

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.08.003
文章编号: 1005-8982 (2018) 08-0013-05

三七护肝胶囊对小鼠酒精性肝损伤的保护作用

程云飞¹, 吕晓君²

(1. 湖北省仙桃市第一人民医院, 湖北 仙桃 433000; 2. 湖北省药品监督检验研究院, 湖北 武汉 430075)

摘要: 目的 探讨三七护肝胶囊对 50% 乙醇所致小鼠酒精性肝损伤的保护作用。**方法** SPF 级昆明种雄性小鼠按体重随机分为空白对照组、模型对照组, 以及三七护肝胶囊高、中、低剂量组, 每组 10 只。连续灌胃 30 d 后, 除空白对照组外, 其余 4 组灌胃 50% 乙醇复制小鼠急性酒精性肝损伤模型。模型复制后 16 h 检测小鼠血清中谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 含量, 以及肝匀浆中丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽 (GSH)、三酰甘油 (TG) 含量, 并观察肝脏病理组织形态学变化。**结果** 三七护肝胶囊高、中剂量组可降低小鼠血清 ALT、AST 和肝匀浆中 MDA、TG 含量, 三七护肝胶囊高剂量组可提高肝匀浆中 SOD、GSH 活性。肝脏病理组织形态学结果显示, 三七护肝胶囊高剂量组小鼠肝细胞脂肪变性程度较轻。**结论** 三七护肝胶囊对酒精性肝损伤具有保护作用。

关键词: 三七护肝胶囊; 酒精性肝损伤; 小鼠

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

Study on protective effect of Sanqi Hupan Capsules against alcoholic liver injury in mice

Yun-fei Cheng¹, Xiao-jun Lü²

(1. Xiantao First People's Hospital, Xiantao, Hubei 433000, China; 2. Hubei Institute for Drug Control, Wuhan, Hubei 430075, China)

Abstract: Objective To study the protective effect of Sanqi Hupan Capsules (SHC) against alcoholic liver injury in mice induced by 50% ethanol. **Methods** SPF-class Kunming male mice were randomly divided into 5 groups, i.e. normal control group, model control group, high-, medium- and low-dosage SHC groups with 10 in each group. After 30 days of continuous gavage, injured liver models were made with 50% ethanol orally except the normal control group. After 16 h, the serum content of ALT and AST and the levels of MDA, SOD, GSH and TG in liver homogenate were determined, the histopathologic changes of the hepatic tissues were observed. **Results** The serum concentrations of ALT and AST, and the liver homogenate levels of MDA and TG in the middle-dosage and high-dosage groups were significantly decreased, and the SOD and GSH levels in the liver homogenate of the high-dosage group were significantly increased. Furthermore histopathological examination revealed fatty degeneration of the hepatic cells was significantly decreased in the high-dosage group. **Conclusions** SHC could protect liver against alcoholic injury.

Keywords: Sanqi Hupan Capsules; alcoholic liver injury; mouse

酒精性肝病初期表现为肝脏脂肪变性、进而发展为肝纤维化、肝硬化^[1]。三七护肝胶囊主要成分为

三七、西洋参、葛根。研究表明, 三七具有止血活血、利胆退黄、降酶、抗纤维化等作用^[2-3]。西洋参总皂

收稿日期: 2016-11-09

[通信作者] 吕晓君, E-mail: lvxiaojunwhu@foxmail.com; Tel: 027-87271327, 13476118549

昔具有抗氧化、保护肝损伤作用^[4]。葛根具有解肌退热、生津止渴、通经活络、解酒毒的功效^[5]。本研究以 50% 乙醇复制小鼠急性酒精性肝损伤模型, 观察三七护肝胶囊对酒精性肝损伤的保护作用, 并探讨其作用机制是否与抗氧化作用有关。

1 材料与方法

1.1 主要药品和试剂

三七护肝胶囊(北京海德润制药有限公司,批号:20141207),无水乙醇(北京国药集团化学试剂有限公司,批号:20140928),丙二醛(Malondialdehyde,MDA)试剂盒(批号:20150826)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)试剂盒(批号:20150826)、谷胱甘肽(Glutathione,GSH)试剂盒(批号:20150825)购自南京建成生物工程研究所,谷丙转氨酶(alanine transaminase,ALT)试剂盒(批号:140115002)、谷草转氨酶(aspartate transaminase,AST)试剂盒(批号:140215011)、三酰甘油(Triglycerides,TG)试剂盒(批号:141714007)购自深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司。

