

紫苏提取液对小鼠急性酒精中毒的作用及机制

史继静, 刘朝奇, 陈晶, 王锦江, 李斌, 张伟, 王雅琴, 杨凡

■背景资料

由于生活水平的提高和历史文化的影响, 酗酒和酒精中毒者呈日益增多趋势, 该病不仅严重损害患者身体健康, 而且极易引发一系列的社会问题, 因此开发有效的解酒药物受到人们越来越多的关注。

史继静, 刘朝奇, 李斌, 张伟, 王雅琴, 杨凡, 三峡大学分子生物学研究所 湖北省宜昌市 443002

陈晶, 王锦江, 王雅琴, 三峡大学医学院 湖北省宜昌市 443002

作者贡献分布: 此课题由史继静与刘朝奇设计; 研究过程由史继静, 陈晶, 王锦江, 李斌, 张伟, 王雅琴及杨凡操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由刘朝奇提供; 数据分析由史继静完成; 本论文写作由史继静撰写, 刘朝奇修改校正完成。

通讯作者: 刘朝奇, 443002, 湖北省宜昌市大学路8号, 三峡大学分子生物学研究所, chaoqi@yahoo.com

电话: 0717-63971796 传真: 0717-63971796

收稿日期: 2008-10-15 修回日期: 2008-11-19

接受日期: 2008-11-24 在线出版日期: 2008-12-28

Effects of aqueous extract of perilla leaves on acute alcohol toxication and its underlying mechanism in mice

Ji-Jing Shi, Chao-Qi Liu, Jing Chen, Jin-Jiang Wang, Bin Li, Wei Zhang, Ya-Qin Wang, Fan Yang

Ji-Jing Shi, Chao-Qi Liu, Bin Li, Wei Zhang, Ya-Qin Wang, Fan Yang, Institute of Molecular Biology, China Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei Province, China

Jing Chen, Jin-Jiang Wang, Ya-Qin Wang, Medical Science College of China Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei Province, China

Correspondence to: Dr. Chao-Qi Liu, Institute of Molecular Biology, China Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei Province, China. chaoqi@yahoo.com

Received: 2008-10-15 Revised: 2008-11-19

Accepted: 2008-11-24 Published online: 2008-12-28

Abstract

AIM: To investigate the effects of aqueous extract of perilla leaves (PLE) on acute alcohol toxication and its underlying mechanism.

METHODS: Alcohol was perfused to establish a mouse model of acute alcohol toxication. Forty Kunming mice (SPF), were divided randomly into four groups: Blank, PLE of low dosage (20 g/kg), PLE of high dosage (40 g/kg) and alcohol group. PLE were administered to the animals. Thirty minutes later, 0.015 mL/g ethanol was administered to each animal except the blank group which was given normal saline. The influence of PLE was observed. And pathologic changes of hepatic tissue were observed at microscopy and the mRNA expression of genes

(IL-6, iNOS, TNF- α and Bax) in hepatic tissue were tested using real time RT-PCR.

RESULTS: The quantity of drunken mice was obviously reduced, and the drunkenness time was delayed in PLE group especially in PLE of high dosage group (47.00 ± 6.04 vs 11.56 ± 12.11 , $P < 0.05$). The ethanol caused swelling of the liver cells, as well as neutrophilic infiltration and several ballooning degenerations of hepatocytes according to the microscopic examinations. However, the severe hepatic lesions induced by ethanol were considerably reduced following administration of different dosages of PLE. Compared with alcohol, PLE significantly down-regulated hepatic IL-6, iNOS, TNF- α mRNA transcription (0.251 ± 0.073 , 0.455 ± 0.096 vs 1.58 ± 0.124 ; 0.381 ± 0.043 , 0.345 ± 0.067 vs 2.088 ± 0.088 ; 0.584 ± 0.061 , 0.270 ± 0.027 vs 2.025 ± 0.056 , $P < 0.05$ or 0.01), except Bax mRNA.

