

引用:南新梅,冯昊天,李亚兰,等.茯苓山药联合豆乳对斑马鱼酒精性肝病的防护作用[J].现代中医药,2024,44(3):111-115.

茯苓山药联合豆乳对斑马鱼酒精性肝病的防护作用

南新梅¹ 冯昊天^{2,3} 李亚兰¹ 贾秀珍^{2,3} 杜进睿^{2,3} 刘艳^{2,3} 尹小静³
马国文³ 李昊虬^{2,3} 吴珺^{1*}

(1. 北京中医药大学, 北京 房山 100029; 2. 内蒙古乳业技术研究院有限责任公司, 内蒙古 呼和浩特 010110; 3. 内蒙古伊利实业集团股份有限公司, 内蒙古 呼和浩特 010110)

摘要:目的 研究茯苓山药联合豆乳对斑马鱼酒精性肝损伤的防护作用。方法 将斑马鱼随机分为对照组、模型组、茯苓山药组、豆乳组、联合用药组和美他多辛组。将给药组的药物溶于养鱼用水中处理斑马鱼 16 h 后, 移除处理药液, 1% 无水乙醇干预 27 h 建立斑马鱼酒精性肝损伤模型。对照组则饲养于正常养鱼用水中。显微镜下拍照统计分析斑马鱼肝脏面积、肝脏明亮度平均值和卵黄囊吸收延迟面积。结果 与对照组比较, 模型组肝脏面积增大、肝脏明亮度平均值降低、卵黄囊面积增大; 与模型组比较, 茯苓山药组、豆乳组、联合用药组和美他多辛组肝脏面积减小, 联合用药组和美他多辛组肝脏明亮度增大、卵黄囊面积减小 ($P < 0.05$)。结论 茯苓山药联合豆乳对斑马鱼酒精性肝损伤有防护作用。

关键词:茯苓; 山药; 豆乳; 斑马鱼; 酒精性肝损伤

中图分类号:R285.5 **文献标识码:**A

文章编号:1672-0571(2024)03-0111-07

DOI:10.13424/j.cnki.mtem.2024.03.021

长期以来,肝病都是危害人类健康的一大杀手,肝脏损伤时会导致糖耐量降低、蛋白质和脂类代谢紊乱、水和电解质紊乱、三酰甘油增多、血氨增高及凝血功能障碍等问题^[1]。酒精性肝病 (Alcoholic liver disease, ALD) 是由于长期大量饮酒导致的肝脏疾病,初期通常表现为脂肪肝,进而可发展成酒精性肝炎、肝纤维化和肝硬化^[2-3]。由于生活水平的提高,酒精性肝损伤的发病率呈逐年稳定上升和年轻化的趋势,成为我国继病毒性肝炎之后的第二大肝脏疾病^[4]。

目前,西医治疗酒精性肝病用药多为水飞蓟素、美他多辛、多烯磷脂酰胆碱、硫普罗宁联合其他药物及营养治疗缓解和改善疾病症状,临床上并没有针对酒精性肝病治疗的特效药^[5]。研究表明,中西医结合治疗对肝功能有明显改善,可防止肝脏纤维化,无明显不良反应,临床效果理想^[6]。

且中药治疗酒精性肝损伤有着高效、低毒副、多靶点等优势^[7]。茯苓和山药均为我国传统的药食同源食物,茯苓利水渗湿,健脾宁心,具有利水消肿、保肝、抗肿瘤、免疫、延迟衰老等药理作用^[8];山药中的有效成分薯蓣皂苷可以调节肠道微生物及相关脂质/氨基酸代谢,有效改善大鼠的非酒精性脂肪肝^[9];豆乳具有抗炎、抗肿瘤、护肝、免疫调节、降血脂、抗高血压等功效^[10]。茯苓-山药复配米稀可改善大鼠的功能性消化不良^[11],但目前针对茯苓山药及复合豆乳对酒精性肝损伤的研究鲜见报道。

以往的大小鼠多采用长期酒精喂养的方式造成慢性酒精性肝病模型^[12],而其与人酒精性肝病差异较大。目前研究已表明,斑马鱼是一种研究肝脏疾病和相关药物发现的新兴模型系统^[13]。斑马鱼幼虫更是广泛用于研究酒精性肝病等代谢紊

