

人参皂苷对酒精性肝损伤的保护作用研究

李晓宇¹, 李晶¹, 王一博¹, 葛岩¹, 刘淑莹^{1,2}, 越皓^{1*}

1. 吉林省人参科学研究院, 长春中医药大学, 吉林 长春 130117

2. 中国科学院长春应用化学研究所, 吉林 长春 130022

摘要: **目的** 研究人参皂苷提取物(GE)对酒精性肝损伤的保护作用与作用机制。**方法** 将ICR雄性小鼠分为正常对照组、阳性对照组(联苯双酯)、模型组及人参皂苷提取物高、中、低剂量组,建立慢性酒精性肝损伤模型,用人参皂苷提取物进行干预,ig给药30 d后,称取肝质量,计算肝脏系数,测定小鼠血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(AST)活力、三酰甘油(TG)、肝脏内丙二醛(MDA)和还原型谷胱甘肽(GSH)的含量,HE染色观察小鼠肝脏病理变化,综合评价人参皂苷提取物对小鼠酒精性肝损伤的保护作用。**结果** 人参皂苷提取物各剂量组能明显降低酒精性肝损伤小鼠的肝脏系数($P<0.05$)、血清TG的含量($P<0.01$),可降低其血清中ALT、AST活力($P<0.05$ 或 $P<0.01$),但与正常组ALT、AST活力仍有差异($P<0.05$);可在一定程度上降低肝组织中MDA含量($P<0.01$),增高肝组织中GSH含量($P<0.01$),减少肝组织病理损伤。**结论** 人参皂苷提取物对酒精性肝损伤有一定保护作用,其机制可能与抑制肝内脂肪堆积,抗氧化作用有关。

关键词: 红参; 人参皂苷; 酒精性肝损伤; 保护作用

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2015)05-0512-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2015.05.009

Protection of ginsenosides extract on alcoholic-induced hepatic injury of mice

LI Xiao-yu¹, LI Jing¹, WANG Yi-bo¹, GE Yan¹, LIU Shu-ying^{1,2}, YUE Hao¹

1. Jilin Ginseng Academy, Changchun University of Chinese Medicine, Jilin, Changchun, 130117, China

2. Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Jilin, Changchun, 130022, China

Abstract: Objective To investigate the hepatoprotective effects of ginsenosides extract (GE) on alcoholic-induced liver injury in mice. **Methods** ICR mice were randomly divided into six groups, including negative control group, positive control group (Bifendate), model group, and low-, mid-, high-dose GE groups. The model of alcoholic-induced liver injury was induced in ICR mice by 56° alcohol. The liver injury mice were intervened by GE for 30 d followed by liver weight and liver index. Meanwhile, the contents of serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) energy, triglyceride (TG), and malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) in the liver were determined. The pathological changes in mice liver were also observed. Comprehensive evaluation of GE on the protective effects of alcoholic liver injury in mice was performed. **Results** GE could obviously reduce the liver weight coefficient of alcoholic-induced liver injury in mice ($P<0.05$) and the content of TG in serum ($P<0.01$). The levels of ALT and AST in serum could be reduced ($P<0.05$ or 0.01), but it had difference from the normal group ($P<0.05$). To a certain extent, GE can reduce the MDA content in liver tissue homogenate ($P<0.01$), increase the content of GSH in liver tissue homogenate ($P<0.01$) and reduce the liver tissue pathological damage. **Conclusion** GE has certain protective effect on alcoholic liver injury in mice. The inhibitory effect of fat accumulation in the liver is more apparent. Ginsenosides could protect liver through the mechanism of anti lipid peroxidation.

