

藤葛复合固体饮料对急性酒精中毒小鼠的 解酒护肝作用

李冬梅^{1*}, 李宝玉¹, 郝志明¹, 李春莲², 文 炎³

(1. 广东农工商职业技术学院热带农林学院, 广州 510507; 2. 江西富牛生态农业发展有限公司, 赣州 342800; 3. 江西省尚美生态农业有限公司, 萍乡 337025)

摘 要: **目的** 研究藤葛复合固体饮料对急性酒精中毒小鼠的解酒作用和护肝功能。**方法** 各实验组灌胃相应受试物后建立急性小鼠醉酒模型, 记录小鼠防醉实验行为学变化, 检测血清乙醇含量、谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)和甘油三酯(triglyceride, TG)水平, 测定体质量、肝脏指数、肝脏乙醇代谢酶活力、抗氧化指标水平、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和抑炎因子白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)水平, 镜检观察肝脏病理学变化。**结果** 与模型组相比, 藤葛复合解酒固体饮料低、高剂量组均可显著延长小鼠酒精耐受时间($P<0.05$, $P<0.01$), 缩短睡眠时间($P<0.01$)和醒酒时间($P<0.05$, $P<0.01$); 低、高剂量组均能极显著降低小鼠血液中乙醇浓度、ALT、AST 和 TG 水平($P<0.01$); 高剂量组显著提高小鼠体质量($P<0.05$)和减轻肝脏指数($P<0.01$); 高剂量组能极显著提高乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADH)、乙醛脱氢酶(acetaldehyde dehydrogenase, ALDH)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)活力、谷胱甘肽过氧化物酶活力(glutathione peroxidase, GSH-Px)、还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)含量($P<0.01$)和降低肝脏丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量($P<0.01$); 低、高剂量组均能明显改善肝组织病理情况, 抑制肝脏中 TNF- α 和 IL-6 水平($P<0.01$)。**结论** 藤葛复合固体饮料对急性酒精中毒小鼠具有较好的解酒护肝作用, 可能与其提高小鼠乙醇代谢酶活力加速乙醇代谢分解、机体抗氧化能力增强、炎症信号的传导抑制有关。

关键词: 藤茶二氢杨梅素; 葛花异黄酮; 急性酒精中毒; 解酒作用; 护肝功能

Anti-alcoholic and hepatoprotective effects of complex solid beverage from *Ampelopsis grossedentata* and *Puerariae flos* extracts in mice with acute alcoholism

LI Dong-Mei^{1*}, LI Bao-Yu¹, HAO Zhi-Ming¹, LI Chun-Lian², WEN Yan³

(1. Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Guangdong AIB Polytechnic College, Guangzhou 510507, China;
2. Jiangxi Funiu Ecological Agriculture Development Co., Ltd., Ganzhou 342800, China;
3. Jiangxi Shangmei Ecological Agriculture Co., Ltd., Pingxiang 337025, China)

基金项目: 2020 年广东省普通高校重点领域专项(乡村振兴)项目(2020ZDZX1094)、2020 年赣州市科技计划项目(赣市科发[2020]60 号)

Fund: Supported by the 2020 Guangdong Province General Universities Key Field Special (Rural Revitalization) Project (2020ZDZX1094), and the 2020 Ganzhou Science and Technology Plan Project (Ganzhou Science and Technology Bureau Issued a Document [2020] No.60)

***通信作者:** 李冬梅, 硕士, 副教授, 主要研究方向食品加工与营养安全。E-mail: 1308216802@qq.com

***Corresponding author:** LI Dong-Mei, Master, Associate Professor, Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Guangdong AIB Polytechnic College, No.198, Yueken Road, Tianhe District, Guangzhou 510507, China. E-mail: 1308216802@qq.com

ABSTRACT: Objective To study the anti-alcoholic effect and hepatoprotective function of the compound solid beverage of *Ampelopsis grossedentata* and *Puerariae fos* on acute alcoholism mice. **Methods** After gavaged of the corresponding test substances in each experimental group, an acute intoxication model was established in mice, recorded the behavioral changes in the anti-intoxication test of mice, measured serum ethanol concentration, serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and triglyceride (TG) levels, and determined the body quality and liver index, liver alcohol metabolism enzyme activity, antioxidant index levels, tumor necrosis factor- α (TNF- α) and anti-inflammatory factor interleukin-6 (IL-6) levels, and the pathological changes of the liver were observed by microscopy. **Results** Compared with the model group, both the low and high dose groups of the compound solid beverage of *Ampelopsis grossedentata* and *Puerariae fos* could significantly prolong the alcohol tolerance time ($P<0.05$, $P<0.01$), shorten the sleep time ($P<0.01$) and sober up time ($P<0.05$, $P<0.01$); both low-dose and high-dose groups could significantly reduce the blood ethanol concentration, ALT, AST and TG levels of mice ($P<0.01$); the high-dose group significantly increased the body weight of mice ($P<0.05$) and relieved the liver index of mice ($P<0.01$); the high-dose group could significantly increase alcohol dehydrogenase (ADH), acetaldehyde dehydrogenase (ALDH), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) activity, glutathione peroxidase (GSH-Px) and glutathione (GSH) content ($P<0.01$), reduced liver malondialdehyde (MDA) content ($P<0.01$). The low and high-dose group could significantly improve the pathological conditions of liver tissue, inhibit the levels of TNF- α and IL-6 in the liver ($P<0.01$). **Conclusion** The compound solid beverage of *Ampelopsis grossedentata* and *Puerariae fos* has better anti-alcoholic and hepatoprotective effects on acute alcoholism mice, which may be related to accelerate ethanol metabolism, enhance the mice's antioxidant capacity, and inhibit the transduction of inflammatory signals.

