五加科植物刺五加干燥的根及根茎经加工提取制成的灭菌水溶液, 具有平补肝肾, 益精壮骨的功效。常用于肝肾不足所致的短暂性脑缺血发作、动脉硬化、脑血栓形成、脑栓塞等治疗^[3]。通过临床观察, 我们发现使用刺五加注射液治疗脑血栓合并肝病的患者, 可使其肝功能有不同程度地改善。但关于刺五加注射液对酒精性肝损伤的保护作用, 鲜有报道。本研究分析其对急性酒精性肝损伤小鼠的保护作用, 探讨其保肝机制。

1 材料与方法

1.1 动物 昆明种小鼠, 体质量 18~22 g, 雄性。

[收稿日期] 2014-06-24

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81000992, 81372899); 安徽省自然科学基金资助项目(1508085MH166)

[作者单位] 1. 蚌埠医学院药理学系, 安徽省生化药物工程技术研究中心, 安徽蚌埠 233030; 2. 蚌埠医学院第二附属医院内科, 安徽蚌埠 233040

[作者简介] 董清清(1981-), 女, 硕士研究生。

[通信作者] 刘浩, 博士, 教授。E-mail: liuhao6886@foxmail.com

购买于安徽医科大学实验动物中心,在温度 20 ~ 24 °C,湿度 50% ~ 60% 的环境中饲养。

1.2 主要试剂和仪器 刺五加注射液(黑龙江格润药业有限责任公司,批号:20130711),硫普罗宁片(河南省新谊药业股份有限公司,批号:20131103);无水乙醇(北京化工厂)。谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)检测试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。DK-8A 电热恒温水浴箱(上海医用恒温设备厂),FC204 型电子分析天平(上海第二天平仪器厂),DG3022 酶联免疫检测仪(中国人民解放军第四军医大学,国营华东电子管厂联合研制),罗氏全自动生化分析仪(瑞士罗氏公司)。

1.3 方法

1.3.1 小鼠急性酒精性肝损伤模型的建立及给药方法 选择昆明种雄性小鼠 60 只,随机分为正常组、模型组和刺五加高、中、低量组,硫普罗宁阳性药对照组,每组各 10 只。造模方法:除正常组蒸馏水灌胃外,其余各组均于每日上午用 50% 乙醇按 12 ml/kg 灌胃 1 次,连续 10 d。同时,每日下午治疗组小鼠分别按低(50 mg/kg)、中(100 mg/kg)、高(200 mg/kg)剂量灌胃给予刺五加注射液相应药液,阳性药对照组按 30 mg/kg 给予硫普罗宁混悬液,均为每天 1 次,正常组和模型组给予同体积的蒸馏水。

1.3.2 检测指标 (1)肝脏指数 = 肝脏质量 / 体重 × 100%。(2)生化指标检测:末次灌胃后,禁食不禁水 16 h,摘除眼球取血,离心后送至蚌埠医学院第二附属医院检验科,检测血清中天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)及三酰甘油(TG)含量。(3)肝组织匀浆中的 MDA、GSH 含量测定:剖腹取肝,0.9% 氯化钠注射液漂洗,吸水纸吸干,取肝右叶 0.2 g 左右,剪碎后加入 9 倍的 0.9% 氯化钠注射液,冰浴制备 10% 的肝匀浆,3 500 r/min 离心 15 min,取适量上清液,根据试剂盒说明书检测肝匀浆中 MDA、GSH 的含量。(4)肝脏病理学检查:取肝脏左叶,放入 10% 的甲醛溶液中固定,经过脱水、透明、浸蜡包埋,切片,贴片和苏木精-伊红染色,在显微镜下观察肝脏组织病理变化并摄片。

1.4 统计学方法 采用方差分析和 q 检验。

2 结果

2.1 刺五加注射液对急性酒精性肝损伤小鼠肝脏指数的影响 与正常组比较,模型组小鼠肝脏指数明显增加($P < 0.01$)。与模型组比较,硫普罗宁阳性药对照组及刺五加高、中剂量组肝脏指数均降低

