

加减葛花解醒汤对小鼠急性乙醇中毒的干预作用

程 婕, 储全根, 储 俊, 刘小双, 轩 云, 蔡正银

(安徽中医药大学, 安徽 合肥 230012)

[摘要]目的 观察加减葛花解醒汤对小鼠急性乙醇中毒的干预作用。方法 将40只昆明种雄性小鼠随机分为正常组, 模型组, 加减葛花解醒汤低、中、高剂量组, 每组8只。采用白酒灌胃复制小鼠急性乙醇中毒模型。给药后处死小鼠, 取全血测定乙醇含量, 取肝脏组织匀浆后分别检测超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量。结果 随着加减葛花解醒汤浓度的升高, 急性乙醇中毒小鼠的醉酒耐受时间逐渐延长, 醒酒时间逐渐缩短。与模型组比较, 加减葛花解醒汤低、中、高剂量组小鼠全血乙醇浓度明显降低($P < 0.05$), 加减葛花解醒汤中、高剂量组小鼠肝组织中SOD水平显著升高($P < 0.05$), 高剂量组MDA水平显著降低($P < 0.05$)。结论 加减葛花解醒汤能明显降低血液乙醇浓度和肝组织中MDA水平, 升高SOD水平, 具备较好的解酒功效, 其解酒的机制可能与保护肝细胞的作用有关。

[关键词]葛花解醒汤; 急性酒精中毒; 解酒作用; 肝功能; 氧化应激

[中图分类号]R575.1 **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2019.02.018

葛花解醒汤出自李东垣《内外伤辨惑论》, 为“解酒化积”之名方^[1]。本课题组既往对该方的解酒作用进行了初步研究^[2], 鉴于该方组成中不属于药食两用的中药, 笔者对原方中的这些药物进行去除, 加上属于药食两用且传统上认为具有解酒作用的枳椇子, 组成加减葛花解醒汤, 进一步观察该方对急性乙醇中毒小鼠的“解酒”作用, 并检测血液中乙醇含量、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)含量、丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量, 以了解其对急性乙醇中毒的干预作用及部分作用机制。

1 材料

1.1 实验动物 健康昆明种雄性小鼠100只, 体重为18~22 g, 均为清洁级, 检疫合格, 由安徽医科大学实验动物中心[生产许可证号为SCXK(皖)2007-001]提供。动物可自行摄取标准饲料和清洁用水, 动物实验遵守安徽中医药大学实验动物伦理委员会的伦理要求。

1.2 药物 56度红星二锅头白酒: 北京红星股份有限公司; 全部中药均购自安徽中医药大学国医堂门诊部, 由安徽中医药大学杨青山鉴定。

1.3 试剂 SOD测定试剂盒、MDA试剂盒: 均购自南京建成生物工程研究所; 无水乙醇: 国药集团化学试剂有限公司。

1.4 仪器 台式高速离心机(型号为TG16-W): 长

沙维尔康湘鹰离心机有限公司; 电热恒温水槽(型号: DK-8D): 上海精密实验设备有限公司; 高压蒸汽灭菌器(型号: SVM30H): 上海申安医疗器械厂; 电子天平(型号: AL204): 梅特勒-托利仪器(上海)有限公司; 酶标仪(型号: MB-530): 深圳惠松有限公司; 气质联用仪(型号: GC456-SQ): 美国布鲁克·道尔顿公司。

2 方法

2.1 中药制剂的制备 本方由木葛花、枳椇子、缩砂仁、白豆蔻各20 g, 白茯苓、橘皮、人参各6 g等组成, 以10倍量的水浸泡2 h, 煮沸1 h, 滤过, 药渣再用8倍量的水煮沸1 h, 滤过, 合并二次滤液, 浓缩成含生药1 g/mL, 此为中浓度组; 高浓度组进行二次浓缩使之含生药量2 g/mL, 低浓度组加入等量蒸馏水稀释成含生药量0.5 g/mL; 装瓶, 0~4℃冰箱放置, 保存以备灌胃用。

