

解酒口服液对小鼠酒精性肝损伤的防护作用机理研究

王新月¹ 孙承琳² 田德禄¹ 刘春梅² 李小林¹

摘要 给小鼠灌胃二锅头白酒复制酒精性肝损伤动物模型,观察解酒口服液对酒精中毒小鼠肝脏脂质过氧化反应、肝线粒体膜流动性及其线粒体膨胀改变的影响。结果表明,解酒口服液通过对抗酒精中毒引起的肝脏脂质过氧化损伤、调整肝线粒体膜流动性、抑制肝线粒体膨胀而起到有效的保肝作用。

主题词 肝硬化,酒精性/中医药疗法 @ 解酒口服液

大量酒精摄入后可引起机体多系统损害,肝脏是酒精代谢的主要脏器。在研究解酒口服液防治急性酒精中毒的基础上^[1],通过观察解酒口服液对酒精性肝损伤实验动物肝脏脂质过氧化损伤、肝线粒体膜流动性及肝线粒体膨胀的影响,分析其对酒精性肝损伤的防护作用及作用机理。

1 材料与方法

1.1 材料

动物:昆明种雄性小鼠,体重 24~28g(由中国预防医学科学院流行病学研究所动物中心提供,合格证号京动字第 01-3057 号)。

试剂:脂质过氧化物标准品四乙氧基丙烷,Fluka 产品。1,6-二苯酚-1,3,5-己三烯(DPH),Sigma 产品。Triton-X-100 为 Rohm-mass 产品。5,5'-二巯基-双硝基苯甲酸(DTNB)、硫代巴比妥酸(TBA)及其它化学试剂均为分析纯,北京化学试剂厂产品。

仪器:紫外/可见分光光度计(日本)、MPF-4 型荧光分光光度计(日本)、MSE-25 型高速离心机(英国)、LAUDA-C₃ 型循环恒温水浴(德国)。

解酒口服液:由葛花、枳椇子、砂仁、黄连等组成,每支 10ml,含生药 16.25g,北京中医药大学东直门医院制剂室生产,批号 960403。

1.2 分组与处理

肝脏脂质过氧化物(LPO)、谷胱甘肽(GSH)的测定:小鼠 46 只随机分为正常组 10 只,模型组 12 只,解酒口服液大、小剂量组各 12 只,各组小鼠于实验环境中用普通饲料喂养 3 天。禁食 12 小时后,大、小剂量组分别给予解酒口服液 32.5g/kg 体重和 16.25g/kg 体重,正常组和模型组以等体积的生理盐水灌胃。1 小时

后,除正常组外,各观察组给予 56 度二锅头白酒 16ml/kg 体重,正常组灌胃等体积的 10%葡萄糖溶液。给酒 6 小时后,断头处死小鼠,取出肝脏,在冰浴下制备 20%的肝匀浆,测定肝 LPO、肝 GSH。

肝线粒体膜流动性、线粒体膨胀抑制百分率的测定:小鼠 30 只随机分为正常组、模型组和治疗组,每组 10 只。各组动物于实验环境普通饲料喂养 3 天。实验时于每日上午治疗组小鼠灌胃解酒口服液 16.25g/kg 体重,正常组和模型组小鼠灌胃等体积的生理盐水。4 小时后,给模型组和治疗组小鼠灌胃 45 度二锅头白酒 16ml/kg 体重,正常组小鼠灌胃等体积的 10%葡萄糖溶液。第 3 天给酒后 5 小时处死动物,取出肝脏,低温冷冻保存。

1.3 实验方法

肝脏 LPO 测定:以硫代巴比妥酸法^[2]。

肝脏 GSH 测定:采用 5,5'-二巯基-双硝基苯甲酸法^[3]。

肝线粒体膜流动性测定:常规制备小鼠肝线粒体^[4],用 Lowry 法测定线粒体蛋白质含量,标准品为牛血清白蛋白。分别测定各样本荧光偏振度(P)^[5](荧光分光光度计激发波长 362nm,发射波长 432nm),按 Perrin^[6]公式计算微粘度(η)值,该值增加表示膜的流动性降低。

肝线粒体膨胀水平测定:将新鲜鼠肝线粒体加入盛有介质的试管中,各管蛋白含量均为 0.5mg/ml,反应总体积为 3.0ml。充分混匀,以紫外/可见分光光度计(波长 540nm)测定各管浊度。然后,每管加入表面活性剂 Triton-X-100-0.1ml,2 分钟后在上述同等条件下比色,测得光密度值^[5]。比较加入表面活性剂前后的差异,观察药物对线粒体膨胀的影响,以抑制百分率表示。