CONCLUSION: PLE has the effect of anti-temulence, rivalrying the hepatic damage induced by ethanol, which might be associated with its roles in down-regulating IL-6, iNOS, TNF- α and Bax mRNA transcription in hepatic tissue.

Key Words: Aqueous extract of perilla leaves; Acute alcohol toxication; Anti-temulence; Gene transcription

Shi JJ, Liu CQ, Chen J, Wang JJ, Li B, Zhang W, Wang YQ, Yang F. Effects of aqueous extract of perilla leaves on acute alcohol toxication and its underlying mechanism in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(36): 4098-4101

摘要

目的: 探讨紫苏提取液(PLE)对小鼠急性酒精中毒的作用及机制。

方法: 用食用白酒(56度)灌胃昆明种小鼠, 建立急性酒精中毒动物模型。选取小鼠40只, 随机分为4组, 每组10只, 分别为空白对照组、PLE低剂量组(20 g/kg)、PLE高剂量组(40 g/kg)、模型组。各实验组给予相应的药物30 min后, 除空白组外其余各组分别灌胃实验用

■同行评议者

李军祥, 教授, 北京中医药大学附属东方医院消化内科; 吴建国, 教授, 武汉大学生命科学院病毒学国家重点实验室

酒0.15 mL/10 g, 空白组灌以等量的生理盐水. 分别观察紫苏提取液对小鼠醉酒潜伏时间及肝组织形态的影响. Real-time PCR检测小鼠肝组织中IL-6、iNOS、TNF- α 、Bax基因mRNA的表达水平.

结果: 酒前灌PLE可降低醉酒小鼠数量、延迟小鼠发生醉酒的时间, 其中高浓度组小鼠发生醉酒的潜伏时间与对照组相比有显著性差异(47.00 ± 6.04 vs 11.56 ± 12.11 , $P < 0.05$). 正常对照组小鼠肝脏小叶、汇管区结构正常, 肝细胞无明显变性、坏死, 无明显炎细胞浸润. 与模型组相比, PLE高剂量组与低剂量组肝细胞变性、坏死, 炎细胞浸润均有明显改善. 与模型组相比PLE可明显下调IL-6、iNOS、TNF- α mRNA的表达(0.251 ± 0.073 , 0.455 ± 0.096 vs 1.58 ± 0.124 ; 0.381 ± 0.043 , 0.345 ± 0.067 vs 2.088 ± 0.088 ; 0.584 ± 0.061 , 0.270 ± 0.027 vs 2.025 ± 0.056 , $P < 0.05$ 或 0.01), 同时Bax mRNA的表达亦下降但无统计学差异.

结论: 紫苏提取液可显著地延长小鼠的醉酒潜伏时间、拮抗乙醇引起的肝脏损伤, 此作用可能与其下调肝组织中IL-6等基因的表达有关.

关键词: 紫苏提取液; 急性酒精中毒; 防醉作用; 基因表达

史继静, 刘朝奇, 陈晶, 王锦江, 李斌, 张伟, 王雅琴, 杨凡. 紫苏提取液对小鼠急性酒精中毒的作用及机制. 世界华人消化杂志 2008; 16(36): 4098-4101

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/4098.asp>

0 引言

少量饮酒能活血通络散寒, 如恣饮无度则对人体多种器官产生损坏, 如损伤肝脏、生殖与神经系统功能等. 在美国, 因酒精摄入过量而导致的肝脏疾病已成为男性第4个主要死亡原因. 我国近十年来, 酒精消费群体日益庞大, 酒精中毒尤其是急性酒精中毒的人数巨增, 开发有效地防醉酒及醒酒的药物及保健食品受到医药及食品行业的普遍重视. 目前, 西方国家开发的解酒产品以合成药物为主, 而中、日、韩等亚洲国家则侧重于天然产物中活性物质的开发研究^[1].