KEY WORDS: dihydromyricetin from *Ampelopsis grossedentata*; isoflavonoids from *Puerariae fos*; acute alcoholism; anti-alcoholic effect; hepatoprotective function

0 引言

酒精滥用是一个世界性的问题, 据估计, 酗酒已成为世界第三大健康问题^[1]。在我国, 饮酒文化相当浓郁, 饮酒人群极其庞大, 由饮酒引起的健康问题和社会问题也很严重^[2]。长期饮酒过度会引发包括酒精性肝病(alcoholic liver diseases, ALD)^[3]在内的 200 多种疾病发生或病情恶化^[4]。有酒的地方就有解酒产品的存在, 市面上的“解酒药”主要为西药和中药。西药多是改善乙醇代谢的药物, 不正确使用对身体存在毒副作用^[5], 且目前市面上宣传有解酒作用的产品虽然种类繁多, 但大多存在作用机制不清晰、解酒效果不明显等问题^[6]。采用药食两用中草药治疗酒精性肝病, 不仅能避免药物对患者身体产生伤害, 同时能避免药物引起的不良反应, 且安全性较高, 目前已成为酒精性肝病治疗的新方向^[7], 也是当今解酒产品研发的新方向。

藤葛复合固体饮料以藤茶提取物二氢杨梅素、葛花提取物异黄酮进行复配, 添加合适辅料制备而成。藤茶, 为葡萄科(Vitaceae)蛇葡萄属(*Ampelopsis Michx*)的显齿蛇葡萄[*Ampelopsis grossedentata* (Hand.-Mazz) W. T. Wang], 是原国家卫生和计划生育委员会认定、近年来研究较多的药茶两用中药之一^[8-9]。藤茶的主要功能活性物质为二氢杨梅素(dihydromyricetin, DMY)^[10]。研究表明, DMY 具有良好

的解酒护肝作用^[11-14]。葛花(*Puerariae fos*)为药食同源植物野葛[*Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi]的干燥花, 始载于陶弘景所撰《名医别录》, 其主要功能成分为异黄酮类化合物, 是传统医学和现代医学中最具代表性的解酒良物之一^[15]。前期体外功能实验研究^[15]表明, 藤茶提取物 DMY 与葛花提取物异黄酮复配对乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADH)激活率达 175.38%, 超氧阴离子清除率达 62.99%, 有较好的解酒作用。而藤茶提取物 DMY 与葛花提取物异黄酮复配在体内是否有解酒作用, 目前尚未见报道。因此, 本研究在前期研究基础上, 建立小鼠急性酒精中毒模型, 对藤葛复合固体饮料的解酒护肝效果及可能的作用机制进行了研究, 以期了解酒护肝产品的研发提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

藤葛复合固体饮料(实验室自制)。藤茶提取物 DMY(藤茶水提取, 纯度 96%, 实验室自制); 葛花提取物(水提物, 纯度 10%, 西安汇林生物科技有限公司); 56°红星二锅头(北京红星股份有限公司); 海王牌金樽片(深圳市海王健康科技发展有限公司)。

清洁级(specific pathogen free, SPF)级雄性 ICR(institute of cancer research, ICR)小鼠(湖南斯莱克景达实验动物有

限公司, 体重 18~22 g, 许可证编号: SCXK(湘)2019-0004)。

三氯乙酸(分析纯, 湖北成丰化工有限公司); 谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)试剂盒(No.20211211)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)试剂盒(No.20211210)、ADH 试剂盒(No.20211210)、乙醛脱氢酶(acetaldehyde dehydrogenase, ALDH)试剂盒(No.20211210)、甘油三酯(triglyceride, TG)试剂盒(No.20211211)、过氧化氢酶(catalase, CAT)试剂盒(No.20211211)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(No.20211208)、还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)试剂盒(No.20211211)、谷胱甘肽过氧化物酶活力(glutathione peroxidase, GSH-Px)试剂盒(No.20211208)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒(No.20211211)(南京建成生物工程研究所); 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)测试盒(No.20211206)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)测试盒(No.20211209)(江苏酶免实业有限公司); 苏木精-伊红(Hematoxylin-Eosin, HE)染色液(赛维尔生物科技有限公司)。

1.2 仪器与设备

BSA124S 型电子分析天平[精度 0.1 mg, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]; JC-FW-100 型粉碎机(青岛聚创环保集团有限公司); YG-2L 型不锈钢搅拌机(郑州科勒机械设备有限公司); DGF-4BS 型电热恒温鼓风干燥箱(上海力辰仪器科技有限公司); TGL-16E 型台式高速冷冻离心机(济南鑫驰医疗科技有限公司); HWS-24 型水浴锅、LRH-150 型孵育箱(上海一恒科学仪器有限公司); QB-9001 型振荡器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); Multiskan 热电 Mk3Thermo 型多功能酶标仪(美国赛默飞公司); EG-1160 型石蜡包埋机、HI-1210 型摊片机、RM-2235 石蜡切片机(德国 Leica 公司); Donatello 型脱水机、Giotto 染色机(意大利 DIAPATH 公司); BX51 型显微镜、DP71 型拍照系统(日本 Olympus 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 藤葛复合固体饮料的制备

实验室自制, 产品配方^[15]为: 藤茶提取物 DMY 添加量 38.50%, 葛花提取物添加量 10.00%, 柠檬酸添加量 16.00%, 甘草酸二钾添加量 4.00%, 麦芽糊精 31.5%, 规格为 2 g/袋。称取一定量的藤茶提取物二氢杨梅素、葛花异黄酮提取物、柠檬酸、甘草酸二钾、麦芽糊精分别过 0.180 mm (80 目)筛网, 搅拌机混合均匀, 60℃下干燥约 12 h, 至水分小于 5%, 80℃下杀菌 5~8 min, 自动分装、封口即得固体饮料。

1.3.2 小鼠耐酒精性实验

取 ICR 小鼠 40 只, 体重 18~22 g, 随机分成 5 组, 每组 8 只。进行适应性喂养 1 周, 禁食不禁水 12 h 后, 各组

分别使用 56°红星二锅头按 0.10 mL/10 g (A)、0.12 mL/10 g (B)、0.14 mL/10 g (C)、0.16 mL/10 g (D)和 0.18 mL/10 g (E)的比例进行灌胃, 记录小鼠醉酒率及存活率等指标, 以小鼠醉酒率最高而死亡率最低的灌酒剂量为最耐酒精灌胃剂量。以小鼠翻正反射消失, 闭眼沉睡为醉酒指标。

