

葛根复合固体饮料保护化学性肝损伤的研究

Study on protective effect of puerarin solid beverage on chemical hepatic injury

黄 敏¹

郑建仙¹

董庆亮¹

李加兴²

HUANG Min¹ ZHENG Jian-xian¹ DONG Qing-liang¹ LI Jia-xing²

(1. 华南理工大学, 广东 广州 510640; 2. 吉首大学, 湖南 吉首 416000)

(1. South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510640, China;

2. Jishou University, Jishou, Hunan 416000, China)

摘要:以葛根、山楂、酸刺、黄秋葵、干姜、玉米肽和结晶果糖为原料制备的固体饮料为受试物,研究其对 Wistar 大鼠 CCl₄ 所致化学性肝损伤的辅助保护作用。将 Wistar 大鼠随机分为阴性对照组、模型对照组和 3 个剂量的试验组,分别灌胃蒸馏水或 1.08, 2.17, 4.33 g/kg bw 的受试物。连续 30 d 后,给除阴性对照组外大鼠灌胃 CCl₄, 成功建立化学性肝损伤模型,并测定丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、甘油三酯(TG)值,取肝脏称重并作病理切片,计算肝脏系数及观察肝脏的病理改变情况。相对于模型对照组大鼠,3 个试验组大鼠在灌胃 CCl₄ 后,其 ALT、AST 水平及肝脏系数明显较低,肝组织病理改变也呈不同程度的减轻,其中以高剂量试验组的效果最为显著。因此,该受试物具有良好的辅助保护化学性肝损伤的功能。

关键词:葛根;玉米肽;化学性肝损伤;动物试验

Abstract: With puerarin solid beverage made of *pueraria*, hawthorn, acid gill, okra, *Rhizoma zingiberis*, corn peptide and crystalline fructose as the test substance, to study its protection function on chemical hepatic injury by CCl₄ in the Wistar mice. Wistar mice were randomly allocated to negative control group, model control group and three experiment groups, which were treated with intubation of distilled water or 1.08, 2.17 or 4.33 g/kg test substance per day for 30 days. Groups which except negative control group were treated with gastric intubation of CCl₄, and the chemical hepatic injury model was gained. The level of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), triglyceride (TG) were detected, and then take the liver weight and pathological section for the liver coefficients and observing the pathological changes of liver. Compared with model control group, ALT, AST and liver

coefficients were decreased significantly in experiment groups after gastric intubation of CCl₄, also with the mitigatory pathologic changes. And the highest dose experiment group (experiment III) gained the most significant effects. Thus, the test substance could protect liver against chemical hepatic injury.

Keywords: *Radix puerariae*; corn peptides; chemical hepatic injury; animal experiment

肝脏是机体内以代谢为主的器官,参与多种化学物质代谢,同时还是人体内最大的解毒器官。目前,各种污染随着现代工业化的发展而日益加剧,各种肝毒性化合物也日益增多,由此可能导致的化学性肝损伤大大增加。因此,具有保护化学性肝损伤功能的食品饮料,在增强免疫力,加速化学毒物的代谢分解和保护肝脏等方面,可发挥良好作用。

大量研究^[1-3]表明,葛根具有明显解酒护肝功效。葛根包括葛根素、大豆苷、大豆苷元等功效成分^[4-5],宋小莉^[6]通过小鼠腹腔注射 CCl₄ 制备急性肝损伤模型,灌胃小鼠不同剂量的葛根水煎液证实葛根水提取物对 CCl₄ 诱导的小鼠化学性肝损伤具有一定保护作用。张建夫等^[7]利用酒精比重计测定葛根在不同条件下与酒精作用的密度,发现葛根在唾液酶的作用下,可以加快酒精分解,起到保肝、护肝的功效。此外,付萍等^[8]通过建立小鼠酒精性肝损伤模型发现玉米肽能使小鼠肝匀浆中 MDA、TG 含量显著减少, GSH 含量增加,且肝组织损害程度得到明显改善。Yamaguchi 等^[9]研究发现玉米肽能够显著提高血浆中亮氨酸和丙氨酸的含量从而降低体内血乙醇浓度,起到防止酒精引起的肝脏损伤的作用。