2.2 小鼠致醉给酒量的测定 参照文献^[3], 将昆明种雄性小鼠20只, 随机分成5组, 每组4只, 禁食12 h后, 采取灌胃给酒的方式, 给酒量设立5个梯度15、16、18、20、22 mL/kg, 记录小鼠的醉倒率和死亡率。

2.3 实验分组及给药方法 将40只昆明种雄性小鼠随机分为5组(正常组, 模型组, 加减葛花解醒汤低、中、高剂量组), 每组8只, 各组均以标准饲料喂养, 适应性饲养3 d后进行实验。各组小鼠禁食、禁水12 h, 正常组正常饮食, 模型组按照16 mL/kg剂量灌胃56度红星二锅头白酒, 加减葛根解醒汤低、中、高剂量组先按照20 mL/kg体质量灌胃低、中、高浓度加减葛花解醒汤, 30 min后再按照16 mL/kg剂

基金项目: 安徽中医药大学探索性科研项目

作者简介: 程婕(1991-), 女, 硕士研究生

通信作者: 储全根(1962-), 男, 博士, 教授, 硕士研究生导师,

286428483@qq.com

量灌胃 56 度红星二锅头白酒,正常组予以等量蒸馏水灌胃。

2.4 观察指标及方法

2.4.1 醉酒的行为学测定 观察记录各组小鼠(除正常组外)醉酒耐受时间(从灌酒到翻正反射消失的时间),维持时间(翻正反射消失持续时间),计算醉倒率。小鼠醉酒与否,以翻正反射是否消失为标准,即小鼠灌酒后将其背向下,轻轻放入鼠笼,若小鼠背向下的姿势保持 30 s 以上,则认为翻正反射消失,即认定为醉酒。

2.4.2 生化指标测定 灌胃给酒后 0.5 h 取血样。取 0.5 mL 全血采用气相色谱法测定乙醇浓度。每组 8 只小鼠摘眼球取血处死,无菌取肝。将肝组织置于生理盐水中机械匀浆制成肝组织匀浆,按照试剂盒说明书分别测定肝组织 SOD、MDA 活性。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计软件对数据进行统计分析。连续型变量采用“均数±标准差($\bar{x}\pm s$)”进行统计学描述。正常组与模型组均数比较采用两个独立样本 t 检验;模型组和加减葛花解醒汤低、中、高剂量组均数比较采用单因素方差分析,均数多重比较采用 LSD 检验。采用双侧检验,显著水准为 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 小鼠致醉酒量的测定 给酒量为 20、22 mL/kg 时,虽然小鼠的醉倒率达到 100%,但同时死亡率也为 100%。当给酒量为 18 mL/kg 时,小鼠的醉倒率为 75%,死亡率高达 50%,而当给酒量为 16 mL/kg 时,小鼠的醉倒率为 75%,死亡率为 0。为使得后续实验得以完成,故选择 16 mL/kg 为 56 度白酒的最佳致醉给酒量。

3.2 各组小鼠翻正反射实验结果比较 与模型组比较,加减葛花解醒汤各治疗组小鼠耐受时间均明显延长($P<0.05$)、维持时间均明显缩短($P<0.05$);且以加减葛花解醒汤高剂量组小鼠耐受时间最长($P<0.05$),维持时间最短($P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组小鼠翻正反射实验结果比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	耐受时间/min	维持时间/min
模型	8	18.88±3.80	346.00±15.68
加减葛花解醒汤低剂量	8	33.50±8.23 [#]	310.63±23.72 [#]
加减葛花解醒汤中剂量	8	43.13±6.98 [#]	290.00±26.60 [#]
加减葛花解醒汤高剂量	8	65.63±11.50 ^{#△◇}	266.75±37.78 ^{#△◇}

注:与模型组比较,[#] $P<0.05$;与加减葛花解醒汤低剂量组比较,[△] $P<0.05$;与加减葛花解醒汤中剂量组比较,[◇] $P<0.05$

3.3 各组小鼠全血中乙醇浓度比较 与模型组比较,加减葛花解醒汤低、中、高剂量组小鼠全血乙醇

浓度明显降低($P<0.05$),且随着剂量的增加,小鼠血液中乙醇浓度呈递减性降低。见表 2。

表 2 各组小鼠全血中乙醇浓度比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	乙醇浓度/($\mu\text{L}/\text{mL}$)
模型	8	4.33±2.10
加减葛花解醒汤低剂量	8	2.66±1.12 [#]
加减葛花解醒汤中剂量	8	2.03±0.65 [#]
加减葛花解醒汤高剂量	8	1.87±0.61 [#]