2 结果

2.1 肝脏 LPO、GSH 变化:表 1 示,实验动物一次大量饮酒后,肝脏 LPO 含量明显升高,与正常组比较差异有显著性($P<0.05$),而预先给予解酒口服液(大、小剂量组)可使肝脏 LPO 含量下降,与模型组相比差异有显著性($P<0.05$)。说明解酒口服液可抑制酒精引起的肝脏脂质过氧化反应。小鼠灌胃白酒后,肝脏 GSH 含量明显下降,与正常组相比差异有显著性($P<$

1 北京中医药大学东直门医院消化内科,北京市东城区海运仓 5 号(100700)

2 北京中医药大学中西医结合研究所

收稿日期:1999-12-17;修回日期:2000-05-10

表 1 各组实验动物肝脏 LPO、GSH 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	LPO($\mu\text{mol/g}$)	GSH($\mu\text{mol/g}$)
正常组	10	13.34 $\pm$ 5.62	7.81 $\pm$ 1.01
模型组	12	18.21 $\pm$ 4.14 Δ	5.56 $\pm$ 0.78 $\Delta\Delta$
解酒口服液小剂量组	12	13.91 $\pm$ 3.88*	7.22 $\pm$ 0.71**
解酒口服液大剂量组	12	13.83 $\pm$ 4.39*	6.56 $\pm$ 0.30**

与正常组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$

0.001)。解酒口服液两个剂量组肝脏 GSH 含量显著高于模型组, 差异有显著性($P < 0.001$)。提示解酒口服液可阻止酒精所致的肝脏 GSH 的耗竭。

2.2 肝线粒体膜流动性、线粒体膨胀水平分析: 小鼠连续 3 天灌胃白酒后, 其肝线粒体膜的荧光偏振度及相应的微粘度均有明显提高, 与正常组相比差异有显著性($P < 0.05$)。解酒口服液治疗组的 P 及相应的 η 值比模型组明显降低, 差异有显著性($P < 0.05$)。表明解酒口服液能够抑制酒精引起的肝线粒体膜流动性升高, 见表 2。

表 2 肝线粒体膜 P 、 η 及线粒体膨胀抑制百分率比较

组别	动物(只)	P	η	线粒体膨胀抑制百分率(%)
正常组	10	0.145 $\pm$ 0.02	0.913 $\pm$ 0.14	28.62 $\pm$ 7.78
模型组	10	0.180 $\pm$ 0.04 Δ	1.291 $\pm$ 0.55 Δ	20.81 $\pm$ 5.50 Δ
治疗组	10	0.146 $\pm$ 0.03*	0.927 $\pm$ 0.22*	32.59 $\pm$ 8.03**

与正常组比较, $\Delta P < 0.05$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 2 同时显示, 模型组肝线粒体明显肿胀, 其抑制百分率明显降低, 与正常组比较差异有显著性($P < 0.05$)。解酒口服液治疗组线粒体肿胀得到明显抑制, 其抑制百分率与模型组相比明显升高, 差异有显著性($P < 0.01$)。提示解酒口服液可抑制酒精中毒小鼠肝线粒体肿胀。

3 讨论

解酒口服液是由葛花、枳椇子、黄连、砂仁等组成的中药复方制剂, 此口服液作为院内制剂已在临床应用多年, 具有良好的解酒效果。方中葛花解肌发汗解酒毒, 此药首出《别录》“消酒”, 《滇南本草》记载: “解酒醒脾, 酒病……酒毒伤胃, 吐血, 呕血。”《本经逢原》云: “葛花, 能解酒毒。”《脾胃论》葛花解醒汤、《滇南本草》葛花清热丸均以葛花为主药。枳椇子甘平无毒, 药性平和, 具有清热生津利小便之用。《本草纲目》谓其: “止呕逆, 解酒毒。”《本草拾遗》曰: “止渴除烦, 去膈上热, 润五脏, 利大小便。”黄连清热燥湿解毒, 砂仁化湿醒脾、和胃止呕, 全方既可利尿解酒毒, 又能保护脾胃。以往实验研究也表明其具有良好的解酒作用^[1], 本实验又

证明了其保肝作用并提示其作用机理。

3.1 解酒口服液能够对抗酒精引起的肝脏脂质过氧化损伤: 急性酒精中毒会导致肝损伤, 其损伤机制之一是通过激活氧分子产生氧自由基, 导致肝细胞膜脂质过氧化反应引起肝细胞损伤^[7], LPO 是其产物。LPO 在酒精性肝病发病机制中占重要地位。动物长期饮用酒精, 细胞器的损害程度与 LPO 的浓度呈平行关系^[8], 而体内依赖于还原型 GSH 的抗氧化系统在抵抗酒精所致肝损伤中起着关键的作用^[9]。本实验结果显示酒精可引起肝脏脂质过氧化反应增强, 而预先给予解酒口服液则可显著抑制酒精导致的肝脏 LPO 含量增加。表明解酒口服液可对抗酒精所致的肝脏脂质过氧化反应, 减轻酒精对肝细胞的损害。肝脏 GSH 含量变化显示, 酒精可导致肝脏脂质过氧化损伤而引起 GSH 的耗竭, 预先给予解酒口服液可抑制肝脏 GSH 的下降。