本研究拟以葛根、山楂、酸刺、黄秋葵、干姜、玉米肽和结晶果糖为原料制成的葛根复合固体饮料为受试物,以 CCl₄ 致 Wistar 大鼠化学性肝损伤为模型,对选用的葛根复合固体饮料的保护化学性肝损伤作用进行动物试验,以检验其实际护肝效果,并对其作用机理进行理论探讨。

作者简介:黄敏,男,华南理工大学在读硕士研究生。

通信作者:郑建仙(1966—),男,华南理工大学教授,博士生导师,博士。E-mail: feixzhen@scut.edu.cn

收稿日期:2016-12-19

1 材料与方法

1.1 材料与设备

受试物:葛根复合固体饮料,以葛根、山楂、酸刺、黄秋葵、干姜、玉米肽和结晶果糖为原料,湖南普兰特生物科技有限公司;

CCl₄:分析纯,广州苏喏化工有限公司;

精制菜油:益海嘉里食品营销有限公司;

ALT、AST、TG 测定试剂盒:中生北控生物科技股份有限公司;

台式低速自动平衡离心机:TDL-40B 型,北京医用离心机厂;

紫外可见分光光度计:UV-102-02FW 型,日本岛津公司;

电子天平:DT500A 型,常熟市意欧仪器仪表有限公司。

1.2 动物试验

1.2.1 试验动物 雄性 Wistar 大鼠 40 只,体重(180~200) g,中山大学实验动物中心提供。

1.2.2 试验方法 将 Wistar 大鼠随机均分为阴性对照组、模型对照组、试验 I 组、试验 II 组和试验 III 组,每组 8 只。给试验 I、II、III 组大鼠每日灌胃受试物,剂量分别为 1.08, 2.17, 4.33 g/kg bw(按颗粒重计,冲剂浓度 0.13 g/mL),分别相当于人体推荐每公斤体重日摄入量的 5, 10, 20 倍;阴性对照组和模型对照组则灌胃同体积的蒸馏水。每日 1 次,连续 30 d。同时,各组大鼠均自由摄食与饮水。除阴性对照组外,其余 4 组大鼠隔夜禁食 16 h 后,于第 31 天均按 5 mL/kg 剂量灌胃 2%浓度的 CCl₄ 溶液(精制菜油配制),4 h 后继续给予受试物。灌胃 CCl₄ 溶液后 48 h,股静脉放血处死老鼠,分离血清,测定 ALT、AST、TG 水平,并取肝脏观察病理损伤情况。

1.2.3 血清生化指标测定 大鼠股静脉取血后,静置, 3 000 r/min 离心 10 min 后得血清,采用速率法以丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、甘油三酯(TG)测定试剂盒操作方法,采用紫外可见分光光度计测定血清 ALT、AST 和 TG 值。

1.2.4 肝组织病理检查 根据卫生部发布的《保健食品检验与评价技术规范》(2003 年版)中“对化学性肝损伤有辅助保护功能检验方法”进行。解剖取肝脏,计算肝脏系数;10%福尔马林将肝组织固定,按常规做组织病理切片检查(石蜡包埋,H.E.染色),普通光学显微镜下观察并记录组织病理改变

情况。分别记录每个视野中各种病变所占视野的面积,并累计所观察视野的病变总分。评分标准见表 1。

表 1 病理损伤评分标准

Table 1 Scoring criteria of pathological lesion

细胞损伤观察情况	计分/分
大致正常	0
病变的肝细胞占整个视野的 1/4	1
病变的肝细胞占整个视野的 1/2	2
病变的肝细胞占整个视野的 3/4	3
病变的肝细胞占整个视野	4

