

蜂胶枳椇子复合物对小鼠酒精性肝损伤的保护作用研究

刘 丹,张美萍,李 英

(山西振东五和医养堂股份有限公司,山西 长治 047100)

摘要:目的:研究蜂胶枳椇子复合物对小鼠乙醇所致急性肝损伤的预防保护作用。方法:实验设5个组,分别为模型对照组、阴性对照组以及高、中、低3个剂量组,各组小鼠12只,3个剂量组每日灌胃受试物的剂量分别为1.8 g/kg、1.2 g/kg、0.6 g/kg,模型对照组和阴性对照组提供等剂量的蒸馏水。灌胃持续30 d后,测定各组小鼠肿瘤坏死因子 α (TNF- α)活性、丙二醛(MDA)、三酰甘油(TG)和还原型谷胱甘肽(GSH)含量,并观察肝细胞脂肪变性情况。结果:各剂量组实验前后小鼠体质量对比阴性对照组、模型对照组均未产生显著影响;对比模型对照组,高剂量组的TG含量、MDA含量显著降低,中高剂量组的GSH含量明显升高,且其血清和肝组织匀浆中TNF- α 含量显著降低,其病理组织学显示:高剂量组与模型对照组比较,肝细胞脂肪变性程度和肝损伤程度均明显减轻。结论:蜂胶枳椇子复合物可以有效保护和预防酒精诱导下小鼠急性肝损伤。

关键词:蜂胶;枳椇子;葛根;酒精性肝损伤

DOI:10.11954/ytctyy.202411006

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1673-2197(2024)11-0034-04



Study on Protective Effect of Propolis *Hovenia* Complex on Alcohol Induced Liver Injury in Mice

Liu Dan, Zhang Meiping, Li Ying

(Shanxi Zhendong Wuhe Medical Care Hall Co., Ltd., Changzhi 047100, China)

Abstract: Objective: The preventive and protective effects of propolis *Hovenia dulcis* complex on acute liver injury induced by alcohol in mice was evaluated in this paper. **Methods:** Five groups were set up in the experiment, which were model group, negative group, and high, medium, and low dose groups, with 12 mice in each group. The daily dose of test objects in the three dose groups was 1.8 g/kg, 1.2 g/kg, and 0.6 g/kg, respectively. The model group and the negative group were provided with the same amount of distilled water. After 30 days of continuous intragastric administration, tumor necrosis factor (TNF- α) activity, malondialdehyde (MDA), triglyceride (TG), and reduced glutathione (GSH) contents were measured, and the steatosis of hepatocytes was observed. **Results:** There was no significant effect on the weight of mice in the negative group and the model group before and after the experiment. Compared with model group, TG content and MDA content were significantly decreased in the high-dose group, GSH content was significantly increased in the medium-high dose group, and TNF- α content in serum and liver homogenate was decreased considerably. The histopathology showed that compared with the model control group, the degree of hepatocyte steatosis and liver injury were significantly reduced in the high-dose group. **Conclusion:** Propolis *Hovenia* compound can effectively protect and prevent acute liver injury induced by alcohol in mice.

Keywords: Propolis; *Hovenia*; *Pueraria*; Alcoholic Liver Injury

急性酒精性肝损伤,是指短期内或一次性饮酒过量,使血液中乙醇量远超肝脏解毒能力所导致的各种改变,诸如肝脂肪变性和肝细胞受损等^[1]。当今,饮酒已成为一种人们普遍的社交娱乐方式。根据调查显示,中国酒精性肝病的发病率逐年增长^[2]。长期酗酒不仅会引发肝纤维化和脂肪肝等,严重时还会导致肝癌、肝硬化等疾病,严重威胁人民群众的

身体健康^[3]。现阶段,治疗急性酒精性肝损伤的临床手段包括药物辅助治疗、营养支持、戒酒等,但疗效一般,且药物介入后常会产生不良反应^[4]。

酒精性肝病治疗无特效药,多因为酒精性肝病发病机制复杂,从国内外研究结果看,主要是单致病因素、多致病因素共同作用所致。酒精性肝损伤作用机制与多种因素有关,包括氧化应激反应和炎症