1.2 实验动物

昆明种小鼠,50只,雄性,SPF级,体重(20±2)g,购自武汉生物制品研究所有限责任公司,实验动物生产许可证号:SCXK(鄂)2012-0003。动物饲养于湖北省食品药品监督检验研究院屏障环境,5只/笼,12h昼/夜循环照明,温度20~26℃,相对湿度为40%~70%。饲料由武汉市万千佳兴生物科技有限公司提供,饲料生产许可证号:SCXK(鄂)2011-0011。实验动物使用许可证号:SYXK(鄂)2014-0009。

1.3 实验仪器

ML303型电子天平、XS6001S动物秤购自瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司,T18basic匀浆仪(德国IKA公司),AU400全自动生化仪、BX41显微镜购自日本Olympus公司,3K15台式冷冻离心机(美国Sigma公司),TU-1901双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),HM525冷冻切片机(美国赛默飞公司)。

1.4 方法

动物按体重随机分为5组:空白对照组、模型对照组,以及三七护肝胶囊高、中、低剂量组,每组10只。用蒸馏水配制成67.5、45.0和22.5mg/ml的三七护肝胶囊混悬液,灌胃体积为20ml/kg。三七护

肝胶囊高、中、低剂量组分别为1.35、0.90和0.45g/kg,相当于人用量的30、20和10倍。空白对照组和模型对照组给予等体积蒸馏水灌胃。灌胃1次/d,并观察动物一般状况,称重1次/周,并按动物体重调整灌胃量。给药30d后,除空白对照组外,其余4组一次灌胃50%乙醇(10ml/kg)复制急性酒精性肝损伤模型^[6]。模型复制后禁食16h,以备检测。

1.5 检测指标

1.5.1 血清生化指标 小鼠摘眼球取血,常温静置后待其凝固,2500r/min离心10min,测定血清中ALT、AST含量。

1.5.2 肝匀浆生化指标 取血后立即颈椎脱臼处死动物,取肝脏称重剪碎,按1:9的比例加入生理盐水,在冰浴中制成10%的匀浆,参照试剂盒说明书检测肝匀浆中MDA、SOD、GSH、TG的含量。

1.5.3 肝组织病理学检查 另取肝左叶,冷冻切片,油红O染色,镜下观察脂滴在肝脏中的分布、范围和面积。每例动物肝组织用40倍物镜连续观察组织切片,从肝脏的一端视野开始记录细胞的病理变化,根据阳性细胞的多少和分布范围,进行肝组织病理学检查评分。评分标准:肝细胞内脂滴散在,稀少为0分;含脂滴的肝细胞≤1/4为1分;含脂滴的肝细胞≤1/2为2分;含脂滴的肝细胞≤3/4为3分;肝组织几乎被脂滴替代为4分。将所得分数的平均值作为该例肝组织的脂肪染色评分。

1.6 统计学方法

数据分析采用SPSS 15.0统计软件,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用重复测量设计的方差分析或单因素方差分析,两两比较用Dunnett-t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般状况

实验期间各组动物一般状况良好,精神、毛发、活动、饮食、大小便正常。空白对照组、模型对照组,以及三七护肝胶囊高、中、低剂量组在第0、1、2、3、4周的体重比较,采用重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点的体重有差别($F = 653.143$, $P = 0.000$),第4周>第3周>第2周>第1周>第0周,呈增长趋势。②5组的体重无差别($F = 1.011$, $P = 0.412$)。③5组的体重变化趋势无差别($F = 1.410$, $P = 0.246$)。见表1和图1。

2.2 三七护肝胶囊对小鼠血清生化指标的影响

2.2.1 ALT 空白对照组、模型对照组, 以及三七护肝胶囊高、中、低剂量组小鼠血清 ALT 含量比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较经 Dunnett-*t* 检验, 模型对照组小鼠血清 ALT 含量较空白对照组升高 ($P < 0.05$); 三七护肝胶囊高、中剂量组小鼠血清 ALT 含量较模型对照组降低 ($P < 0.05$); 三七护肝胶囊低剂量组小鼠血清 ALT 含量与模型对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