($P < 0.05 \sim P < 0.01$),刺五加低剂量组肝脏指数与模型组差异无统计学意义($P > 0.05$)(见表 1)。

表 1 刺五加注射液对急性酒精性肝损伤小鼠肝脏指数的影响($n_i = 10; \bar{x} \pm s$)

分组	肝脏指数/%	F	P	$MS_{组内}$
正常组	4.18 ± 0.33			
模型组	5.16 ± 0.35 ^{##}			
硫普罗宁阳性药对照组	4.58 ± 0.39 ^{**}	8.40	<0.01	0.136
刺五加注射液				
高剂量组	4.53 ± 0.37 ^{**}			
中剂量组	4.73 ± 0.36 [*]			
低剂量组	4.92 ± 0.41			

q 检验:与正常组比较 ^{##} $P < 0.01$;与模型组比较 ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$

2.2 刺五加注射液对急性酒精性肝损伤小鼠血清中 ALT、AST、TG 含量的影响 与正常组比较,模型组小鼠血清中 ALT、AST 和 TG 含量均显著上升($P < 0.01$)。硫普罗宁阳性药对照组及刺五加注射液 3 个剂量组均能显著降低模型小鼠血清的 ALT、AST 和 TG 含量($P < 0.05 \sim P < 0.01$)。但刺五加注射液低剂量组血清 TG 与模型组差异无统计学意义($P > 0.05$)(见表 2)。

表 2 刺五加注射液对急性酒精性肝损伤小鼠血清中 ALT、AST 和 TG 的影响($n_i = 10; \bar{x} \pm s$)

分组	ALT/(U/L)	AST/(U/L)	TG/(mmol/L)
正常组	25.4 ± 6.92	31.9 ± 6.90	1.32 ± 0.76
模型组	91.5 ± 13.93 ^{##}	109.5 ± 15.17 ^{##}	3.47 ± 1.49 ^{##}
硫普罗宁阳性药对照组	59.4 ± 11.90 ^{**}	67.5 ± 10.73 ^{**}	2.24 ± 1.12 [*]
刺五加注射液			
高剂量组	55.5 ± 9.96 ^{**}	58.2 ± 7.73 ^{**}	1.76 ± 0.84 ^{**}
中剂量组	68.2 ± 10.80 ^{**}	77.9 ± 11.64 ^{**}	2.13 ± 0.56 [*]
低剂量组	78.2 ± 12.08 [*]	94.4 ± 11.55 ^{**}	2.89 ± 0.87
F	41.11	62.41	6.18
P	<0.01	<0.01	<0.01
$MS_{组内}$	124.218	120.253	0.971

q 检验:与正常组比较 ^{##} $P < 0.01$;与模型组比较 ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$