收稿日期:2024-01-17

作者简介:刘丹(1982—),女,硕士,山西振东五和医养堂股份有限公司高级研究员,执业中药师,研究方向为中药类保健食品功能学。E-mail:278401423@qq.com

信号通路等。中药黄酮类化合物成分是一种天然产物,能通过多种机制调控酒精性肝损伤的发生和发展,起到缓解酒精性肝病的效果^[5]。蜂胶是一种固体胶状物质,微苦,呈青绿色、棕褐色,是一种药食同源类原料。研究表明,蜂胶具有抗氧化、抗菌、抗肿瘤、降血糖、保护肝脏和提高免疫力等诸多功效^[6],蜂胶能降低乙醇所致肝损伤模型小鼠肝组织中的 TG 含量,升高其肝组织中 GSH 含量,减轻肝组织脂肪变性程度^[7-8]。近年来,市场上出现了大量中药配伍类型的护肝解酒保健食品,最常见的是葛根枳椇子配伍^[9],其主要护肝活性成分为黄酮类^[10-11],蜂胶含有丰富的黄酮类化合物,其抗氧化作用显著^[12]。基于蜂胶与枳椇子和葛根的药效作用,本研究将 3 种原料配伍成复合制剂,进一步观察 3 种成分复合在一起时的整体护肝效果,旨在充分研究和评估该受试物在改善化学性肝损伤方面的复合作用。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

SPF 级昆明种雄性小鼠 60 只,体质量为 18~22 g,提供者 of 山西医科大学,动物生产许可证号为 SCXK(晋)2019-0004,动物使用许可证号 SYXK(晋)2019-0012,蜂胶粉(长葛市燕元蜂产品有限公司),枳椇子提取物、葛根提取物(山东济南秦越人农业发展有限公司),甘油三酯(Triglyceride, TG)试剂盒、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)试剂盒、还原型谷胱甘肽(Glutathione, GSH)试剂盒(南京建成),ELISA 试剂盒(赛默飞),Heraeus Megafuge 8R 型超高速冷冻离心机(赛默飞),BX51F32H01 光学显微镜(OLYMPUS),MS204S 型电子分析天平(Mettler Toledo)。

1.2 实验方法

1.2.1 蜂胶枳椇子复合物的制备 将微晶纤维素和糊精混合 10 min 后,加入提取比例为 10:1 的葛根提取物和提取比例为 8:1 的枳椇子提取物、蜂胶粉混合 10 min,加入浓度为 85% 的乙醇制备颗粒,再加入硬脂酸镁混合后压片,片质量 0.6 g,总黄酮含量为 4.27%,人群推荐服用量为 6 片/d,其中蜂胶粉、枳椇子提取物、葛根提取物分别占比 14%、11%、22%。

1.2.2 实验动物分组与剂量设计 SPF 级小鼠在

控温 20~25℃、相对湿度为 40%~70% 环境中饲养,自由进食、饮水适应 1 周后,随机分为 5 组,即为阴性对照组、模型对照组、高中低 3 个剂量组,每组 12 只。按照人群日推荐用量 3.6 g/60 kg BW(0.06 g/kg)作为剂量设计依据,3 个剂量组的剂量为 1.8 g/kg、1.2 g/kg、0.6 g/kg BW(分别等同于人群推荐量的 30 倍、20 倍与 10 倍)。