乱性疾病^[14]。在此基础上,本研究探索茯苓、山药两种传统药食同源的中药以及食源性豆乳三者联合对于斑马鱼急性酒精性肝病的治疗效果。以期对开发解酒保肝药物或保健食品提供有力的用药基础和研究思路。

1 材料

1.1 实验动物 野生型 AB 品系斑马鱼,以自然成对交配繁殖方式进行繁殖。年龄为受精后 3 天(3 dpf)的斑马鱼饲养于 28 ℃ 的养鱼用水中(水质:每 1 L 反渗透水中加入 200 mg 速溶海盐,电导率为 450 ~ 550 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$;pH 为 6.5 ~ 8.5;硬度为 50 ~ 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{CaCO}_3$),由杭州环特生物科技股份有限公司提供,饲养管理符合国际 AAALAC 认证的要求。

1.2 样品与试剂 茯苓粉(批号 20190201,规格:20 g/袋,南京泽郎生物科技有限公司);山药粉(批号 20200503,规格:0.907 g/管,南京泽郎生物科技有限公司);植选高蛋白原浆豆乳(批号 20200909,规格:315 mL/瓶,内蒙古乳业技术研究院有限责任公司);无水乙醇(批号 20181025,国药集团化学试剂有限公司);过碳酸钠(批号 D1827013,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);甲基纤维素(批号 M0512,美国西格玛公司);美他多辛(批号 200401,规格:0.25 g/粒 \times 8 粒/盒,浙江震元制药有限公司)。

1.3 仪器 SZX7 解剖显微镜(日本奥林巴斯株式会社);VertA1 CCD 相机(上海土森视觉科技有限公司);zebra Lab 3.11 行为分析仪(法国 ViewPoint 公司);CP214 精密电子天平(美国奥豪斯公司);96 孔板(中国耐思生命科技股份有限公司)。

2 方法

2.1 分组及给样 将 180 尾受精后 3 d 斑马鱼随机分为 6 组,每组 30 尾,分别为对照组、模型组、茯苓山药处理组(FL-SY)、豆乳处理组(ZXG)、联合用药处理组(FL-SY+ZXG)、美他多辛阳性对照药处理组。对照组正常养鱼用水饲养,除对照组和模型组外,其它给药组浓度分别为茯苓粉 63.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ + 山药粉 52.9 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、豆乳 56 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、茯苓粉 63.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ + 山药粉 52.9 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ + 豆乳 56

$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、阳性药物美他多辛 149 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。给药组处理 16 h 后移除药液,随后使用 1 % 乙醇处理 1 h 构建兴奋期醉酒模型,1% 无水乙醇处理 27 h 诱导斑马鱼建立酒精性肝损伤模型。研究茯苓山药联合豆乳对于斑马鱼的预防醉酒及肝损伤保护作用。

2.2 斑马鱼预防醉酒作用评价 给予药液处理完毕后,每组随机选取 10 尾斑马鱼置于 96 孔板中,每孔 1 尾,每孔 200 μL 的 1% 无水乙醇。行为分析仪记录给予无水乙醇后 1 h 内的斑马鱼的总运动距离(D),以总运动距离的统计学分析结果评价供试品对无水乙醇诱导的斑马鱼兴奋期醉酒模型的预防醉酒作用,计算公式如下:

$$\begin{aligned} & \text{预防醉酒作用及解酒作用}(\%) \\ &= \frac{D(\text{模型组}) - D(\text{给药组})}{D(\text{模型组}) - D(\text{对照组})} \times 100\% \end{aligned}$$

2.3 斑马鱼肝肿大评价 无水乙醇诱导的斑马鱼肝脏形态异常包括水肿、前凸和肝肿大^[15],每组随机选取 10 尾斑马鱼在解剖显微镜下拍照并采集数据,图像处理软件 NIDS-Element's 对斑马鱼肝脏面积大小(A1)进行分析,按照以下公式计算肝肿大改善作用:

$$\begin{aligned} & \text{肝肿大改善作用}(\%) \\ &= \frac{A1(\text{模型组}) - A1(\text{给药组})}{A1(\text{模型组}) - A1(\text{对照组})} \times 100\% \end{aligned}$$