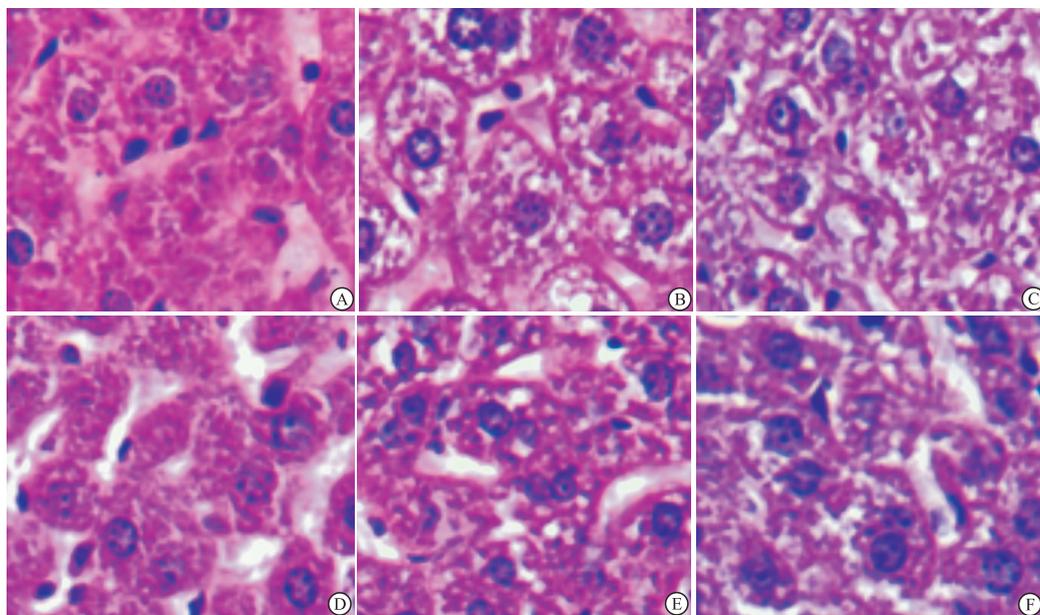
2.3 刺五加注射液对急性酒精性肝损伤小鼠肝脏 GSH 和 MDA 含量的影响 与正常组比较,模型组小鼠肝脏 MDA 含量明显增高,GSH 含量明显减少($P < 0.01$)。与模型组比较,硫普罗宁阳性药对照组 MDA 含量明显降低($P < 0.01$),GSH 含量则增加($P < 0.05$);与模型组比较,刺五加注射液高、中和低剂量组 MDA 含量均减低($P < 0.05 \sim P < 0.01$),刺五加注射液高、中 GSH 含量均增加($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$),但低剂量组 GSH 含量与模型组差异无

统计学意义 ($P > 0.05$) (见表 3)。

表 3 刺五加注射液对急性酒精性肝损伤小鼠肝组织中 MDA 和 GSH 的影响 ($n_i = 10; \bar{x} \pm s$)

分组	MDA/(nmol/mgprot)	GSH/(mg/gprot)
正常组	3.79 ± 1.15	4.37 ± 1.60
模型组	10.04 ± 1.63 ^{##}	1.73 ± 0.89 ^{##}
硫普罗宁阳性药对照组	6.14 ± 1.12 [*]	3.20 ± 0.77 [*]
刺五加注射液		
高剂量组	6.07 ± 1.09 ^{**}	4.17 ± 0.95 ^{**}
中剂量组	8.20 ± 0.99 [*]	3.19 ± 0.82 [*]
低剂量组	8.88 ± 1.29 [*]	2.05 ± 1.52
<i>F</i>	34.30	8.82
<i>P</i>	<0.01	<0.01
<i>MS</i> 组内	1.511	1.305

q 检验:与正常组比较 ^{##} $P < 0.01$;与模型组比较 ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$



A: 正常组;B: 模型组;C: 硫普罗宁组;D: 高剂量组;E: 中剂量组;F: 低剂量组

图1 各组小鼠肝组织病理形态学的变化(HE染色)

3 讨论

乙醇由消化道吸收,主要经肝脏代谢,长期大量地摄入乙醇,会造成肝脏损害,继而形成酒精性肝病。乙醇通过肝脏细胞色素 P450 系统并在铁离子参与下发生氧化作用,产生活性氧、过氧化氢、羟自由基等氧自由基^[4]。当机体的抗氧化能力不能够清除过量的自由基时,肝脏中即发生氧化应激,会导致生物膜脂质过氧化,破坏膜磷脂结构,抑制膜蛋白功能,改变其通透性和流动性,毁坏线粒体,断绝细胞的能量供给,最终导致细胞死亡^[5]。氧自由基及其介导的脂质过氧化在酒精性肝病的发生发展中发挥重要作用^[6]。

2.4 刺五加注射液对小鼠肝脏组织病理学变化的影响 正常组的肝细胞排列整齐,细胞核圆形或椭圆形,居中,细胞质内无脂质滴,未见气球样变,未见肝细胞坏死、无炎性细胞浸润等现象。与正常组比较,模型组小鼠正常肝小叶结构遭到破坏,肝细胞明显水肿,细胞质疏松,肝细胞内可见大小不等、分布不均的脂肪空泡,将细胞核挤压至一边,伴有不同程度中性粒细胞浸润,并可见点、碎片状坏死。与模型组比较,阳性药对照组及刺五加注射液中、低剂量组的肝细胞肿胀程度不同程度地缓解,脂肪变性和炎性细胞浸润得以改善。刺五加高剂量组的治疗效果最好,细胞包膜完整,排列整齐,核质清晰(见图 1)。