2.2.2 AST 空白对照组、模型对照组, 以及三七护肝胶囊高、中、低剂量组小鼠血清 AST 含量比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较经 Dunnett-*t* 检验, 模型对照组小鼠血清 AST 含量较空白对照组升高 ($P < 0.05$); 三七护肝胶囊高、中剂量组小鼠血清 AST 含量较模型对照组降低 ($P < 0.05$); 三七护肝胶囊低剂量组小鼠血清 AST 含量与模型对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。三七护肝胶囊高、中剂量组可降低小鼠血清 ALT、AST 含量, 对小鼠酒精性肝损伤有一定保护作用。见表 2。

2.3 三七护肝胶囊对小鼠肝匀浆生化指标的影响

2.3.1 MDA 空白对照组、模型对照组, 以及三七护肝胶囊高、中、低剂量组小鼠小鼠肝匀浆中 MDA

含量比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较经 Dunnett-*t* 检验, 模型对照组小鼠肝匀浆中 MDA 含量较空白对照组升高 ($P < 0.05$); 三七护肝胶囊高、中剂量组小鼠肝匀浆中 MDA 含量较模型对照组降低 ($P < 0.05$); 三七护肝胶囊低剂量组小鼠肝匀浆中 MDA 含量与模型对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

2.3.2 SOD 空白对照组、模型对照组, 以及三七护肝胶囊高、中、低剂量组小鼠小鼠肝匀浆中 SOD 含量比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较经 Dunnett-*t* 检验, 模型对照组小鼠肝匀浆中 SOD 含量较空白对照组降低 ($P < 0.05$); 三七护肝胶囊高剂量组小鼠肝匀浆中 SOD 含量较模型对照组升高 ($P < 0.05$); 三七护肝胶囊中、低剂量组小鼠肝匀浆中 SOD 含量与模型对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

2.3.3 GSH 空白对照组、模型对照组, 以及三七护肝胶囊高、中、低剂量组小鼠小鼠肝匀浆中 GSH 含量比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较经 Dunnett-*t* 检验, 模型对照组小鼠肝匀浆中 GSH 含量较空白对照组降低 ($P < 0.05$); 三七护肝胶囊高剂量组小鼠肝匀浆中 GSH 含量较模型对照组升高 ($P < 0.05$); 三七护肝胶囊中、低剂量组小鼠肝匀浆中 GSH 含量与模型对照

表 1 三七护肝胶囊对小鼠体重的影响 ($n=10, g, \bar{x} \pm s$)

组别	第 0 周	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周
空白对照组	19.7 ± 0.7	30.1 ± 2.3	34.9 ± 2.6	37.1 ± 2.9	39.7 ± 2.5
模型对照组	19.6 ± 0.8	30.4 ± 1.2	36.2 ± 1.3	38.4 ± 1.9	40.7 ± 2.7
三七护肝胶囊高剂量组	19.6 ± 0.9	29.5 ± 1.9	34.1 ± 2.2	35.9 ± 2.4	38.6 ± 2.5
三七护肝胶囊中剂量组	19.6 ± 0.8	30.1 ± 1.4	35.6 ± 2.4	37.5 ± 2.8	41.0 ± 3.6
三七护肝胶囊低剂量组	19.6 ± 0.8	30.1 ± 1.9	34.6 ± 2.7	36.8 ± 3.1	39.3 ± 3.1

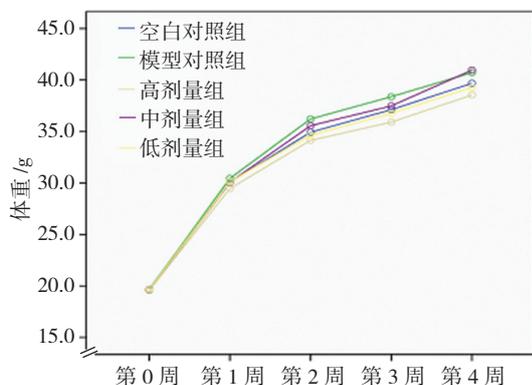


图 1 各组小鼠不同时间点体重变化趋势

表 2 各组小鼠血清 ALT、AST 含量比较

($n=10, u/L, \bar{x} \pm s$)

