

自拟解酒护肝汤对酒精性肝炎模型大鼠的保护作用

马阮昕 王晓东 江晓妹

【摘要】 目的 探讨自拟解酒护肝汤对酒精性肝炎模型大鼠的肝脏保护作用。**方法** 将 SD 大鼠随机分为 6 组,每组 10 只。将大鼠按体重用 56% 酒精给予灌胃,7 mL/kg,1 天 1 次,持续 4 周。从造模后第 5 周起,阳性对照组灌胃给予西乐葆 0.05 mg/kg,解酒护肝汤治疗组分别给予灌胃低、中、高剂量(5.0 mg/kg,15.0 mg/kg,30.0 mg/kg),持续 30 天。末次给药后,经腹主动脉取血,以及取肝脏组织,称重固定。随后试剂盒检测血清丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase,ALT)、谷氨酸氨基转移酶(aspartate transaminase,AST)和丙二醛(malondialdehyde,MDA),ELISA 和免疫组化法分别检测血清和肝脏肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor,TNF- α),HE 染色观察肝脏组织形态。**结果** 与模型对照组比较,解酒护肝汤各剂量组的 ALT、AST 显著减少($P<0.05$),解酒护肝汤中、高剂量组的 MDA、TNF- α 显著减少($P<0.05$)。解酒护肝汤高剂量组的肝脏脏器系数显著下降($P<0.05$)。解酒护肝汤各剂量组肝脏 TNF- α 表达均有一定程度减少。**结论** 自拟解酒护肝汤对酒精性肝炎模型大鼠肝脏有一定的保护作用。

【关键词】 解酒护肝汤; 酒精性肝炎; 血清; 大鼠; 肿瘤坏死因子 α

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.08.002

Effects of Jiejiu Hupan Decoction on Alcoholic Hepatitis in Rats MA Ruanxin, WANG Xiaodong, JIANG Xiaomei. The Sixth Affiliated Hospital Of SUN Yatsen University, Guangzhou 510655, China

作者单位: 510655 广州,中山大学附属第六医院药学部(马阮昕、王晓东);中山大学附属第一医院药学部(江晓妹)

作者简介: 马阮昕(1986-),女,本科,初级药师。研究方向:药学研究。E-mail:657078890@qq.com

【Abstract】 Objective To study the effects of *Jiejiu Hupan* Decoction on alcoholic hepatitis in rats. **Methods** SD rats were randomly divided into 6 groups ($n=10$). Model preparation was gastric gavage with 35% alcohol (15 ml/kg) for 4 weeks, once a day. After models were built, positive control group was given celebrex 0.05 mg/kg, and protect liver soup group was given, *Jiejiu Hupan* decoction low, medium and high dose (5.0 mg/kg, 15.0 mg/kg, 30.0 mg/kg) for 30 days. After the last administration, blood was collected by abdominal aortic blood, and liver tissue was weighed and fixed. The serum ALT, AST and MDA were detected. TNF- α in serum and liver was detected by ELISA and immunohistochemical method. And the HE staining was used to observe liver. **Results** Compared with the model group, the level of ALT, AST, MDA and TNF- α of *Jiejiu Hupan* decoction was significantly reduce ($P<0.05$). The expressions of TNF- α and organ coefficients in liver were reduced in *Jiejiu Hupan* decoction groups and liver damage was slowed down. **Conclusion** *Jiejiu Hupan* decoction has a protect effect on alcoholic hepatitis in rats.

【Key words】 *Jiejiu Hupan* Decoction; alcoholic hepatitis; Serum; Rats; TNF- α

酒精性肝病是由于长期大量饮酒导致的肝脏疾病,酒精性肝炎是酒精性肝病的一种病症^[1-2]。近年来,中国由酒精所致肝损害的发病率亦呈逐年上升趋势,酒精已成为继病毒性肝炎后导致肝损害的第二大病因^[3]。中医学虽无酒精性肝病之称,但有论治“伤酒”“胁痛”“黄疸”等病证的文献^[4]。因此,中医治疗酒精性肝病有独特之处,本实验采用自拟解酒护肝汤对酒精性肝炎大鼠的作用进行研究。

1 材料与方法

1.1 动物

SD 大鼠 60 只,雄性,体重 180~220 g,8 周龄,由广东省实验动物监测所提供,实验动物生产许可证号:SCXK(粤)2008-0020,动物适应 3 天后进行实验。

1.2 药物

自拟解酒护肝汤的药物组成:葛根 20 g、连翘 20 g、石菖蒲 20 g、茵陈 20 g、虎杖 20 g、柴胡 20 g、甘草 10 g,水煎煮,浓缩后生药量为 2 g/L。