1.2.3 实验方法 准确称取粉碎后的蜂胶枳椇子复合物 18 g、12 g、6 g,用蒸馏水定容至 200 mL 作为高剂量组、中剂量组、低剂量组小鼠灌胃用,开始试验前配制,灌胃前将其摇晃均匀,未使用的样品存储于 4℃ 冰箱中。3 个剂量组每日经口灌胃相应浓度的受试物,灌胃容量为 0.2 mL/10 g,肝损伤模型对照组、阴性对照组提供等剂量蒸馏水,每 7 天对动物进行称重,根据体质量变化调节灌胃量,在第 30 天,对模型组和 3 个剂量组 1 次灌胃给予 50% 浓度的乙醇 14 mL/kg^[13-14],阴性对照组提供等剂量的蒸馏水,各组动物禁食 16 h,从眼球取血,在 4℃ 环境中,将血液 3 000 r/min 离心 15 min 进行分离,得到血清,按照试剂盒中的详细说明和步骤,检测血清中 TNF-α 的含量。取血后小鼠颈椎脱臼处死,快速并及时处理肝脏,制备肝匀浆后检测各项指标(MDA、还原型 GSH、TG、TNF-α),具体步骤按照试剂盒说明操作,并进行肝脏病理组织学检查且在显微镜下观察肝细胞受损程度(根据病变所占视野面积的不同程度进行变性评分)。

1.3 数据处理

用 EXCEL 建立数据库,统计分析软件为 SPSS 25.0,采用样本 *t* 检验和参数统计方法。样本量 > 30 近似服从正态分布,可以直接采取样本 *t* 检验的模型。将各组进行两两比较,得出概率 *P* 值来判断两组间差异是否具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 蜂胶枳椇子复合物对小鼠体质量的影响

各实验组小鼠饮食、摄食活动正常,体质量逐日增长,从表 1 可见,受试物对各剂量组小鼠体质量无明显影响,与模型对照组和阴性对照组比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05)。见表 1。

表 1 蜂胶枳椇子复合物对小鼠体质量的影响

($\bar{x} \pm s$, g)

组别	剂量(g/kg BW)	动物数(只)	0 周	1 周	2 周	3 周	4 周
阴性对照组	0.0	12	19.7±0.2	30.5±1.2	33.7±0.7	35.6±1.0	37.2±1.9
模型对照组	0.0	12	19.9±0.1	31.0±1.6	33.5±0.9	35.1±1.5	36.7±2.5
低剂量组	0.6	12	20.1±0.1	31.6±0.7	33.3±1.4	35.3±2.1	36.9±3.1
中剂量组	1.2	12	20.0±0.4	30.9±0.9	34.2±1.6	36.0±2.5	37.9±3.0
高剂量组	1.8	12	19.9±0.5	31.6±0.8	33.4±1.0	35.2±2.2	36.6±2.7

2.2 蜂胶枳椇子复合物对小鼠肝脏匀浆中 TG 含量的影响

酒精短时间大量进入体内导致脂类物质在肝脏过度沉积,促进肝内脂类物质 TG 合成增加,脂蛋白的合成及分泌受阻^[15]。由表 2 数据可见,模型对照组较阴性对照组肝组织中 TG 显著升高($P<0.01$),说明酒精诱发肝脏内脂质代谢紊乱,与模型组比较,高剂量组能显著降低小鼠肝组织中 TG 含量($P<0.01$),表明蜂胶枳椇子复合物能缓解酒精诱发的肝脏组织脂质过氧化,可明显预防酒精引起的肝脏脂质蓄积。见表 2。

表 2 各组小鼠肝匀浆中 TG 的含量 ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量(g/kg BW)	动物数(只)	TG(mmol/L)
阴性对照组	0.0	12	1.27±0.88
模型对照组	0.0	12	3.78±0.48*
低剂量组	0.6	12	3.29±1.08
中剂量组	1.2	12	3.13±1.09
高剂量组	1.8	12	2.87±0.90 [#]

