

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.10.008

奇魅植物酵素对小鼠酒精性肝损伤保护作用的研究

秦松¹,王君²,高志鹏¹,柳长柏¹,邹黎黎^{1△}

(1. 三峡大学医学院肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室,湖北宜昌 443002;

2. 湖北省宜昌市第一人民医院细胞治疗研究所 443000)

[摘要] 目的 探讨奇魅植物酵素对小鼠酒精性肝损伤的保护作用。方法 用连续灌服酒精的方法建立小鼠酒精性肝损伤模型,将 60 只雄性昆明小鼠分为 5 组:空白对照组,模型组,低剂量组、中剂量组、高剂量组(模型组基础上分别加 5、25、50 mL/kg 奇魅植物酵素)。连续灌胃 9 周后,测定各组小鼠血清中天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)的活性。测定各组小鼠肝组织中丙二醛(MDA)、三酰甘油(TG)、还原性谷胱甘肽(GSH)、乙醇脱氢酶(ADH)及乙醛脱氢酶(ALDH)的活性,以及肝指数的变化及肝组织病理学观察。结果 成功建立小鼠酒精性肝损伤模型;与模型组比较,各剂量组的奇魅植物酵素均可有效地降低血清中 AST、ALT 及肝组织中 TG 水平,提高 ADH、ALDH、GSH 水平。此外,病理学观察结果与酶学变化相一致。结论 奇魅植物酵素对小鼠酒精性肝损伤有一定的保护作用。

[关键词] 奇魅植物酵素;肝疾病,酒精性;保护作用**[中图分类号]** R285**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)10-1323-03

Protection of Qimei Fermented Beverage against alcohol-induced liver injury in mice

Qin Song¹, Wang Jun², Gao Zhipeng¹, Liu Changebai¹, Zou Lili^{1△}

(1. Hubei Provincial Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Immunotherapy, Medical College,

Three Gorges University, Yichang, Hubei 443002, China; 2. Institute for Cell Therapy, Yichang

Municipal First People's Hospital, Yichang, Hubei 443000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the protective effect of Qimei Fermented Beverage against alcohol-induced liver injury in mice. **Methods** Alcohol-induced liver injury mouse model was established by continuously intragastric administration. Totally 60 male mice were randomly divided into five groups, blank control group, model group, low, middle and high doses groups (adding 5, 25, 50 mL/kg Qimei Fermented Beverage). After continuous intragastric administration for 9 weeks, the levels of serum aspartate transaminases (AST) and alanine transaminases (ALT) were detected in each group, moreover the levels of malondialdehyde (MDA), triglyceride (TG), glutathione (GSH) and alcohol dehydrogenase (ADH), aldehyde dehydrogenase (ALDH) of liver homogenate, and liver index change were measured. Liver histopathological changes were observed. **Results** The alcohol-induced liver injury model in mice was successfully established. Compared with model group, different doses groups of Qimei Fermented Beverage could effectively reduce the levels of serum AST, ALT and liver tissue TG, increased the levels of ADH, ALDH, GSH. In addition, the pathological examination results of liver were consistent with those in enzymology. **Conclusion** Qimei Fermented Beverage has certain protective effect against alcohol-induced liver injury and can obviously improve the alcohol-induced liver injury.

[Key words] Qimei fermented beverage; liver disease, alcoholic; protective effect

酒精性肝损伤是指长期大量饮酒或含有酒精的饮料造成的肝脏疾患,20 世纪 90 年代以前酒精性肝病(alcoholic liver disease)是发达国家常见的肝脏疾病,经常饮酒可导致脂肪肝,可加快脂肪性肝炎、肝纤维化及肝硬化的进程^[1-5]。2004 年全球 3.8% 的人类死于饮酒,酒精会导致多器官损伤,其中以肝脏损伤尤为显著,其发病机制复杂,较为公认的是氧化应激可能是酒精性肝损伤的驱动力^[6-9]。临床上采用传统抗氧化剂维生素 A 和维生素 E 治疗酒精性肝损伤,但疗效不佳。因此酒精性肝损伤的防治已成为医学上的一个重要研究课题。

