

荆防颗粒对急性醉酒模型小鼠的解酒作用及作用机制

高 铭^{1,2}, 张 霞^{1,2}, 罗戴民^{1,2}, 杨若聪^{1,2}, 饶志粒^{1,2}, 曾 南^{1,2*}

1. 西南特色中药资源国家重点实验室, 四川 成都 611137

2. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

摘要: **目的** 建立小鼠醉酒模型, 探究荆防颗粒的解酒作用及其作用机制。 **方法** 将雌雄各半 SPF 级昆明种小鼠随机分为模型组和荆防颗粒组, 模型组 ig 生理盐水, 荆防颗粒组 ig 荆防颗粒 30 min 后, 小鼠 ig 56° 红星二锅头 (17 mL/kg) 构建急性醉酒模型, 以翻正反射消失/恢复时间评价各组小鼠醉酒潜伏期和睡眠时间, 并计算醉酒率; 转棒实验观察小鼠 ig 白酒 10 min 后的在棒时间, 并观察小鼠胃黏膜损伤情况。进一步基于急性醉酒小鼠模型, 观察药物对小鼠肝组织酒精代谢酶乙醇脱氢酶 (alcohol dehydrogenase, ADH)、过氧化氢酶 (catalase, CAT)、细胞色素 P450 第二家族 E 亚型多肽 1 (cytochrome P4502E1, CYP2E1)、乙醛脱氢酶 (acetaldehyde dehydrogenase, ALDH) 的调节作用; Western blotting 考察荆防颗粒对细胞自噬通路相关蛋白表达的影响。 **结果** 与模型组比较, 荆防颗粒降低小鼠醉酒率, 并明显延长小鼠在棒时间及减轻胃黏膜损伤, 表现出解酒作用; 荆防颗粒显著提高模型小鼠肝组织 ADH、CAT 活力 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 逆转过量饮酒导致的 CYP2E1 蛋白表达升高 ($P < 0.001$), 升高模型小鼠肝组织 ADH1、ALDH2 蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01); 明显上调模型小鼠肝组织微管相关蛋白 1 轻链 3II (microtubule-associated protein1 light chain 3II, LC3II)/LC3I 值 ($P < 0.01$), 降低 p62 蛋白表达 ($P < 0.05$)。 **结论** 荆防颗粒能降低小鼠醉酒率, 改善过度饮酒引起的中枢抑制及胃黏膜损伤表现, 呈现出解酒作用; 其作用机制可能与提高酒精代谢酶 ADH、CAT、ALDH 活力或表达以加速机体酒精代谢, 激活自噬, 缓解 CYP2E1 诱导的损伤有关。

关键词: 解酒; 荆防颗粒; 酒精代谢; 自噬; 急性醉酒模型小鼠

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2023)04-1164-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.04.016

Anti-drinking effect and mechanism of Jingfang Granules on acute drunkenness model mice

GAO Ming^{1,2}, ZHANG Xia^{1,2}, LUO Dai-min^{1,2}, YANG Ruo-cong^{1,2}, RAO Zhi-li^{1,2}, ZENG Nan^{1,2}

1. State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, Chengdu 611137, China

2. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective To investigate the anti-drinking effect and mechanism of Jingfang Granules (荆防颗粒) by establishing a mouse model of drunkenness. **Methods** Male and female half SPF grade Kunming mice were randomly divided into model group and Jingfang Granules group. After ig saline in model group and ig Jingfang Granules in Jingfang Granules group for 30 min, mice were ig liquor (17 mL/kg) to establish an acute intoxication model. The intoxication latency and sleep time of each group were evaluated by the disappearance/recovery time of righting reflex, and intoxication rate was calculated. The stick-turning experiment was conducted to observe the in-stick time of the mice after taking liquor for 10 min and to observe the damage to the gastric mucosa of the mice. Based on an acute intoxication mouse model, the effect of Jingfang Granules on alcohol metabolism enzymes such as alcohol dehydrogenase (ADH), catalase (CAT), cytochrome P450 second family E subtype polypeptide 1 (CYP2E1) and acetaldehyde dehydrogenase (ALDH) in liver tissue of mice were evaluated; Effect of Jingfang Granules on the expression of proteins related to the autophagy pathway were observed by Western blotting. **Results** Compared with model group, Jingfang Granules reduced the rate of intoxication and prolonged the time of mice on the stick, and alleviated the gastric mucosal damage, which showed the effect of an alcohol reliever; Jingfang Granules significantly increased ADH and CAT activity in liver tissues of model mice ($P < 0.05$, 0.01 , 0.001),

收稿日期: 2022-09-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82074094); 西南特色中药资源国家重点实验室开放研究基金项目 (2020XSGG002)

作者简介: 高 铭, 硕士研究生, 研究方向为中药药理与毒理。E-mail: 1500972433@qq.com

*通信作者: 曾 南, 教授, 博士生导师, 主要从事中药药理和毒理学研究。E-mail: zengnan966@126.com

reversed the increase in CYP2E1 expression caused by excessive alcohol consumption ($P < 0.001$), and increased the expression of ADH1 and ALDH2 in liver tissue of model mice ($P < 0.05, 0.01$), significantly up-regulated the expression ratio of microtubule-associated protein1 light chain 3II (LC3II)/LC3I in liver tissue ($P < 0.01$) and reduced the expression of p62 protein ($P < 0.05$).

Conclusion Jingfang Granules could reduce the rate of intoxication in mice, and improve the manifestation of central inhibition and gastric mucosal damage caused by excessive alcohol consumption, which presents an antidotal effect. Its mechanism may be related to increasing the activity or expression of alcohol-metabolizing enzymes such as ADH, CAT and ALDH, which accelerate alcohol metabolism and activate autophagy to alleviate the CYP2E1-induced damage.

