

葛花醇提取液对酒精中毒小鼠模型作用的研究

苗亮, 刘永红, 华蕾, 纪强, 张鹏, 李旭, 高波, 王德利

【摘要】

目的 探讨葛花醇提取液对酒精中毒小鼠模型的作用机理和疗效。

方法 选用清洁级昆明小鼠 80 只, 随机分为 4 组, 分别为空白对照组、模型对照组、醇提液治疗组和阳性药对照组。空白组按 10 ml/kg bw 生理盐水灌胃, 模型组按 10 ml/kg bw 白酒灌胃, 醇提组按 10 ml/kg bw 白酒 + 10 ml/kg bw 醇提液灌胃, 阳性药组按 10 ml/kg bw 白酒 + 10 ml/kg bw 快速解酒液灌胃。连续 45 d, 每天 2 次。利用半自动生化仪测 AST、ALT 指标, 制作肝组织切片观察其形态学变化。

结果 葛花醇提取液治疗组小鼠与模型组小鼠相比各种中毒症状均有所缓解且存活率提高; ALT、AST 指标较模型组有明显降低并接近空白对照组, 趋近于正常值; 肝组织形态学有明显改善, 疗效好于阳性药对照组。

结论 葛花醇提取液可以明显减轻酒精对小鼠所造成肝损伤的程度, 起到解酒保肝作用, 对于因酒精中毒而引发的肝细胞受损, 肝纤维化, 脂肪肝等酒精性肝病具有较好的治疗效果。

【关键词】 小鼠; 酒精中毒; 疾病模型, 动物

www.cmbp.net.cn

中国医药生物技术, 2009, 4(4):262-265

酒精中毒引起的酒精性肝病 (ALD) 是长期过量饮酒的并发症之一, 酒精性肝损伤传统上分为酒精性脂肪肝 (AFL)、酒精性肝纤维化 (AF)、酒精性肝炎 (alcoholic hepatitis, AH)、酒精性肝硬化 (alcoholic cirrhosis, AC) [1-2]。在美国, 酒精性肝硬化是前 7 位死亡率较高的疾病之一, 占肝硬化发病率的 80% 以上 [3]。在我国由于酒精中毒所致肝硬化患者也有逐年增加的趋势。大量资料表明, 长期饮酒可造成消化、循环、呼吸、泌尿、血液等全身各系统脏器不同程度的损害, 增加感染的机会, 引起机体抵抗力下降, 尤其是肝、肾受害更为严重 [4]。一些口腔癌、咽癌、喉癌、肝癌、胰腺癌、胆管癌、结肠癌及上呼吸道癌的患者与过量饮酒也有密切关系 [5]。因此, 酗酒对人体健康有害已成为

不争的事实。很久以来, 人们就试图研制各种解酒药来解除或减轻饮酒所带来的不适。所以, 我们想通过葛花醇提取液对酒精中毒小鼠模型作用的研究, 试图找到一种对于酒精性肝病具有预防和治疗作用的理想药物, 以减轻酒精对人体肝损伤的程度。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级昆明小鼠 80 只, 雌雄各半, 体重 20 ± 2 g, 由吉林大学实验动物中心提供。

1.1.2 实验药物及试剂 中药葛花, 购于吉林大药房; 洮南香白酒 (酒精度 42% V/V) 由吉林洮南香酒业有限公司提供; 快速解酒液, 由河南省星九实业有限公司提供; 谷丙转氨酶 (GPT/ALT, 以下简称 ALT) 试剂盒、谷草转氨酶 (GOT/AST, 以下简称 AST) 试剂盒, 批号: 2008029, 2008030, 由长春汇力生物技术有限公司提供; 甲醛, 无水乙醇, 均为市售分析纯。

1.1.3 主要仪器 GF-D800 半自动生化分析仪购自山东高密; 离心机购自德国 Eppendorf 公司; 旋转蒸发仪购自上海雅荣; 分析天平购自北京赛多利斯; 高速万能粉碎机购自天津市泰斯特仪器有限公司; 光学显微镜购自日本 OLYMPUS 公司, 型号为 BX51; 石蜡切片机购自德国 LEICA 公司, 型号为 RM2245; 组织烘片机购自德国 LEICA 公司, 型号为 HI1210; 组织摊片机购自德国 LEICA 公司, 型号为 HI1220; 组织包埋机购自德国 LEICA 公司, 型号为 EG1150H; 电热股份干燥箱购自上海