1.3.3 藤葛复合固体饮料的解酒功能行为学指标测定

32 只 ICR 小鼠, 体重 18~22 g, 随机分为酒精模型组、阳性对照组(海王金樽)以及藤葛复合固体饮料低、高剂量组, 每组 8 只, 给药浓度如下: 阳性对照组(海王金樽)(0.27 g/kg), 藤葛复合固体饮料低剂量组(0.30 g/kg)和高剂量组(1.20 g/kg)。进行适应性喂养 1 周后, 各组小鼠禁食不禁水 12 h, 酒精模型组按照 0.1 mL/10 g 灌胃给予蒸馏水, 海王金樽组、藤葛复合固体饮料组分别按 0.1 mL/10 g 灌胃给予药物和不同浓度, 30 min 后, 酒精模型组、阳性对照组、固体饮料组按 1.3.2 确定的最佳灌酒剂量用 56°红星二锅头灌胃。记录给药、给药时间以及小鼠翻正反射消失时间和翻正反射恢复时间, 计算酒精耐受时间(翻正反射消失时间-给药时间)、睡眠时间(翻正反射恢复时间-翻正反射消失时间)、醒酒时间(翻正反射恢复时间-给药时间)^[16]。

1.3.4 小鼠血清乙醇质量浓度、TG 浓度、ALT 和 AST 活性的测定

40 只 ICR 小鼠, 分组及给受试物同 1.3.3 项, 外加空白组, 从灌胃白酒开始计时, 分别在 0.5、1.0、2.0、4.0 h 对小鼠进行眼眶取血, 每份血样取 500 μ L 于 10 mL 离心管中, 加入 500 μ L 20%三氯乙酸除蛋白, 240000 $\times$ g 离心 5 min, 取上清液, 采用酸性重铬酸盐氧化法检测血液中乙醇的质量浓度^[15]。4 h 眼眶取血, 120000 $\times$ g 4℃离心 5 min, 取上清液, 参照试剂盒说明书测定 TG 浓度、ALT 和 AST 活性。

1.3.5 小鼠体质量和肝脏指数、肝组织中各项指标的测定和切片观察

另取 40 只 ICR 小鼠, 分组及给受试物同 1.3.4 项, 每天给药 1 次, 每次给药后 30 min, 除正常对照组灌胃等体积蒸馏水外, 其余各组小鼠均按 1.3.2 确定的最佳灌酒剂量灌胃小鼠, 连续 7 d, 实验结束时各组小鼠禁食 4 h, 称量体质量, 于第 8 d 处死小鼠, 快速取出肝脏, 立即用预冷生理盐水漂洗并用滤纸吸干后称重, 按照式(1)计算肝脏指数。

$$\text{肝脏指数}/\% = \frac{\text{小鼠肝质量}}{\text{小鼠体重}} \times 100\% \quad (1)$$

剪取少量肝组织, 加入 9 倍体积的生理盐水, 冰上匀浆, 120000 $\times$ g 4℃离心 5 min, 得肝组织上清液。参照试剂盒说明书测定小鼠肝脏组织中 ADH、ALDH、CAT、SOD、GSH-Px 活力, MDA、GSH 含量以及 TNF- α 、IL-6 水平。每只小鼠肝组织包埋 1 份样本后做 HE 检测。

1.4 数据处理

采用 SPSS 26.0 统计软件, 实验数据结果采用平均值 $\pm$ 标准偏差表示, 组间差异采用单因素方差分析, 当

$P<0.05$ 为差异显著, 当 $P<0.01$ 时, 差异性极显著。

2 结果与分析

2.1 小鼠急性醉酒模型的建立

由表 1 可知, 随着灌酒剂量的增大, 小鼠醉酒率上升, 同时死亡率也逐渐升高, 当灌酒剂量为 0.14 mL/10 g 时, 醉酒率达到 100%, 且醉后死亡率为 0, 故选择 0.14 mL/10 g 为最佳灌酒剂量。

表 1 急性醉酒模型实验结果($n=8$)
Table 1 Acute drunk model test results ($n=8$)

组别	灌酒剂量 (mL/10 g)	小鼠数量	醉酒率/%	死亡率/%
A	0.10	8	75.0	0
B	0.12	8	87.5	0
C	0.14	8	100.0	0
D	0.16	8	100.0	12.5
E	0.18	8	100.0	25.0

2.2 藤葛复合固体饮料对醉酒小鼠行为学指标的影响

由表 2 可知, 与酒精模型组[酒精耐受时间为(11.60±3.67) min, 睡眠时间为(188.93±6.54) min, 醒酒时间为(200.53±9.77) min)]相比, 阳性对照组、藤葛复合固体饮料低、高剂量组小鼠的酒精耐受时间均能延长, 分别为(21.59±3.46)、(21.11±8.52)、(36.92±5.16) min, 其中阳性对照组、藤葛复合固体饮料低剂量组分别与酒精模型组相比, 两者效果相当($P<0.05$), 而高剂量组效果差异极显著($P<0.01$)。与模型对照组相比, 阳性对照组、藤葛复合固体饮料低、高剂量组小鼠的睡眠时间缩短, 分别为(154.18±6.60)、(163.42±7.17)、(139.49±12.52) min, 3 个剂量组的睡眠时间差异均极显著($P<0.01$); 3 个剂量组小鼠醒酒时间均能缩短, 其中阳性对照组、高剂量组差异

表 2 藤葛复合固体饮料对醉酒小鼠行为学指标的影响($n=8$)
Table 2 Effects of the complex solid beverage of *Ampelopsis grossedentata* and *Puerariae fos* on behavioral indicators of drunk mice ($n=8$)

组别	酒精耐受 时间/min	睡眠时间 /min	醒酒时间 /min
酒精模型组	11.60±3.67	188.93±6.54	200.53±9.77
阳性对照组	21.59±3.46 [#]	154.18±6.60 ^{##}	175.76±9.42 ^{##}
藤葛复合固体 饮料低剂量组	21.11±8.52 [#]	163.42±7.17 ^{##}	184.53±8.91 [#]
藤葛复合固体 饮料高剂量组	36.92±5.16 ^{##}	139.49±12.52 ^{##}	176.41±7.39 ^{##}

注: 与模型组比较, [#]表示差异显著, $P<0.05$; ^{##}表示差异极显著, $P<0.01$, 下同。

均极显著($P<0.01$), 低剂量组差异显著($P<0.05$)。以上结果表明, 阳性对照组、藤葛复合固体饮料低、高剂量组均可改善醉酒小鼠的行为学指标, 有较好的解酒防醉效果, 藤葛复合固体饮料解酒防醉存在一定的剂量-效应关系。