组别	ALT	AST
空白对照组	34.2 ± 7.4	113.6 ± 29.7
模型对照组	75.3 ± 10.8	358.9 ± 33.9
三七护肝胶囊高剂量组	43.1 ± 7.3	171.2 ± 18.6
三七护肝胶囊中剂量组	52.1 ± 7.9	212.3 ± 22.3
三七护肝胶囊低剂量组	70.4 ± 11.6	332.1 ± 31.7
F 值	36.549	141.910
P 值	0.000	0.000

组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

2.3.4 TG 空白对照组、模型对照组, 以及三七护肝胶囊高、中、低剂量组小鼠小鼠肝匀浆中 TG 含量比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较经 Dunnett- t 检验, 模型对照组小鼠肝匀浆中 TG 含量较空白对照组升高 ($P < 0.05$); 三七护肝胶囊高、中剂量组小鼠肝匀浆中 TG 含量较模型对照组降低 ($P < 0.05$); 三七护肝胶囊低剂量组小鼠肝匀浆中 TG 含量与模型对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。三七护肝胶囊高、中剂量组可降低小鼠肝匀浆中 MDA、TG 含量, 三七护肝胶囊高剂量组可升高小鼠肝匀浆中 SOD、GSH 含量, 对小鼠酒精性肝损伤有一定保护作用。见表 3。

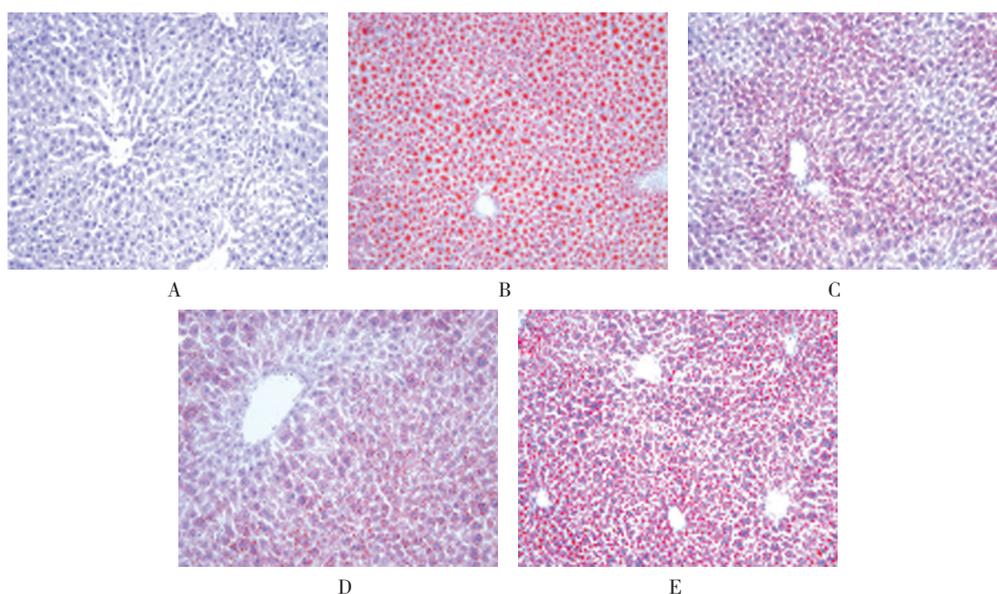
2.4 小鼠肝脏组织病理学检查结果

空白对照组肝细胞结构正常, 肝细胞条索排列

整齐, 肝细胞内基本无脂滴, 脂肪染色评分 (0.78 ± 0.42) 分; 模型对照组肝细胞发生脂肪变性, 肝组织几乎被脂滴替代 (染色后正常肝细胞为蓝色, 脂滴呈红色), 脂肪染色评分 (3.20 ± 0.62) 分; 三七护肝胶囊高、中、低剂量组肝细胞也发生不同程度的脂肪变性, 脂肪染色评分分别为 (2.52 ± 0.76)、(2.56 ± 0.75) 和 (2.88 ± 0.91) 分, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 17.459, P = 0.000$)。进一步两两比较经 Dunnett- t 检验, 模型对照组小鼠脂肪染色评分较空白对照组升高 ($P < 0.05$); 三七护肝胶囊高剂量组小鼠脂肪染色评分较模型对照组降低 ($P < 0.05$); 三七护肝胶囊中、低剂量组小鼠脂肪染色评分与模型对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。三七护肝胶囊高剂量组可减轻小鼠肝细胞脂肪变性程度, 对小鼠酒精性肝损伤有一定保护作用。见图 2。