Key words: detoxification; Jingfang Granules; alcohol metabolism; autophagy; acute drunkenness model mice

自古以来,酒精与人类的文化生活密切相关。然而过量饮酒会引起急性、慢性酒精中毒,给身体带来许多危害,如增加心脏负担、破坏肝细胞结构,引起消化、心血管及神经系统在内的多组织器官损伤,导致人体出现头昏、恶心、呕吐、动作迟缓、记忆力减退、昏迷等症状,严重时致死亡^[1-2]。为缓解单次过量饮酒给机体造成的损害,提高大众健康质量,解酒护肝产品的研发成为研究热点。荆防颗粒源自荆防败毒散,该方最早记载于明代张时彻《摄生众妙方》,由荆芥、防风、羌活、独活、柴胡、川芎、桔梗、前胡、枳壳、茯苓、甘草 11 味中药组成,具有发汗解表、散风祛湿之功效^[3-4]。研究报道,荆防颗粒连续 ig 给药 8 周对四氯化碳诱导的小鼠肝纤维化有明显保护作用,可降低模型小鼠血清天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)活性及总胆汁酸(total bile acid, TBA)和三酰甘油(triglyceride, TG)水平,并减轻肝细胞变性、坏死及炎性细胞浸润;同时发现荆防颗粒能降低肝组织丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量,提高超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性和谷胱甘肽(glutathione, GSH)水平^[5],表明荆防颗粒对机体主要解毒器官——肝脏有一定保护作用。荆防败毒散加减方单次预防给药能明显降低急性酒精中毒小鼠醉酒率并延长醉酒潜伏期;单次治疗给药可降低急性酒精中毒小鼠血液乙醇浓度,提高小鼠肝脏和胃组织乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADH)、SOD 活性,降低 MDA 含量,促进酒精代谢,表现出良好解酒促醒作用^[6]。上述实验结果表明荆防败毒散对四氯化碳和酒精引起的肝脏损伤有保护作用,本课题组既往研究亦发现荆防颗粒能降低醉酒小鼠血液中乙醇含量,其解酒作用可能与激活磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)通路有关^[7]。一般而言,摄

入机体的酒精 90%以上会经胃肠道吸收,仅少量通过呼吸、汗液、尿液等排出体外。由胃肠道吸收的部分酒精在胃肠道的首过代谢下被氧化,更多的酒精则是通过门静脉进入肝脏,经肝脏内丰富的酶进行代谢^[8]。此外,进入血液循环后的少量酒精还可透过血脑屏障,由大脑中的酶系统代谢。总之,进入肝脏的酒精通过氧化途径和非氧化途径进行代谢,前者主要涉及 ADH 和微粒体乙醇氧化系统(microsomal ethanol oxidizing system, MEOS)如细胞色素 P450 第二家族 E 亚型多肽 1(cytochrome P4502E1, CYP2E1)和过氧化氢酶(catalase, CAT),后者参与酒精代谢的比例较低,一般是在酶介导下酒精与内源性代谢物如葡萄糖醛酸、硫酸盐、磷脂和脂肪酸的结合,生成相应代谢物^[9]。本研究基于前期研究基础及部分人群服用体验结果,构建小鼠急性醉酒模型,拟进一步明确荆防颗粒的解酒效应表现及可能相关的作用机制,旨在为荆防颗粒临床应用的拓展提供一定科学依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级昆明种小鼠,雌雄各半,体质量 18~22 g,购自北京斯贝福实验动物有限公司,许可证号 SCXK(京)2019-0010。动物饲养于成都中医药大学药学院动物观察室,许可证号 SYXK(川)2020-124。所有动物均自由进食进水,在明暗各 12 h 的环境中饲养,光照时间为 8:00~20:00 时,环境温度保持在(22±2)℃。本实验符合动物实验伦理学要求,获成都中医药大学实验动物伦理委员会的批准(批准号 20200320)。

1.2 药品与试剂

荆防颗粒(批号 0012008009)购自山东新时代药业有限公司;N-乙酰-L-半胱氨酸(N-acetyl-L-cysteine, NAC, 批号 824O033)购自北京索莱宝科技有限公司;56° 红星二锅头(批号 20191204)购自北京红星股份有限公司;CAT 检测试剂盒(批号

071321220513)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺)/还原型辅酶 I(nicotinamide adenine dinucleotide, NADH)检测试剂盒(批号 052021220128)购自碧云天生物技术有限公司;小鼠 ADH 试剂盒(批号 8AKF434LSX)购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;ADH1 兔抗(批号 5295S)、p62 兔抗(批号 23214S)购自美国 CST 公司;CYP2E1 兔抗(批号 54i7601)购自 Affinity Antibody 公司;乙醛脱氢酶 2(acetaldehyde dehydrogenase 2, ALDH2)兔抗(批号 323861)、微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein1 light chain 3, LC3)兔抗(批号 334372)购自上海艾比玛特医药科技有限公司;β-actin 兔抗(批号 AC220227008)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)兔抗(批号 AC2111013A)、β-tubulin 兔抗(批号 AC2101019B)购自武汉赛维尔公司;HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(批号 BST17G08A17H54)购自博士德生物公司。

1.3 仪器

MDF-U50V 型超低温冰箱(日本 Sanyo 公司);UPT-2-5T 型超纯水仪(成都优普电子产品有限公司);ZB-200 型疲劳转棒仪(成都泰盟软件有限公司);KZ-II 型高效组织研磨仪(武汉赛维尔生物科技股份有限公司);ST16R 型低温高速冷冻离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);DYY-6C 型电泳仪电源(北京市六一仪器厂);ChemiDocXRS+化学发光成像系统、ImageLab 凝胶分析系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 荆防颗粒预防给药对小鼠的解酒作用