紫苏是传统的药食两用植物, 其性温、味辛, 归肺、脾、胃经, 具有发汗、行气和中、镇咳、镇痛、健胃、利尿、安胎、散寒解表、写肺化痰及解鱼蟹虫毒之功效^[2], 是国家卫生部首批颁布的既是食品又是药品的60种中药之一. 但有关紫苏在防醉及醒酒方面的作用还未见报

道, 本研究拟通过小鼠急性酒精中毒动物模型观察其在防醉及保肝方面的作用, 为将其开发为解酒产品提供实验基础.

1 材料和方法

1.1 材料 健康昆明种小鼠70只, 雌雄各半, 体重18-22 g, 由湖北省实验动物中心提供, SPF级动物. 56度二锅头白酒为北京红星酒业有限公司产品. TRIzol RNA提取试剂盒购自Invitrogen公司. 逆转录试剂盒、dNTP和Taq酶均为Fermentas产品, SYBR[®]Premix Ex Taq[™]购自宝生物工程(大连)有限公司.

1.2 方法

1.2.1 紫苏提取液(PLE)的制备: 取市售新鲜紫苏叶加入适量水(5 g/mL)榨汁后4℃过夜, 次日纱布过滤后离心8000 r/min, 20min, 留取上清液即得实验样品.

1.2.2 小鼠给酒剂量的选择: 30只小鼠随机分为3组, 每组10只, 雌雄各半. 实验前禁食12 h, 自由饮水. 实验时分别按0.14 mL/10 g、0.15 mL/10 g、0.16 mL/10 g的剂量给各组小鼠ig白酒, 观察记录小鼠醉酒数. 醉酒与否以翻正反射是否消失为指标, 小鼠灌酒后, 将其背向下轻轻放在动物笼内, 若动物背向下的姿势保持30 s以上则认为翻正反射消失, 即为醉酒, 反之为不醉.

1.2.3 PLE对小鼠醉酒的影响: 选取小鼠40只, 雌雄各半, 随机分为4组, 每组10只, 分别作为: 空白对照组: ig生理盐水0.1 mL/10 g; PLE低剂量组(20 g/kg)ig 0.1 mL/10 g; PLE高剂量组(40 g/kg)ig 0.1 mL/10 g; 模型组: ig生理盐水0.1 mL/10 g. 各实验组给予相应的药物30 min后, 除空白组外其余各组分别灌胃实验用酒0.15 mL/10 g, 空白组灌以等量的生理盐水. 记录小鼠醉酒数及潜伏时间.

1.2.4 肝组织病理变化观察: 灌酒6 h后颈椎脱臼法处死小鼠, 分离肝脏, 部分肝组织用40 g/L甲醛固定36 h后, HE染色, 观察小鼠肝组织形态. 部分肝组织冻至-80℃冰箱, 用于提取RNA.

1.2.5 肝组织基因mRNA表达水平的检测: 用TRIzol RNA提取试剂盒提取肝组织的总RNA, 按照逆转录试剂盒进行操作. 用Real-time PCR检测小鼠肝组织中IL-6、iNOS、TNF- α 、Bax基因mRNA的表达水平. PCR反应体系为: 模板cDNA 1 μ L, 2 \times SYBR Premix Ex Taq 12.5 μ L, 上下游引物各0.5 μ L, 加水至25 μ L, 每个样品重复3管. 所用引物设计如下: β -actin(108 bp):

■ 研发前沿

多年来的研究表明, 通过化学合成方法研制解酒药物并未取得实质性的进展, 而以天然药物为主的传统中医药在防治酒精性损伤方面显示了独特的优势.