可以认为, 解酒口服液对酒精性肝损伤有明显保护作用。其作用机理之一是减轻酒精对肝脏的脂质过氧化损伤反应, 提高机体的抗氧化能力。从而清除酒精在肝脏产生的自由基而稳定肝细胞膜的结构, 也可能通过减少自由基与膜脂质和膜蛋白共价结合而减轻酒精的肝毒性反应。

3.2 解酒口服液能够保护酒精中毒状态下肝线粒体结构与功能的完整性: 生物膜在生命活动中具有重要意义。线粒体膜的流动性与膜的各种重要功能如能量转换、物质运送、信息传递等密切相关^[10]。要揭示膜中发生各种过程的机制, 研究膜脂区的流动性及其对膜功能的影响是一个重要方面, 而荧光偏振法是简便易行的技术^[11]。本实验结果显示, 酒精中毒可使肝线粒体膜的流动性发生变化, 致肝线粒体膜的流动性降低, 从而影响线粒体的能量(ATP)代谢和耗氧功能; 解酒口服液能够对抗酒精中毒引起的肝线粒体膜流动性的改变, 增强肝线粒体脂质双层膜流动性, 保护线粒体结构和功能的完整性。

线粒体肿胀是常见的病理变化, 是由于水分进入线粒体所致, 可由多种病理因素如缺氧、中毒等引起。在电子显微镜下观察, 酒精性肝损伤时, 肝线粒体可发生明显肿胀。本实验用表面活性剂 Triton-X-100 诱导肝线粒体膨胀, 观察各组线粒体肿胀的变化规律。结果发现, 模型组肝线粒体明显肿胀, 显示酒精对 Triton-X-100 诱导的线粒体肿胀有协同作用。解酒口服液可明显抑制酒精中毒所致的线粒体肿胀, 其抑制百分率显著高于模型组, 也高于正常组。提示解酒口服液不仅能够对抗酒精中毒引起的线粒体肿胀, 而且对 Triton-

X-100 诱导的正常肝细胞线粒体肿胀也有一定的抑制作用,从而维持线粒体的正常功能。

超氧阴离子是自由基反应的启动者,在过渡元素存在下,迅速转化为羟自由基。羟自由基可直接参与线粒体膜脂层多不饱和脂肪酸发生脂质过氧化的链锁反应,破坏膜脂的结构,其终产物是小分子醛类、氢过氧化物和烷烃气等。上述产物又可诱发线粒体膨胀,改变膜的流动性和 ATP 酶活性,这些变化都是破坏线粒体结构与功能完整的因素^[6]。解酒口服液对肝线粒体结构和功能的保护作用与其抗肝脏脂质过氧化反应有密切关系。

本研究结果显示,解酒口服液不仅可以解除醉酒患者的痛苦,而且对酒精性肝损伤具有良好的保护功能,值得进一步深入研究。

参考文献

- 1 王新月,田德禄,孙承琳.解酒口服液防治小鼠急性酒精中毒的实验研究.中国医药学报,1998,13(6):34-36.
- 2 Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem, 1979, 95(2):

351-358.

- 3 Boyne AF, Ellman GL. A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components. Anal Biochem, 1972, 46(2): 639-653.
- 4 祁颂平,刘春梅,张家俊,等.用荧光探针研究赤芍成分的衍生物对线粒体膜流动性的影响.生物化学与生物物理学报,1986,18(3): 246-251.
- 5 刘春梅,陈文为.天南星生物碱对鼠肝线粒体膜的作用.生物化学杂志,1989,5(5):451-455.
- 6 林克椿,聂松青,薄惠卿,等.腹水癌细胞膜胆固醇含量对膜流动性及恶性程度的影响.生物化学与生物物理进展,1982,43(1):31-33.
- 7 Strubelt O, Younes M, Pentz R. Enhancement by glutathione depletion of ethanol-induced acute hepatotoxicity in vitro and in vivo. Toxicology, 1987, 45(2): 213-223.
- 8 叶维法主编.肝病治疗学.天津:天津科学技术出版社,1990,812.
- 9 Larrey D, Pessayre D. Genetic factors in hepatotoxicity. In: Guillouzo A ed. Liver cells and drugs, 1st ed. France: Clichy Cedex, 1988, 164: 143-152.
- 10 李露斯,汪青松,闫国和,等.大鼠脑缺血后脑线粒体功能的改变.中华神经科杂志,1996,29(6):329-331.
- 11 余竹元,汤钊猷,潘小平.膜流动性与肿瘤宿主红细胞钠泵活性升高的关系.肿瘤,1985,5(6):241-242.

