

## 葛根复合胶囊对小鼠酒精性肝损伤的保护作用研究\*

王思为, 夏道宗<sup>△</sup>, 方月娟, 余 妙, 罗 萌

(浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053)

**摘要:**目的 研究葛根复合胶囊对小鼠酒精性肝损伤的保护作用。方法 采用灌胃 50%酒精(12mL/kg)的方式建立小鼠急性酒精性肝损伤模型,研究不同剂量(100,300,500mg/kg)葛根复合胶囊(CCPL)对酒精性肝损伤小鼠活动状态,血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(AST),肝脏氧化应激参数丙二醛(MDA)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px),以及肝脏组织病理学的影响。结果 中、高剂量 CCPL 可显著降低酒精性肝损伤小鼠血清中 ALT 和 AST 活性,并能显著升高肝脏中 GSH-Px 活性( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。低、中、高剂量 CCPL 均可显著降低酒精性肝损伤小鼠肝脏中 MDA 含量( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ),且具有量效关系,最大降幅为 54.4%;其中高剂量组与阳性对照护肝片效果相当。此外,CCPL 对酒精性肝损伤小鼠肝脏组织的病理学改变有较强拮抗效应。结论 葛根复合胶囊对小鼠酒精性肝损伤具有较好的保护作用,能为以葛根为主要原料开发具有解酒护肝功效的膳食补充剂或药物奠定了基础。

**关键词:** 葛根; 复合胶囊; 酒精; 肝损伤保护

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2015)01-0001-04

葛根为豆科植物野葛或甘葛藤 [*Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi] 的干燥根,市面上最多的是葛根粉,具有很多功效,据《中国药典》(2010 版)记载,葛根味甘辛,性凉,入脾,胃,肺经,有解肌退热,生津止渴,透疹,升阳止泻,通络活络,解酒毒之功效<sup>[1-3]</sup>。葛根含有黄酮类、香豆素类、多糖等多种活性成分<sup>[4-5]</sup>。枳椇子系鼠李科植物枳椇 (*Hovenia dulcis* Thunb.) 的干燥成熟带肉质花序轴的果实及种子,具有很好的药理作用,其功效主要为清热利尿、止渴除烦、解酒等<sup>[6-7]</sup>。葛根和枳椇子都是我国卫生部公布的药食两用物品。

酒及酒精性饮料作为日常饮用的饮品在中国具有悠久的历史,并且随着社会的发展,酒的消费在当今世界经济中占了很大的比重。适当的饮酒能促进血液循环的功效,但长期大量饮酒会导致中毒性的酒精性肝损伤,例如酒精性脂肪肝、酒精性肝硬化、酒精性肝纤维化等,还有可能会进一步产生严重的疾病<sup>[8-9]</sup>。目前国内对解酒药物的研究报道较多,但有关解酒功能性食品的开发还很少。本课题

已经完成葛根解酒护肝复合胶囊的制备工艺研究,确定 100g 胶囊含葛根醇提物 16g(相当于葛根粉 150g)、枳椇子粉末 36g、蔗糖 25g、葡萄糖 6g、牛磺酸 5g、Vc 5g、淀粉 5g、柠檬酸 2g。本文旨在研究葛根复合胶囊(compound capsule of *Pueraria lobata*, CCPL)对小鼠酒精性肝损伤的保护作用,为以葛根为主要原料开发具有解酒护肝功效的膳食补充剂或药物奠定基础,提供科学实验依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

##### 1.1.1 样品与试剂

葛根复合胶囊,本实验室自制;护肝片,黑龙江葵花药业股份有限公司;ALT、AST、MDA、GSH-Px 检测试剂盒,南京建成生物工程研究所;乙醇、甲醛等其他试剂均为国产分析纯。

##### 1.1.2 动物

实验用清洁级雄性 ICR 小鼠由浙江中医药大学动物实验中心提供,来源于上海西普尔-必凯实验动物有限公司,动物生产许可证号 SCXK(沪)