1.2.5 数据处理 试验数据采用 SPSS 22.0 统计软件,组间采用单因素方差分析进行数据处理,以平均数±标准差表示,P<0.05,组间数据显著,P<0.01,组间数据极显著。

2 结果与分析

2.1 受试物对大鼠体重的影响

各组大鼠在试验初期(0 d)、中期(15 d)和末期(30 d)分别称重,结果见表 2。由表 2 可知,经过灌胃不同剂量的受试物 30 d 后,各试验组与 CCl₄ 模型组、阴性对照组相比,各个时期大鼠体重及增重差异均无显著性(P>0.05),表明该受试物对大鼠体重基本无影响。

2.2 受试物对大鼠血清中 ALT、AST、TG 的影响

由表 3 可知,阴性对照组大鼠血清各项生化指标均处于正常范围内,而 CCl₄ 模型对照组的血清 ALT 和 AST 较阴性对照组显著升高(P<0.01),说明 CCl₄ 致肝细胞损伤,其细胞膜通透性改变,ALT、AST 释放入血从而血清中 ALT、AST 水平升高,成功建立化学性肝损伤模型^[10]。3 个试验组中,在灌胃不同剂量的受试物后,其 ALT 和 AST 水平都有了相应程度的下降,其中试验 II、III 组较模型对照组差异极显著(P<0.01),试验 I 组的 ALT 值与模型对照组差异显著(P<0.05),AST 值虽无显著性差异,但是其 AST 值低于模型对照组。各试验组的 TG 值虽无显著性差异,但高剂量组的 TG 值仍接近于阴性对照组。因此,受试物在 1.08, 2.17, 4.33 g/kg bw(相当于人体推荐每公斤体重日摄入量的 5, 10, 20 倍)剂量时,具有降低 CCl₄ 致大鼠化学性肝损伤血清 ALT、AST 的作用,尤以高剂量组的效果最为明显。

2.3 受试物对大鼠肝脏系数的影响

由表 4 可知,模型对照组肝脏系数较阴性对照组显著增

表 2 受试物对大鼠体重的影响

Table 2 Effect of the test substance on the mice weight (n=8)

组别	受试物/ (g · kg ⁻¹ bw)	2%CCl ₄ / (mL · kg ⁻¹)	初期重/g	中期重/g	末期重/g	增重/g
阴性对照组	0.00	0	190.70±9.61	234.40±8.11	272.40±13.52	81.60±10.17
模型对照组	0.00	5	191.20±7.73	238.60±11.37	277.50±14.49	86.30±11.35
实验 I 组	1.08	5	190.40±8.34	236.90±10.28	268.30±9.25	77.90±9.11
实验 II 组	2.17	5	189.50±9.12	234.10±10.62	274.80±11.23	85.30±10.69
实验 III 组	4.33	5	191.10±7.97	233.80±9.91	282.60±14.26	91.50±12.74

表 3 受试物对大鼠血清 ALT、AST、TG 的影响[†]

Table 3 Effect of the test substance on the level of serum ALT, AST and TG in mice (*n*=8)

组别	受试物/ (g·kg ⁻¹ bw)	2% CCl ₄ / (mL·kg ⁻¹)	ALT/ (U·L ⁻¹)	AST/ (U·L ⁻¹)	TG/ (mmol·L ⁻¹)
阴性对照组	0.00	0	104.5±31.6	294.3±49.4	1.53±0.39
模型对照组	0.00	5	1191.1±404.5* *	945.2±364.7* *	1.47±0.36
试验Ⅰ组	1.08	5	750.8±414.9* *△	769.6±278.2* *	1.43±0.32
试验Ⅱ组	2.17	5	568.6±189.2* *△△	448.7±114.0* *△△	1.37±0.17
试验Ⅲ组	4.33	5	491.4±224.7* *△△	408.8±146.2△△	1.55±0.42