正常情况下,血清转氨酶为胞质源性,ALT 主要分布在细胞质内,AST 主要存在于线粒体中,血清含量很少。当肝脏严重受损,肝细胞膜的通透性增大,ALT、AST 从肝细胞中释放,导致血清中 ALT、AST 水平明显升高。因此转氨酶是检测肝细胞损伤最敏感的指标。同时,肝脏是脂质代谢的枢纽,机体在大量摄入乙醇后,抑制三羧酸循环和脂肪 β -氧化,肝内大量脂肪酸酯化合成 TG,形成酒精性脂肪肝。蓄积在肝组织的大量 TG 又会被装配成极低密度脂蛋白进入血液,因此其血清中的水平也相应升高^[7]。

MDA 是参加氧化应激反应的相关因子,长期大量摄入酒精会导致脂质过氧化终产物 MDA 增多,MDA 可与磷脂酰乙醇胺和蛋白质交联,生成无活性

脂褐质,破坏细胞膜结构,细胞肿胀坏死,其含量是组织氧化程度的指标,间接反映了肝细胞受自由基攻击后损伤的程度^[8],因此检测肝组织 MDA 含量是评估肝组织过氧化损伤的程度及治疗后肝细胞恢复情况的重要指标^[9]。随之产生大量的氧自由基,会消耗大量的还原物质 GSH,破坏肝脏内皮细胞窗孔,促进肝脏脂肪变^[10]。GSH 不仅可直接清除酒精代谢过程中的自由基,同时作为谷胱甘肽过氧化物酶的特异性底物,清除细胞内过氧化氢及脂过氧化物。因此,检测肝组织 GSH 含量是评估体内抗氧化能力的重要指标^[11]。刺五加是五加科植物刺五加的干燥根及根茎,性温、无毒,相关研究^[12]表明,刺五加能够促进核酸和蛋白质的合成,提高人体清除氧自由基的能力,从而增强机体的适应性和耐受性。刺五加具有多种活性化学成分,包括黄酮类、皂苷类、多糖类、有机酸类等^[13]。目前,关于刺五加的活性成分及药理作用的研究主要集中在皂苷和多糖类成分上,对其它类成分如黄酮类化合物关注较少^[14]。刺五加注射液的主要有效成分是刺五加总黄酮,黄酮类化合物是一类重要的天然化合物,由于具有特别的化学结构而具有重要的生理、生化作用。现代医学研究^[15]表明黄酮类物质具有清除自由基、抗衰老降血糖、降血脂、抗心律失常等。

硫普罗宁是一种与青霉素性质相似的含游离巯基的甘氨酸衍生物,具有保肝降酶、抑制 TG 蓄积的作用,同时还可以通过巯基与自由基的可逆结合,消除自由基。通过长期临床证实:该药能够改善酒精性肝损伤的相关指标及症状,并具有安全可靠等特点^[16-17],因此,本实验选其作为阳性对照药。通过实验发现,模型组小鼠血清 ALT、AST、TG 水平升高,肝脏出现明显的水肿、脂肪和炎性变,表明成功构建了小鼠酒精性肝脏损伤模型。结合氧化和抗氧化的指标分析,模型组小鼠肝脏还原物质 GSH 浓度下降,脂质过氧化终产物 MDA 含量增高,证明酒精代谢诱导的氧化应激是促成酒精性肝脏损伤发生的重要原因。予以刺五加注射液治疗后,血清中 AST、ALT、TG 水平较模型组明显降低,肝组织病理损伤程度明显好转,说明刺五加注射液能改善肝细胞膜的结构和功能,对酒精性肝损伤具有一定的保护作用。本实验中,刺五加各剂量组能不同程度地升高小鼠肝脏 GSH 活性发挥作用、降低 MDA 水平,表明其是通过提高抗氧化酶的活性,据上述各项生化指标,刺五加注射液高剂量组优于硫普罗宁阳性药对照组,能更有效地缓解小鼠急性酒精性肝损伤。