2.3 藤葛复合固体饮料对醉酒小鼠血清乙醇质量浓度的影响

一次过量摄入酒精会引起血液中乙醇质量浓度的急剧升高^[17], 如表 3 所示, 与空白组相比, 酒精模型组小鼠血清乙醇含量极显著升高($P<0.01$), 并于灌酒后 0.5 h 达到最高, 为 1.12 μL/100 mL, 之后随着时间的延长, 乙醇含量缓慢下降, 到 2.0 h 时仍具有较高水平, 说明小鼠急性酒精中毒模型建立成功; 与模型组比较, 阳性对照组、藤葛复合固体饮料低、高剂量组在 0.5、1.0、2.0、4.0 h 时均可极显著降低小鼠血液中乙醇质量浓度($P<0.01$), 且高剂量组小鼠在 4 个时间段中血液乙醇质量浓度比低剂量组小鼠降低的幅度更大, 表明藤葛复合固体饮料对醉酒小鼠乙醇质量浓度的影响存在一定的剂量-效应关系。

表 3 藤葛复合固体饮料对小鼠血液乙醇质量浓度的影响
(μL/100 mL, $n=8$)

Table 3 Effects of the complex solid beverage of *Ampelopsis grossedentata* and *Puerariae fos* on the ethanol content in mice blood (μL/100 mL, $n=8$)

组别	乙醇			
	0.5 h	1.0 h	2.0 h	4.0 h
空白组	0.02±0.01	0.01±0.01	0.01±0.01	0.01±0.01
酒精模型组	1.12±0.02 ^{**}	0.71±0.01 ^{**}	0.31±0.05 ^{**}	0.09±0.01 ^{**}
阳性对照组	0.65±0.04 ^{##}	0.44±0.01 ^{##}	0.23±0.02 ^{##}	0.08±0.01 ^{##}
藤葛复合固体 饮料低剂量组	0.84±0.03 ^{##}	0.64±0.03 ^{##}	0.21±0.04 ^{##}	0.06±0.01 ^{##}
藤葛复合固体 饮料高剂量组	0.64±0.01 ^{##}	0.43±0.02 ^{##}	0.17±0.04 ^{##}	0.04±0.01 ^{##}

注: 与空白组比较, *表示差异显著, $P<0.05$, **表示差异极显著, $P<0.01$, 下同。

2.4 藤葛复合固体饮料对醉酒小鼠体质量和肝组织肝脏指数的影响

过量饮酒导致小鼠食欲和吸收功能降低, 易造成小鼠营养不良、体质量下降^[18-19], 肝脏指数, 表示的是肝脏在整个体重上所占的比例, 通过这个指数可以判断肝脏是否发生肿大, 当肝脏因为某些炎症反应或其他原因出现增生、充血、水肿时, 肝脏会变得肿大, 此时对应的肝脏占的体重比例也上升^[20]; 肝损害会引起小鼠肝肿大、发育不良和肝硬化, 肝脏指数在一定程度上可以反映肝脏的损伤^[21]。

从表 4 可以看出, 与空白组相比, 模型组小鼠体质量极显著减轻($P<0.01$)、肝脏指数显著升高($P<0.05$), 说明小

鼠急性酒精肝损伤造模成功;与模型组相比,阳性对照组、藤葛复合固体饮料低剂量组对小鼠体质量影响差异不显著,肝脏指数显著降低($P<0.05$);藤葛复合固体饮料高剂量组小鼠体质量明显升高($P<0.05$)、肝脏指数极显著下降($P<0.01$)。结果表明藤葛复合固体饮料在一定程度上能减轻饮酒造成的体质量下降和肝损伤,且存在一定的剂量-效应关系。

表 4 藤葛复合固体饮料对小鼠体质量和肝脏指数的影响($n=8$)
Table 4 Effects of the complex solid beverage of *Ampelopsis grossedentata* and *Puerariae fos* on the weight and liver indexes in mice ($n=8$)

组别	体质量/g	肝脏指数/%
空白组	30.80±0.24	6.04±0.18
酒精模型组	26.95±1.59**	6.44±0.32*
阳性对照组	28.17±1.04	5.97±0.25 [#]
藤葛复合固体饮料低剂量组	28.63±1.47	5.96±0.20 [#]
藤葛复合固体饮料高剂量组	29.57±2.07 [#]	5.66±0.34 ^{##}

2.5 藤葛复合固体饮料对醉酒小鼠酒精代谢酶 ADH 和 ALDH 活性的影响

ADH 和 ALDH 是酒精代谢的关键酶,其活力的变化会影响血液中乙醇含量,因此常用 ADH 和 ALDH 活力衡量药物解酒效果^[22]。由表 5 可见,与空白组比较,模型组小鼠肝组织中 ADH、ALDH 活性极显著降低($P<0.01$);与模型组比较,阳性对照组 ADH 活力显著升高($P<0.05$)、ALDH 活力极显著升高($P<0.01$),藤葛复合固体饮料低剂量组对小鼠的 ADH、ALDH 活性影响不显著;藤葛复合固体饮料高剂量组均能极显著提高醉酒小鼠肝脏中酒精代谢酶 ADH、ALDH 的活性($P<0.01$)。结果表明高剂量藤葛复合固体饮料能通过提高 ADH、ALDH 活性加速酒精的代谢,降低血液中乙醇的含量,起到较好的解酒效果,且存在一定的剂量-效应关系。

表 5 藤葛复合固体饮料对小鼠肝组织 ADH、ALDH 活性的影响($n=8$)
Table 5 Effects of the complex solid beverage of *Ampelopsis grossedentata* and *Puerariae fos* on the activity of ADH, ALDH in mice liver tissue ($n=8$)

组别	ADH/(U/mg prot)	ALDH/(U/mg prot)
空白组	358.98±68.23	594.96±46.88
酒精模型组	208.77±43.48**	329.64±73.10**
阳性对照组	288.70±12.60 [#]	520.59±16.57 ^{##}
藤葛复合固体饮料低剂量组	212.22±51.41	345.72±45.95
藤葛复合固体饮料高剂量组	371.38±22.55 ^{##}	592.95±28.90 ^{##}