■应用要点

本文研究了传统的药食两用植物紫苏在防醉及保肝方面的作用,并对其机制进行了初步探讨,为其开发解酒产品提供实验基础。

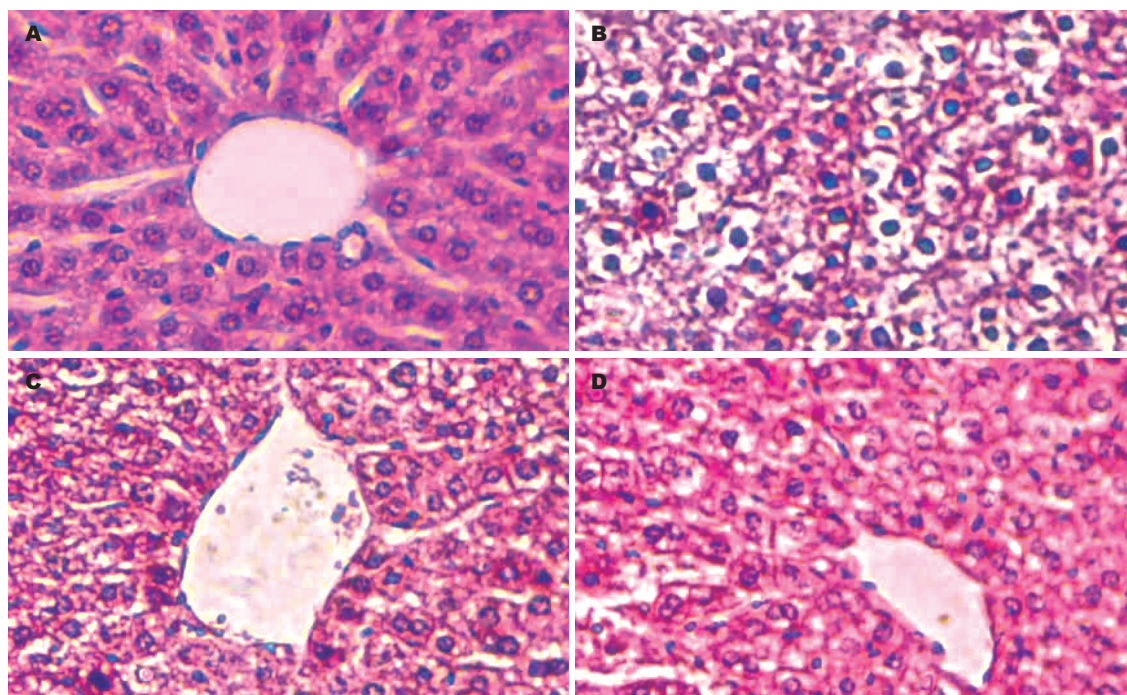


图1 PLE对小鼠急性酒精性肝损伤的影响(HE染色×200)。A: 空白对照组; B: 模型组; C: PLE低剂量组; D: PLE高剂量组。

上游5'-CCA CAG CTG AGA GGG AAA TC-3', 下游5'-TCT CCA GGG AGG AAG AGG AT-3'; IL-6(116 bp): 上游5'-CCA CTT CAC AAG TCG GAG GCT TA-3', 下游5'-GCA AGT GCA TCA TCG TTG TTC ATA C-3'; iNOS(135 bp): 5'-GGC AGC CTG TGA GAC CTT TG-3', 下游5'-GCA TTG GAA GTG AAG CGT TTC-3'; Bax(165 bp): 上游5'-CAG GAT GCG TCC ACC AAG AA-3', 下游5'-GTT GAA GTT GCC ATC AGC AAA CA-3'; TNF- α (128 bp): 上游5'-ACG GCA TGG ATC TCA AAG AC-3', 下游5'-GTG GGT GAG GAG CAC GTA GT-3'。以 β -actin作为内参照,分析IL-6等基因的mRNA表达水平。

统计学处理 所有数据均以mean \pm SD表示,并采用SPSS10.0统计软件进行数据整理和统计, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 食用白酒灌胃制备小鼠急性酒精中毒动物模型 分别给小鼠ig白酒0.14 mL/10 g、0.15 mL/10 g、0.16 mL/10 g记录60 min内小鼠醉酒数,结果0.14 mL/10 g组10只醉倒8只,0.15 mL/10 g、0.16 mL/10 g组10只全部醉倒,因此选0.15 mL/10 g作为实验用剂量。