基金项目: 2008 年生命科学与技术大学生创新实践基地创新实验基金 (JDCX2008005) 资助项目

作者单位: 130012 长春, 吉林大学生命科学学院 (苗亮、纪强、张鹏、李旭、高波、王德利); 130201 吉林, 吉林化工集团公司总医院 (刘永红); 130022 长春, 吉林省产品质量监督检验院 (华蕾)

通讯作者: 王德利, Email: wdl2003ok@163.com

收稿日期: 2009-03-09

实验仪器厂有限公司, 型号为 101A-2E; 电冰箱购自青岛海尔股份有限公司, 型号为 BCH198K。

1.2 方法

1.2.1 药物提取 葛花醇提取液用索式提取器提取。每次称取葛花 12 g, 先用高速万能粉碎机以 24000 R/MIN 转速粉碎成 60 ~ 200 目粒度的粉末, 再用滤纸包好放入索式提取器中, 下面装无水乙醇蒸馏, 每次提取约 4 ~ 5 h。之后醇提取液用旋转蒸发器浓缩 30 ~ 60 min 至浓度为 1 g/ml (醇提取液事先加部分水, 略大于最后的体积), 成水悬浊液, 暂存于 4 °C 冰箱备用。

1.2.2 实验分组及给药方法 将 80 只小鼠随机分 4 组, 每组 20 只, 雌雄各半。各组均饲喂小鼠标准颗粒饲料 (由吉林大学实验动物中心提供), 自由饮水, 正常饲养 3 d 后, 根据各种动物及人之间药物等效剂量的换算系数表及公式算出应灌胃剂量, 用灌胃器开始灌胃。A 为空白对照组, 按 10 ml/kg bw 灌喂生理盐水; B 为病理模型组, 按 10 ml/kg bw 灌喂白酒; C 为醇提取液治疗组, 灌喂 10 ml/kg bw 白酒 20 min 后按 10 ml/kg bw 灌喂葛花醇提取液; D 为成品药物对照组, 灌喂 10 ml/kg bw 白酒 20 min 后按 10 ml/kg bw 灌喂成品解酒药 (即快速解酒液), 每日早晚各 1 次, 连续 45 d^[6]。

1.2.3 观察指标及检测方法 实验过程中每天观察小鼠活动状况及对外来刺激的反应, 监测小鼠体重变化; 45 d 后统计成活率; 处死存活小鼠, 采取眼眶取血, 血液以 3018 × g 离心 5 min 分离血清后, 采用 ALT、AST 试剂盒, 利用 GF-D800 半自动生化分析仪测量血清中 ALT、AST 的浓度; 小心取出肝脏, 肉眼观察其器质性改变或外部形态变化; 然后立即用 10% 甲醛固定, 制作石蜡切片, 采用苏木素—伊红染色法: 依次进行脱蜡—逐级降低浓度酒精水化—染色—逐级升浓度酒精脱水—透明—封固, 利用光学显微镜来观察肝组织形态学

变化。

1.3 数据处理

实验数据 $\bar{x} \pm s$ 用表示, 用统计学软件 spss 13.0 对数值进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 各组体重、活动状况及存活率的变化比较

实验开始时, 各组体重无明显变化。10 d 之后, 病理模型组体重明显比其他组体重轻, 而醇提取组和阳性药对照组比空白对照组稍轻, 通过 spss13.0 统计学软件检测所得的 *P* 值 (见表 1)。每日给酒后, 病理模型组小鼠 10 min 内出现行走不稳, 平衡能力下降, 反应迟钝, 倦卧少动, 精神萎靡, 存活率明显偏低。葛花醇提治疗组和阳性药对照组灌喂提取液和成品解酒药后, 现象有所缓解且存活率升高。