2.6 藤葛复合固体饮料对醉酒小鼠肝损伤修复的影响

血清 ALT、AST 和 TG 水平是评价急性肝损伤的重要指标,过量饮酒会导致肝脏受损,引起血清 ALT、AST 和 TG 水平显著升高^[17]。由表 6 可知,与空白组比较,模型组小鼠血清 ALT、AST 活力和 TG 水平极显著升高($P<0.01$),提示小鼠急性酒精中毒致肝损伤模型建立成功,小鼠急性酒精中毒造模已造成小鼠肝细胞线粒体的损害^[23]。与模型组比较,阳性对照组、藤葛复合固体饮料低、高剂量组小鼠血清中的 ALT、AST 活力和 TG 水平均极显著降低($P<0.01$),对急性醉酒小鼠肝损伤修复存在一定的剂量-效应关系。

表 6 藤葛复合固体饮料对小鼠血清中 ALT、AST 和 TG 水平的影响($n=8$)

Table 6 Effects of the complex solid beverage of <i>Ampelopsis grossedentata</i> and <i>Puerariae fos</i> on serum ALT, AST and TG levels in mice ($n=8$)			
组别	ALT/(U/g)	AST/(U/g)	TG/(mmol/L)
空白组	92.63±1.64	66.45±3.90	0.39±0.02
酒精模型组	128.61±2.95**	242.86±6.81**	0.63±0.04**
阳性对照组	48.64.57±12.94 ^{##}	69.61±6.53 ^{##}	0.36±0.02 ^{##}
藤葛复合固体饮料低剂量组	91.50±14.79 ^{##}	90.34±4.19 ^{##}	0.51±0.01 ^{##}
藤葛复合固体饮料高剂量组	47.20±15.04 ^{##}	7.39±2.31 ^{##}	0.36±0.02 ^{##}

2.7 藤葛复合固体饮料对醉酒小鼠氧化应激的影响

乙醇代谢中产生的乙醛可与肝细胞中的蛋白质、DNA 发生整合,形成乙醛加合物,如 MDA-乙醛加合物,同时,乙醛加合物还能使机体活性氧基团(reactive oxygen species, ROS)增多,氧化应激水平升高,导致脂质过氧化,MDA 增高,某些抗氧化物质如 SOD、GSH-Px 大量消耗,削弱机体多个器官特别是肝脏的抗氧化能力^[24],从而导致机体肝脏发生氧化应激。从表 7 可以看出,与空白组相比,模型组小鼠肝脏 CAT、SOD、GSH-Px 和还原型 GSH 活力均极显著降低,MDA 含量极显著升高($P<0.01$),表明乙醇致肝损伤小鼠肝脏抗氧化能力降低,氧化应激增强。与模型组相比,阳性对照组、藤葛复合固体饮料低剂量组小鼠 CAT、GSH-Px 活力极显著升高($P<0.01$),MDA 含量极显著下降($P<0.01$),但 SOD 和还原型 GSH 活力无显著性增强;而藤葛复合固体饮料高剂量组小鼠肝脏 CAT、SOD、GSH-Px 和还原型 GSH 活力极显著增强($P<0.01$),MDA 水平极显著下降($P<0.01$)。结果表明藤葛复合固体饮料通过提高小鼠的抗氧化能力较好地改善肝脏的氧化应激状态,且存在一定的剂量-效应关系。

表 7 藤葛复合固体饮料对小鼠肝脏 CAT、SOD、GSH-Px 活力和 GSH、MDA 水平的影响(n=8)

Table 7 Effects of the complex solid beverage of *Ampelopsis grossedentata* and *Puerariae fos* on CAT, SOD and GSH-Px activities, and GSH and MDA levels in liver of rats (n=8)

组别	CAT/(U/mg prot)	SOD/(U/mg prot)	GSH-PX 活力/(U/mg prot)	还原型 GSH/(U/mg prot)	MDA/(nmol/mg prot)
空白组	52.60±3.31	240.12±26.38	2621.28±231.78	604.88±107.22	7.66±1.15
酒精模型组	26.98±4.48**	202.38±5.55**	1617.09±278.13**	427.50±38.87**	21.21±2.67**
阳性对照组	34.84±1.23 ^{##}	219.04±3.94	2188.87±129.10 ^{##}	504.72±7.30	10.31±0.98 ^{##}
藤葛复合固体饮料低剂量组	33.75±1.51 ^{##}	212.55±182	2063.15±105.27 ^{##}	425.82±35.69	14.60±1.81 ^{##}
藤葛复合固体饮料高剂量组	40.96±1.52 ^{##}	234.13±3.61 ^{##}	2426.52±49.69 ^{##}	572.86±61.09 ^{##}	9.90±1.14 ^{##}

2.8 藤葛复合固体饮料对醉酒小鼠肝组织 TNF-α、IL-6 水平的影响

在乙醇介导的炎症损伤过程中, TNF-α 和 IL-6 等是产生肝细胞级联反应的主要炎性细胞因子^[25-27]。乙醛与细胞大分子(脂质和蛋白质)相互作用, 激活促炎细胞因子、白细胞介素等, 诱导炎症介质的表达, 从而引起肝损伤^[28]。作为启动炎症反应的关键, TNF-α、IL-6 可通过激活 NF-κB 信号通路的关键蛋白引发一系列炎症和免疫应答反应, 两者相互促进, 其分泌水平可直接反映炎症的严重程度^[29]。从表 8 可看出, 与空白组相比, 模型组小鼠肝脏细胞释放的 TNF-α、IL-6 浓度增大($P<0.01$ 、 $P<0.05$), 说明乙醇已致小鼠发生炎症反应; 与模型组相比, 阳性对照组和藤葛复合固体饮料低、高剂量组均能降低 TNF-α 和 IL-6 含量, 其中藤葛复合固体饮料低、高剂量组差异极显著($P<0.01$), 说明藤葛复合固体饮料可以通过抑制促炎症介质 TNF-α、IL-6 的释放, 帮助维持体内免疫稳态对酒精性肝损伤的炎症水平具有较好的干预作用。

表 8 藤葛复合固体饮料对酒精性肝损伤模型细胞因子 TNF-α (a)、IL-6 (b)分泌水平的影响(pg/mL, n=8)