2.4 斑马鱼肝变性评价 酒精性肝损伤会引发肝脏毒性,斑马鱼肝毒性时肝脏明亮度会发生改变^[16]。每组随机选取 10 尾斑马鱼在解剖显微镜下拍照并采集数据,图像处理软件 NIDS-Element's 统计斑马鱼肝脏明亮度平均值(S),以肝脏明亮度平均值的结果计算肝变性改善作用,评价茯苓山药豆乳对斑马鱼酒精性肝损伤的防护作用:

$$\begin{aligned} & \text{肝变性改善作用}(\%) \\ &= \frac{S(\text{样品组}) - S(\text{给药组})}{S(\text{对照组}) - S(\text{模型组})} \times 100\% \end{aligned}$$

2.5 斑马鱼卵黄囊吸收情况评价 无水乙醇诱导的斑马鱼酒精性肝损伤会导致肝脏功能变差,卵黄囊吸收变慢^[17]。每组随机选取 10 尾斑马鱼在解剖显微镜下拍照并采集数据,图像处理软件 NIDS-Element's 分析斑马鱼卵黄囊吸收延迟面积(A2),计算卵黄囊吸收延迟改善作用:

卵黄囊吸收延迟改善作用(%)

$$= \frac{A2(\text{模型组}) - A2(\text{给药组})}{A2(\text{模型组}) - A2(\text{对照组})} \times 100\%$$

2.6 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,检测数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较应用 t 检验,多组间比较应用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 实验结果

3.1 茯苓山药及豆乳对斑马鱼的预防醉酒作用

如表 1 所示,与对照组比较,模型组总运动距离明显升高,出现醉酒情况($P < 0.01$);与模型组相比,FL-SY 组、ZXG 组和 FL-SY+ZXG 组给药后斑马鱼总运动距离均有明显下降,对斑马鱼兴奋期醉酒有着显著预防醉酒作用($P < 0.001$)。

表 1 斑马鱼预防解酒结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	总运动距离/mm	预防醉酒作用(%)
对照组	6191±449	100
模型组	9206±723 **	0 **
FL-SY 组	5329±497 ###	128 ###
ZXG 组	5856±443 ###	105 ###
FL-SY+ZXG 组	5558±314 ###	121 ###

注:与对照组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,### $P < 0.001$

3.2 茯苓山药及豆乳对斑马鱼的肝肿大的改善情况

如表 2 所示,与对照组比较,模型组肝脏面积显著增加,差异具有统计学意义($P < 0.01$),说明 1% 无水乙醇诱导 27 h 后斑马鱼酒精性肝损伤表现出肝肿大;与模型组相比,FL-SY、FL-SY+ZXG 组、阳性药美他多辛组肝脏面积减小,对斑马鱼肝肿大情况具有明显改善作用($P < 0.05$)。

表 2 斑马鱼肝脏面积($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	肝脏面积/像素	肝肿大改善作用(%)
对照组	54531±3101	100
模型组	71665±2612 **	0 **
FL-SY 组	59352±2924 #	72 #
ZXG 组	69574±2268	62
FL-SY+ZXG 组	54851±3603 ##	98 ##
美他多辛组	58978±2400 #	74 #

注:与对照组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$

3.3 茯苓山药及豆乳对斑马鱼的肝变性的改善

情况 如表 3 所示,与对照组比较,模型组肝脏明亮度平均值显著降低,出现肝变性情况($P < 0.05$);与模型组相比,ZXG 组和 FL-SY+ZXG 组及阳性药美他多辛组肝脏明亮度平均值增加,对肝变性情况有一定改善作用($P < 0.05$)。

表 3 斑马鱼肝脏明亮度平均值($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	肝脏明亮度平均值/像素	肝变性改善作用(%)
对照组	73.24±1.07	100
模型组	70.04±0.56 **	0 **
FL-SY 组	71.97±0.99	60
ZXG 组	72.14±0.71 #	66 #
FL-SY+ZXG 组	72.02±0.67 #	62 #
美他多辛组	72.26±0.43 #	69 #