1.3 试剂与仪器

兔 IgG-免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,型号:SV1022),Rat-TNF α ELISA 试剂盒(BIOVALUE 公司,批号:BV-E13052505),丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase,ALT)试剂盒、谷氨酸氨基转移酶(aspartate transaminase,AST)试剂盒和丙二醛(malondialdehyde,MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20130402),葛根、连翘、石菖蒲、茵陈、虎杖、柴胡和甘草(广州市岭南中药饮片有限公司,批号:131101),赛科希德 SA-5000 自动血流变测试仪(北京寒科希特科技发展有限公司),BX50F-3 型 OLYMPUS 显微镜(日本奥林巴斯公司),FA(N)/JA(N)系列电子天平(上海民桥精密科学仪器有限公司),Bio-Rad 450 型酶标仪。

1.4 动物模型及分组

SD 大鼠随机分为 6 组,每组 10 只。空白对照组给予等体积生理盐水,分次灌胃,持续 4 周。阳性对照组、模型对照组和解酒护肝汤治疗组均按体重用 56% 酒精给予灌胃,7 mL/kg,1 天 1 次,持续 4 周^[5]。从造模后第 5 周起,阳性对照组和解酒护肝汤治疗组分别灌胃给予西乐葆 0.05 mg/kg,解酒护肝汤低、中、高剂量(5.0 mg/kg, 15.0 mg/kg, 30.0 mg/kg),持续 30 天;空白对照组和模型对照组则分别给予等体积生理盐水灌胃,持续 10 天。末次给药后禁食 24 小时,10% 水合氯醛(35 mg/kg)腹腔内注射麻醉,所有动物经腹主动脉取血,取肝脏组织分别在 10% 福尔马林和 4% 多聚甲醛中固定。

1.5 实验指标

生化指标测定:血清中 MDA、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor, TNF- α) 检测分别严格按试剂盒要求操作。血清转氨酶的变化:全自动生化检测仪检测血清 AST、ALT 含量。肝脏的脏器系数:通过各组大鼠肝脏的质量与相应的大鼠体重的比值来计算出肝脏的脏器系数。肝组织病理学检查:常规石蜡包埋、切片,HE 染色,光镜下观察肝脏组织学变化。肝组织 TNF- α 的免疫组化检查:常规石蜡包埋,作 5 μ m 切片,免疫组化 SABC 法染色,DAB 显色。以组织细胞胞浆中出现棕黄色沉淀,染色强度高于背景非特异性染色者为阳性表达,用磷酸盐缓冲液作为阴性对照。

1.6 统计学处理

所有数据用 SPSS 17.0 软件处理,结果以均数 \pm

标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较用 LSD 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 解酒护肝汤对酒精性肝炎大鼠的生化指标的影响

与空白对照组比较,模型对照组的 MDA、TNF- α 显著增加($P<0.01$);与模型对照组比较,阳性对照组、解酒护肝汤中、高剂量组的 MDA、TNF- α 都显著减少($P<0.05$)。见表 1。

表 1 解酒护肝汤对酒精性肝炎大鼠的 MDA、TNF- α 的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)			
组别	剂量 (mg/kg)	MDA ($\mu\text{mol/L}$)	TNF- α (pg/mL)
空白对照组	—	1.76 \pm 0.74 ^b	1.06 \pm 0.02 ^b
模型对照组	—	3.58 \pm 1.65	1.53 \pm 0.09
阳性对照组	0.05	1.98 \pm 0.81 ^b	1.11 \pm 0.07 ^b
解酒护肝汤低剂量组	5.00	3.24 \pm 0.96	1.41 \pm 0.15
解酒护肝汤中剂量组	15.00	2.91 \pm 1.17 ^a	1.32 \pm 0.12 ^a
解酒护肝汤高剂量组	30.00	2.55 \pm 0.93 ^b	1.12 \pm 0.19 ^b

注:与模型对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ 。

2.2 解酒护肝汤对酒精性肝炎大鼠的血清转氨酶的影响

与空白对照组比较,模型对照组的 ALT、AST 显著增加($P<0.01$);与模型对照组比较,阳性对照组、解酒护肝汤低、中、高剂量组的 ALT、AST 都显著减少($P<0.01$)。见表 2。

表 2 解酒护肝汤对酒精性肝炎大鼠的血清 ALT、AST 的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)			
组别	剂量 (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)
空白对照组	—	42.06 \pm 7.92 ^a	81.40 \pm 10.83 ^a
模型对照组	—	87.30 \pm 11.16	144.60 \pm 16.47
阳性对照组	0.05	46.00 \pm 3.52 ^a	83.10 \pm 8.40 ^a
解酒护肝汤低剂量组	5.00	52.09 \pm 4.30 ^a	89.45 \pm 10.90 ^a
解酒护肝汤中剂量组	15.00	51.30 \pm 8.60 ^a	87.13 \pm 5.74 ^a
解酒护肝汤高剂量组	30.00	48.33 \pm 8.43 ^a	84.67 \pm 11.40 ^a