Table 8 Effects of the complex solid beverage of *Ampelopsis grossedentata* and *Puerariae fos* on the secretion levels of cytokines TNF-α (a) and IL-6 (b) in HepG2 cell model of alcoholic liver injury (pg/mL, n=8)

组别	TNF-α 含量	IL-6 含量
空白组	326.60±0.78	50.05±0.97
酒精模型组	337.90±2.57**	52.77±1.29*
阳性对照组	329.45±8.18 [#]	44.66±2.83 ^{##}
藤葛复合固体饮料低剂量组	326.38±4.37 ^{##}	47.39±1.49 ^{##}
藤葛复合固体饮料高剂量组	316.96±5.54 ^{##}	45.65±1.96 ^{##}

2.9 藤葛复合固体饮料对醉酒小鼠肝脏组织病理学变化的影响

醉酒小鼠 HE 染色结果见图 1。由图 1 小鼠肝脏 HE 染色结果可知, 空白组小鼠肝细胞形态结构完整, 核大而圆, 结构清晰, 肝小叶结构整齐, 胞质均匀, 胞浆内无脂滴, 肝窦未见明显淤血扩张及炎症浸润。模型组小鼠肝细

胞肿胀, 细胞核固缩, 肝细胞出现灶状坏死, 肝索排列紊乱, 胞质中出现大小不一的脂滴, 并伴有少量炎性细胞浸润。与模型组相比, 阳性对照组及藤葛复合固体饮料低、高剂量组肝细胞损伤程度明显减轻, 阳性对照组肝索排列整齐, 肝窦无扩张, 肝细胞出现少量坏死; 藤葛复合固体饮料低剂量组肝细胞出现轻微炎症和少量坏死, 肝小叶出现少量坏死胞浆内存在极少量细小的脂滴; 藤葛复合固体饮料高剂量组肝细胞结构基本恢复, 肝索形状排列比较清晰, 胞浆内无脂滴出现, 脂肪变性程度轻于低剂量组。

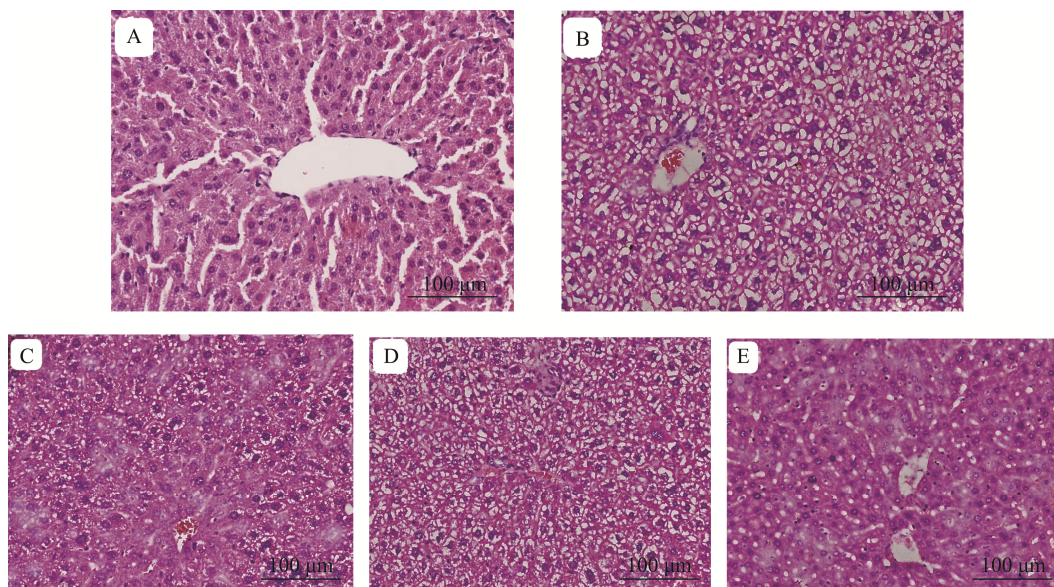
3 讨论与结论

藤葛复合固体饮料由藤茶提取物 DMY、葛花提取物葛花异黄酮和合适辅料复配而成。已有研究表明, 藤茶提取物 DMY 能有效抑制人肝脏微粒体 CYP3A4 和 CYP2E1 的活性^[30], 显著提高 ALD 小鼠乙醇代谢相关酶的表达, 并降低小鼠血清中炎性细胞因子和趋化因子的水平^[31], 显著降低慢性酒精暴露引起的 AST、ALT、血清碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)水平异常升高, 部分恢复肝脏细胞病理形态, 下调炎症细胞因子 IL-6 的表达水平, 减轻肝脏炎症^[32-33], 从而具备良好的解酒护肝作用, 目前二氢杨梅素已经在美国作为防止酒精宿醉的营养补充剂使用^[34]。此外, DMY 还具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抗高血压等多种生理功能, 对机体具多靶点保护作用^[35]。在中国、日本和韩国, 葛花是药食同源的中药, 广泛地用于治疗酒精中毒及与酒精相关的肝脏疾病^[36]。研究发现葛花提取物通过调节小鼠的乙醇代谢和抗氧化酶, 对急性酒精中毒起到保护作用^[37]。

本研究结果显示, 与空白组比较, 酒精模型组小鼠血液乙醇质量浓度极显著上升, 体质量明显下降, 肝脏指数极显著上升, 肝脏组织 ADH 和 ALDH 活力极显著降低, 血清 ALT、AST 活力和 TG 水平极显著升高, 肝脏 CAT、SOD、GSH-Px 和还原型 GSH 活力均显著降低, MDA 含量显著升高, TNF-α、IL-6 浓度极显著增大; HE 染色显示, 小鼠肝细胞肿胀, 细胞核固缩, 胞质中出现大小不一的脂滴, 并伴有少量炎性细胞浸润, 说明酒精致小鼠肝损伤模型造模成功。与酒精模型组相比, 灌胃藤葛复合固体饮料小鼠血液乙醇质量浓度极显著降低; 体质量明显升高、肝脏指数明