注:与对照组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$

3.4 茯苓山药及豆乳对斑马鱼的卵黄囊吸收延迟的改善情况

如表 4 所示,与对照组比较,模型组卵黄囊面积显著增加,出现卵黄囊吸收延迟情况($P < 0.01$);与模型组相比,FL-SY+ZXG 组及阳性药美他多辛组卵黄囊面积减小,对卵黄囊吸收延迟情况有明显改善作用($P < 0.01$)。

表 4 斑马鱼卵黄囊面积($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	卵黄囊面积/像素	卵黄囊吸收延迟改善作用(%)
对照组	3822±732	100
模型组	72954±17985 ***	0 ***
FL-SY 组	39239±11791	49
ZXG 组	50290±13497	33
FL-SY+ZXG 组	17023±6228 ##	81 ##
美他多辛组	15866±2548 ##	83 ##

注:与对照组比较,*** $P < 0.001$;与模型组比较,## $P < 0.01$

3.5 茯苓山药及豆乳对斑马鱼肝损伤表型图

显微镜下观察,见图 1 对照组斑马鱼形态正常,肝脏呈透明状,卵黄囊基本吸收完全。模型组斑马鱼形态学改变较为明显,表现为肝脏面积肿大、肝脏明亮度减小、卵黄囊水肿等。美他多辛组肝脏形态恢复;FL-SY 组仅肝脏面积明显减小,FL-SY+ZXG 组肝脏面积、肝脏明亮度增加、卵黄囊面积减小。