Key words: red ginseng; ginsenosides; alcoholic-induced liver injury; hepatoprotection

人参与五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. 的加工品。人参与具有抗氧化、抗衰老、提高机体免疫力及护心保肝等药理作用。乙醇在体内主要经肝

收稿日期: 2015-06-29

基金项目: 吉林省科技发展计划(20130303101YY); 公益性行业(农业)专项(2013031106)

作者简介: 李晓宇(1991—), 女, 硕士, 研究方向为中药有效活性成分分析。Tel: 13252645950 E-mail: dadagongzhu1@163.com

*通信作者 越皓(1977—), 男, 吉林长春人, 研究员, 博士, 硕士研究生导师, 主要从事中药化学成分、药效物质基础和代谢。
Tel: (0431)86045467 E-mail: yuehao@sohu.com

脏代谢,其代谢物乙醛及代谢过程中产生的活性氧会对肝脏造成损害,长期饮酒和过量饮酒,会造成乙醇在体内堆积,对肝脏造成不同程度的损伤,损伤程度从轻到重表现为脂肪肝、肝纤维、肝硬化^[1],引起机体内天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、三酰甘油(TG)、丙二醛(MDA)等生化指标水平增高。人参皂苷是红参的主要活性成分,《中国药典》和国家标准均以人参皂苷为红参的考核指标。近年来,有研究发现红参具有保肝功能^[2-3],本文旨在研究人参皂苷提取物对小鼠酒精性肝损伤的防治作用,揭示作用机制,为红参的临床应用提供依据。

1 材料与仪器

1.1 仪器

Infinite M200pro 酶标仪(瑞士帝肯);Lecia-DM2500 微生物显微镜,德国 Lecia 公司。

1.2 药物与试剂

鲜人参,为5年生,产自吉林省抚松县,由长春中医药大学王淑敏教授鉴定为五加科人参属人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer 干燥根;联苯双酯滴丸(浙江万邦药业有限公司,批号 A02130407);56°北京红星二锅头酒(北京红星二锅头酒厂,批号 20140224);ALT 试剂盒、AST 试剂盒、MDA 试剂盒、GSH 试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20150112);TG 试剂盒(浙江东瓯生物工程有限公司,批号 2015040104)。

1.3 实验动物

清洁级 ICR 雄性小鼠,体质量 20~22 g,由吉林大学基础医学院动物实验中心提供,动物合格证号:SCXK-(吉)2014-005。

2 实验方法

2.1 红参炮制

称取鲜人参约 300 g,用纱布包好,放入蒸参箱,在 60 min 升温到 100 °C 后蒸制 6 h,蒸制完毕后置于 50 °C 烘干箱内烘干。将烘干后的红参研碎成粉,过 80 目筛。

2.2 人参皂苷提取物(Ginseng saponin extracts, GE)制备

称取红参粉末,加入 8 倍量 80%乙醇,超声提取(500 W, 100 Hz) 30 min,抽滤,滤渣加入 6 倍量乙醇超声 30 min,滤过,合并滤液,40 °C 水浴蒸干,加入适量水溶解,即得人参皂苷提取物(人参总皂苷含量为 3.84%),4 °C 下保存待用。

2.3 动物分组

取清洁级 ICR 雄性小鼠 72 只,正常喂养 5 d 后,将其按体重平均分为 6 组,分别为对照组、阳性组(联苯双酯)、模型组及 GE 高、中、低剂量组,每组 12 只。

2.4 动物造模及给药

给药剂量按照成人日均用量与小鼠给药量进行剂量换算,除对照组每天 ig 等体积的蒸馏水外,其余各组 ig 给予 56°白酒,给药剂量为 0.2 mL/20 g,1 次/d,造模 5 d。给药组给予 GE,低、中、高剂量组每日分别给予 0.38、0.75、1.13 g/kg 生药材浓度的 GE,阳性对照组给予联苯双酯 0.90 mg/kg,给药后 1 h 给予 56°白酒,1 次/d,连续 30 d。小鼠给药期间每周进行称质量并记录,并观察小鼠的毛色、饮食、行为及死亡情况。

2.5 样本采集

处理前禁食 12 h,给药及白酒 1 h 后,小鼠摘眼球取血,常温静置后待其凝固,3 000 r/min 离心 15 min,取血清,-80 °C 保存待测。采血后,迅速剖取肝脏,用冷生理盐水洗净,滤纸吸湿后,称取肝脏湿重,计算肝脏系数(肝脏系数=肝质量/体质量)。取肝右叶做 HE 染色,肝左叶制备 10%肝匀浆,匀浆制备方法:用冷生理盐水冲洗肝脏至无血色,称质量,加入 9 倍量冷生理盐水机械匀浆,将匀浆液 2 500 r/min 离心 20 min,4 °C,取上清。

