

4.4 红景天中除含红景天甙外尚有酪醇、胡萝卜甙、百脉根甙、没食子酪等,在本文条件下以上物质不干扰红景天甙的测定。另外,保健品中的其他甙类、黄酮类、叶绿素以及人工添加物质如山梨酸、苯甲酸、糖精钠、色素等,亦不干扰红景天甙的测定。

4.5 本方法最低检出限为 $0.01\mu\text{g}$ 。

5 本文应用高效液相色谱法测定保健品中的红景天甙,方法简便,干扰少,精密度及准确度均较满意(回收率为 $96.2\% \sim 101.4\%$, RSD 为 $2.82\% \sim 5.98\%$)。有较强的实用性。

6 参考文献

- 1 彭江南,等.大花红景天化学成分的研究.中草药,1995,26(4)
- 2 陈金瑞,等.长鞭红景天化学成分研究.植物学报,1991,33(1):61~64
- 3 王曙,等.红景天属植物中红景天甙的高效液相色谱分析.药学学报,1992,27(1)

乙醇诱发急性肝损伤生物标记物的探讨

童 英 姚小曼 吴少平 北京市卫生防疫站 (100013)

转氨酶 GPT 和 GOT 是应用最广的急慢性肝损伤的指标,但乙醇诱发急性肝损伤对转氨酶的影响报道较少,有一例报道以 $6\ 000\ \text{mg/kg BW}$ 乙醇给小鼠灌胃,16 h 后小鼠血清 GPT 无明显升高。⁽³⁾大量研究表明 $4\ 800 \sim 6\ 000\ \text{mg/kg}$ 乙醇对小鼠一次灌胃后 4~16 h 可引起肝组织中 MDA 和 GSH 含量的变化。^(1~3) $6\ 000\ \text{mg/kg}$ 乙醇灌胃后 24 h 可导致血清甘油三脂升高。⁽⁴⁾ $2\ 400\ \text{mg/kg}$ 乙醇对大鼠连续灌胃 9 周同时喂饲低营养饲料可引起肝细胞的病理组织学改变,即肝细胞水肿呈有气球样变,胞质内广泛出现圆形脂肪滴并有灶性及点状坏死。⁽⁵⁾对乙醇诱发急性肝损伤生物标记物的研究,可为评价保健食品复制乙醇急性肝损伤动物模型的观察指标提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物 昆明种小鼠,体重 $20 \sim 25\ \text{g}$,雄性,由军事医学科学院动物中心提供。

1.2 乙醇 北京化工厂生产,批号:961104。试验时用蒸馏水稀释成 50% 的乙醇。

1.3 试验方法 将小鼠随机分组每组 10 只,乙醇组给予 50% 乙醇一次经口灌胃,灌胃量 $0.1 \sim 0.12\ \text{mL}/10\ \text{g BW}$ ($4\ 000 \sim 4\ 800\ \text{mg/kg BW}$)。阴性对照组给予等量蒸馏水。

以 $4\ 000\ \text{mg/kg BW}$ 乙醇对小鼠每日灌胃一次,分别在 4、7、14、30 d 时取内眦静脉血测定血清中丙谷转氨酶(GPT)、谷草转氨酶(GOT)的含量,30 d 组同时取肝脏进行病理组织学检查。

以 $4\ 000\ \text{mg/kg BW}$ 乙醇对小鼠每日灌胃一次连续 30 d,取肝脏制成 10% 肝匀浆,测定肝组织中丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)含量。

以 $4\ 800\ \text{mg/kg BW}$ 乙醇对小鼠一次灌胃 12 h 后测定肝组织中 MDA、GSH 和血清甘油三脂(TG)含量,同时取肝脏进行脂肪染色,镜检。试验重复一次。

1.4 观察指标的测定方法

血清谷丙转氨酶(GPT)的测定 赖氏法(试剂盒北京化工厂生产)。

血清谷草转氨酶(GOT)的测定 赖氏法(试剂盒北京化工厂生产)。

血清甘油三脂(TG)的测定 甘油磷酸氧化酶过氧化物酶法(试剂盒北京化工厂生产)。

丙二醛(MDA)测定 TBA 比色法。

还原型谷胱甘肽(GSH)测定 DTNB 比色法。

超氧化物歧化酶(SOD)测定 黄嘌呤氧化酶法(试剂盒南京建成生物工程研究所生产)。

蛋白质定量 考马斯亮蓝比色法。

肝脏病理组织学检查 常规制片, H. E 染色, 镜检。

肝组织脂肪染色 取肝脏 10% 福尔马林固定, 冰冻切片, 苏丹Ⅲ脂肪染色, 镜检。

2 结果

2.1 以 4 000 mg/kg BW 乙醇对小鼠连续灌胃 4~30 d 后血清 GPT、GOT 含量与对照组相比无显著性差异(见表 1)。肝脏病理组织学检查结果显示, 30 d 组与对照组相比无明显肝细胞变性坏死等形态学改变。