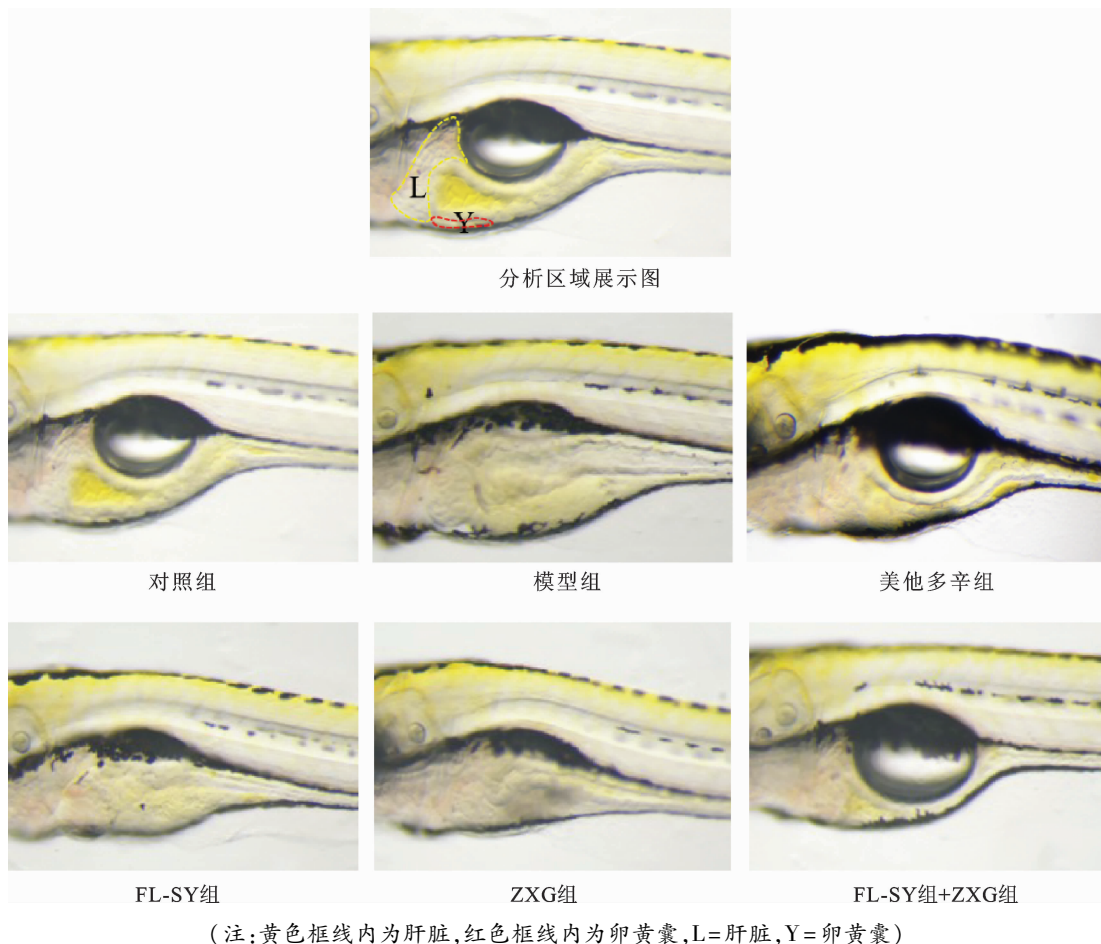


图 1 斑马鱼肝损伤表型图

4 讨论

啮齿类动物大鼠是传统上研究 ALD 的模型,但此类模型耗时久且只出现轻度脂肪变性,造模期间灌胃给药相较于斑马鱼更复杂^[14]。斑马鱼幼鱼的光学透明性可以通过简单的光学显微镜来实时观察斑马鱼不同发育阶段主要脏器和不同生物学事件过程中的变化^[18];造模时在养鱼用水中添加化合物就能够实现动物暴露于毒素和化学物质的过程^[19]。基于斑马鱼的种种特性,现已应用于酒精性肝损伤的研究。实验结果显示模型组与对照组相比,统计结果具有显著差异($P<0.05$),认为斑马鱼酒精性肝损伤模型造模成功。

现代研究表明,酒精在肝脏应激诱发大量自由基生成,氧化损伤继发性激活肝脏炎症反应,从而引发肝组织变性、坏死,造成酒精性肝损伤^[20-21]。中药在防治肝病方面历史悠久,含有的抗炎、抗氧化活性成分可调节酒精诱导的氧化应激以及炎症等^[22],对于酒精性肝损伤有明显治疗

效果^[23]。药食同源的茯苓和山药中含有抗炎和氧化的有效成分。茯苓提取物茯苓多糖 PS1 和 PS2 具有抗炎作用,茯苓酸具有抗氧化作用^[24]。山药的有效活性成分薯蓣皂苷有抗炎作用,可以通过抑制炎症和细胞凋亡来起到对肝脏的保护作用,山药中酚类物质(主要是黄酮)、超氧化物歧化酶有抗氧化作用^[25]。豆乳中大豆异黄酮、大豆多肽有很强的抗氧化能力^[26],且大豆中分离纯化制备的多烯磷脂酰胆碱是酒精性肝损伤常用的药物。

在本研究中,以茯苓山药及豆乳为研究对象,以斑马鱼为模型,评价药食同源的茯苓、山药和食源性饮品豆乳对于斑马鱼的酒精性肝损伤的防护作用。实验结果表明茯苓山药以及豆乳均能预防醉酒。茯苓山药粉仅改善了斑马鱼的肝肿大现象,豆乳单独使用仅改善了斑马鱼的肝变性情况。当茯苓山药联合豆乳时明显改善了斑马鱼肝肿大、肝变性、卵黄囊吸收延迟等肝损伤状态,说明

豆乳这款饮品对于茯苓山药防护肝损伤起到了良好的辅助功效。

综上所述,在此研究基础上可以深入研究在合理剂量范围内,使肝保护作用达到最佳的同时对斑马鱼不产生毒副作用的配伍、剂型。茯苓山药及豆乳对斑马鱼酒精性肝损伤的防护机制仍未明确,后续值得通过更进一步实验如对茯苓、山药、以及豆乳中有抗炎和抗氧化作用的特定活性成分进行深入探究,为茯苓山药及豆乳防治酒精性肝损伤提供更为可靠的实验依据,推动“食药一体”营养观的发展。

参考文献

[1]杜玉兰,严建刚,毛新亮,等. 功能性工程米对斑马鱼酒精性肝损伤的保护作用[J]. 现代食品,2021,7(17):139-142.

[2]SINGAL AK, MATHURIN P. Diagnosis and treatment of alcohol-associated liver disease: A review[J]. *Jama*,2021,326(2):165-176.

[3]冯玉娥,万敏. 三黄茵赤汤治疗湿热蕴结型酒精性肝损伤临床研究[J]. 现代中医药,2022,42(3):123-127.