2.6 生化指标检测

每组取同等样本量的小鼠血清及肝匀浆,严格按照试剂盒操作方法进行小鼠血清 ALT、AST、TG、肝匀浆 MDA、GSH 含量测定。

2.7 肝组织病理学检查

取小鼠肝脏右叶置于 10%中性福尔马林中进行固定,经一定梯度浓度的乙醇脱水、石蜡包埋、切片进行 HE 染色,用显微镜观察肝组织病理变化。

2.8 数据处理

应用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析,采用单因素方差分析,组间比较采用最小显著差数法(LSD),数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 小鼠状况观察

试验期间,GE 中剂量组及阳性组死亡小鼠 4 只,其余各组死亡小鼠 2 只。对照组小鼠精神状态正常,毛色正常,模型组小鼠毛色较差,造模期间,ig 给予白酒后 20 min 左右,出现醉酒状态,不自主

行为增多,爬行不稳,有些小鼠呈现昏睡状态,给药组小鼠给予白酒 20 min 后,醉酒状态较模型组稍好。

3.2 体质量及肝脏系数变化

各组小鼠体质量无统计学差异,与对照组相比,模型组小鼠肝质量增大 ($P<0.05$),表明长期饮酒和乙醇的堆积造成小鼠肝脏受损肿大,质量增加可能与肝脏内脂肪堆积或其他物质生成有关。给药组小鼠肝脏系数相较模型组有明显降低 ($P<0.05$),GE 高、中、低剂量组均有降低,但组间变化趋势不明显,GE 对酒精引起的小鼠肝脏受损肿大有一定的缓解作用。见表 1。

表 1 不同剂量 GE 对小鼠体质量、肝质量及肝脏系数影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of different doses of GE on body, liver weights, and liver index in mice with alcoholic- induced liver injury ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n	体质量/g	肝质量/g	肝脏系数%
对照	—	10	34.50±4.62	1.37±0.21	3.96±0.13
模型	—	10	34.55±2.69	1.59±0.12*	4.62±0.19**
GE	0.38	10	35.28±4.02	1.59±0.29	4.41±0.43 [#]
	0.75	8	36.92±3.28	1.50±0.21	4.14±0.31 ^{##}
	1.13	10	33.90±4.20	1.41±0.12 [#]	4.34±0.46 [#]
联苯双酯	9×10 ⁻⁴	8	32.90±2.90	1.36±0.18 [#]	4.12±0.34 ^{##}

与对照组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$; 下表同

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$ vs model group; same as below

表 2 不同剂量 GE 对小鼠血清 ALT、AST 和 TG 水平影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of different doses of GE on levels of ALT, AST, and TG in serum of mice with alcoholic- induced liver injury ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	10	18.14±5.83	68.02±8.06	0.25±0.05
模型	—	10	37.65±5.54*	82.06±13.9*	0.37±0.05**
GE	0.38	10	26.39±8.09 ^{##}	62.08±7.30 ^{##}	0.17±0.03 ^{##}
	0.75	8	24.69±1.81 ^{##}	78.00±7.74 ^{##}	0.22±0.03 ^{##}
	1.13	10	38.80±8.80*	72.26±16.09 ^{##}	0.18±0.03 ^{##}
联苯双酯	9×10 ⁻⁴	8	25.98±8.73 [#]	54.15±21.14 ^{##}	0.19±0.03 ^{##}

3.4 对小鼠肝脏 MDA、GSH 的影响

小鼠肝匀浆 MDA 含量结果显示,模型组小鼠 MDA 含量高于对照组 ($P<0.01$),GE 各剂量组 MDA 含量低于模型组 ($P<0.01$)。模型组 GSH 含量低于对照组 ($P<0.01$),GE 各剂量组 GSH 含量高于模型组 ($P<0.01$),GE 可降低 MDA 含量,增加 GSH 含量,说明其可在一定程度上抵御肝脏内的氧化作用,从而保护肝脏进一步损伤。见表 3。