注:与模型组比较,[#] $P<0.05$

3.4 各组小鼠肝组织中 SOD、MDA 水平比较 与正常组比较,模型组小鼠肝组织中 SOD 水平显著降低($P<0.05$),MDA 水平显著升高($P<0.05$);与模型组比较,加减葛花解醒汤中、高剂量组小鼠肝组织中 SOD 水平显著升高($P<0.05$),高剂量组 MDA 水平显著降低($P<0.05$),加减葛花解醒汤升高 SOD 和降低 MDA 的作用具有明显的剂量依赖性。见表 3。

表 3 各组对小鼠肝组织 SOD、MDA 水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	SOD/(U/g)	MDA/(U/g)
正常	8	89.32±16.62	4.56±0.65
模型	8	68.72±3.12 [*]	8.19±1.91 [*]
加减葛花解醒汤低剂量	8	77.31±12.40	6.73±2.05
加减葛花解醒汤中剂量	8	83.05±13.75 [#]	6.54±0.66
加减葛花解醒汤高剂量	8	93.09±11.10 ^{#△}	4.70±0.21 ^{#△◇}

注:与正常组比较,^{*} $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$;与低剂量组比较,[△] $P<0.05$;与中剂量组比较,[◇] $P<0.05$

4 讨论

酒精的主要化学成分是乙醇,乙醇在体内可直接扩散进入血液,随血液流向各个组织器官,大约有 95% 的乙醇通过肝脏代谢^[4],仅有 2%~10% 由呼吸道、尿液和汗腺以原形排出体外。醉酒,医学上称为急性乙醇中毒,是由于血液中过高浓度的乙醇短时间内大量进入脑内,抑制大脑皮质,使皮质下中枢失去控制,中枢神经细胞对各种信息的反应和传递发生障碍而产生的一系列病理变化^[5]。当乙醇进入肝细胞后,通过代谢氧化成乙醛,在黄嘌呤氧化酶的作用下,乙醛转变成超氧化物和自由基,机体的氧化应激平衡受到破坏,体内 SOD 等抗氧化酶被破坏,从而无法清除过量自由基时,就会造成广泛的肝细胞损伤^[6]。MDA 是脂质过氧化的终产物,可作用于核因子 NF- κ B,使致炎因子基因表达释放增加,还可使细胞膜的流动性和通透性发生障碍,导致肝细胞结构与功能损害,形成机体的自由基损伤^[7]。

为了更好地研究葛花解醒汤的解酒作用并探讨其作用机制,笔者在葛花解醒汤的基础上进行加减,去除了非药食同源的药物。全方以葛花与

枳椇子为君,两药均入阳明,葛花芳香化湿,解酒醒脾,令湿热从肌肉而出;《本草拾遗》载有“枳椇子,止渴除烦,去膈上热,润五脏,利大小便”。白茯苓淡利渗湿,能驱酒湿之邪从小便而出。缩砂仁、白豆蔻温中健脾,行气消滞。诸药合用,共成解酒化积、分消化湿、健脾和胃之剂。现代研究表明,葛花提取物能使灌酒后的雄性大鼠血液乙醇浓度明显下降,主要是葛花中含有的大豆苷及大豆苷元能有效减轻乙醇对大脑的抑制作用^[8]。HAN等^[9]认为,灌胃给予葛花提取物葛花苷或腹腔注射其代谢产物葛花苷均能降低乙醇中毒大鼠血液中乙醇的浓度及死亡率。现代药理研究表明,三萜类和黄酮类化合物是枳椇子的主要活性成分,具有抗甜味、抑制组胺释放和保肝解酒等作用^[10-12]。柳海艳等^[13]发现,枳椇子提取物可能通过增加体内抗氧化物如维生素C、维生素E和维生素A的含量,从而达到增加SOD活力的作用。