2.2 ALT 和 AST 的测量

用半自动生化分析仪检测后, 各组小鼠 ALT、AST 的浓度结果见表 1。通过 spss13.0 统计学软件检测所得的 *P* 值可以看出: 病理模型组与空白对照组相比 ALT、AST 值明显升高 (*P* < 0.05); 而葛花醇提取液组与空白对照组相比 ALT、AST 值则无明显变化 (*P* > 0.05); 葛花醇提取液和阳性药快速解酒液均能使升高的酒精中毒小鼠模型的 ALT、AST 值降低。葛花醇提取液组与病理模型组相比 ALT、AST 值明显降低, 具有显著性差异 (*P* < 0.01), 接近空白对照组的正常值, 可以看出葛花醇提取液能明显地改善小鼠由于酒精中毒而引起的肝损伤, 具有解酒保肝作用。

2.3 病理切片的观察

依照所制作石蜡切片的特点 (胞核呈蓝色, 胞浆呈红色, 红细胞呈桔红色, 其它成分呈深浅不同红色) 来观察肝组织切片的结构变化, 结果发现病理模型组肝脏局部可见不同程度点状坏死和小灶状坏死, 中央静脉周围的肝细胞可见明显的脂肪变

表 1 45 d 各组小鼠体重、存活率和生化指标

Table 1 Body weight, survival ratio and biochemical indicators at 45 d in each mouse group

	只数 Number	存活率 (%) Survival ratio	体重 (g) Body weight	谷丙转氨酶 (U/L) ALT	谷草转氨酶 (U/L) AST
对照组 Control group	20	95%	32.4 ± 3.0	54.656 ± 15.282	99.020 ± 7.731
模型组 Model group	20	65%	25.8 ± 3.8 ^a	79.250 ± 23.531 ^a	127.552 ± 24.84 ^a
醇提组 Alcohol extract group	20	90%	30.3 ± 2.1 ^b	54.004 ± 16.459 ^b	94.567 ± 25.813 ^b
阳性组 Positive group	20	85%	31.1 ± 2.1 ^c	58.805 ± 22.641 ^c	100.439 ± 14.977 ^c

注: 与空白对照组比较: ^a*P* < 0.05, ^b*P* > 0.05, ^c*P* > 0.05; 与模型组比较: ^b*P* < 0.01, ^c*P* < 0.05

Note: As compared with blank control group: ^a*P* < 0.05, ^b*P* > 0.05, ^c*P* > 0.05; Compare with model group: ^b*P* < 0.01, ^c*P* < 0.05.

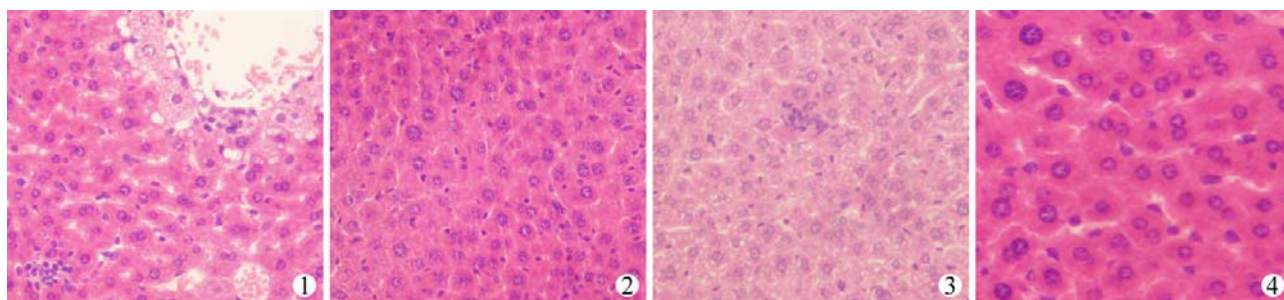


图 1 病理模型组 图 2 醇提液治疗组 图 3 阳性药对照组 图 4 空白对照组

Figure 1 Pathology model group **Figure 2** Alcohol extract treatment group **Figure 3** Male drug control group **Figure 4** Blank control group

性(图 1);醇提液组和阳性药对照组也出现少量点状坏死,程度较病理模型组轻(图 2、3);空白对照组则基本正常,没有病理改变(图 4)。

3 讨论

葛花为豆科葛属植物野葛的干燥花蕾,是传统医学中最具代表性的解酒药物^[7]。但大多都是把葛花与其它药物配伍使用,而单独验证葛花本身解酒保肝的功能和疗效尚未见报道,这一研究无疑具有重大创新性意义。葛花的化学成分主要为异黄酮类和皂苷类化合物^[8],采用有机溶剂提取的工艺已有报道^[9],而无水乙醇具有毒性较小,易分离且相对经济环保等特点,因此选其为提取溶剂较为理想。本实验采用葛花的醇提取液对酒精中毒小鼠模型的治疗作用及对小鼠模型某些生化指标的影响,来确定葛花的疗效和作用机理。实验的关键和难点在于建立一个有效的、相对稳定的动物模型。