[†] 与阴性对照组相比,* P<0.05,* * P<0.01;与模型对照组相比,△ P<0.05,△△ P<0.01。

加(P<0.01),说明灌胃 CCl₄明显引起了大鼠肝损伤,肝脏肿胀效果明显。通过与模型对照组比较,各试验组大鼠的肝脏系数均呈不同程度的下降,其中高剂量组效果显著(P<0.01),且接近于阴性对照组。

2.4 受试物对大鼠肝组织病理学的影响

由表 5 可知,阴性对照组大鼠的肝脏结构基本正常,而 CCl₄则明显引起了肝损伤,导致大鼠肝小叶中心性肝细胞的气球样变、脂肪变性、胞浆凝集和肝细胞坏死等病变,说明模型建立成功。灌胃受试物的 3 个试验组中,高剂量组在气球样变、脂肪变性、胞浆凝集和肝细胞坏死的病理积分都明显低于模型对照组,且具有差异性显著(P<0.05),其他中、低剂量组各项指标较模型对照组虽没有明显降低(P>0.05),

表 4 受试物对大鼠肝脏系数的影响[†]

Table 4 Effect of the test substance on the liver coefficients of mice (*n*=8)

组别	受试物/ (g·kg ⁻¹ ·bw)	2% CCl ₄ / (mL·kg ⁻¹)	肝脏系数
阴性对照组	0.00	0	3.34±0.10
模型对照组	0.00	5	4.32±0.35* *
试验Ⅰ组	1.08	5	4.05±0.41* *
试验Ⅱ组	2.17	5	3.83±0.49* △
试验Ⅲ组	4.33	5	3.55±0.37△△

[†] 与阴性对照组相比,* P<0.05,* * P<0.01;与模型对照组相比,△ P<0.05,△△ P<0.01。

表 5 受试物对大鼠肝组织病理学的影响[†]

Table 5 Effect of the test substance on the liver histopathology of mice (*n*=8)

组别	受试物/ (g·kg ⁻¹ bw)	2% CCl ₄ / (mL·kg ⁻¹)	病理改变(积分)			
			气球样变	脂肪变性	胞浆凝集	肝细胞坏死
阴性对照组	0.00	0	0	0	0	0
模型对照组	0.00	5	2.50±0.62	1.58±1.39	1.21±0.97	0.95±0.82
试验Ⅰ组	1.08	5	2.26±0.76	1.33±1.12	0.89±0.53	0.82±0.97
试验Ⅱ组	2.17	5	1.98±1.03	1.15±0.96	0.72±0.65	0.54±0.63
试验Ⅲ组	4.33	5	1.61±0.94△	0.64±0.58△	0.41±0.36△	0.28±0.31△

[†] 与模型对照组相比,△ P<0.05,△△ P<0.01。

但仍呈减轻趋势,且随受试物的浓度增加,各项病变积分相对下降。

2.5 受试物保护化学性肝损伤的作用机理探讨

选用的葛根复合固体饮料以葛根、山楂、酸刺、黄秋葵、干姜、玉米肽和结晶果糖为原料,经生物技术、高新分离技术提取制备而成,整个生产过程对原料中的功效成分进行了最大限度的提取和活性保留,以保证其功效成分的高含量和强活性,而显示出良好的生理功效。

葛根中含有丰富的异黄酮类化合物和皂苷成分,其具有较好的抗氧化作用,可以不同程度地清除体内自由基,减少氧自由基和其他自由基对肝脏的损害,降低肝细胞脂质过氧化程度,提高体内抗氧化酶的活性,维持肝细胞膜的结构和功能的完整^[11-12]。同时研究^[13]表明,葛根粗提物可以一定程度上抑制乙醇引起的胃肠道通透性增加,从而起到保护肠粘膜的作用。此外,葛根提取物以及葛根素可以一定程度上

减少乙醇分解代谢过程中所产生的自由基,从而减轻免疫反应给肝细胞带来的损伤。徐茂红等^[14]发现葛根总黄酮能降低 CCl₄诱导的化学性肝损伤小鼠肝匀浆中 MDA、IFN-γ、TNF-α 的活性,推测其作用机制可能与减少细胞因子 TNF-α、IFN-γ 的表达有关。