将 SPF 级昆明种小鼠适应性喂养 3 d 后,按体质量分层随机分为模型组和荆防颗粒高、中、低剂量(15、10.5、5.25 g/kg)组,每组 20 只,雌雄各半。实验前小鼠禁食不禁水 12 h,实验当日各给药组 ig 相应药物(20 mL/kg),模型组 ig 等体积生理盐水,给药 30 min 后,各组小鼠 ig 56° 红星二锅头(17 mL/kg),随即观察小鼠行为状态,小鼠醉酒以翻正反射消失为标准:小鼠背向下的姿势保持 30 s 以上,则认为翻正反射消失,即为醉酒,计算各组小鼠醉酒率。记录各组小鼠醉酒潜伏期时间(从 ig 白酒到翻正反射消失的时间)和睡眠时间。以小鼠 ig 白酒的时间开始计时观察 8 h,若 8 h 后醉酒状态仍然未恢复的小鼠,按照 480 min 进行计

算。根据本次实验中荆防颗粒 3 个剂量组对急性醉酒模型小鼠醉酒率的影响结果,选择具有明显效应的 2 个剂量开展后续醉酒小鼠在棒时间及胃黏膜损伤实验研究,并重复观察小鼠醉酒率。

$$\text{醉酒率} = \frac{\text{醉酒小鼠只数}}{\text{该组小鼠总只数}}$$

2.2 荆防颗粒预防给药对醉酒小鼠在棒时间及胃黏膜损伤的影响

SPF 级昆明种小鼠适应性喂养 3 d 后,按体质量分层随机分为 4 组,雌雄各半,其中对照组 8 只,4 个处理时间批次(给酒后 30、60、90、120 min)的模型组 50 只、荆防颗粒 15 g/kg 组 40 只及荆防颗粒 10.5 g/kg 组 40 只。各组小鼠禁食不禁水 12 h 后,实验当日各给药组 ig 相应药物(20 mL/kg),模型组 ig 等体积生理盐水,给药 30 min 后,除对照组外,其余各组小鼠 ig 56° 红星二锅头(17 mL/kg),对照组 ig 等体积的生理盐水。ig 56° 红星二锅头(17 mL/kg) 10 min 后将未进入醉酒状态的小鼠放在转棒仪上,观察记录小鼠在棒时间,观察时间为 2 min,超过 2 min 未掉下者按 2 min 计,同法观察对照组小鼠 ig 生理盐水 10 min 后的在棒时间。4 个处理时间批次的小鼠分别于给酒后 30、60、90、120 min 处死并剖取胃,结扎胃部贲门和幽门,以 2 mL 10%福尔马林固定 5 min 后,沿胃大弯剖开,观察酒精对胃黏膜的影响。对照组小鼠同法取样观察。采用半定量分析方法,损伤程度按照整个胃黏膜中肉眼观察到的胃出血点数目作为分级计分标准,见表 1。

表 1 胃黏膜肉眼观察评分标准

Table 1 Gastric mucosa visualization scoring standard

损伤程度	出血点/个	得分/分
未见异常	0	0
轻度病变	1	1
中度病变	2	2
重度病变	≥3	3

2.3 荆防颗粒预防给药对醉酒小鼠酒精代谢酶活性及自噬相关蛋白表达的影响

SPF 级昆明种小鼠适应性喂养 3 d 后,按体质量分层随机分为 5 组,雌雄各半,分别为对照组 8 只,模型组 12 只,荆防颗粒高、低剂量(15、10.5 g/kg)组各 12 只和 NAC(300 mg/kg)组 12 只。小鼠禁食不禁水 12 h 后,实验当日各给药组 ig 相应药物(20 mL/kg),对照组和模型组 ig 等体积生理盐水,给药 1 h(依据预试验结果)后,除对照组外,其余各组

小鼠 ig 56° 红星二锅头 (17 mL/kg), 对照组 ig 等体积的生理盐水。ig 白酒 1 h (酒后 30~60 min 血液乙醇浓度可达高峰^[10]) 后小鼠眼眶取血并颈椎脱臼处死, 剖取肝脏、胃组织将其冻存备用。取肝脏、胃组织, 按试剂盒说明书加入提取液, 进行组织研磨, 制成 10% 组织匀浆, 检测肝组织中 ADH、CAT 活力以及肝、胃组织中 NAD^+/NADH 值。

加入 RIPA 裂解液提取肝组织总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 调等浓度后, 加上样缓冲液使蛋白变性。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 用 5% 牛血清白蛋白溶液封闭 90 min, 分别加入一抗 ADH1 (1:1000)、CYP2E1 (1:1000)、ALDH2 (1:2000)、LC3 (1:1000)、p62 (1:1000)、 β -actin (1:2000)、GAPDH (1:2000)、 β -tubulin (1:2000), 4 °C 孵育过夜, 洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入二抗 (1:5000) 孵育 90 min, 再次洗膜后在显影成像仪中显色曝光, 采用 Image Lab 6.0.1 软件分析条带。

2.4 统计学分析

采用 SPSS 26.0 软件进行数据统计, 以 $\bar{x} \pm s$ 表

示, 计量数据符合正态性分布的采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 或 t 检验, 不符合正态者则采用非参数检验法分析。