注:模型组与阴性组比较,* $P<0.01$;各剂量组与模型组比较,[#] $P<0.01$ 。

2.3 蜂胶枳椇子复合物对小鼠肝脏匀浆中 MDA、还原型 GSH 的影响

酒精经酶代谢时,会消耗大量还原型物质如 GSH,无法将大量自由基完全清除,产生氧化应激现象,从而导致细胞脂质过氧化产物迅速增加,引起肝细胞膜受损。由此可见,还原型 GSH 的量是衡量抗氧化能力的重要因素^[16]。MDA 是脂质过氧化的产物,其含量的多少可以反映过氧化损伤程度和细胞受损程度^[17]。本实验按 14 mL/kg BW 的剂量给予 50%浓度的酒精 16 h 后与阴性对照组比较,肝损伤模型组肝匀浆中 MDA 升高,还原型 GSH 降低,差异有统计学意义($P<0.01$ 、 $P<0.01$),说明本次实验模型成功,与模型对照组比,高剂量组能够降低肝匀浆中 MDA,差异有统计学意义($P<0.05$),中高剂量组能够升高肝匀浆中还原型 GSH,差异有统计学意义($P<0.01$ 、 $P<0.01$),说明蜂胶枳椇子复合物能减轻乙醇所致肝损伤小鼠的过氧化损伤和肝细胞受损程度,能提高其抗氧化能力,保护肝细胞。见表 3。

表 3 各组小鼠肝匀浆中 MDA、还原型 GSH 的含量

($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量(g/kg BW)	动物数(只)	MDA(nmol/mg prot)	还原型 GSH(mg/g prot)
阴性对照组	0.0	12	1.46±0.74	6.65±1.14
模型对照组	0.0	12	2.44±0.61*	2.32±0.75*
低剂量组	0.6	12	2.13±0.39	3.53±2.00
中剂量组	1.2	12	1.93±1.05	4.23±0.76 [#]
高剂量组	1.8	12	1.89±0.52 [#]	4.17±0.75 [#]

注:模型组与阴性组比较,* $P<0.01$;各剂量组与模型组比较,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$ 。

2.4 蜂胶枳椇子复合物对小鼠肝匀浆和血清中 TNF-α 含量的影响

肿瘤坏死因子 α(TNF-α)是一种主要由巨噬细胞和单核细胞产生的促炎细胞因子,可导致肝细胞脂肪变性、炎症因子浸润、肝细胞凋亡坏死等一系列问题。由此,降低 TNF-α 的高表达,还可阻断与酒精性肝损伤有关的炎症通路,抑制病程的发展^[10]。本实验测定小鼠血清以及肝匀浆中 TNF-α 含量,模型对照组与阴性对照组比较,TNF-α 含量显著升高($P<0.01$),说明 α 促炎因子参与了酒精引发小鼠肝损伤的过程,中高剂量组均能显著降低 TNF-α 含量($P<0.05$ 、 $P<0.01$),说明蜂胶枳椇子复合物能有效抑制 TNF-α 促炎症因子分泌,血清及肝匀浆中 TNF-α 结果一致。见表 4。

表 4 各组小鼠肝匀浆和血清中 TNF-α 含量 ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量(g/kg BW)	动物数(只)	肝匀浆中 TNF-α(pg/mL)	血清中 TNF-α(pg/mL)
阴性对照组	0.0	12	58.38±1.28	20.28±1.13
模型对照组	0.0	12	78.88±7.08*	29.05±4.49*
低剂量组	0.6	12	72.54±8.92	28.07±1.61
中剂量组	1.2	12	67.20±12.77 [#]	23.30±0.92 [#]
高剂量组	1.8	12	60.79±1.40 [#]	21.76±7.88 [#]

注:模型组与阴性组比较,* $P<0.01$;各剂量组与模型组比较,* $P<0.05$,[#] $P<0.01$ 。

2.5 蜂胶枳椇子复合物对小鼠肝脏病理组织学的影响

模型对照组与阴性对照组比较,肝细胞变性评分差异有统计学意义($P<0.01$),表明实验小鼠酒精性肝损伤模型成立,高剂量组与模型组相比较,肝细胞脂肪变性程度减轻,差异有统计学意义($P<0.05$),表明蜂胶枳椇子复合物能减轻酒精性肝损伤小鼠肝脏脂肪变性及炎性细胞浸润程度。见表 5。