玉米肽护肝效果同样明显,王双玉等^[15]通过建立小鼠酒精性肝损伤模型,观察到玉米肽剂量组小鼠肝匀浆中 MDA 含量明显降低,GSH-PX 活力明显升高,表明玉米肽具有良好的清除自由基和抗氧化能力,可对抗酒精所引起的肝脏脂质过氧化反应,清除酒精在肝脏中所产生的自由基,从而减轻肝细胞损伤。同时有研究^[16]发现,当肝脏发生急性损伤时,会使得人体血浆中支链氨基酸和芳香族氨基酸的分子比值下降。玉米肽因其具有高 F 值,能够有效维持血浆中支链氨基酸的浓度,从而减轻肝脏损伤。

CCl₄是典型的化学性肝损伤动物模型的毒剂,其机理主

要是其代谢过程中产生大量自由基 $\text{CCl}_3 \cdot$ 和 $\text{CCl}_3\text{OO} \cdot$,会破坏肝细胞膜上的磷脂分子从而引起脂质过氧化,破坏肝细胞膜结构达到致肝脏损伤的目的^[17],试验结果证明受试物对 CCl_4 所致大鼠化学性肝损伤有很好的保护作用,提示其可能通过上述机制发挥保肝作用,即抑制肝细胞膜脂质过氧化从而修复损伤的肝细胞。

此外,由于该固体饮料成分比较复杂多样,除上述提及的功效成分以外,其可能还含有其他的功能因子,尚待进一步的研究与探讨。

3 结论

试验结果显示,葛根复合固体饮料各剂量组大鼠与 CCl_4 模型组、阴性对照组大鼠体重数据并无显著性差异,说明受试物对动物体重基本无影响。 CCl_4 模型组大鼠血清中 ALT、AST 活性较阴性对照组显著升高($P<0.01$),说明 CCl_4 致大鼠肝细胞损伤成功,细胞膜通透性改变,血清中 ALT、AST 水平升高。灌胃不同剂量的受试物后,ALT、AST 水平都呈下降趋势,尤以中高剂量组效果明显($P<0.01$)。此外, CCl_4 模型组大鼠肝脏系数较阴性对照组显著增加($P<0.01$),肝脏肿胀严重,且观察到气球样变、脂肪变性、胞浆凝集和肝细胞坏死等病变现象。而同样受毒但灌胃不同剂量受试物的 3 个试验组的大鼠,其肝脏系数明显下降,肝组织病理改变也都呈不同程度的减轻,尤其是高剂量组的效果最为明显($P<0.05$)。因此,葛根复合固体饮料对试验动物具有良好的保护化学性肝损伤的作用。

参考文献

[1] 周吉银,周世文. 葛根总黄酮及葛根素解酒的药理研究进展[J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(9): 1 280-1 282.

[2] 王桐,石丽花. 三种天然护肝食品——松花粉、葛根、余甘子[J]. 农业工程技术: 农产品加工业, 2008(12): 43-44.

[3] 张闯,唐汉军,李琳,等. 复合型葛根保健茶的研制[J]. 食品与机械, 2013; 29(3): 238-241.

[4] 苏勇,李忠海,钟海雁,等. 葛根膳食纤维对小白鼠降血糖的影响[J]. 食品与机械, 2006, 22(5): 66-68.

(上接第 72 页)

安全威胁常态化和严重化发展的趋势,充分利用刑法对严重损害社会利益行为的有效遏制作用,是保证正常的食品安全管理秩序的必然选择。然而,中国当前的食品安全犯罪的刑事政策依然没有突破其固有的消极事后预防的传统,在很大程度上已经不能适应对食品安全实行全过程事中控制的积极预防的时代潮流,因此必须对其进行适应现代社会食品安全保证需要的转变。这种转变涉及到中国食品安全刑事政策的根本转向,本文仅从食品安全的定罪范围、量刑程度以及刑事规制作用等方面对其进行较为抽象的论述,以期能对中国食品安全犯罪的刑事政策研究提供一定的参考。

参考文献

[1] 张耀宇,邬春阳. 去年全国公安机关侦破危害食品安全犯罪案件

[5] 董英,徐斌,林琳,等. 葛根的化学成分研究[J]. 食品与机械, 2005, 21(6): 85-88.