3 结果

3.1 荆防颗粒预防给药对小鼠的解酒作用

以小鼠 ig 白酒至翻正反射消失的时间为醉酒潜伏期, 翻正反射消失至翻正反射恢复的时间为小鼠睡眠时间。如表 2 所示, 模型组小鼠的醉酒率为 90%, 而荆防颗粒 (15、10.5、5.25 g/kg) 组小鼠的醉酒率分别为 0、25%、75%, 表明荆防颗粒预防给药具有一定解酒作用, 尤以 15、10.5 g/kg 剂量组效果明显。后续在棒时间实验中重复观察了 15、10.5 g/kg 剂量组小鼠的醉酒率, 结果表明模型组小鼠醉酒率为 90%, 而荆防颗粒 15、10.5 g/kg 剂量组小鼠醉酒率分别为 7.31%、10%; 进一步在解酒机制研究实验中, 再次观察荆防颗粒对小鼠醉酒率的影响, 结果表明模型组、荆防颗粒 15、10.5 g/kg 以及 NAC 组的醉酒率分别为 75%、8%、17% 和 67%。综上, 荆防颗粒 15、10.5 g/kg 预防给药具有明确解酒作用, 能显著降低醉酒率。

表 2 荆防颗粒对小鼠醉酒率及醉酒时间的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 20$)

Table 2 Effect of Jingfang Granules on rate and duration of intoxication in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 20$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	出现醉酒的小鼠数/只	醉酒潜伏期/min	睡眠时间/min	醉酒率/%	死亡率/%
模型	—	18	77.60 ± 58.72	312.67 ± 189.75	90	5
荆防颗粒	15	0	0 ^{###}	0 ^{###}	0	0
	10.5	5	66.20 ± 36.94	331.74 ± 177.25	25	0
	5.25	15	64.27 ± 51.49	319.47 ± 148.28	75	0

与模型组比较: ^{###} $P < 0.001$

^{###} $P < 0.001$ vs model group

3.2 荆防颗粒预防给药对小鼠在棒时间的影响

转棒实验主要检测啮齿类动物运动功能, 当其中枢神经系统损害或药物对其运动协调功能产生影响时, 可通过测量动物在滚筒上行走的持续时间评定。小鼠过量饮酒后, 中枢神经系统被抑制, 协调性会变差, 致使小鼠很快从转棒上掉落, 在棒时间缩短。如表 3 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠 ig 白酒 10 min 后, 在转棒仪上的时间明显缩短 ($P < 0.001$), 提示动物出现步态、平衡功能障碍; 与模型组比较, 荆防颗粒能延长模型小鼠的在棒时间。

3.3 荆防颗粒对醉酒小鼠胃黏膜的影响

急性大量饮酒会直接损伤胃黏膜, 甚至造成胃出血, 因此在解酒实验中同时观察荆防颗粒对胃黏膜的保护作用。如图 1 和表 4 所示, 与模型组比较,

表 3 荆防颗粒对小鼠 ig 白酒 10 min 后在棒时间的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of Jingfang Granules on stick time of mice after 10 min ig liquor ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n/只	在棒时间/s	延长率/%
对照	—	8	2.88 ± 0.84	638.5
模型	—	28	0.39 ± 0.50 ^{***}	—
荆防颗粒	15	24	0.83 ± 0.64	112.8
	10.5	26	1.50 ± 1.75	284.6

与对照组比较: ^{***} $P < 0.001$

^{***} $P < 0.001$ vs control group

小鼠 ig 白酒后 30、60、90、120 min, 荆防颗粒 15、10.5 g/kg 剂量组小鼠胃黏膜损伤程度有明显减轻表现 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 小鼠胃黏膜出血表现有所缓解, 出血点数显著降低。

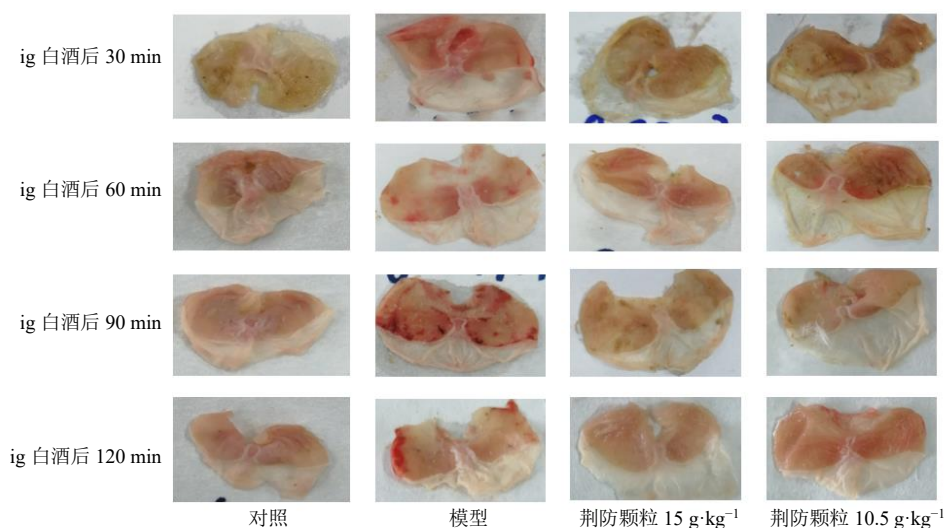


图 1 荆防颗粒对醉酒小鼠胃黏膜损伤的影响

Fig. 1 Effect of Jingfang Granules on gastric mucosal damage in intoxicated mice

表 4 荆防颗粒对醉酒小鼠胃黏膜损伤的影响 ($\bar{x} \pm s$)Table 4 Effect of Jingfang Granules on gastric mucosal damage in intoxicated mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	给酒后 30 min		给酒后 60 min		给酒后 90 min		给酒后 120 min	
		n/只	损伤分值	n/只	损伤分值	n/只	损伤分值	n/只	损伤分值
对照	—	8	0	8	0	8	0	8	0
模型	—	10	0.80 ± 1.23*	10	0.90 ± 1.28*	6	1.83 ± 1.17***	9	1.56 ± 1.33*
荆防颗粒	15	6	0 [#]	6	0 [#]	6	0 ^{###}	6	0 ^{##}
	10.5	6	0 [#]	7	0 [#]	8	0 ^{###}	7	0 ^{##}