奇魅植物酵素是将数十种药食同源的中草药,经混合菌种发酵研制而成。本实验以湖北富程祥云生物科技有限公司提供的奇魅植物酵素为研究对象,旨在探讨其对小鼠酒精性肝损伤的保护作用,为进一步研究和开发植物酵素的药用价值提供理论基础。

1 材料与方

1.1 材料与试剂 SPF 级昆明小鼠 60 只,雄性,由三峡大学实验动物中心提供[湖北省实验动物质量合格证:SCXK(鄂)

2011-0061];奇魅植物酵素由湖北富程祥云生物科技有限公司提供,样品受理编号:三峡大学第 SDHZ2013071 号。丙二醛(MDA)、三酰甘油(TG)、还原性谷胱甘肽(GSH)试剂盒、乙醇脱氢酶(ADH)、乙醛脱氢酶(ALDH)标准品及组织测定试剂盒购自南京建成生物工程公司。乙醇及其他主要试剂均为国产分析纯,由三峡大学医学院肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室提供。

1.2 仪器与设备 MIKRO 120 高速离心机(德国 Zentrifogen 公司);DL-600S 型三用恒温水箱(上海精宏实验设备有限公司);组织切片机 HM 340E(德国 Microm 公司);CS-VI 型摊片烤片机(孝感市宏业医用仪器有限公司);包埋机 EG1150H,多功能显微镜 NPS60(德国 Leica 公司)。

1.3 方法

1.3.1 动物模型的建立及分组 参考马晓茜^[10]的模型建立方式,将小鼠分为 5 组,即低剂量组、中剂量组、高剂量组、模型组和空白对照组,每组 12 只。根据生产厂家提供人群推荐日摄入量,奇魅植物酵素分别扩大 1、5、10 倍(即 5、25、50

mL/kg)作为实验的低、中、高剂量组。将小鼠禁食 12 h 后,奇魅植物酵素剂量组分别灌胃 1、5、10 倍的植物酵素(5、25、50 mL/kg 奇魅植物酵素),模型组和空白对照组分别灌胃等量的蒸馏水。30 min 后,奇魅植物酵素各剂量组和模型组灌胃 42% 的酒精,空白对照组灌胃等量的蒸馏水,连续灌胃 60 d。实验期间每 2 天称 1 次体质量,根据体质量变化调整灌胃剂量。

1.3.2 样品处理 实验结束后将小鼠禁食 12 h,眼球取血,离心后取血清,待测其生化指标天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)的活性。将小鼠颈椎脱臼处死后,取出小鼠肝脏:(1)肝脏称质量计算脏体系数;(2)取小块肝组织匀浆,进行 MDA、TG、GSH、ADH 及 ALDH 水平测定;(3)取部分肝组织进行病理组织学检查,取出动物肝脏观察形态学变化,立即用 10% 甲醛溶液固定,常规石蜡包埋,6 μ m 切片,普通苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察,以肝细胞变性坏死作为观察指标。

1.4 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件进行数据处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,进一步两两比较采用 SNK 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 模型构建情况 与空白对照组比较,模型组血清 AST、ALT,肝组织 MDA、TG、GSH、ADH、ALDH 等指标差异有统计学意义,说明酒精性肝损伤小鼠模型构建成功,见表 1~2。