首先,通过大量预实验来探索灌胃白酒的最佳量及酒精度数,最终得出 10 ml/(kg·bw) 42° 白酒是较为合理和适中的灌胃量。经过几次酒精中毒小鼠模型的建立,ALT、AST 指标的检测和肝组织病理切片的观察,得出了较为理想的酒精中毒模型。每次给酒后,在 10 min 左右出现行走不稳,平衡能力下降,不能爬笼,四肢外伸,呼吸变浅,反应迟钝,倦卧少动,精神萎靡身体倦怠,毛发竖立等症状。连续 45 d 后,通过 ALT、AST 指标测量,病理模型组与空白对照组有显著差异($P < 0.05$),肝组织切片观察,肝细胞脂肪变性的病变部位主要在肝小叶中央静脉周围,程度严重的可弥漫分布于肝小叶各区,呈现出大泡性脂变。由于线粒体增加对 NADH 的再氧化,使耗氧过多,造成肝窦的血氧梯度下降过陡,小叶中央区的肝细胞因缺氧而易发生坏死和纤维化^[6]。机体大量摄入乙醇后,在乙醇脱氢酶的催化下大量脱氢氧化,使三羧循环

障碍和脂肪酸氧化减弱而影响脂肪代谢,乙醇可致 α -磷酸甘油增多而促进甘油三酯合成,致使脂肪在肝细胞内沉积^[10]。肝组织的病变保证了实验结果对评价药物疗效的可信性。ALT 主要存在于肝细胞浆中,当肝细胞损伤时,细胞内转氨酶可进入血中,引起血清中 ALT 的水平升高。AST 也存在于肝细胞浆内,并分布于线粒体内,当肝细胞严重损伤时,AST 从线粒体内释放入血,使血清 AST 水平升高^[11]。因此 ALT、AST 数值升高幅度可以说明小鼠的酒精中毒程度。实验结果表明,醇提取液解酒效果明显,ALT、AST 值较病理对照组下降程度很明显,通过 Q 检验, $P < 0.01$,具显著性差异。而肝组织病理切片结果表明醇提组的肝脏病理损伤程度远轻于病理模型组变化,也好于成品组接近空白对照组。均可说明葛花具有改善酒精对人体新陈代谢造成异常的效果。

通过统计小鼠成活率及体重变化,测量并分析小鼠血清中 ALT、AST 值的变化,以及观察肝脏器质性改变和肝组织病理切片结果,可以初步得出结论:葛花醇提取液能够明显减轻小鼠由于酒精中毒而引起肝损伤程度,对小鼠酒精性肝病模型有很好的治疗作用。

参考文献

- [1] Wasser S, Tan CE. Experimental models of hepatic fibrosis in the rat. *Ann Acad Med Singapore*, 1999, 28(1):109-111.
- [2] Soni MG, Mehendale HM. Role of tissue repair in toxicologic interactions among hepatotoxic organics. *Environ Health Perspect*, 1998, 106 Suppl 6:1307-1317.
- [3] Yue Y, Chen J, Liu FG. Risk factors in alcoholic liver disease. *J Chin Phys*, 2005, 33 (8):24-25. (in chinese)
岳萌, 陈建, 刘福国 酒精性肝病的危险因素. *中国临床医生*, 2005, 33(8):24-25.
- [4] Zeng YF. Research progress of chronic alcoholism. *Clin Focus*, 2005, 20(21):1257-1259. (in Chinese)
曾艳芳. 慢性酒精中毒的研究进展. *临床荟萃*, 2005, 20(21):1257-1259.