显下降;血清 ALT、AST 活力和 TG 水平极显著降低,肝脏 CAT、SOD、GSH-Px 和还原型 GSH 活力均显著升高,MDA 含量显著降低,TNF- α 、IL-6 浓度极显著降低,病理组织切片也显示小鼠肝细胞炎症减轻,表明藤葛复合固体饮料通过增强酒精代谢酶 ADH、ALDH 活力加速乙醇代谢、提高抗氧化酶 CAT、SOD、GSH-Px 和还原型 GSH 活

力抵御乙醇给机体的氧化应激损伤,降低肝脏炎症水平缓解酒精性肝损伤,其中低剂量组与阳性对照组效果相当,高剂量组整体效果更佳,存在一定的剂量-效应关系,起到较好的解酒护肝功能。该固体饮料解酒护肝功能因子明确、口感佳、感官性状优良、携带方便、效果优良、值得开发推广。



注: A. 空白组; B. 模型组; C. 阳性对照组; D. 藤葛复合固体饮料低剂量组; E. 藤葛复合固体饮料高剂量组。

图 1 小鼠肝脏组织病理学变化(HE, 400 $\times$)

Fig.1 Histological observations of liver tissues (HE, 400 $\times$)

参考文献

- [1] AXLEY PD, RICHARDSON CT, SINGAL AK. Epidemiology of alcohol consumption and societal burden of alcoholism and alcoholic liver disease [J]. Clin Liver Dis, 2019, 23(1): 39–50.
- [2] 张鸿志, 李璐, 刘永明, 等. 解酒制品研究进展[J]. 酿酒科技, 2021, 9: 65–73.
ZHANG HZ, LI L, LIU YM, et al. Research progress in anti-hangover products [J]. Liquor-Mak Sci Technol, 2021, 9: 65–73.
- [3] ROCCO A, COMPARE D, ANGRISANI D, et al. Alcoholic disease: Liver and beyond [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20 (40): 14652–14659.
- [4] 罗安玲. 葛根、藤茶、玉米低聚肽复合组方对小鼠的解酒保肝作用研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2019.
LUO ANL. Study on the anti-alcohol and hepatoprotective effect of compound of *Pueraria*, *Ampelopsis grossedentata*, and corn oligopeptides against alcoholic liver injury in mice [D]. Shanghai: Shanghai Jiaotong University, 2019.
- [5] 孔维宗, 王迎春. 酒精性肝病的治疗进展[J]. 现代医药卫生, 2017, 33(1): 15–17.
KONG WZ, WANG YC. Progress on alcohol liver disease treatment [J]. Mod Med Health, 2017, 33(1): 15–17.
- [6] 陈家明, 焦春伟, 梁慧嘉, 等. 姜黄植物饮料对 KM 小鼠的解酒作用[J]. 现代食品科技, 2022, 38(7): 40–47.
CHEN JM, JIAO CW, LIANG HJ, et al. Antialcoholism effects of *Curcuma* botanical beverage in KM mice [J]. Mod Food Sci Technol, 2022, 38(7): 40–47.
- [7] 赵先银, 刘梦扬, 王丹, 等. 药食两用中草药防治酒精性肝病的研究进展[J]. 中南药学, 2021, 19(2): 231–237.
ZHAO XY, LIU MY, WANG D, et al. Research progress in medicinal and edible Chinese herbal medicine for alcoholic liver disease [J]. Cent South Pharm, 2021, 19(2): 231–237.
- [8] 范莉. 中药藤茶的质量评价及其活性成分二氢杨梅素的代谢相关研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2018.
FAN L. Quality evaluation of *Ampelopsis grossedentata* and metabolic-related study of its bioactive ingredient dihydromyricetin [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2018.
- [9] 李佳川, 李思颖, 王优, 等. 藤茶化学成分、药理作用及质量标志物(Q-marker)预测分析[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2021, 47(3): 254–266.
LI JC, LI SY, WANG Y, et al. Predictive analysis on chemical composition, pharmacological effects and quality marker (Q-marker) of *Ampelopsis grossedentata* [J]. J Southwest Minzu Univ (Nat Sci Ed), 2021, 47(3): 254–266.
- [10] 李冬梅, 郑耿扬, 梁鼎, 等. 藤茶二氢杨梅素口服液制备工艺优化[J]. 农业工程, 2020, 10(6): 66–70.
LI DM, ZHENG GY, LIANG D, et al. Preparation technology optimization of dihydromyricetin oral liquid from *Ampelopsis grossedentata* [J]. Agric Eng, 2020, 10(6): 66–70.
- [11] 罗非君, 丁锦屏. 藤茶及二氢杨梅素的生物学功能研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2022, 41(2): 8–21.
LUO FJ, DING JP. Progress of biological functions of vine tea and dihydromyricetin [J]. J Food Sci Biotechnol, 2022, 41(2): 8–21.