本次结果表明,加減葛花解醒汤能明显降低小鼠血液中乙醇含量,这与本课题组既往研究成果^[2]一致,说明加減的药物并没有影响其作用效果,方剂可以进行进一步优化。同时加減葛花解醒汤可下调肝组织中MDA水平、升高SOD的活力,能增强小鼠体内清除氧自由基的能力,推测此可能是其保护肝细胞损伤的部分机制,这与毛中伏等^[14]研究的解酒中药复方“肝易复”对小鼠急性酒精性肝损伤的保护作用结果一致。本实验为加減葛花解醒汤的进一步研究和开发奠定了基础。

参考文献:

- [1] 古今,马尧遥.解酒药物的研究进展[J].中国药物应用与检测,2010,7(6):371-373.
- [2] 储全根,张登山,汪克明,等.李氏解酒方解酒作用的实验研究[J].安徽中医学院学报,2007,26(5):27-29.
- [3] 汤子春,邹坤,汪鋈植,等.开口箭与筒鞘蛇菰提取物醒酒作用的实验研究[J].时珍国医国药,2006,17(11):

2163-2165.

- [4] MASALKAR P D, ABHANG S A. Oxidative stress and antioxidant status in patients with alcoholic liver disease [J]. Clin Chim Acta, 2005, 355(1/2): 61-65.
- [5] MEIER P, SEITZ H K. Age, alcohol metabolism and liver disease [J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2008, 11(1): 21-26.
- [6] 王心如. 毒理学基础 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 65-67.
- [7] LV W P, WANG C, LI L, et al. Progress in studies of products of antiinebriation [J]. Strait Pharm J, 2009, 21(6): 811.
- [8] 高学清, 汪何雅, 钱和, 等. 葛根和葛花对急性酒精中毒小鼠的解酒作用 [J]. 食品与生物技术学报, 2012, 36(6): 621-627.
- [9] HAN Y O, HAN M J, PARK S H, et al. Protective effects of kakkalide from flos puerariae on ethanol-induced lethality and hepatic injury are dependent on its biotransformation by human intestinal microflora [J]. Journal of Pharmacological Sciences, 2003, 93(3): 331-336.
- [10] 王艳林, 韩钰, 钱京萍, 等. 枳椇子抗脂质过氧化作用的实验研究 [J]. 中草药, 1994, 25(6): 306-307.
- [11] YOSHIKAWA K, TUMURAS S, YAMADA K, et al. Antisweet natural products: VII: Hodulosides I, II, III, IV and V from the leaves of Hovenia dulcis Thunb [J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2008, 40(9): 2287-2291.
- [12] 韩钰, 王艳林, 樊玉谷, 等. 枳椇子对实验性肝损伤的保护作用 [J]. 现代应用药学, 1997, 14(2): 6-8.
- [13] 柳海艳, 钟赣生, 李怡文, 等. 醇提和水提葛花枳椇子及其配伍对酒精性肝损伤大鼠肝脏抗氧化功能的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(4): 1181-1184.
- [14] 毛中伏, 谈硕彦, 闫昌誉, 等. 解酒中药复方“肝易复”对小鼠急性酒精性肝损伤的保护作用 [J]. 中药新药与临床药理, 2016, 27(5): 660-665.

(收稿日期: 2018-09-05; 编辑: 曹健)

Therapeutic Effect of Modified Gehua Jiecheng Decoction on Mice with Acute Alcoholism

CHENG Jie, CHU Quan-gen, CHU Jun, LIU Xiao-shuang, XUAN Yun, CAI Zheng-yin
(Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230012, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the therapeutic effect of Modified Gehua Jiecheng Decoction on mice with acute alcoholism. **Methods** A total of 40 male Kunming mice were randomly divided into normal group, model group, and low-, middle-, and high-dose Modified Gehua Jiecheng Decoction groups, with 8 mice in each group. A mouse model of acute alcoholism was established by the administration of liquor by gavage; after drug treatment, the mice were sacrificed, and whole blood was collected to measure the content