\* 基金项目: 国家自然科学基金(81374048);国家级大学生创新创业训练计划项目(201410344008);浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划(2014R410003)

收稿日期: 2014-12-26

作者简介: 王思为(1990-),男,浙江衢州人,在读硕士研究生,主要从事中药药理学研究。

<sup>△</sup>通信作者: 夏道宗, E-mail: xiadaozong@zcmu.edu.cn

2008-0016。

### 1.1.3 仪器

7020 全自动生化分析仪, 日本 Hitachi 公司; HM335E 轮转切片机、AP280-2 展片机、STP120 脱水机, 德国 Microm 公司; AWTO STAINER XL 自动染色机, 德国 Leica 公司; B5 professional series 生物显微成像系统, MotiC 实业集团; UV-2600 紫外可见分光光度仪, 尤尼柯(上海)仪器有限公司; DKS-16 电热恒温水浴锅, 嘉兴市中新医疗仪器有限公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 动物分组及饲养

取 ICR 雄性小鼠 60 只, 称重并随机分 6 组, 分别为正常对照组、酒精性肝损伤模型组、阳性对照组和葛根复合胶囊(CCPL)低、中、高剂量组, 每组 10 只。各组小鼠自由进食和饮水, 适应性喂养 7d 后进行实验。阳性对照组按 800mg/kg 的剂量灌胃给予护肝片水混悬液; 葛根复合胶囊组分别按 100, 300, 500mg/kg 的剂量灌胃给予葛根复合胶囊水溶液(10mL/kg)。除空白对照组外, 其余各组小鼠在给药后 1h, 用 50%酒精按 12mL/kg 的剂量灌胃; 每周称重 2 次, 按体质量调整灌胃量。实验进行 6 周后, 禁食 16h, 摘眼球取血后颈椎脱臼处死小鼠, 快速剥离肝脏, 分成 2 部分: 一部分用于生化测定, 一部分用于病理学分析(用 10%福尔马林固定, 常规石蜡包埋切片, HE 染色, 400 倍显微镜下观察)。

### 1.2.2 血清 ALT、AST 活性和肝脏 MDA 含量、GSH-Px 活性的测定

取小鼠肝脏和血液, 按试剂盒要求制备组织匀浆和血清, 并测定血清中 ALT 和 AST 的活性, 以及肝脏中 MDA 含量和 GSH-Px 活性。各项指标的具体测定原理、测定前各试剂的配制方法, 以及每项指标蛋白含量的测定方法详见各试剂盒说明书。酶活力及 MDA 等含量的计算均严格按照试剂盒说明书提供的公式进行。

### 1.2.3 数据处理

采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据处理。数据均采用均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )的表示方法, 不同处理间的差异采用 *t* 检验和单因素方差分析进行比较, 以  $P < 0.05$  为有显著性。

## 2 结果

### 2.1 CCPL 对酒精性肝损伤小鼠活动状态的影响

空白对照组动物皮毛光亮整洁, 灵活好动, 饮

食正常, 体质量持续增加; 酒精性肝损伤模型组有不同程度的精神萎靡, 活动少, 饮食减少, 大便稀溏, 皮毛凌乱, 体质下降等表现; 葛根复合胶囊各组 and 阳性对照组较模型组有不同程度的改善, 表现出一定的量效关系。

### 2.2 CCPL 对酒精性肝损伤小鼠血清 ALT 和 AST 活性的影响

由表 1 可见, 与正常组相比, 酒精性肝损伤模型组小鼠血清 ALT、AST 活性显著升高, 升幅分别为 36.3% 和 48.9%。中、高剂量葛根复合胶囊可显著降低酒精性肝损伤小鼠血清中 ALT、AST 活性 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 且具有量效关系。低剂量葛根复合胶囊对肝脏的保护作用效果不显著 ( $P > 0.05$ )。高剂量葛根复合胶囊效果与护肝片相当。