表 3 各组小鼠肝匀浆中 MDA、SOD、GSH、TG 含量比较 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	MDA/ (nmol/mg)	SOD/ (u/mg)	GSH/ (mg/g)	TG/ (mmol/L)
空白对照组	3.45 ± 1.55	145.88 ± 19.39	8.22 ± 1.92	2.01 ± 0.95
模型对照组	6.03 ± 1.56	80.02 ± 12.73	6.18 ± 1.46	3.07 ± 0.87
三七护肝胶囊高剂量组	3.81 ± 0.94	123.32 ± 14.98	8.31 ± 1.90	2.02 ± 0.50
三七护肝胶囊中剂量组	3.79 ± 0.96	90.76 ± 14.54	7.33 ± 1.96	2.17 ± 0.40
三七护肝胶囊低剂量组	5.45 ± 1.75	87.56 ± 13.92	7.39 ± 1.45	2.71 ± 0.84
F 值	6.833	33.575	2.266	4.028
P 值	0.000	0.000	0.048	0.007



A: 空白对照组; B: 模型对照组; C: 三七护肝胶囊高剂量组; D: 三七护肝胶囊中剂量组; E: 三七护肝胶囊低剂量组。

图 2 小鼠肝脏组织病理学检查结果 (油红 O 染色 $\times 200$)

3 讨论

目前, 酒精性肝病成为仅次于病毒性肝炎的第二大类肝脏疾病^[6-7], 长期大量饮酒可使乙醇在体内慢性蓄积, 引起机体内 ALT、AST、TG、MDA 等血液生化指标水平升高^[8-9]。肝功能检查项目中, 转氨酶升高是反映肝脏实质性损害的重要指标。ALT、AST 主要存在于肝细胞的线粒体和胞浆内, 正常血清中含量极少。当肝细胞损伤时, 肝细胞内 ALT、AST 释放入血, 血清中 ALT、AST 水平升高, 因此血清 ALT、AST 是检测肝细胞损伤较为敏感和有效的重要生化指标^[10]。酒精主要在肝脏代谢、降解, 当乙醇在机体内大量蓄积时, 在乙醇脱氢酶和氧化酶的催化作用下生成转化为乙酸, 从而抑制三羧酸循环, 使肝细胞的脂肪氧化能力减弱, 脂肪在肝细胞内堆积, 肝组织 TG 指标升高。同时乙醇在肝细胞内微粒体氧化系统作用下产生氧自由基, 导致肝细胞膜脂质过氧化, 影响肝细胞功能。MDA 是不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应生成的终末产物之一, 其含量可以间接反映膜脂质氧化的受损程度^[11]。SOD 是生物体内清除自由基的重要抗氧化酶, 可以对抗与阻断氧自由基对细胞造成的损害, 并及时修复受损细胞。其水平的高低是衡量机体抗氧化能力大小的重要指标^[12]。GSH 是体内中重要的抗氧化剂和自由基清除剂, 是一种小分子肽。其作为谷胱甘肽过氧化物酶的底物, 在清除细胞内脂质过氧化物中发挥抗氧化作用。乙醇在肝脏代谢时产生大量氧自由基, 消耗众多的还原性保护物质, 如 GSH。GSH 水平下降, 引起肝细胞变性和坏死; GSH 水平升高提示机体抗氧化能力下降^[12]。因此, 降低 ALT、AST 和 TG 含量, 减少脂质过氧化, 增强清除氧自由基能力可保护受损肝细胞, 缓解继发性肝功能下降。