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$, 下表同* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs model group, same as below tables

3.4 荆防颗粒对醉酒小鼠肝、胃组织 NAD⁺/NADH 值的影响

NAD 是存在于所有细胞中的一种辅酶, 包括 NAD⁺ (氧化型) 和 NADH (还原型) 2 种形式。乙醇代谢过程中, 其首先在 ADH 的作用下氧化成乙醛, 此过程中 NAD⁺ 被还原成 NADH。因此通过比较各组 NAD⁺/NADH 值, 可间接判断 ADH 活力。如表 5 所示, 与模型组比较, 荆防颗粒 (15、10.5 g/kg) 组胃组织 NAD⁺/NADH 值均显著降低 ($P < 0.05$), 荆防颗粒 (15 g/kg) 组小鼠肝组织 NAD⁺/NADH 值显著降低 ($P < 0.05$), 说明荆防颗粒促进

了 NAD⁺ 向 NADH 的转化, 增加了 NADH, 表明药物可提高 ADH 对乙醇的代谢能力。

3.5 荆防颗粒对醉酒小鼠肝组织 ADH、CAT 活性的影响

ADH 是机体代谢酒精最主要的酶, 荆防颗粒可促进 NAD⁺ 被还原成 NADH, 提示药物对该酶活性有提高作用; CAT 分布非常广泛, 在肝脏、肾脏和红细胞中水平高, 是清除能导致氧化损伤的过氧化氢的主要场所, 乙醇代谢过程中, CAT 也参与部分乙醇代谢, 同时生成水和氧气。因此对醉酒小鼠肝组织 ADH、CAT 活力进行检测。如表 6 所示, 与模

表 5 荆防颗粒对醉酒小鼠胃、肝组织 NAD⁺/NADH 值的影响 ($\bar{x} \pm s$)Table 5 Effect of Jingfang Granules on NAD⁺/NADH in gastric and liver tissues of intoxicated mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	胃组织		肝组织	
		n/只	NAD ⁺ /NADH	n/只	NAD ⁺ /NADH
对照	—	8	0.63 ± 0.48	6	0.44 ± 0.33
模型	—	7	0.50 ± 0.41	7	0.26 ± 0.24
荆防颗粒	15	8	0.23 ± 0.20 [#]	7	0.13 ± 0.07 [#]
	10.5	6	0.18 ± 0.14 [#]	6	0.25 ± 0.14
NAC	0.3	7	0.42 ± 0.29	6	0.12 ± 0.07 ^{###}

表 6 荆防颗粒对醉酒小鼠肝组织 ADH 和 CAT 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Effect of Jingfang Granules on ADH and CAT activities in liver tissues of intoxicated mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n/只	ADH/(U·g ⁻¹)	n/只	CAT/(U·mg ⁻¹)
对照	—	7	3.51 ± 1.76	7	19.91 ± 1.29
模型	—	6	3.07 ± 0.47	7	17.65 ± 0.79**
荆防颗粒	15	7	4.79 ± 2.11 [#]	9	21.03 ± 1.59 ^{###}
	10.5	7	4.22 ± 0.73	9	20.47 ± 2.38 ^{##}
NAC	0.3	6	3.57 ± 1.00	8	21.16 ± 1.61 ^{###}

型组比较, 各给药组均可提高小鼠肝组织 ADH 活力, 其中荆防颗粒 15 g/kg 组具有显著性差异 ($P < 0.05$), 表明荆防颗粒解酒作用的发挥确与提高 ADH 活力有关; 同时各给药组均能显著提高 CAT 活力 ($P < 0.01$ 、 0.001), 提示荆防颗粒还可通过提高机体抗氧化能力发挥解酒作用。

3.6 荆防颗粒对醉酒小鼠肝组织 ADH1、ALDH2、CYP2E1 蛋白表达的影响

ALDH 是酒精氧化途径的第 2 步, 也是代谢引起酒精中毒关键分子——乙醛的唯一酶。当血液及组织液中的酒精浓度 > 10 mmol/L 时, 微粒体乙醇氧化系统也参与酒精代谢^[1], 其中 CYP2E1 是该系统中研究最多的酒精代谢酶。因此在明确荆防颗粒对 ADH、CAT 活性的调节作用后, 进一步观察荆防颗粒对醉酒小鼠肝组织中 ADH1、ALDH2、CYP2E1 蛋白表达的影响, 如图 2 和表 7 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肝组织中 ADH1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$), 说明单次过量饮酒可能抑制肝脏正常酒精代谢; 与模型组比较, 15 g/kg 荆防颗粒显著升高醉酒小鼠肝组织 ADH1、ALDH2 蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01), 表明荆防颗粒能通过上调 ADH、ALDH 的表达以促进酒精代谢。此外, 模型组小鼠肝组织 CYP2E1 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$), 提示过量饮酒会诱导 CYP2E1 参与肝脏酒精代谢, 而该代谢过程伴随活性氧 (reactive oxidative species, ROS) 的产生; 荆防颗粒和 NAC 能显著逆转该表现 ($P < 0.01$ 、 0.001), 说明荆防颗粒对过量饮酒导致的氧化应激可能具有一定缓解作用。

3.7 荆防颗粒对醉酒小鼠肝组织自噬通路 LC3 及 p62 蛋白表达的影响

如图 3 和表 8 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肝组织内 LC3II/LC3I 升高, 提示急性醉酒模型小鼠肝细胞的自噬可能被激活, 启动一定代偿保护效应; 与模型组比较, 荆防颗粒组 LC3II/LC3I 显著升高 ($P < 0.01$), 表明荆防颗粒解酒作用的发挥可能与激活自噬清除异物有关。与对照组比较, 醉酒小鼠肝组织中 p62 蛋白表达上调 ($P < 0.05$), 提示模型小鼠肝组织的自噬-溶酶体降解存在障碍; 与模型组比较, 荆防颗粒能显著促进自噬小体的降解, 明显下调 p62 蛋白表达 ($P < 0.05$)。提示在急性醉酒状态下, 荆防颗粒可激活自噬并促进自噬小体降解加速酒精代谢, 从而发挥肝脏保护作用。