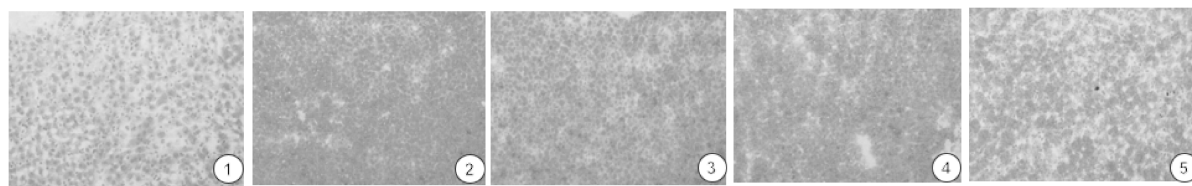
表 5 蜂胶枳椇子复合物对小鼠肝脏病理组织学的影响

($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量(g/kg BW)	动物数(只)	肝细胞变性评分(分)
阴性对照组	0.0	12	0.25±0.45
模型对照组	0.0	12	3.08±1.00*
低剂量组	0.6	12	2.83±1.03
中剂量组	1.2	12	2.75±0.87
高剂量组	1.8	12	2.25±0.45 [#]

注:模型组与阴性组比较,* $P<0.01$;各剂量组与模型组比较,[#] $P<0.05$ 。

肝脏病理组织苏丹Ⅲ染色结果显示,阴性对照组小鼠肝细胞大小未见改变,且肝组织未见异常,而模型组小鼠部分肝细胞坏死且有炎症细胞浸润,说明动物实验模型成立,低中剂量组小鼠局部炎症细胞有所改善,高剂量组可明显减轻病变程度和范围,进一步说明蜂胶枳椇子复合物可以减轻受损的肝脏炎症,达到护肝的功效。见图 1。



注:① 阴性对照组;② 模型对照组;③ 低剂量组(0.6 g/kg);④ 中剂量组(1.2 g/kg);⑤ 高剂量组(1.8 g/kg)。

图1 蜂胶枳椇子复合物对小鼠肝脏的影响(苏丹Ⅲ染色,×400)

3 讨论

近年来,由酒精性肝损伤所引起的肝硬化、肝衰竭等疾病发病率逐年增长,严重威胁到人们的身体健康。其影响机理为机体摄入大量乙醇后,在乙醇脱氢酶的催化下乙醇大量脱氢氧化,使脂肪酸氧化减弱和三羧酸循环受阻,从而影响脂肪代谢,致使脂肪在肝细胞内沉积而引起肝细胞脂肪变性和TG水平升高。酒精短时间内大量进入机体时,会消耗GSH类还原型物质从而引起氧化应激反应,导致肝细胞受损,而MDA的多少则能反映其受损严重性^[18-19]。因此,清除氧自由基、降低肝脏组织脂质过氧化、降低TG含量是被视为对肝脏有保护作用的指标^[11]。

蜂胶、枳椇子、葛根单独使用可用于防治急性酒精性肝损伤^[7,20-21],本研究用这3种原料配伍成复合制剂,进一步观察3种成分复合在一起的整体效果。本实验表明,蜂胶枳椇子复合物对小鼠的正常生长无影响,能显著降低小鼠肝匀浆中TG含量,从而预防肝脏脂质蓄积,能显著降低肝匀浆中MDA含量,升高肝匀浆中还原型GSH,减轻过氧化损伤和肝细胞受损程度,提高其抗氧化能力。蜂胶枳椇子复合物还能抑制TNF- α 等促炎症因子的分泌,改善酒精性肝损伤小鼠肝脏脂肪变性及炎性细胞浸润程度。因此,蜂胶枳椇子复合物能够保护和预防酒精引起的小鼠急性肝损伤,其作用机制与抑制炎症反应、抗脂质过氧化相关。

参考文献:

- [1] 魏芳,许瑞杰,蔡诗怡,等.石榴多酚对小鼠急性酒精性肝损伤的保护作用[J].中国中药杂志,2014,39(14):2721-2725.
- [2] 王秋艳,丁慧敏,朱亚男,等.多汁乳菇多糖对小鼠急性酒精性肝损伤的保护作用[J].食品工业科技,2021,42(24):313-319.
- [3] LIU X, HOU R L, YAN J J, et al. Purification and characterization of *Inonotus hispidus* exopolysaccharide and its protective effect on acute alcoholic liver injury in mice[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 129(15): 41-49.
- [4] 周慧雨,牛立云,刘慧蒙,等.药食同源组合物对小鼠急性酒精性肝损伤保护作用研究[J].食品与发酵工业,2023,49(20): 259-264.
- [5] 欧阳香,程虹毓,胡伟琼,等.黄酮类化合物抗酒精性肝损伤作

- 用及机制研究进展[J].中国药理学通报,2020,36(9):1200-1205.
- [6] PASUPULETI V R, SAMMUGAM L, RAMESH N, et al. Honey, propolis, and royal jelly: a comprehensive review of their biological actions and health benefits[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2017, 2017: 1259510.
- [7] 戴伟,尹晓晨.蜂胶对乙醇所致化学性肝损伤的保护作用研究[J].实用预防医学,2010,17(6):1207-1209.
- [8] 王彦武,黄超培,何励,等.花康牌蜂胶口服液对大鼠酒精性肝损伤保护作用的实验研究[J].应用预防医学,2013,19(2): 118-120.
- [9] 陈丰,陈绍红,柳海艳,等.辅助性保护化学性肝损伤保健食品配方的特点分析[J].中草药,2018,49(7):1703-1709.
- [10] 梁玉琼,黄庆,梁小勤,等.复方枳椇子制剂对急性酒精性肝损伤小鼠的保护作用[J].时珍国医国药,2020,31(1):72-74.
- [11] 周颖,罗小菊,常秀亭,等.葛根枳椇软胶囊对乙醇所致大鼠化学性肝损伤的保护作用[J].生物化工,2018,4(5):27-29.
- [12] 俞斌,刘进祖,孙丽萍.蜂胶及其活性成分对肝损伤的保护作用研究进展[J].中国蜂业,2014,65(Z4):34-38.
- [13] 汪艳丽,余燕影,田洁,等.水飞蓟宾乳糖修饰对急性酒精性肝损伤保护作用的影响[J].时珍国医国药,2013,24(10): 2360-2363.
- [14] 程金来,周子玉,刘丽,等.小鼠急性酒精性肝损伤造模方法的比较[J].中国比较医学杂志,2023,33(7):26-33.
- [15] TANG L Y, CHEN Y, RUI B B, et al. Resveratrol ameliorates lipid accumulation in HepG2 cells, associated with down-regulation of lipin1 expression[J]. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 2016, 94(2): 185-189.
- [16] VAIRETTI M, DI PASQUA L G, CAGNA M, et al. Changes in glutathione content in liver diseases: an update[J]. Antioxidants (Basel), 2021, 10(3): 364-403.
- [17] 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.
- [18] 李志满,臧爱梅,沙纪越,等.西洋参枳椇子配伍对急性酒精性肝损伤的保护作用[J].食品工业科技,2022,43(1):375-380.
- [19] 严峻,夏勇,张世鑫,等.金樱子、枳椇子、牛磺酸混合物对小鼠酒精性肝损伤的保护作用研究[J].预防医学,2020,32(9): 968-970.
- [20] 张楠,杨欢欢,严秀莺,等.枳椇子预防大鼠酒精性肝损伤的肝脏代谢组学[J].沈阳药科大学学报,2020,37(11):1003-1008.
- [21] 梁婕,凌敏,张薇,等.葛根提取物对小鼠酒精性肝损伤的辅助保护效果[J].江苏预防医学,2020,31(3):280-282.

(编辑:赵 可)