注:与模型对照组比较,^a $P<0.01$ 。

2.3 解酒护肝汤对酒精性肝炎大鼠的肝脏脏器系数的影响

与空白对照组比较,模型对照组的肝脏脏器系数显著减少($P<0.05$);与模型对照组比较,阳性对照组、解酒护肝汤高剂量组的肝脏脏器系数都显著增加($P<0.05$)。见表 3。

表 3 解酒护肝汤对酒精性肝炎大鼠的肝脏脏器系数的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量 (mg/kg)	脏器系数 (g/g)
空白对照组	—	50.81 \pm 5.96 ^a
模型对照组	—	40.87 \pm 4.60
阳性对照组	0.05	48.84 \pm 3.57 ^a
解酒护肝汤低剂量组	5.00	41.44 \pm 8.25
解酒护肝汤中剂量组	15.00	45.65 \pm 2.70
解酒护肝汤高剂量组	30.00	47.43 \pm 6.27 ^a

注:与模型对照组比较,^a $P<0.05$ 。

2.4 解酒护肝汤对酒精性肝炎大鼠肝脏病理组织的影响

图 1 结果呈示,空白对照组大鼠肝小叶清晰,肝细胞索排列尚整齐,未见肝细胞胞质疏松化,炎细胞浸润。模型对照组大片肝细胞胞质疏松化,肝细胞索紊乱,有灶性炎症细胞浸润及轻度纤维增生。浸润的炎细胞以淋巴细胞为主,未见纤维间隔形成。阳性对照组与解酒护肝汤治疗组肝小叶结构完整,肝细胞胞质轻度疏松化,较模型组轻,未见明显炎细胞浸润及纤维增生。阳性对照组、解酒护肝汤治疗组与模型对照组大鼠的肝脏病理比较,炎症及纤维化增生程度均比模型对照组轻,这提示解酒护肝汤有减轻酒精引起的肝细胞的炎症程度。

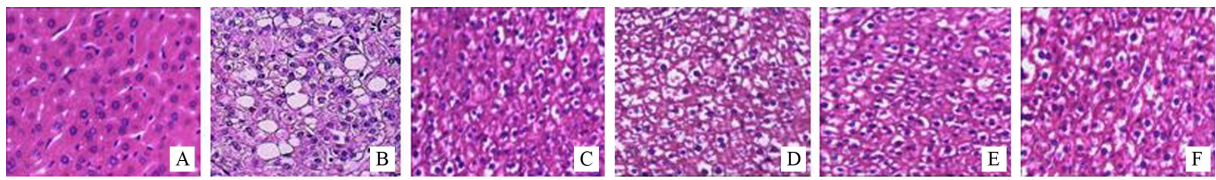
2.5 解酒护肝汤对酒精性肝炎大鼠肝脏 TNF- α 表达的影响

图 2 结果呈示,空白对照组没有 TNF- α 的表达,在模型对照组及解酒护肝汤各剂量组都有 TNF- α 的表达,可观察到模型对照组的棕黄色较深,而解酒护肝汤低、中、高剂量组的棕黄色逐渐变浅,且棕黄色的范围也逐渐减少。

3 讨论

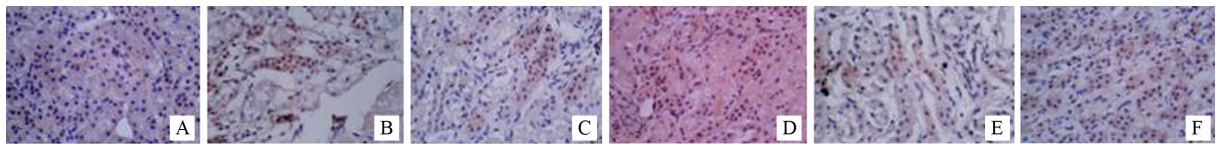
酒精性肝病的病因主要是乙醇在肝细胞内分解代谢,乙醇在肝细胞质的乙醇脱氢酶的作用下氧化为乙醛,乙醛为高活性化合物,能干扰肝细胞多方面的功能^[1-2],引起肝细胞代谢紊乱,使肝细胞变性和坏死,并发炎症反应以及胶原纤维和结节增生^[6]。自拟解酒护肝汤方中的柴胡、茵陈、虎杖、葛根清利肝胆湿热,柴胡行气活血化瘀,葛根有解酒毒之功,甘草调合药性,诸药配合,共奏护酒肝、解酒毒,改善肝功能作用。