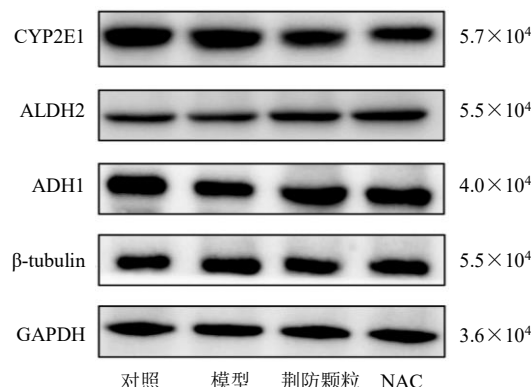


图 2 荆防颗粒对醉酒小鼠肝组织 ADH1、ALDH2 和 CYP2E1 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of Jingfang Granules on ADH1, ALDH2, and CYP2E1 protein expressions in liver tissues of intoxicated mice

表 7 荆防颗粒对醉酒小鼠肝组织 ADH1、ALDH2 和 CYP2E1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 7 Effects of Jingfang Granules on ADH1, ALDH2 and CYP2E1 protein expressions in liver tissues of intoxicated mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n/只	ADH1/β-tubulin	n/只	ALDH2/GAPDH	n/只	CYP2E1/GAPDH
对照	—	5	1.00 ± 0.00	6	1.00 ± 0.00	6	1.00 ± 0.00
模型	—	4	0.79 ± 0.18**	6	0.96 ± 0.19	6	2.04 ± 0.65**
荆防颗粒	15	3	1.63 ± 0.34 [#]	6	1.93 ± 0.43 ^{##}	5	0.70 ± 0.26 ^{###}
NAC	0.3	4	1.72 ± 0.18 ^{##}	6	1.92 ± 0.59 ^{##}	6	1.14 ± 0.35 ^{##}

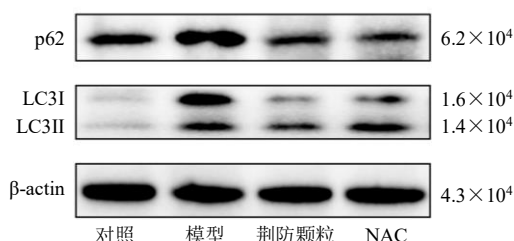


图 3 荆防颗粒对醉酒小鼠肝组织自噬通路相关蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of Jingfang Granules on autophagic pathway-related protein expressions in liver tissues of intoxicated mice

表 8 荆防颗粒对醉酒小鼠肝组织自噬通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 8 Effect of Jingfang Granules on autophagic pathway-related protein expressions in liver tissues of intoxicated mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	n/只	LC3II/LC3I	n/只	p62/β-actin
对照	—	4	1.00 ± 0.00	6	1.00 ± 0.00
模型	—	7	1.07 ± 0.43	4	2.03 ± 0.75*
荆防颗粒	15	7	1.78 ± 0.43 ^{##}	6	0.87 ± 0.40 [#]
NAC	0.3	4	1.25 ± 0.37	6	0.92 ± 0.22 ^{##}

4 讨论

无论发达还是非发达国家,饮酒是常见的大众行为之一^[12],尤其是当下生活压力日益增长,饮酒更成为大多数人排解压力的方法之一。但饮酒过量,同样会对身体健康造成危害。近年来,急性酒精中毒在临床上也越来越常见。急性酒精中毒,俗称醉酒^[13],中医病名“酒毒”。醉酒是指饮酒过量所引起的急性脏腑功能受损,并出现恶心呕吐、胁腹胀满、易怒易激、行走不稳或谵妄昏迷等症状,属中医常见急症,严重者可发生呼吸循环衰竭,最终导致死亡^[14]。目前临床上治疗急性酒精中毒的药物主要有利尿药、蛋白肽类药、提高酒精代谢酶活性类药及护肝养胃类中药 4 种^[15],然而并无明确适合大众日常生活中有效便捷的解酒药物。已有研究发现荆防败毒散加减及荆防败毒散现代制剂荆防颗粒有良好的解酒防醉作用^[6-7],本研究在前期研究基础上开展其解酒作用与机制研究,进一步丰富其解酒作用研究内容,为其临床应用拓展与二次开发提供一定药理学依据。

小鼠过量饮酒初期呈现呼吸、心率加快等兴奋表现,继而出现体态不稳、共济失调,最后进入昏睡状态^[16]。实验中常以翻正反射消失作为判断小鼠是否出现急性酒精中毒(醉酒)表现的标准,即小

鼠保持背向下姿势 >30 s 不恢复可称为醉酒。此外大量饮酒亦会造成动物胃黏膜急性损伤^[17]。因目前尚未见性激素对酒精代谢影响的报道,且饮酒行为男女均有,故研究中选用雌雄各半的小鼠开展荆防颗粒的解酒实验研究,结果表明荆防颗粒能显著降低小鼠的醉酒率,延长小鼠醉酒潜伏期,表现出解酒作用,同时给药组无小鼠死亡表现,提示药物具有保护作用;进一步转棒仪实验表明荆防颗粒可延长小鼠的在棒时间,且通过肉眼观察评分发现荆防颗粒组小鼠胃黏膜出血点明显少于模型组小鼠,结合前期研究结果荆防颗粒能显著降低醉酒小鼠血清乙醇含量^[7],可认为荆防颗粒具有解酒防醉作用,并对大量饮酒所致的胃黏膜损伤有一定保护作用。