本研究结果显示, 模型对照组小鼠血清 ALT、AST 含量升高, 肝匀浆中 MDA 含量升高、SOD 活性降低、GSH 含量降低、TG 含量升高, 肝细胞脂肪染色评分升高, 说明模型复制成功。三七护肝胶囊是由三七、西洋参、葛根为主要成分组成的复方制剂。研究报道, 三七可降低小鼠急性酒精性肝损伤血清 ALT、AST 活性^[13]。西洋参能降低饮酒所导致的血清转氨酶升高, 抑制过氧化产物 MDA 产生^[14]。葛根素可使肝组织 SOD 活性增高, MDA 含量降低^[15]。本实验中, 通过该 3 种药材配伍, 观察其对急性酒精性肝

损伤的保护作用, 结果发现, 高、中剂量三七护肝胶囊可降低血清 ALT、AST 含量和肝组织中 TG 含量, 抑制脂肪在肝细胞内堆积, 改善小鼠肝细胞脂肪变性程度, 对酒精性肝损伤具有较好的保护作用; 同时, 本实验从抗氧化方面初步探讨三七护肝胶囊保护酒精性肝损伤的作用机制, 结果发现, 高剂量三七护肝胶囊可降低肝脏中脂质过氧化代谢产物 MDA 的含量, 升高肝脏中清除氧自由基的抗氧化酶 SOD 活性, 增加肝组织中还原型保护物质 GSH 的含量, 提示其对酒精性肝损伤肝脏的保护作用可能与对抗肝脏自由基的脂质过氧化有关。

参 考 文 献:

- [1] 黄碧燕, 肖桂珍, 朱鹏. 酒精性肝炎的临床治疗研究进展 [J]. 临床军医杂志, 2015, 43(11): 1200-1203.
- [2] 衣超鹏, 韦维, 农凤映, 等. 三七提取液对小鼠免疫性肝损伤的保护作用研究 [J]. 广西中医药, 2014, 37(5): 78-79.
- [3] 黄瑞香, 周知午. 三七与水飞蓟素对酒精性小鼠肝损伤的保护作用研究 [J]. 湖南中医杂志, 2011, 27(5): 128-129.
- [4] 赵玉珍, 刘蕾, 陈立平, 等. 西洋参茎叶皂甙对大鼠实验性肝损伤的影响 [J]. 中成药, 2000, 22(3): 219-220.
- [5] 高明菊, 马妮, 赵爱, 等. 三七葛根胶囊对小鼠酒精性肝损伤的保护作用 [J]. 人参研究, 2015, 3: 13-15.
- [6] 邱媛媛, 王伟恒, 朱樑. 炎症因子在酒精性肝病发生发展中的作用 [J]. 临床肝胆病杂志, 2016, 32(3): 574-578.
- [7] 庞树朝, 郭卉. 中医药治疗酒精性肝病研究述评 [J]. 世界中西医结合杂志, 2016, 11(1): 140-142.
- [8] 秦松, 王君, 高志鹏, 等. 奇魅植物醇素对小鼠酒精性肝损伤保护作用的研究 [J]. 重庆医学, 2016, 45(10): 1323-1325.
- [9] 赵洁, 雷金燕. 酒精性肝病的研究进展 [J]. 北京中医药, 2009, 28(11): 907-908.
- [10] 李晓宇, 李晶, 王一博, 等. 人参皂苷对酒精性肝损伤的保护作用研究 [J]. 药物评价研究, 2015, 38(5): 512-515.
- [11] 钟萍, 孙设宗, 王先义, 等. 香菇多糖对酒精性肝损伤小鼠预防性肝保护作用的研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2012, 22(14): 34-37.
- [12] 孟宪军, 邓静, 朱力杰, 等. 北五味子藤茎总三萜对小鼠酒精性肝损伤的保护作用 [J]. 食品科学, 2013, 34(15): 228-231.
- [13] 王春梅, 李贺, 李生, 等. 北五味子木脂素对小鼠酒精性肝损伤的保护作用 [J]. 食品科学, 2014, 35(13): 262-265.
- [14] 刘同刚, 沙凯辉, 王邦茂. 三七对小鼠急性酒精性肝损伤保护作用的实验研究 [J]. 山东医药, 2010, 50(16): 44-45.
- [15] 颜王鑫, 宋冬, 陈海娥, 等. 葛根素对再灌注损伤肝能量代谢的保护作用及机制 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2014, 22(10): 563-567.

(童颖丹 编辑)