2.2 PLE预防醉酒实验 灌酒前30 min给小鼠灌以不同浓度的PLE,观察记录小鼠醉酒数及潜伏

表1 各组小鼠醉酒率和潜伏时间比较($n=10$)

分组	剂量	醉酒(n , %)	潜伏时间(min)
模型组		10(100)	11.56 \pm 12.11
PLE低剂量组	20 g/kg	8(80)	29.77 \pm 20.65
PLE高剂量组	40 g/kg	6(60)	47.00 \pm 6.04 ^a

^a $P<0.05$ vs 模型组。

时间,结果显示给酒前灌PLE可降低醉酒小鼠数量、延迟小鼠发生醉酒的时间,其中高浓度组小鼠发生醉酒的潜伏时间与对照组相比有显著性差异($P<0.05$,表1)。

2.3 PLE对小鼠肝组织病理变化的影响 HE染色光镜下观察小鼠的肝组织形态,结果显示:正常对照组小鼠肝脏小叶、汇管区结构正常,肝细胞无明显变性、坏死,无明显炎细胞浸润;模型组小鼠肝脏均可见肝小叶中央静脉周围灶状肝细胞坏死,肝细胞气球样变明显,坏死区域内可见炎细胞浸润;与模型组相比,PLE高剂量组与低剂量组肝细胞变性、坏死,炎细胞浸润均有明显改善(图1)。

2.4 PLE对小鼠肝组织IL-6等基因mRNA表达的影响 取小鼠的肝组织提RNA,反转录cDNA,进行Real-time PCR,结果显示与模型组相比PLE可明显下调IL-6、iNOS、TNF- α mRNA表达,同时Bax mRNA表达亦有降低(表2)。

表 2 各组小鼠IL-6、iNOS、TNF- α 、Bax基因mRNA表达水平的比较 ($n = 10$)

分组	IL-6	iNOS	TNF- α	Bax
空白对照组	1	1	1	1
模型组	1.580 \pm 0.124	2.088 \pm 0.088	2.025 \pm 0.056	1.552 \pm 0.081
PLE低剂量组	0.251 \pm 0.073 ^a	0.381 \pm 0.043 ^b	0.584 \pm 0.061 ^a	1.160 \pm 0.065
PLE高剂量组	0.455 \pm 0.096 ^a	0.345 \pm 0.067 ^b	0.270 \pm 0.027 ^b	1.156 \pm 0.035

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 模型组.

3 讨论

中医学认为, 酒性热而气悍, 饮酒过度, 酒毒蓄积. 肝脾胃诸脏受损, 气阴两伤为酒精中毒之主要病机. 本实验结果显示, 小鼠在短时间内如摄入一定量的高浓度(56度)白酒会产生急性酒精中毒的症状, 表现为翻正反射消失较快出现, 醒酒时间延长; 另一方面, 一定量的高浓度白酒还会诱发小鼠肝脏的损伤, 引起肝组织病理学的改变.

紫苏作为常用的传统中药, 具有抗炎、抗过敏、抗氧化、抗癌等多种功能^[3-6]. 王凤仪 *et al* 方“紫苏煎”可以有效降低改良烟熏法所致慢性支气管炎大鼠肺组织中的内皮素-1的含量, 从而减轻炎症反应^[7]. 姚秀玲 *et al* 研究了紫苏提取物体外给药对温育时小鼠肝匀浆脂质过氧化物生成的抑制作用, 结果显示紫苏提取物的抗氧化活性明显优于维生素C^[8]. 另有研究报道发现紫苏子对CCl₄所致化学性肝损伤有辅助保护作用^[9-10]. 本研究发现PLE具有显的解酒作用, 能使小鼠的醉酒潜伏时间延长, 并能逆转56度白酒引起的肝组织病理损伤. 提示PLE在发挥解酒作用的同时, 还对酒精引起的肝损伤具保护作用.