表 1 葛根复合胶囊对酒精性肝损伤小鼠血清 ALT 和 AST 活性的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/(mg/kg)	ALT/(U/L)	AST/(U/L)
正常组	-	41.60±9.57	94.50±19.24
模型组	-	65.30±13.52**	140.70±26.35**
阳性对照组	800	49.58±8.37###	112.53±19.68###
CCPL 低剂量组	100	60.20±11.95	128.50±27.12
CCPL 中剂量组	300	57.80±10.87#	121.10±24.68#
CCPL 高剂量组	500	50.60±10.13###	109.60±21.99###

注: 与正常组相比, \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组相比, # $P < 0.05$ ; 与模型组相比, ### $P < 0.01$ 。

### 2.3 CCPL 对酒精性肝损伤小鼠肝脏 MDA 含量和 GSH-Px 活性的影响

由表 2 可见, 与正常组相比, 酒精性肝损伤模型组小鼠肝脏 MDA 含量显著升高, GSH-Px 活性显

表 2 葛根复合胶囊对酒精性肝损伤小鼠肝脏 MDA 含量和 GSH-Px 活性的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/(mg/kg)	MDA/(nmol/mg prot)	GSH-Px/(U/mg prot)
正常组	-	2.53±0.29	65.2±10.60
模型组	-	8.04±1.25**	43.80±6.89*
阳性对照组	800	3.48±0.49###	55.92±9.76#
CCPL 低剂量组	100	5.92±1.03#	47.10±9.35
CCPL 中剂量组	300	4.58±0.83###	51.30±9.22#
CCPL 高剂量组	500	3.67±0.60###	56.70±10.80#

注: 与正常组相比, \* $P < 0.05$ ; 与正常组相比, \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组相比, # $P < 0.05$ ; 与模型组相比, ### $P < 0.01$ 。

著降低。低、中、高剂量葛根复合胶囊均可显著降低酒精性肝损伤小鼠肝脏中 MDA 含量( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ),且具有量效关系。中、高剂量葛根复合胶囊可显著升高酒精性肝损伤小鼠肝脏中 GSH-Px 活性( $P<0.05$ ),但低剂量葛根复合胶囊的作用效果不显著( $P>0.05$ )。高剂量葛根复合胶囊在防护肝脏氧化应激方面效果与护肝片相当。

#### 2.4 肝脏组织的一般病理学观察

由图 1 所示,正常对照组小鼠肝脏肝小叶结构正常,肝细胞呈条索状排列,肝窦可见,汇管区为正

常结构;肝细胞内脂滴很少。酒精性肝损伤小鼠肝组织损伤严重,肝细胞排列紊乱,多数肝细胞呈细胞水肿,肝细胞可见明显的片状坏死,细胞核不规则,胞质内可见大小不一的脂肪滴空泡。低剂量葛根复合胶囊组小鼠虽然与模型组相比,含脂滴的肝细胞数量明显减少,但仍有较多分布。与模型组相比较,中、高剂量葛根复合胶囊可显著改善小鼠的酒精性肝损伤,其中高剂量组小鼠部分肝细胞接近于正常小鼠的水平。阳性对照护肝片组小鼠的肝细胞脂滴很少,与正常小鼠无明显差异。