[6] 宋小莉. 葛根对化学性肝损伤小鼠的保护作用[J]. 山东中医杂志, 2010(2): 121-122.

[7] 张建夫,陈亚红,黄香丽,等. 葛根与葛花解酒的功效研究[J]. 安徽农业科学, 2009(35): 17 505-17 506.

[8] 付萍,杨铭,陈颖丽,等. 玉米肽对小鼠酒精性肝损伤保护作用的研究[J]. 中国中医药科技, 2008(2): 115-116.

[9] YAMAGUCHI M, NISHIKORI F, YOSHIDA M, et al. Water soluble vegetable oligopeptides: comparative study on alcohol metabolism and plasma amino acid concentrations in stroke-prone spontaneously hypertensive rats[J]. Journal of Food Biochemistry, 1998, 22(3): 227-244.

[10] 隋玉杰,何慧,石燕玲,等. 玉米肽对半乳糖胺诱导肝损伤小鼠的保护作用[J]. 中国粮油学报, 2009(5): 36-39.

[11] CHANG Bo Yoon, LEE Dong-Sung, LEE Jun-Kyoung, et al. Protective activity of kudzu (Pueraria thunbergiana) vine on chemically-induced hepatotoxicity: in vitro and in vivo studies [J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2016, 16: 1-8.

[12] LIM Dong Wook, LEE Changho, KIM In-Ho, et al. Anti-inflammatory effects of total isoflavones from pueraria lobate on cerebral ischemia in rats[J]. Molecules, 2013, 18(9): 10 404-10 412.

[13] 高学清. 葛根和葛花的解酒护肝作用及其机理研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013: 9-11.

[14] 徐茂红,王菲菲,高燕,等. 大别山区产葛根黄酮对 CCl_4 诱导的小鼠化学性肝损伤保护作用[J]. 皖西学院学报, 2012(5): 92-94.

[15] 王双玉,李坤,阚国仕,等. 玉米抗氧化肽的制备及其对小鼠急性酒精性肝损伤的保护作用[J]. 食品研究与开发, 2007(3): 29-33.

[16] 沈蓓英,孙冀平. 高 F 值寡肽生理功能和制备[J]. 粮食与油脂, 1999(2): 27-30.

[17] 陈勇,程明,韩凤梅,等. CCl_4 肝损伤与免疫性肝损伤小鼠模型间差异性比较研究[J]. 实验生物学报, 2005(5): 55-60.

1.5 万起[N]. 人民公安报, 2016-06-15(004).

[2] 武晓红,王嘉琪. 食品安全权益刑法保障研究: 以两高涉危害食品安全司法解释为视角[J]. 兰州学刊, 2014(4): 174-179.

[3] 李莎莎. 非传统安全视角下食品安全犯罪的刑事政策及立法[J]. 河南大学学报: 社会科学版, 2014 (2): 48-55.

[4] 吕丹丹,刘晓莉. 协同治理模式下食品安全刑法规制的战略选择[J]. 学术探索, 2015(11): 63-68.

[5] 谭雅颖. 食品安全犯罪刑法规制的审视与完善[J]. 食品与机械, 2015, 31(6): 270-272.

[6] 陈君. 风险社会下公害犯罪之抽象危险犯[J]. 北京理工大学学报: 社会科学版, 2014(3): 120-124.

[7] 吴玉萍. 民生刑法视角下食品安全犯罪之刑法规制[J]. 齐鲁学刊, 2014(4): 103-109.

[8] 张磊. 我国食品安全犯罪刑事立法政策反思[J]. 学术探索, 2014 (10): 31-35.