肝脏是酒精代谢主要器官,通过几种代谢酶和非酶机制将 90% 以上摄入的酒精代谢成乙醛,随后乙醛进一步被线粒体中的 ALDH2 和细胞质中的 ALDH1 氧化为醋酸,最后醋酸经三羧酸循环,彻底氧化为水和二氧化碳排出体外,少部分生成蛋白质、脂肪等大分子物质被机体利用^[18]。肝脏中酒精主要经 ADH、CAT、CYP2E1 3 种酶代谢生成为乙醛。ADH 是一种位于胞质中的锌依赖性酶,其中 I 类 ADH 在肝、胃、肾和结肠等组织中表达水平较高,其使用 NAD⁺ 作为辅助因子,参与肝脏中大部分酒精的氧化。ADH 对乙醇的代谢受 ADH 酶、副产物乙醛水平以及细胞质中 NADH 与 NAD⁺ 比率的调节^[11]。CAT 虽然在酒精代谢过程中贡献较小,但能以 H₂O₂ 依赖的方式将乙醇氧化为乙醛,研究表明乙醇长期喂养后可使大鼠肝脏 CAT 活性增加^[19]。本研究结果显示,荆防颗粒显著促进醉酒模型小鼠肝、胃组织中 NAD⁺ 向 NADH 的转化,并提高肝组织 ADH 的活性以及 ADH1 蛋白表达量;同时显著提高模型小鼠肝组织 CAT 活性。由此可认为,荆防颗粒能通过提高 ADH、CAT 对酒精的代谢能力,来加快肝脏对酒精的代谢速率,从而发挥良好的解酒防醉作用。此外,酒精可被微粒体乙醇氧化体系氧化,该系统主要涉及 CYP2E1^[20],另外 2 种细胞色素 CYP1A2 和 CYP3A4 对微粒体乙醇氧化体系也有贡献,但影响程度较弱^[21]。CYP2E1 主要在血液酒精浓度较高或长期饮酒的酒精代谢中发挥重要作用,其参与酒精代谢的同时还会促进羟乙基自由基(HER)、羟自由基(OH[•])和超氧化物(O²⁻)等一系列 ROS 的产生,被认为是酒精诱导肝细胞氧化应激的主要因素之一^[22]。本研究结果发现,模

型组小鼠肝组织 CYP2E1 表达显著升高, 结合模型小鼠肝组织 ADH1 表达下降表现, 提示过量饮酒后 CYP2E1 被诱导表达增加, 主要负责肝脏中酒精代谢, 然而作为肝细胞氧化应激的主要贡献者, 以 CYP2E1 为主导的酒精代谢对肝脏是不利的。荆防颗粒对模型小鼠肝脏 CYP2E1 表达有明显下调表现, 提示其可抑制 CYP2E1 代谢途径, 由此缓解过量饮酒引起的氧化应激所致损伤。ALDH2 在代谢饮酒产生的乙醛及减轻氧化应激下脂质过氧化副产物 4-羟基壬烯酸的毒性中均发挥着重要作用^[23], 本研究结果表明荆防颗粒能显著提高模型小鼠肝组织 ALDH2 表达量, 提示该颗粒在促进乙醇氧化的同时还可加速机体内乙醛代谢, 呈现解酒保肝作用。荆防颗粒对肝脏中包括 ADH、CAT、CYP2E1、ALDH 在内的酒精代谢酶调节作用如图 4 所示。

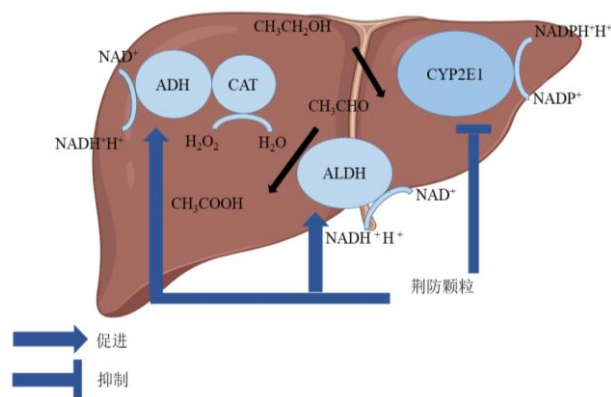


图 4 荆防颗粒对肝脏酒精代谢酶影响的机制图

Fig. 4 Mechanism diagram of effect of Jingfang Granules on liver alcohol metabolism enzymes

氧化应激过程中产生的 ROS 被认为是自噬的激活物, 能够参与诱导自噬的启动, 另一方面自噬可作为缓冲系统来控制 ROS 的水平^[24]。前期研究表明荆防颗粒可激活急性醉酒模型小鼠肝组织 PI3K/Akt 信号通路发挥解酒作用^[7], 而已有研究证实肝损伤模型中激活的 PI3K/Akt 信号通路可上调自噬^[25], 且本实验中的急性醉酒模型小鼠肝脏 CYP2E1 蛋白表达异常升高, 而该酶参与酒精代谢的同时会伴随过量 ROS 的产生, 引起氧化失衡, 诱导自噬来缓冲控制 ROS 的损伤。基于此进一步观察荆防颗粒对模型小鼠肝组织自噬的影响, 结果显示荆防颗粒可显著升高 LC3II/LC3I 值表现出激活自噬, 并显著下调 p62 蛋白表达表现出促进自噬小体降解的作用, 从而发挥保护肝脏作用, 研究结果亦与以往结果^[7]吻合。