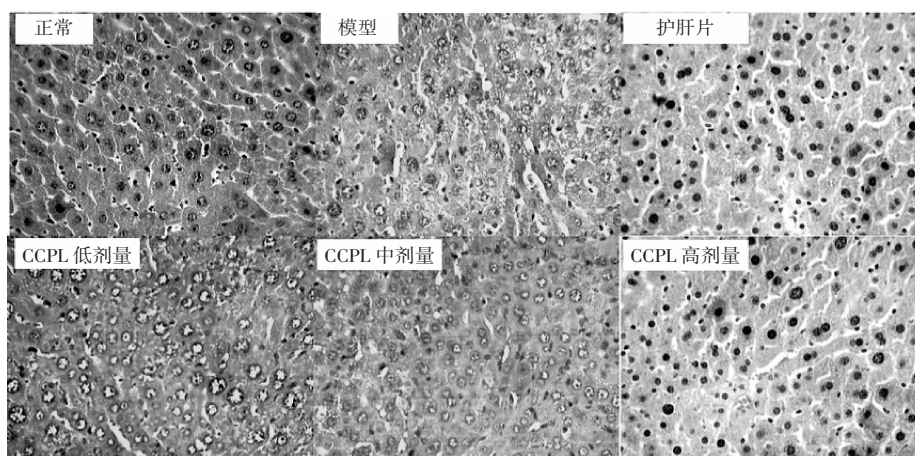


图 1 CCPL 对小鼠肝脏组织病理学改变的影响( $\times 400$ )

### 3 讨论

近年来,由于酒精性肝损伤被人们所重视,对于解酒护肝药物的研究越来越多,但目前我国相关功能性食品的开发还很少。葛根和枳椇子都是我国卫生部公布的药食两用物品。葛根复合胶囊中的葛根提取物,含有多种有效成分,其中包括的葛根素等黄酮类化合物,可以保护由于不同原因造成的肝损伤<sup>[10]</sup>。为研究以葛根提取物为主要原料制备的解酒护肝胶囊的功效,本实验以酒精作为肝毒剂,把人类的酒精性肝损伤加以复制到小鼠身上而建立急性酒精性肝损伤模型。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内,引起血 ALT 升高<sup>[11-12]</sup>。AST 除存在于肝细胞浆中,也存在于线粒体内,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<sup>[13]</sup>。本研究表明,与正常组相比,酒精性肝损伤模型组小鼠血清 ALT、AST 活性显著升高,升幅分别为 36.3%和 48.9%。有研究表明,酒精性肝损伤动物体内脂质过

氧化加剧,氧化/抗氧化动态平衡被打破,产生氧化应激<sup>[14-15]</sup>。机体内 GSH-Px 等抗氧化酶可有效清除自由基,而 MDA 是脂质过氧化的分解产物,其含量常常反映机体组织内脂质过氧化的程度。实验结果表明,中、高剂量 CCPL 可显著升高肝脏中 GSH-Px 活性。低、中、高剂量 CCPL 均可显著降低酒精性肝损伤小鼠肝脏中 MDA 含量,且具有量效关系,最大降幅为 54.4%。此外,CCPL 对酒精性肝损伤小鼠肝脏组织的病理学改变有较强拮抗效应。本研究为以葛根为主要原料开发具有解酒护肝功效的膳食补充剂或药物奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] Penetar DM, Toto LH, Farmer SL, et al. The isoflavone puerarin reduces alcohol intake in heavy drinkers: A pilot study [J]. Drug and Alcohol Dependence, 2012, 126 (1-2): 251-256.
- [2] Hwang YP, Kim HG, Hien TT, et al. Puerarin activates endothelial nitric oxide synthase through estrogen receptor-