3.5 病理观察结果

正常组肝细胞结构正常,肝细胞条索排列整齐;模型组肝细胞变性坏死,有炎性细胞浸润,脂泡小而密集;联苯双酯组炎性细胞浸润和坏死程度减轻,

3.3 对小鼠血清 ALT、AST、TG 的影响

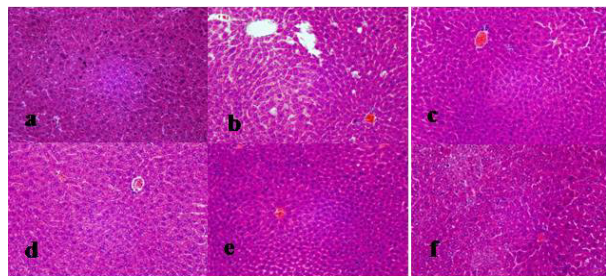
与对照组相比,模型组小鼠血清 ALT ($P<0.05$)、AST ($P<0.05$)、TG ($P<0.01$) 含量明显升高;与模型组相比,GE 高、中剂量组 ALT 含量降低 ($P<0.01$),GE 各剂量组均能降低 AST 和 TG 水平 ($P<0.01$),联苯双酯组可明显降低 ALT、AST 水平。但 GE 高、中、低剂量组间呈现的量效关系不明显。长期白酒灌胃会造成小鼠血清 ALT、AST、TG 含量增高,GE 可明显降低血清 TG 的含量,对 ALT、AST 含量降低有一定作用,说明 GE 对小鼠酒精性肝损伤有一定保护作用。见表 2。

表 3 不同剂量 GE 对小鼠肝内 MDA 和 GSH 水平影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of different doses of GE on levels of MDA and GSH in liver tissue of mice with alcoholic- induced liver injury ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n	MDA/(μmol·g ⁻¹)	GSH/(μmol·g ⁻¹)
对照	—	10	2.99±0.56	8.41±1.28
模型	—	10	4.40±0.65**	3.50±0.43**
GE	0.38	10	2.96±0.92 ^{##}	10.21±1.29 ^{##}
	0.75	8	3.14±0.74 ^{##}	10.25±1.81 ^{##}
	1.13	10	3.68±0.77	10.63±1.89 ^{##}
联苯双酯	9×10 ⁻⁴	8	2.76±0.46 ^{##}	6.43±2.01 ^{##}

GE 中、高组也可见一定的炎性细胞浸润,但程度较模型组轻,小而密集的脂泡明显减少,见图1。



a-对照组; b-模型组; c-GE 低剂量组; d-GE 中剂量组; e-GE 高剂量组; f-阳性组
a-control group; b-model group; c-low-dose GE group; d-mid-dose GE group; e-high-dose GE group; f-positive group

图1 各组小鼠肝脏病理学观察(HE染色)

Fig. 1 Histopathological observation on hepatic tissue of mice in each group (HE staining)

4 讨论

本研究采用长期、固定剂量的酒精灌胃造模方法^[4-5]来模拟长期饮酒的状态,形成慢性酒精性肝损伤模型。通过实验观察,长期灌胃白酒的小鼠,不自主行为增多,会出现嗜睡、四肢无力、食欲减退、呼吸衰竭等状态,模型组小鼠的生化指标也表明长期白酒灌胃引起的肝功能的损伤,长期、固定剂量的酒精灌胃引起小鼠慢性酒精性肝损伤是可行的。

ALT、AST 是检验肝脏损伤的一个重要指标,正常血清里 ALT、AST 含量极少,只有在肝细胞死亡破裂后肝细胞内的 ALT、AST 才会释放入血,血清中 ALT、AST 含量增加说明肝脏出现炎症。乙醇经肝脏代谢过程中产生的活性氧会直接对肝细胞造成氧化损伤^[6],形成过脂质氧化产物——MDA,其含量是细胞氧化损伤的一个重要检测指标。模型组小鼠肝组织 MDA 含量高于正常组,GSH 含量低于正常组,肝脏长期的酒精代谢会造成肝脏内氧化物质的增多,还原物质减少,造成肝细胞氧化损伤。同时肝脏脂质过氧化会产生脂肪酸的氧化,影响肝脏微管功能,致使肝脏内 TG 代谢障碍,长期的乙醇摄入,不仅增大了小鼠的肝质量、肝脏系数,也致使模型组小鼠较正常组小鼠 TG 的量明显增多。