ALT 主要存在于肝细胞浆内,当肝细胞损伤时,细胞内转氨酶可进入血中,引起血 ALT 升高。



注:A 空白对照组;B 模型对照组;C 阳性对照组;D 解酒护肝汤低剂量组;E 解酒护肝汤中剂量组;F 解酒护肝汤高剂量组

图1 解酒护肝汤对酒精性肝炎大鼠的肝脏的病理组织影响的 HE 染色图($\times 200$)



注:A 空白对照组;B 模型对照组;C 阳性对照组;D 解酒护肝汤低剂量组;E 解酒护肝汤中剂量组;F 解酒护肝汤高剂量组

图2 解酒护肝汤对酒精性肝炎大鼠的肝脏的 TNF- α 表达影响的 HE 染色图($\times 200$)

AST、 γ -GT、LDH 也存在于肝细胞浆内,AST 分布于线粒体内,当肝细胞损害严重时,线粒体内 AST 释放入血,使血清 AST 升高大于 ALT^[7]。由于整个肝脏内转氨酶含量约为血中含量的 100 倍,所以肝脏实质性损害时,只要有 1% 的肝细胞坏死,就可使血清酶活性增加 1 倍。当细胞膜通透性增加时,即使无坏死,因肝细胞内转氨酶浓度高于血清 1000~5000 倍,可顺浓度差而释放入血^[8]。因此转氨酶是肝细胞损害的敏感标志,也是乙醇所致肝损伤最敏感的指标。

MDA 是自由基攻击膜不饱和脂肪酸的产物,可以与蛋白质的游离氨基作用,引起蛋白质分子内和分子间交联,导致细胞损伤^[9]。正常生理状态下,体内的 MDA 含量是极低的,其含量的高低可以反映机体细胞受到自由基攻击的程度。国内外大量研究表明,肝脏库否氏细胞和肝血窦内皮细胞经活化后大量分泌的 TNF- α 等细胞因子是引起肝细胞坏死的重要介质,TNF- α 的产生是酒精性肝损伤最早的反应之一^[10-11]。

本研究结果观察到,模型对照组的 ALT、AST、MDA 和 TNF- α 比空白对照组显著增加,符合酒精性肝炎的临床基本指征^[4]。与模型对照组比较,解酒护肝汤各剂量组的 ALT、AST 都显著减少($P<0.01$),这说明解酒护肝汤对模型大鼠肝脏损伤有减缓作用;解酒护肝汤中、高剂量组的 MDA 显著减少($P<0.01$),这说明解酒护肝汤有抗氧化的作用;解酒护肝汤各剂量组的肝脏 TNF- α 表达都减少,说明解酒护肝汤对模型大鼠肝脏有抗炎作用;解酒护肝汤高剂量组的肝脏脏器系数显著减少

($P<0.05$),各剂量组肝脏炎症及纤维化增生程度减轻,说明解酒护肝汤对模型大鼠的肝脏有保护作用。

综上所述,自拟解酒护肝汤对酒精性肝炎模型大鼠可以缓解肝脏损伤,有抗氧化和抗炎作用,为自拟解酒护肝汤在临床应用提供了实验依据。

参 考 文 献

- [1] 徐正婕,陆伦根. 酒精性肝病的流行病学和自然史[J]. 中国处方药,2010,(1):32-33.
- [2] 厉有名. 酒精性肝病的流行病学特点[J]. 实用肝脏病杂志,2012,15(3):180-182.
- [3] 陈大尧,秦文喜. 饮酒对血脂影响的调查研究[J]. 中国预防医学杂志,2001,4(1):26-27.
- [4] 关永霞,李晓梅,张永霞,等. 化滞柔肝颗粒对酒精联合脂多糖诱导的酒精性肝炎小鼠的保护作用[J]. 实用肝脏病杂志,2015,18(5):530-533.
- [5] 陈奇. 中药药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,1993:837.
- [6] 韩振国,王岩,李国栋. 肝细胞生长因子/扩散因子和血管内皮生长因子对肿瘤血管再生的影响[J]. 吉林大学学报医学版,2004,30(3):376-377.
- [7] 河福金,袁长恩,王德福,等. 小柴胡汤对大鼠酒精性肝损伤的防护作用[J]. 中西医结合肝病杂志,1995,4(1):19-21.
- [8] 梁扩寰,李绍白. 肝脏病学[M]. 北京:人民卫生出版社,1995:208.
- [9] Papadlm IE, Loumbourdis NS. Exposure of the frog *Rana ridibunda* to copper rimact on two biomarkers, lipid peroxidation, and glutathione [J]. Bulletin Environment Contaminant Toxicology,2002,69(6):885-891.
- [10] 方志红,崔剑巍,胡义扬,等. 酒精性肝病的内毒素损伤机制[J]. 中华肝病杂志,2005,13(8):636-638.

(收稿日期:2016-07-03)

(本文编辑:禹佳)