- dependent PI3-kinase and calcium-dependent AMP-activated protein kinase[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2011, 257(1):48-58.
- [3] Ng CF, Koon CM, Cheung DW, et al. The anti-hypertensive effect of Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) and Gegen (*Pueraria lobata*) formula in rats and its underlying mechanisms of vasorelaxation [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011, 137(3):1366-1372.
- [4] Xiong Y, Yang Y, Yang J, et al. Tectoridin, an isoflavone glycoside from the flower of *Pueraria lobata*, prevents acute ethanol-induced liver steatosis in mice [J]. *Toxicology*, 2010, 276(1):64-72.
- [5] Dean AJ. Natural and complementary therapies for substance use disorders [J]. *Current Opinion in Psychiatry*, 2005, 18(3):271-276.
- [6] Hyun TK, Eom SH, Yu CY, et al. *Hovenia dulcis*-an Asian traditional herb[J]. *Planta Medica*, 2010, 76(10):943-949.
- [7] Wang M, Zhu P, Jiang C, et al. Preliminary characterization, antioxidant activity in vitro and hepatoprotective effect on acute alcohol-induced liver injury in mice of polysaccharides from the peduncles of *Hovenia dulcis* [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2012, 50(9):2964-2970.
- [8] Szachowicz-Petelska B, Dobrzyńska I, Skrzydlewska E, et al. Protective effect of blackcurrant on liver cell membrane of rats intoxicated with ethanol [J]. *Journal of Membrane Biology*, 2012, 245(4):191-200.
- [9] 陈梨, 杨辉, 张奉学, 等. 加味四逆汤对 Con A 肝损伤小鼠细胞凋亡的保护作用 [J]. *云南中医学院学报*, 2014, 37(3):5-7.
- [10] Zhang R, Hu Y, Yua J, et al. Effects of *Puerariae radix* extract on the increasing intestinal permeability in rat with alcohol-induced liver injury [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009, 126(2):207-214.
- [11] Li XZ, Ramzan I. Role of ethanol in kava hepatotoxicity[J]. *Phytother Research*, 2010, 24(4):475-480.
- [12] 张传涛, 周显华, 周道杰, 等. 加味楂曲饮防治实验性非酒精性脂肪肝的药效学研究 [J]. *云南中医学院学报*, 2013, 36(3):12-15.
- [13] Habib-Ur-Rehman M, Tahir M, Lone KP, et al. Ethanol induced hepatotoxicity in albino rats[J]. *Journal of the College of Physicians and Surgeons-Pakistan*, 2011, 21(10):642-643.
- [14] 夏道宗, 潘东曼, 龚金炎, 等. 青梅提取物防治氧嗉酸钾致小鼠高尿酸血症的研究 [J]. *现代食品科技*, 2013, 29(1):8-10, 28.
- [15] Jayaraman J, Veerappan M, Namasivayam N. Potential beneficial effect of naringenin on lipid peroxidation and antioxidant status in rats with ethanol-induced hepatotoxicity [J]. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2009, 61(10):1383-1390.

(编辑: 杨阳)

### Protective Effects of Compound Capsule of *Pueraria lobata* on Liver Injury Induced by Ethanol in Mice

WANG Si-wei, XIA Dao-zong, FANG Yue-juan, YU Miao, LUO Meng

(College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

**ABSTRACT: Objective** To investigate protective effects of compound capsule of *Pueraria lobata* on liver injury induced by ethanol in Mice. **Methods** To investigate the compound capsule of *Pueraria lobata* (CCPL) (100, 300, 500mg/kg) on liver injury induced by 50% ethanol (12mL/kg. bw) in mice, and determine the active condition, serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities, liver malondialdehyde (MDA) content and glutathione peroxidase (GSH-Px) activity, and hepatic histopathologic changes. **Results** The results indicated that CCPL at the dose of 300 and 500mg/kg. bw could significantly decrease the serum ALT and AST activities, and significantly increase the hepatic GSH-Px activity of mice with liver injury induced by ethanol ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Low, medium and high dose of CCPL could significantly reduce the liver MDA content on liver injury induced by ethanol in mice ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), and has concentration-response relationship, the biggest drop of 54.4%, and the high dose of CCPL has the same effect with positive control liver-protection tablet. In addition, CCPL could protect the hepatic histopathologic changes. **Conclusion** CCPL could significantly protect the liver injury induced by ethanol in mice, and this study laid a foundation for *Pueraria lobata* and CCPL exploitation to anti-alcohol and liver-protection dietary supplement or drug.

**KEY WORDS:** *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi; compound capsule; ethanol; liver injury protection