红参醇提液中的成分主要是人参皂苷,红参中含有 20 多种人参皂苷,如人参皂苷 Re、Rb₁、Rh₁、Rh₂、Rd 等,其人参皂苷 Rg₃、Rg₂、Rh₁ 的含量高于白参^[7]。研究发现人参皂苷 20 (S)-人参皂苷 Rg₃ 可明显抑制肝损伤小鼠 ALT、AST 的酶活性^[8],人

参皂苷 Rb₁ 可明显降低大鼠肝微粒体细胞色素 P450 酶与 NADPH-P450 的活性^[9],人参皂苷 Rh₂ 可抑制肝纤维 DNA 的合成^[10]等。通过本研究发现,GE 可明显降低长期白酒灌胃小鼠血清中 TG 的含量,对降低其 ALT、AST 作用不明显,对抑制肝脏内 MDA 的含量,增加 GSH 含量有一定作用,对长期饮酒所造成的肝损伤有一定的预防和保护作用,从而阻止肝脏向纤维化进一步恶化。GE 中、高剂量组与模型组的病理观察比较,GE 可在一定程度上抑制肝细胞炎症发生,但抑制效果不明显,但可以显著减少小而密集的脂肪泡数量,GE 中、高剂量组可明显抑制肝脏内的泡样损伤。GE 可能主要通过抑制体内活性氧对肝脏脂质过氧化、减少肝脏脂肪堆积这一途径来避免肝脏受损。

综合以上结果,人参皂苷提取物对小鼠酒精性肝损伤有一定的保护作用,以中、高剂量效果最好,但红参保肝机制尚不明确,此研究为红参的保健开发和治疗酒精性肝损伤提供了一定的参考。

参考文献

- [1] 赵洁,雷金燕. 酒精性肝病的研究进展 [J]. 北京中医药, 2009, 28(11): 907-908.
- [2] Scott Luper N D. A review of plants used in the treatment of liver disease: Part 1 [J]. *Liver Dis*, 1998, 3(6): 410-421.
- [3] 董亚男,陈逸云,叶青艳,等. 不同剂型垂盆草对急性肝损伤大鼠的防治作用 [J]. 药物评价研究, 2013, 36(6): 426-430.
- [4] 李有贵. 竹节人参皂苷对乙醇性肝损伤的保护机理研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2011.
- [5] 杜正彩,邓家刚,黄慧学,等. 芒果叶醇提取物对小鼠急性酒精性肝损伤的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(22): 250-253.
- [6] Masalkar P D, Abhang S A. Oxidative stress and antioxidant status in patients with alcoholic liver disease [J]. *Clin Chim Acta*, 2005, 335(1-2): 61.
- [7] Kitagawa I, Yoshikawa M, Yoshihara M, et al. Chemical studies on crude drug precession I on the constituents of ginseng radix rubra(1) [J]. *Yakugaku Zasshi*, 1983, 103: 612.
- [8] Lee H U, Bae E A, Han M J, et al. Hepatoprotective effect of 20 (S)-ginsenosides Rg₃ and its metabolite 20 (S)-ginsenoside Rh₂ on tert-butyl hydroperoxide-induced liver injury [J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28(10): 1992-1994.
- [9] Park K H, Shin H J, Song Y B, et al. Possible role of ginsenoside Rb1 on regulation of rat liver triglycerides [J]. *Biol Pharm Bull*, 2002, 25(4): 457-460.
- [10] Byun B H, Shin I L, Lee L. Antiproliferative effects of *Panax ginseng* ginsenosides on DNA synthesis in cultured mouse fibroblasts [J]. *Koryo Insam Hakhoechi*, 1995, 19(2): 114.