2.2 各组小鼠血清 AST、ALT 的活性及肝指数变化 中剂量

组和高剂量组的 AST、ALT 的活性明显低与模型组($P < 0.01$)。各剂量组肝指数低于模型组($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 奇魅植物酵素对各组小鼠血清 AST、ALT 的活性及肝指数的影响($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量 (mL/kg)	AST(U/L)	ALT(U/L)	肝指数
空白对照组	20	131.33 \pm 8.45	37.33 \pm 4.04	4.08 \pm 0.31
模型组	20	550.00 \pm 63.26	649.50 \pm 86.87	5.56 \pm 0.52
低剂量组	5	592.00 \pm 50.56	324.50 \pm 22.07 ^a	4.86 \pm 0.27 ^a
中剂量组	25	328.17 \pm 13.14 ^a	143.50 \pm 6.57 ^a	4.59 \pm 0.17 ^b
高剂量组	50	296.50 \pm 22.17 ^a	92.75 \pm 8.35 ^a	4.89 \pm 0.38 ^a

^a: $P < 0.05$, ^b: $P < 0.01$, 与模型组比较。

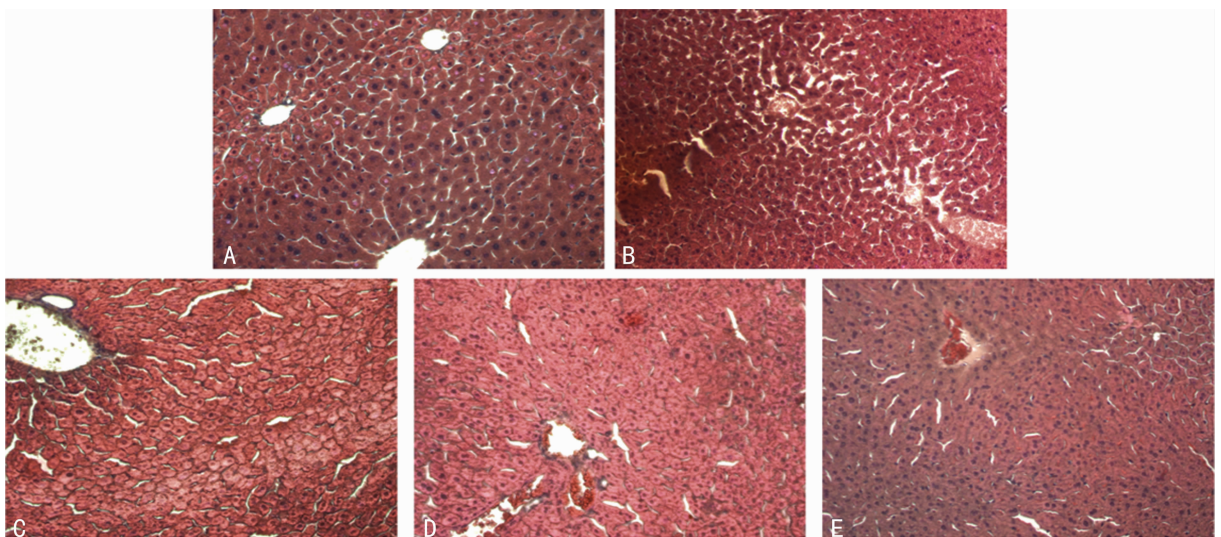
2.3 各组小鼠肝组织 ADH、ALDH 的活性及 TG、GSH、MDA 水平变化 各剂量组肝组织的 ADH、ALDH 活性及 GSH 水平明显高于模型组($P < 0.05$)。TG、MDA 水平低于模型组($P < 0.05$),见表 2。

2.4 各组小鼠肝组织病理切片观察 HE 染色结果表明模型组正常小叶结构消失,肝索排列紊乱,细胞间无明显分界,局部呈碎屑状坏死,汇管区炎症细胞浸润明显。低剂量组、中剂量组和高剂量组肝细胞损伤明显轻于模型组,中剂量组、高剂量组尤为明显,见图 1。