· 方药研究 ·

桃红四物汤中6种指标性成分的含量测定

王继陈^{1,2}, 韩 岚^{1,2}, 张艳艳^{2,3}, 彭代银^{1,2}

(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012; 2. 中药复方安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230012; 3. 安徽医学高等专科学校, 安徽 合肥 230601)

[摘要]目的 建立超高效液相色谱法同时测定桃红四物汤中6种指标性成分(羟基红花黄色素A、苦杏仁苷、芍药苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、藁本内酯)的含量。方法 采用Agilent Technologies 1290 Infinity超高效液相色谱系统、DAD检测器。色谱柱为Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), 流动相A为0.05%乙酸水(含7.84 mmol/L乙酸铵), B为甲醇溶液, 采用梯度洗脱程序和多波长融合检测方法, 流速0.2 μL/min, 进样量2 μL, 柱温25℃。结果 6种指标性成分的线性、分离度、稳定性、重复性与精密性良好; 该方法能够快速、稳定地定量羟基红花黄色素A、苦杏仁苷、芍药苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、藁本内酯。结论 该方法稳定、可靠、重复性高, 可适用于桃红四物汤的质量控制。

[关键词]桃红四物汤; 指标性成分; 含量测定; 超高效液相色谱

[中图分类号]R927.2 **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2019.02.019

桃红四物汤是活血化瘀、养血调经的经典名方, 由桃仁、红花、当归、川芎、熟地黄和白芍组成。现代药理研究表明, 桃红四物汤中阿魏酸、羟基红花黄色素A、苦杏仁苷、藁本内酯等成分具有抗炎、抑制血小板聚集、抗血栓形成、抗血小板活化等药理作用^[1-3], 临床上可用于治疗脑缺血、骨折、痛经、产后病等疾病^[4-7]。对此, 建立桃红四物汤质量控制标准十分必要, 现行《中华人民共和国药典》(2015年版)中无桃红四物汤的质量控制标准, 且目前关于桃红

四物汤质量控制的研究较少, 对成分的考察较为片面, 只选择某一部位或者某一类成分进行考察^[8-11], 且忽视中药复方整体性、复杂性的特点, 仍然需要进一步研究。本研究采用超高效液相色谱法建立同时测定羟基红花黄色素A、苦杏仁苷、芍药苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、藁本内酯6种成分含量的方法, 为桃红四物汤的质量标准研究提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 主要仪器 1290 Infinity超高效液相色谱仪[包括G4220A 1290 Bin Pump(系列号DEBAA05426)四元泵、G1316C 1290TCC(系列号DEBAC10714)柱温箱、G4226A 1290Samper(系列号DEBAP06788)自动进样器、G4212A 1290DAD(系列号DEBAF04086)检测器]; 美国安捷伦公司;

基金项目:国家自然科学基金项目(81503291, 81473387); 安徽省重点研究与开发计划项目(1704a0802141)

作者简介:王继陈(1994-), 男, 硕士研究生

通信作者:彭代银(1963-), 男, 教授, 博士研究生导师, pengdy@163.com

of alcohol; liver tissue homogenate was used to measure the activity of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA). **Results** With the increase in the concentration of Modified Gehua Jiecheng Decoction, there was a gradual increase in drunkenness tolerance time and a gradual reduction in sobering time in mice with acute alcoholism. Compared with the model group, the low-, middle-, and high-dose Modified Gehua Jiecheng Decoction groups had a significant reduction in the concentration of alcohol in blood ($P < 0.05$); the middle- and high-dose Modified Gehua Jiecheng Decoction groups had a significant increase in the level of SOD in liver tissue ($P < 0.05$), and the high-dose Modified Gehua Jiecheng Decoction group had a significant reduction in the level of MDA in liver tissue ($P < 0.05$). **Conclusion** Modified Gehua Jiecheng Decoction can significantly reduce the concentration of alcohol in blood and the content of MDA in liver tissue and increase the activity of SOD. Therefore, it has a good antialcoholic effect, possibly by protecting hepatocytes.

[Key words] Gehua Jiecheng Decoction; Acute alcoholism; Antialcoholic effect; Liver function; Oxidative stress