- [5] Chen WL. Alcohol and chemistry. Educ Chem, 1999, (12):38-39. (in Chinese)
陈维莉. 酒与化学. 化学教学, 1999, (12):38-39.
- [6] Qi JS, Zhao JS, Li E, et al. Prescription anti-inebriation Xingshen on the role of a mouse model of alcoholism research. Mod J Integr Traditional Chin West Med, 2001, 10(7):607-609. (in Chinese)
齐锦生, 赵京山, 李恩, 等. 解酒醒神方药对酒精中毒小鼠模型作用的实验研究. 现代中西医结合杂志, 2001, 10(7):607-609.
- [7] Zhu H, Liu XR, Wang XQ. Research progression of Flos puerariae. Study J Traditional Chin Med, 2005, 23(12):2273-2274. (in Chinese)
朱华, 刘蕊蕊, 王孝勋. 葛花的研究进展. 中医药学刊, 2005, 23(12):2273-2274.
- [8] Kim C, Shin S, Ha H, et al. Study of substance changes in flowers of Pueraria thunbergiana Benth. during storage. Arch Pharm Res, 2003, 26(3):210-213.
- [9] Yin JT, Zhong Y, Sun JY, et al. Research of Flos puerariae chemical constituent(I). Chin Traditional Herbal Drugs, 2006, 37(3):350-352. (in Chinese)
尹俊亭, 仲英, 孙敬勇, 等. 葛花化学成分的研究(I). 中草药, 2006, 37(3):350-352.
- [10] Plaa GL. Chlorinated methanes and liver injury: highlights of the past 50 years. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2000, 40:40-65.
- [11] Yang MX, Tian YX, Yao SK, et al. The effect of relieving alcoholism and protecting liver drink upon the blood serum, liver tissue ALT and AST of alcoholic liver injury rat. Hebei J Traditional Chin Med, 2002, 22(10):793-796. (in Chinese)
杨牧祥, 田元祥, 姚树坤, 等. 解酒护肝饮对酒精性肝损伤大鼠血清和肝组织 ALT、AST 的影响. 河北中医, 2002, 22(10):793-796.

Role of *Flos puerariae* alcohol extract in a mouse model of alcoholism research

MIAO Liang, LIU Yong-hong, HUA Lei, JI Qiang, ZHANG Peng, LI Xu, GAO Bo, WANG De-li

【Abstract】

Objective To explore the mechanism and efficacy of *Flos puerariae* alcohol extract in a mouse model of alcoholism

Methods A total of 80 clean grade Kunming mice were divided into four groups of control group, model control group, treatment group and positive drug control group. 10ml/kg bw oral physiological saline, 0ml/kg bw oral distillate, 10ml/kg bw distillate +10 ml/kg bw alcohol extract and 10ml/kg bw liquor +10 ml/kg bw were administered respectively twice a day for 45 consecutive days. The semi-automatic biochemical analyzer was employed to test AST and ALT. And the liver tissue slices were prepared to observe the morphological changes.

Results *Flos puerariae* alcohol demonstrated a higher survival rate of mice. ALT and AST decreased significantly more than the pathology model group. And liver morphology significantly improved and the efficacy of anti-inebriation was better than the positive drug group.

Conclusion *Flos puerariae* alcohol extract can significantly reduce the damaging effect of alcohol upon murine liver tissue and thus it plays a role in anti-inebriation.

【Key words】 Mice; Alcoholism; Disease models, animal

Author Affiliations: College of Life Science, Jilin University, Changchun, 130012, China (MIAO Liang, JI Qiang, ZHANG Peng, LI Xu, GAO Bo, WANG De-li), General Hospital of Jilin Chemical Industry Group Corporation, Jilin, 132021, China (LIU Yong-hong), Product Quality Supervision Inspection Department, Jilin Province, Changchun, 130022, China (HUA Lei)

Corresponding author: WANG De-li, Email: wdl2003ok@163.com

www.cmbp.net.cn

Chin Med Biotechnol, 2009, 4(4):262-265

· 信息站点 ·

关于印发药品安全专项整治工作方案的通知

为贯彻落实国务院关于深入开展药品安全专项整治的工作部署,进一步解决影响药品安全的深层次问题,全面提升药品安全水平,维护人民群众切身利益,国家食品药品监督管理局于 2009 年 7 月 7 日印发《药品安全专项整治工作方案》。详情可登陆国家食品药品监督管理局网站查阅 (<http://www.sda.gov.cn/WS01/CL0055/39865.html>)。