北京中医药大学基础医学院、北京高等中医药培训学校全国函授招生

为了弘扬祖国传统医学,切实为热爱中医事业的广大青年、在职人员解决晋升、应聘、自谋职业等问题,北京中医药大学基础医学院和北京高等中医药培训学校联合函授招生。

招生专业:(1)中医专业,(2)针灸、按摩专业。

各专业均由北京中医药大学基础医学院专家教授负责指导,并解答疑难问题,选用全国高等医药院校五版教材,并确保大专水平。学习结束颁发带钢印的学习证书。凡初中以上文化程度者均可报名。汇款6元至北京中医药大学主楼135房间,刘长贵收,即寄简章。

通讯地址:邮编100029,北京中医药大学,谢计格收,电话:(010)64286738、64202604、84254689。

京教社字(东城)2000017号 (广告编号:200012-16)

中国中医研究院培训中心 2001 年招生通知

中国中医研究院是中国中医药研究和医疗教学的重要基地,本中心依托中国中医研究院科研医疗教学的优势,集国内大批中医药界名老中医药专家教授。雄厚的师资力量和他们丰富的临床技能知识和办学经验,为国内外广大医务工作者提供一个学习交流的机会,本中心真诚欢迎中医药界同行朋友来中心学习进修。现将 2001 年上半年招生计划安排如下。

1. 全国高级中医进修班:3月2日~3月13日,6月12日~6月23日。
2. 中西医结合肾病、糖尿病诊疗经验专题进修班:3月8日~3月13日。
3. 任志远针灸刀、小针刀、薛立功古长圆针针拔松解疗临床应用专题进修班:3月16日~3月23日,5月9日~5月16日,6月26日~7月3日,7月16日~7月23日。
4. 高级中医肛肠病诊疗技术进修班:3月24日~4月2日,5月25日~6月3日,7月5日~7月14日,10月10日~10月19日。
5. 中医美容培训班:4月4日~4月9日,6月5日~6月10日,7月16日~7月21日。
6. 继承名老中医经验专题进修班:4月11日~4月22日。
7. 高级针灸临床经验应用进修班:4月24日~5月7日。
8. 高级推拿按摩进修班:5月9日~5月20日,7月1日~7月12日。

日。9. 高级中西医结合治疗颈肩腰腿痛与骨折、肢体畸形矫正经验进修班:5月21日~5月30日。10. 中西医结合外科皮肤病、性病诊疗经验进修班:5月18日~5月24日。11. 中西医结合风湿病(痹证)临床诊疗经验进修班:6月12日~6月21日。

以上各班于开班前1周电话联系,上课前1日报名。报名上课地址:中国中医研究院培训中心第一、第二教室(内设冷暖空调)。各班学费800元,报名费10元。学习结业颁发中英文对照钢印结业证书和继续教育学分证明。食宿统一安排,费用自理,请备2寸免冠照片1张。地址:北京东直门内北新仓18号中国中医研究院培训中心,邮政编码:100700,联系人:狄福金,电话:(010)64062096,64028399,传真:(010)64062096。2001年7月1日~7月12日的推拿按摩班以及7月16日~7月23日的小针刀班在山东青岛黄岛骨伤医院举办,联系电话:(0532)6803234。

京教社广字(东城)2000065号 (广告编号:200012-17)

新世纪全国中药研究暨中药房管理学术研讨会征文通知

为了更好地总结中医、中西医结合临床用药的经验,深入探讨中药房在医院改革中的体会和措施,进一步推动和促进全国中药事业的发展,中国中医药学会定于2001年5月在海南省海口市召开新世纪全国中药研究暨中药房管理学术研讨会,现将有关事项通知如下:

1. 征文内容:运用中医、中西医结合方法临床用药经验、病例报道;中药房改革的思路 and 措施;中药房库存管理、经济核算、窗口服务及计算机使用的经验;对中药的文献整理、实验研究和学术争鸣;中药药理研究;中药剂型改革和中成药使用;中药鉴别、保管和饮片包装。

2. 征文要求:来稿以3000字以内为限,并附800字以内摘要一份,文章用计量规范,数据准确。作者单位、邮编和姓名列于题目之下,临床文章加盖公章。来稿时请寄20元审稿费(不寄款者恕不审稿),不退稿。入选论文由中国中医药学会学术部颁发论文证书。符合《北京中医》杂志用稿要求者,将给予优先刊登。截稿日期:2001年2月20日。来稿请寄:北京东单三条甲7号《北京中医》编辑部高丹枫收,邮编:100005,信封请注明“会议稿”字样,联系电话:(010)65251589,具体开会地点、时间另行通知。