表 2 奇魅植物酵素对各组小鼠 ADH、ALDH 活性及 TG、GSH、MDA 水平的影响($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量 (mL/kg)	ADH (U/mg)	ALDH (U/mg)	TG (nmol/mg)	GSH (nmol/mg)	MDA (nmol/mg)
空白对照组	20	4.61 \pm 0.54	2.04 \pm 0.22	0.58 \pm 0.18	4.19 \pm 0.59	1.51 \pm 0.30
模型组	20	2.26 \pm 0.35	1.04 \pm 0.27	1.89 \pm 0.24	2.24 \pm 0.26	3.64 \pm 0.42
低剂量组	5	3.60 \pm 0.38 ^b	1.57 \pm 0.24 ^b	1.20 \pm 0.27 ^a	3.50 \pm 0.46 ^a	2.89 \pm 0.30 ^a
中剂量组	25	3.70 \pm 0.36 ^b	1.73 \pm 0.29 ^{ab}	0.91 \pm 0.17 ^a	3.33 \pm 0.31 ^a	2.69 \pm 0.44 ^a
高剂量组	50	3.63 \pm 0.42 ^b	1.57 \pm 0.19 ^b	1.05 \pm 0.25 ^a	3.24 \pm 0.30 ^a	2.96 \pm 0.28 ^a

^a: $P < 0.05$, ^b: $P < 0.01$, 与模型组比较。



A: 空白对照组; B: 模型组; C: 低剂量组; D: 中剂量组; E: 高剂量组。

图 1 肝脏 HE 染色($\times 200$)

3 讨 论

肝脏是酒精代谢的主要场所,长期大量饮酒会引起酒精性肝炎、脂肪肝、肝硬化等疾病。而奇魅植物酵素包含消化酶如糖化酶、脂肪酶等酶类成分,富含益生菌,且低能量、无脂肪。更值得一提的是,与化学药品、中药制剂等解酒药相比,奇魅植物酵素是通过代谢酶解酒,不会给肝肾造成代谢负担及任何不良反应。已有研究表明植物酵素具有良好的润肠通便^[8]、解酒醒酒^[9]的作用。本文旨在探讨植物酵素对酒精性肝损伤的保护作用。

ALT 和 AST 是存在于肝细胞质和线粒体中的转氨酶,当肝细胞严重病变、坏死时,ALT 和 AST 就会渗漏入血,所以血清 ALT 和 AST 活性升高为肝细胞损伤的特异性指标,而肝脏病理学检查则被认为是判断肝脏损伤的金标准^[10]。本实验采取连续灌胃的方法建立慢性酒精性肝损伤模型^[11],发现模型组小鼠血清 ALT 和 AST 活性水平明显升高,肝脏出现明显的脂肪和炎症性病理学改变,证实小鼠酒精性肝损伤模型建立成功。研究发现与模型组相比,中剂量和高剂量组的 ALT、AST 的活性和 MDA 的水平显著降低,GSH 的水平显著升高。这与夏伟等^[12]发现桦木酸可以改善酒精对小鼠的机体损伤,降低 ALD 大鼠血清中 AST、ALT 的活性水平,上调肝组织总蛋白的水平及提高肝组织中 GSH,降低 MDA 的水平指标有相同的效用。而 MDA 是机体进行脂质过氧化作用的终产物,MDA 的水平反应组织过氧化的程度^[13],由此说明植物酵素可能是通过抗氧化作用来保护肝脏的。

饮酒后,约 90% 在肝内代谢,进入体内的酒精大部分通过 ADH 代谢转化为乙醛,乙醛再经 ALDH 的作用,代谢为无毒的乙酸。然而,乙醛代谢为乙酸的速度较慢,易导致乙醛在体内蓄积^[14]。乙醛可与肝细胞中的蛋白质、DNA 发生螯合,形成乙醛加合物,如 MDA-乙醛加合物等。诸多乙醛加合物可导致受其影响的蛋白发生变构,失去应有的功能,从而引起肝细胞功能受损^[15-17]。另外酒精性肝损伤可出现轻度的黄疸和肝脏肿大,肝质量常达正常肝脏的 2~3 倍。本研究发现各剂量组肝组织中的 ADH、ALDH 的水平均显著降低,同时肝指数也显著降低。说明奇魅植物酵素可能是通过促进酒精在肝组织中的代谢来保护肝脏的。

综上所述,高剂量的奇魅植物酵素可以有效地改善酒精性肝损伤,其作用机制可能与抗氧化作用和促进酒精代谢有关,其药用价值有待进一步开发。

参考文献

[1] 丁晓东. 酒精性肝病肝损伤的信号通路[J]. 肝脏, 2012, 17(4): 269-271.
 [2] Rehm J, Mathers C, Popova S, et al. Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders [J]. Lancet, 2009, 373

(9682): 2223-2233.