- [12] QIU P, DONG Y, LI B, *et al.* Dihydromyricetin modulates p62 and autophagy crosstalk with the Keap-1/Nrf2 pathway to alleviate ethanol-induced hepatic injury [J]. *Toxicol Lett*, 2017, 274: 31–41.
- [13] XIE JL, CHEN TU, MING S, *et al.* Dihydromyricetin alleviates carbon tetrachloride-induced acute liver injury via JNK-dependent mechanism in mice [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(18): 5473–5481.
- [14] SILVA J, SPATZ MH, FOLK C, *et al.* Dihydromyricetin improves mitochondrial outcomes in the liver of alcohol-fed mice via the AMPK/Sirt-1/PGC-1 α signaling axis [J]. *Alcohol*, 2021, (91): 1–9.
- [15] 李冬梅, 杨洁, 李宝玉, 等. 藤葛复合解酒固体饮料的制备及体外解酒作用[J]. *食品工业*, 2022, 43(4): 47–53.
LI DM, YANG J, LI BY, *et al.* The preparation of ampelopsis grossedentata and puerariae fos complex anti-inebriation solid beverage and evaluation of anti-inebriation activity *in vitro* [J]. *Food Ind*, 2022, 43(4): 47–53.
- [16] 李冬梅, 李志阳, 杨君, 等. 蒺藜提取物对酒精性肝损伤大鼠的保护作用[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(18): 380–386.
LI DM, LI ZY, YANG J, *et al.* Protective effect of *Acanthopanax trifoliatum* extract on rats with alcoholic liver injury [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2021, 42(18): 380–386.
- [17] 周宏炫, 黄颖, 谭书明, 等. 刺梨多酚对急性酒精中毒大鼠的解酒和护肝作用[J]. *食品科学*, 2021, 42(17): 163–169.
ZHOU HX, HUANG Y, TAN SM, *et al.* Anti-alcoholic and hepatoprotective effects of polyphenols from the fruit of *Rosa roxburghii* Tratt. in rats with acute alcoholism [J]. *Food Sci*, 2021, 42(17): 163–169.
- [18] LIEBER CS. Alcoholic fatty liver: Its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis [J]. *Alcohol*, 2004, 34(1): 9–19.
- [19] 肖婷, 郭正红, 骆光佳, 等. 不同莓果提取物对小鼠慢性酒精性肝病的作用[J]. *贵州医科大学学报*, 2021, 46(9): 1018–1023, 1030.
XIAO T, GUO ZH, LUO GJ, *et al.* Effects of different berry extracts on chronic alcoholic liver disease in mice [J]. *J Guizhou Med Univ*, 2021, 46(9): 1018–1023, 1030.
- [20] 陈志飘. 白扁豆多糖防治酒精性肝病的实验研究[D]. 恩施: 湖北民族学院, 2017.
CHEN ZP. Experimental study on prevention and treatment of white hyacinth bean polysaccharide on alcoholic liver disease [D]. Enshi: Hubei University for Nationalities, 2017.
- [21] XIANG JL, ZHU WX, LI ZX, *et al.* Effect of juice and fermented vinegar from *Hovenia dulcis* peduncles on chronically alcohol-induced liver damage in mice [J]. *Food Function*, 2012, 3(6): 628–634.
- [22] 黄颖, 谭书明, 陈小敏, 等. 刺梨口服液对急性醉酒小鼠的解酒护肝作用[J]. *现代食品科技*, 2019, 35(7): 18–23.
HUANG Y, TAN SM, CHEN XM, *et al.* Antialcoholism effects of *Rosa roxburghii* Tratt oral liquid in acute drunkenness mice [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2019, 35(7): 18–23.
- [23] 陈丰. 枳椇解酒保肝方对大鼠酒精性肝损伤的防治作用及机制探讨[D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
CHEN F. Prevention and treatment and its mechanism of Zhige Jiejiu Baogan Fang on alcoholic liver injury in rats [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2018.
- [24] 赵雪珂, 穆茂, 程明亮. 酒精性肝病与氧化应激[J]. *临床肝胆病杂志*, 2014, 30(2): 118–120.
ZHAO XK, MU M, CHENG ML. Alcoholic liver disease and oxidative stress [J]. *J Clin Hepatol*, 2014, 30(2): 118–120.
- [25] 段佳辉. 忧遁草叶提取物解酒、保肝及抗氧化功能的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2019.
DUAN JH. Anti-alcoholism, liver-protection and antioxidant function of extracts from *Clinacanthus nutans* leaves [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019.
- [26] ZHAO Y, XIAO X, FRANK SJ, *et al.* Distinct mechanisms of induction of hepatic growth hormone resistance by endogenous IL-6, TNF- α , and IL-1 β [J]. *Am J Physiol Endoc M*, 2014, 307(2): E186–198.
- [27] LI Y, LI S, XIA Y, *et al.* Alteration of liver immunity by increasing inflammatory response during co-administration of methamphetamine and atazanavir [J]. *Immunopharm Immun*, 2020, 42(3): 237–245.
- [28] WANG YC, XU GL, JIANG WD, *et al.* Estrogen suppresses metastasis in rat hepatocellular carcinoma through decreasing interleukin-6 and hepatocyte growth factor expression [J]. *Inflammation*, 2012, 35(1): 143–149.
- [29] 冯琳. 发酵枸杞汁的制备及解酒护肝功能的评价[D]. 无锡: 江南大学, 2021.
FENG L. Preparation of fermented *Lycium barbarum* juice and its evaluation of anti-alcoholism and liver-protection [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021.
- [30] WANG H, ROGERS TJ, PATON JC, *et al.* Differential effects of *Escherichia coli* subtilase cytotoxin and shiga toxin 2 on chemokine and proinflammatory cytokine expression in human macrophage, colonic epithelial, and brain microvascular endothelial cell lines [J]. *Infect Immun*, 2014, 82(9): 3567–3579.
- [31] LIU L, SUN S, RUI H, *et al.* *In vitro* inhibitory effects of dihydromyricetin on human liver cytochrome P450 enzymes [J]. *Pharm Biol*, 2017, 55(1): 1868–1874.
- [32] SILVIA J, YU X, MORADIAN R, *et al.* Dihydromyricetin protects the liver via changes in lipid metabolism and enhanced ethanol metabolism [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2020, 44(5): 1046–1060.
- [33] QIU P, DONG Y, LI B, *et al.* Dihydromyricetin modulates p62 and autophagy crosstalk with the Keap-1/Nrf2 pathway to alleviate ethanol-induced hepatic injury [J]. *Toxicol Lett*, 2017, 274: 31–41.
- [34] LIU D, MAO YQ, DING LJ, *et al.* Dihydromyricetin: A review on identification and quantification methods, biological activities, chemical stability, metabolism and approaches to enhance its bioavailability [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2019, 91: 586–597.
- [35] 邓阳, 颜苗, 蔡琳琳, 等. 二氢杨梅素多靶点保护作用的研究进展[J]. *中国医院药学杂志*, 2016, 36(13): 1136–1140.
DENG Y, YAN M, CAI HL, *et al.* Research progress in multi-target protection of dihydromyricetin [J]. *Chin J Hosp Pharm*, 2016, 36(13): 1136–1140.
- [36] 许皖. 葛花、枳椇子及其配伍对急性酒精性肝损伤小鼠保护作用的实验研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2020.
XU W. Experimental study on the protective effects of Gehua, Zhijuzi and their compatibility on mice with acute alcoholic liver injury [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2020.
- [37] CHEN X, CAI F, GUO S, *et al.* Protective effect of Flos puerariae extract following acute alcohol intoxication in mice [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2014, 38(7): 1839–1846.

(责任编辑: 黄周梅 韩晓红)

作者简介



李冬梅, 硕士, 副教授, 主要研究方向为食品加工与营养安全。
E-mail: 1308216802@qq.com