表 1 乙醇对小鼠血清 GPT、GOT 的影响

给药时间 d	动物数 只	GPT U/L		GOT U/L	
		对照组	乙醇组	对照组	乙醇组
4	10	47.3±8.8	52.1±8.8	90.0±24.8	98.5±25.4
7	10	38.8±15.6	47.3±14.2	117.1±34.9	138.3±24.7
14	10	50.8±10.3	46.4±10.2	178.2±53.4	166.7±40.8
30	10	58.9±24.1	55.5±16.3	109.5±48.3	146.5±64.2

2.2 以 4 000 mg/kg BW 乙醇连续灌胃 30 d, 肝组织中 GSH 含量明显低于对照组, $P < 0.01$; MDA 含量和 SOD 活性与对照组无显著性差异(表 2)。

表 2 乙醇灌胃 30 d 肝组织中 MDA、GSH、SOD 的变化

组别	动物数 只	MDA	GSH	SOD
		nmol/mg 蛋白	$\mu\text{mol/g}$ 肝重	NU/mg 蛋白
对照组	10	1.94±0.76	7.44±2.66	49.17±12.3
乙醇组	10	1.75±0.54	4.27±2.41 ⁽¹⁾	46.63±4.66

注:与对照组比较 $P < 0.01$

2.3 以 4 800 mg/kg BW 乙醇对小鼠一次灌胃 12 h 后肝组织 MDA 含量明显升高, GSH 含量降低, 血清 TG 升高, 与对照组相比均有显著性差异(表 3), 两次试验结果一致。肝组织脂肪染色结果显示: 乙醇组 80% 动物肝脏可见程度不同的脂滴, 50% 的动物可见大片

状弥漫性脂滴; 对照组大多数动物肝脏内偶见脂滴, 仅呈单个或小片状(表 4)。

表 3 4 800 mg/kg BW 乙醇组 MDA、GSH、TG 的变化

	动物数 只	MDA nmol/mg 蛋白		GSH $\mu\text{mol/g}$ 肝重		TG mmol/L	
		对照组	乙醇组	对照组	乙醇组	对照组	乙醇组
第一次	10	1.45±0.26	3.35±1.64 ⁽²⁾	8.64±1.12	7.74±0.40 ⁽¹⁾	102.2±13.5	128.7±30.2 ⁽¹⁾
第二次	10	1.19±0.21	2.42±0.66 ⁽²⁾	8.94±1.11	7.70±0.69 ⁽¹⁾	89.7±17.6	118.3±24.8 ⁽¹⁾

注:与对照组比较(1) $P < 0.05$, (2) $P < 0.01$ 。

3 讨论

3.1 乙醇作为亲肝性毒物慢性或急性中毒都会导致肝损伤作用, 转氨酶 GPT、GOT 是检测肝脏毒物应用最广的肝损害指标, 但本试验结果表明不论急性或亚急性乙醇接触均未导致血清 GPT、GOT 的明显升高, 这与周炯亮的报道相同,⁽⁶⁾周教授在游离肝细胞试验体系中发现氯乙醇(CE)、乙醇(AL)、四氯化碳(CCl_4)及三氯甲烷(CHCl_3)均产生脂质过氧化作用, 但其强度不同, 如以丙二醛(MDA)含量衡量, 出现下列强度顺序: $\text{CCl}_4 > \text{CHCl}_3 > \text{CE} > \text{AL}$, 表明乙醇是这些毒物中过氧化强度最弱者。如按游离肝细胞 GOT 漏出量来判断, 则以 CCl_4 和 CHCl_3 最敏感, AL 不易检出。说明乙醇诱发肝损伤往往检测不出转氨酶升高的原因是 AL 的氧化能力较弱, 损伤细胞膜的程度仅引起脂质过氧化的作用, 尚未达到使转氨酶从胞浆中漏出的程度。

此研究亦表明, 常规病理组织学检查不是检测乙醇肝损伤的敏感指标。

3.2 表 2 结果表明以 4 000 mg/kg 乙醇连续灌胃 30 d 后,肝组织中 GSH 含量明显低于对照组($P < 0.01$),MDA 含量和 SOD 活性无明显变化,而表 3 以 4 800 mg/kg 乙醇给小鼠一次灌胃 12 h 后肝组织中 MDA 含量明显升高,GSH 含量降低与对照组相比均有显著性差异($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$),此剂量约相当于人每日饮用 50 度白酒 500 mL 的水平。不少报道表明乙醇中毒的肝损伤机制之一是激活氧分子产生氧自由基导致肝细胞膜的脂质过氧化,⁽⁷⁻¹⁰⁾然而脂质过氧化物作用具有明显的时间一效应关系,因为乙醇在体内的代谢特点是长期接触后乙醇脱氢酶的活性代偿性增高,机体对乙醇的耐受性增加,因而肝脏中 MDA 含量无明显升高仅出现 GSH 含量降低。此研究表明乙醇给小鼠灌胃 12 h 后可捕获到 MDA 含量升高的结果,且试验重现性好。王根生等⁽²⁾亦有同样报道。