综上,刺五加注射液对酒精性肝损伤有着一定的保护作用,其主要有效成分是刺五加总黄酮,其机制与抑制氧化应激有关。

[参 考 文 献]

- [1] Wu W, Zhu B, Peng X, *et al.* Activation of farnesoid X receptor attenuates hepatic injury in a murine model of alcoholic liver disease[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 44(3): 68 - 73.
- [2] Yi J, Xia W, Wu JP, *et al.* Betulinic acid prevents alcohol-induced liver damage by improving the antioxidant system in mice[J]. *J Vet Sci*, 2014, 15(1): 141 - 148.
- [3] 曾超, 刘艳, 刘高峰, 等. 刺五加注射液对大鼠肝微粒体四 CYP450 亚型酶活性的影响[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2012, 17(2): 164 - 170.
- [4] 大海燕, 张善玉, 朴莲荀. 银杏叶提取物对小鼠急性酒精性肝损伤的保护作用[J]. *延边大学医学院学报*, 2013, 36(4): 268 - 270.
- [5] 张伟, 洪汝涛, 田国磊. 大鼠酒精性脂肪肝模型的建立[J]. *安徽医药*, 2012, 16(7): 885 - 887.
- [6] 李素婷, 张子俊, 杜超, 等. 山楂叶总黄酮对酒精性肝损伤小鼠脂质过氧化水平的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2014, 34(4): 1012 - 1014.
- [7] 陈伟, 蒋定文, 何颖, 等. 九通胶囊对小鼠酒精性肝损伤的保护作用[J]. *现代中药研究与实践*, 2013, 27(2): 36 - 38.
- [8] 宋莎莎, 何伟, 魏伟, 等. 复方枳椇子制剂对乙醇所致小鼠肝损伤的保护作用[J]. *安徽医药*, 2013, 17(6): 923 - 925.
- [9] 吴绍康, 张娜, 沈先荣, 等. 枇杷花水提取物防治小鼠急性酒精性肝损伤研究[J]. *解放军药理学学报*, 2014, 30(2): 135 - 137.
- [10] 顾芳, 周艳, 杨浩然, 等. β -酪啡肽-7 对小鼠酒精性肝损伤防治作用的研究[J]. *中国药理学通报*, 2013, 29(3): 397 - 400.
- [11] Lu KH, Tseng HC, Liu CT, *et al.* Wild bitter gourd protects against alcoholic fatty liver in mice by attenuating oxidative stress and inflammatory responses[J]. *Food Funct*, 2014, 5(5): 1027 - 1037.
- [12] 王志斌, 郭江涛, 姜海, 等. 刺五加的化学成分和药理作用研究[J]. *中医药信息*, 2013, 30(3): 29 - 32.
- [13] Han J, Bian L, Liu X, *et al.* Effects of *Acanthopanax senticosus* Polysaccharide Supplementation on Growth Performance, Immunity, Blood Parameters and Expression of Pro-inflammatory Cytokines Genes in Challenged Weaned Piglets [J]. *Asian-Australas J Anim Sci*, 2014, 27(7): 1035 - 1043.
- [14] 郝乘仪, 南极星. 刺五加肝保护作用的研究进展[J]. *吉林医药学院学报*, 2013, 34(2): 112 - 114.
- [15] 张涛, 朴俊虹, 袁蕾, 等. 刺五加化学成分及自由基清除活性研究[J]. *中草药*, 2012, 43(6): 1057 - 1060.
- [16] 朱登玲. 硫普罗宁治疗酒精性肝病的临床研究[J]. *中国社区医师*, 2014, 30(14): 39 - 40.
- [17] Tang MC, Cheng L, Qiu L, *et al.* Efficacy of Tiopronin in treatment of severe non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2014, 18(2): 160 - 164.