综上, 荆防颗粒能显著降低醉酒小鼠醉酒率, 并保护过量饮酒造成的胃黏膜损伤, 其解酒作用的发挥与提高肝、胃组织 ADH 对酒精的转化效率, 升高肝组织中 ADH、ALDH、CAT 的表达或活力, 促进乙醛代谢, 对抗过量饮酒诱发的氧化应激, 及激活肝组织自噬与促进自噬小体降解有关。研究结果初步明确了荆防颗粒解酒防醉的作用机制, 同时提示对急性酒精性肝损伤可能具有保护作用。然而, 本研究存在一些不足之处, 如未涉及更多酒精诱导肝脏氧化应激的相关指标, 后续可进一步补充荆防颗粒抗氧化的解酒作用机制研究, 以丰富荆防败毒散及其制剂荆防颗粒的现代药理研究内容。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 白佳萌, 赵世豪, 闫梓喆, 等. 解酒颗粒对急性醉酒小鼠的解酒保肝作用研究 [J]. 现代中医药, 2022, 42(6): 42-45.
- [2] 贺伟, 郭伶伶, 张祎, 等. 饮酒的危害与中药解酒之功效 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14(4): 50-52.
- [3] 陈文璐, 张怡萍, 牟艳芳, 等. 基于生物信息技术的荆防颗粒治疗冠状病毒感染疾病机制探析 [J]. 中草药, 2020, 51(15): 3937-3951.
- [4] 梁红宝, 姜宇璐, 袁晓梅, 等. 基于 GC-MS 和 UPLC-Q-Exactive MS 技术的荆防颗粒化学成分研究 [J]. 中草药, 2022, 53(6): 1697-1708.
- [5] 李郁茹, 赵亚芳, 程国良, 等. 荆防颗粒对 CCl₄ 诱导小鼠肝纤维化的治疗作用及其机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(22): 6127-6136.
- [6] 童妍, 李锐, 吴晓青. 荆防败毒散加减对急性酒精中毒小鼠的解酒作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21): 221-223.
- [7] 高铭, 杨若聪, 刘淇, 等. 基于生物信息技术探究荆防颗粒解酒保肝的作用机制 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(21): 5683-5692.
- [8] Zakhari S. Overview: how is alcohol metabolized by the body? [J]. *Alcohol Res Health*, 2006, 29(4): 245-254.
- [9] Heier C, Xie H, Zimmermann R. Nonoxidative ethanol metabolism in humans-from biomarkers to bioactive lipids [J]. *IUBMB Life*, 2016, 68(12): 916-923.
- [10] 张健, 张惟广, 谢非. 饮酒、醉酒及解酒 [J]. 酿酒, 2001, 28(5): 38-41.
- [11] Jiang Y C, Zhang T, Kusumanchi P, et al. Alcohol metabolizing enzymes, microsomal ethanol oxidizing system, cytochrome P450 2E1, catalase, and aldehyde dehydrogenase in alcohol-associated liver disease [J]. *Biomedicine*, 2020, 8(3): 50.

- [12] Teesson M, Baillie A, Lynskey M, *et al.* Substance use, dependence and treatment seeking in the United States and Australia: A cross-national comparison [J]. *Drug Alcohol Depend*, 2006, 81(2): 149-155.
- [13] 张荣珍, 刘清泉, 黄昊. 急性酒精中毒中医诊疗专家共识 [J]. 中国中医急症, 2018, 27(10): 1693-1696.
- [14] 急性酒精中毒诊治共识专家组. 急性酒精中毒诊治共识 [J]. 中华急诊医学杂志, 2014, 23(2): 135-138.
- [15] 柴郑. 复方解酒护肝分散片的研究 [D]. 开封: 河南大学, 2016.
- [16] 赵丽晶, 乔振鑫, 于乐, 等. 叶黄素对急性酒精中毒小鼠胃黏膜的保护作用 [J]. 吉林医药学院学报, 2022, 43(1): 23-26.
- [17] Matsuhashi T, Otaka M, Odashima M, *et al.* Protective effect of a novel rice extract against ethanol-induced gastric mucosal injury in rat [J]. *Dig Dis Sci*, 2007, 52(2): 434-441.
- [18] Cederbaum A I. Alcohol metabolism [J]. *Clin Liver Dis*, 2012, 16(4): 667-685.
- [19] Crabb D W, Bosron W F, Li T K. Steady-state kinetic properties of purified rat liver alcohol dehydrogenase: Application to predicting alcohol elimination rates *in vivo* [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1983, 224(1): 299-309.
- [20] Bae S H, Sung S H, Cho E J, *et al.* Concerted action of sulfiredoxin and peroxiredoxin I protects against alcohol-induced oxidative injury in mouse liver [J]. *Hepatology*, 2011, 53(3): 945-953.
- [21] Lieber C S. The discovery of the microsomal ethanol oxidizing system and its physiologic and pathologic role [J]. *Drug Metab Rev*, 2004, 36(3/4): 511-529.
- [22] Lu Y K, Cederbaum A I. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol [J]. *Free Radic Biol Med*, 2008, 44(5): 723-738.
- [23] Nene A, Chen C H, Disatnik M H, *et al.* Aldehyde dehydrogenase 2 activation and coevolution of its ϵ PKC-mediated phosphorylation sites [J]. *J Biomed Sci*, 2017, 24(1): 3.
- [24] Li Y, Shen B, Lv C X, *et al.* Methyl gallate prevents oxidative stress induced apoptosis and ECM degradation in chondrocytes via restoring Sirt3 mediated autophagy and ameliorates osteoarthritis progression [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 114: 109489.
- [25] Wang H, Zhu J J, Wei L Z, *et al.* TSLP protects against sepsis-induced liver injury by inducing autophagy via activation of the PI3K/Akt/STAT3 pathway [J]. *Pathol Res Pract*, 2022, 236: 153979.

[责任编辑 李亚楠]