表 2 及表 3 表明给小鼠乙醇后 12 h 或连续灌 30 d,肝脏的 GSH 均明显下降,而 SOD 无变化,这与 Larry⁽¹¹⁾等报道机体接触乙醇后,体内依赖抗氧化系统的 GSH 在抵抗乙醇所致肝损伤中起着关键作用是一致的。国内孙维强报道⁽³⁾给予小鼠乙醇 6 h 后测定肝脏 GSH 及 MDA 含量,结果表明 GSH 含量明显低于正常对照组,而 MDA 含量明显升高,此结果与本研究基本一致。

3.3 目前认为乙醇引起肝损伤的特点是首先出现肝细胞的脂肪变性,其机制是机体大量摄入乙醇后在乙醇脱氢酶的催化下大量脱氢氧化,使三羧酸循环障碍和脂肪酸氧化减弱而影响脂肪代谢,致使脂肪在肝细胞中沉积,⁽¹²⁾同时血清中 TG 也明显升高。从表 3 可以看出以 4 800 mg/kg BW 乙醇给小鼠一次灌胃后 12 h 血清中 TG 水平明显升高,与对照组相比有显著性差异($P < 0.05$),而且重现性良好。肝脏冰冻切片脂肪染色在镜下可见 80% 动物的肝脏可见程度不同的脂滴,50% 动物的肝细胞可见大片弥漫性脂滴,试验结果与 Baraona E 等的报道一致。⁽⁴⁾

4 小结 本次研究结果表明,肝组织 MDA 和 GSH 含量,血清中 TG 含量以及肝脏冰冻切片脂肪染色这四项指标可作为乙醇诱发急性肝损伤的生物标记物,其中 MDA 为损伤指标,TG、GSH 为生化指标,冰冻切片脂肪染色为病理指标。建议用这四项指标作为复制乙醇急性肝损伤动物模型的观察指标。

5 参考文献

- 程体娟,等.沙棘籽油对小鼠实验性肝损伤的保护作用.中华预防医学杂志,1992,26(4):227~229
- 王根生,等.甘草类黄酮对乙醇所致肝脏损伤的影响.中国药理学报,1993,9(4):271~273
- 孙维强,等.桃仁抗肝脏脂质过氧化损伤的实验研究.湖南中医杂志,1993,9(6):47~48
- Baraona E, et al. Effect of ethanol on lipid metabolism. J. Lipid Res, 1979, 20:289~315
- 叶永安,等.“慢肝消”对大鼠酒精性肝损伤防护作用的研究.中国中医基础医学杂志,1996,2(6):32~33
- 中华预防医学会毒理学会生化毒理学组第二次学术讨论会资料汇编,1991,7:2
- Strubelt O, et al. Enhancement by glutation depletion of ethanol-induced acute hepatotoxicity in vitro and in vivo. Toxicology, 1987, 45:213~223
- Boveris A, et al. Increased chemoluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rat. Arch Biochem Biophys, 1983, 227(2):534~541
- Dianzani M U. Lipid peroxidation in ethanol poisoning: a critical reconsideration. Alcohol, 1985, 20(2):161~173
- Vendemiale G, et al. Increased plasma levels of glutathione and malondialdehyde after acute ethanol ingestion in humans. J Hepatol, 1989, 9(3):359~365
- Larrey D, et al. Genetic factors in hepatotoxicity In: guillouzo A ed. Liver cells and drugs, 1st ed. France: Clichy cedex, 1988, 164:143~152
- 江泉观,主编.基础毒理学.北京:化学工业出版社,132~143

表 4 4 800 mg/kg 乙醇对肝脏脂滴的影响

	动物数 只	0~+ 例数	+ 例数	++ 例数	+++ 例数	++++ 例数
对照组	10	7	1	2	0	0
乙醇组	10	2	1	2	3	2

注:0~+ 肝细胞内偶见个别或几个脂滴;+ 肝细胞内散在脂滴或小灶状脂滴;++ 肝细胞内弥漫但散在或灶片状脂滴;+++ 肝细胞内广泛脂滴;++++ 肝细胞内广泛脂滴,细胞内脂滴密集。