近年来研究发现, 酒精性肝损伤的发生与多种因素有关, 其中乙醇及其代谢产物对肝脏的直接毒性作用、诱导Bax高表达导致肝细胞凋亡, 及细胞因子分泌调控紊乱(IL-6、TNF- α 等的异常释放)在该病的发生、发展中起重要作用^[11-12]. 由于乙醇及其氧化产物的作用, 过量的乙醛和脂质过氧化物可直接损伤肝细胞, 并通过激活Kuffer细胞产生大量的NO和TNF- α , 进一步诱导IL-6等炎症因子的产生, 促进炎症的发展. 本研究发现, PLE可明显降低小鼠肝组织中iNOS、TNF- α 、IL-6 mRNA的表达水平, 且可下调与肝细胞凋亡密切相关的促凋亡基因Bax

mRNA的表达, 这可能是其对小鼠急性酒精性肝损伤发挥保护作用的机制之一.

4 参考文献

- 胡文, 何静, 樊永明, 吴玉英. 植物性天然香料及其提取技术. 精细与专用化妆品 2004; 12: 6-9
- 刘大川, 王静, 苏望懿, 胡小泓, 李江平, 李俊. 紫苏植物的开发研究. 中国油脂 2001; 26: 7-9
- Banno N, Akihisa T, Tokuda H, Yasukawa K, Higashihara H, Ukiya M, Watanabe K, Kimura Y, Hasegawa J, Nishino H. Triterpene acids from the leaves of *Perilla frutescens* and their anti-inflammatory and antitumor-promoting effects. *Biosci Biotechnol Biochem* 2004; 68: 85-90
- Ueda H, Yamazaki C, Yamazaki M. Luteolin as an anti-inflammatory and anti-allergic constituent of *Perilla frutescens*. *Biol Pharm Bull* 2002; 25: 1197-1202
- Makino T, Furuta Y, Wakushima H, Fujii H, Saito K, Kano Y. Anti-allergic effect of *Perilla frutescens* and its active constituents. *Phytother Res* 2003; 17: 240-243
- Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Sanbongi C, Kato Y, Osawa T, Yoshikawa T. Rosmarinic acid, a major polyphenolic component of *Perilla frutescens*, reduces lipopolysaccharide (LPS)-induced liver injury in D-galactosamine (D-GalN)-sensitized mice. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 798-806
- 王凤仪, 贾育新, 李生财, 王小荣, 刘峰林, 楚惠媛. 敦煌古方“紫苏煎”对慢性支气管炎大鼠血清、肺组织中NO、ET-1含量的影响. 甘肃中医学院学报 2006; 23: 13-16
- 姚秀玲, 朱惠丽, 吕晓玲. 紫苏提取物对过氧化氢引起的溶血反应和小鼠肝匀浆脂质过氧化物生成的抑制作用. 天津中医学院学报 2005; 24: 126-128
- 王雨, 刘佳, 高敏, 俞红, 吴克枫, 阮海星, 朱彩霖. 紫苏子对高脂血症大鼠血脂水平的影响. 贵阳医学院学报 2006; 31: 336-338
- 王雨, 刘佳, 高敏, 俞红, 吴克枫, 阮海星, 朱彩霖. 紫苏子对化学性肝损伤的实验研究. 贵州医药 2006; 30: 836-837
- 许东升. 酒精性肝病的病因和发病机制. 胃肠病学 2003; 8: 297-299
- Adachi M, Higuchi H, Miura S, Azuma T, Inokuchi S, Saito H, Kato S, Ishii H. Bax interacts with the voltage-dependent anion channel and mediates ethanol-induced apoptosis in rat hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G695-G705

编辑 李军亮 电编 何基才

同行评价

该论文选题新颖, 设计合理, 方法先进, 结论可靠, 语言通顺, 对临床有一定的参考价值.