[3] Roede JR, Orliry DJ, Fisher AB, et al. Over-expression of peroxiredoxin 6 dose not prevent ethanol-mediated oxidative stress and may play a role in hepatic lipid accumulation[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2009, 330(1): 79-88.
 [4] Osama EI, Feng H, Kim WH, et al. IL-6-deficient mice are susceptible to ethanol-induced hepatic steatosis: IL-6 protects against ethanol-induced oxidative stress and mitochondrial permeability transition in the liver[J]. Cell Mol Immunol, 2004, 1(3): 205-211.
 [5] Reuben A. Alcohol and the liver[J]. Curr Opin Gastroenterol, 2008, 24(4): 328-338.
 [6] Loguercio C, Federico A. Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis[J]. Free Radical Bio Med, 2003, 34(1): 1-10.
 [7] Dolganiuc A, Szabo G. In vitro and in vivo models of acute alcohol exposure [J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(10): 1168-1177.
 [8] 赵金凤, 曲佳乐, 皮子凤, 等. 植物酵素润肠通便保健功能研究[J]. 食品与发酵科技, 2012, 48(3): 54-56.
 [9] 曲佳乐, 赵金凤, 皮子凤, 等. 植物酵素解酒护肝保健功能研究[J]. 食品科技, 2013, 38(9): 51-55.
 [10] 马晓茜. 大鼠酒精性肝损伤模型的制备及观察[J]. 山东医学高等专科学校学报, 2011, 33(2): 81-83.
 [11] 吴伟青, 陈静, 刘超群, 等. 绿茶多酚对小鼠酒精性肝损伤的保护作用[J]. 食品科学, 2011, 32(13): 310-313.
 [12] 夏伟, 朱若岑, 蒋维维, 等. 桦木酸对小鼠酒精性肝损伤的保护作用[J]. 营养学报, 2015, 37(1): 68-72.
 [13] 黄川锋, 王海鑫, 康爱英, 等. 辛夷对急性酒精性肝损伤小鼠的肝保护作用及机制研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31(7): 515-518.
 [14] 吴高峰. 牛磺酸对大鼠酒精性肝病防治作用及其机理的研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2006.
 [15] Xu D, Thiele GM, Beckenhauer JL, et al. Detection of circulating antibodies to malondialdehyde-acetaldehyde adducts in ethanol-fed rats[J]. Gastroenterology, 1998, 115(3): 686-692.
 [16] 赵雪珂, 穆茂, 程明亮. 酒精性肝病与氧化应激[J]. 临床肝胆病杂志, 2014, 30(2): 118-120.
 [17] Setshedi M, Wands JR, Monte SM. Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease [J]. Oxid Med Cell Longev, 2010, 3(3): 178-185.

(收稿日期: 2015-11-08 修回日期: 2015-12-20)

(上接第 1322 页)

[23] Zhang YP, Shields LB, Zhang Y, et al. Use of magnetic stimulation to elicit moto revoked Potentials, somatosensory evoked potentials, and H-reflexes in non-sedated rodents[J]. J Neurosci Methods, 2007, 165(1): 9-17.

[24] Darian-Smith C. Monkey models of recovery of voluntary hand movement after spinal cord and dorsal root injury [J]. ILAR J, 2007, 48(4): 396-410.

(收稿日期: 2015-11-08 修回日期: 2015-12-06)