[4]侯鹏,杨烁,秦利静,等. 活性多糖抗酒精性肝损伤机制的研究进展[J]. 吉林医药学院学报,2022,43(1):56-58.

[5]梁瀚文. 酒精性肝病的治疗现状分析[J]. 现代商贸工业,2019,40(13):77-79.

[6]魏华,叶志伟. 中西医结合治疗酒精性肝病的临床观察[J]. 湖北中医药大学学报,2017,19(2):60-62.

[7]林芳芳,龚先琼. 中药单体治疗酒精性肝损伤的研究现状[J]. 医学信息,2021,34(5):32-35,39.

[8]岳美颖. 茯苓主要药理作用及临床应用[J]. 亚太传统医药,2016,12(7):68-69.

[9]ZHOU Y, LI R, ZHENG Y, et al. Diosgenin ameliorates non-alcoholic fatty liver disease by modulating the gut microbiota and related lipid/amino acid metabolism in high fat diet-fed rats [J]. *Front Pharmacology*, 2022, 13: 854790.

[10]李学莉,胡海娥,张金桃,等. 乳酸菌发酵豆乳研究进展[J]. 食品工业科技,2016,37(12):385-390.

[11]钟亚东,潘猛,徐德昌,等. 茯苓-山药复配米稀和猴头菇饼干对功能性消化不良大鼠的改善作用[J]. 食品工业科技,2021,42(22):355-362.

[12]LAI Y, TAN Q, XV S, et al. Ginsenoside rb1 alleviates alcohol-induced liver injury by inhibiting steatosis, oxidative stress, and inflammation [J]. *Front Pharmacology*,

2021,12:616409.

[13]KATOCH S, PATIAL V. Zebrafish: An emerging model system to study liver diseases and related drug discovery [J]. *Journal of Applied Toxicology*,2021,41(1):33-51.

[14]LIU YS, YUAN MH, ZHANG CY, et al. Puerariae lobatae radix flavonoids and puerarin alleviate alcoholic liver injury in zebrafish by regulating alcohol and lipid metabolism [J]. *Biomed Pharmacother*,2021,134:111121.

[15]DAI W, WANG K, ZHEN X, et al. Magnesium isoglycyrhizinate attenuates acute alcohol-induced hepatic steatosis in a zebrafish model by regulating lipid metabolism and er stress [J]. *Nutrition & Metabolism*,2022,19(1):23.

[16]郭胜亚,朱晓宇,廖文瀚,等. 斑马鱼模型评价 5 种中药肝脏毒性[J]. 实验动物科学,2016,33(5):21-27.

[17]陈志亮. 应用斑马鱼研究酒精性肝病相关内质网应激 [J]. 中国继续医学教育,2019,11(12):167-170.

[18]DE Oliveira S, HOUSERIGHT RA, GRAVES AL, et al. Metformin modulates innate immune-mediated inflammation and early progression of nafld-associated hepatocellular carcinoma in zebrafish [J]. *Journal of Hepatology*, 2019,70(4):710-721.

[19]李芝奇,徐玥,赵霞,等. 斑马鱼作为一种重要的工具进行肝脏疾病研究[J]. 中国中药杂志,2021,46(2):320-332.

[20]张茹,杜娟. 五指毛桃对小鼠酒精性肝损伤的保护作用[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版),2021,37(2):139-144.

[21]范妤,郭东艳,郑蓓,等. 湖北海棠总黄酮对两种急性肝损伤小鼠模型的实验研究[J]. 现代中医药,2018,38(5):116-120.

[22]FU K, WANG C, MA C, et al. The potential application of chinese medicine in liver diseases: A new opportunity [J]. *Front Pharmacology*,2021,12:771459.

[23]孟文文,刘慧茹,张文光,等. 中药防治酒精性肝病作用机制的研究进展[J]. 中草药,2022,53(3):868-881.

[24]徐德宏,谭朝阳,郑慧,等. 茯苓功效成分茯苓酸的研究进展[J]. 食品科学,2022,43(7):1-18.

[25]余佳浩,倪晓瑜,黄秀彦,等. 不同品种山药蒸制过程中淀粉消化率及抗氧化活性[J]. 食品科学,2022,43(15):1-15.

[26]孙明明,王萍,李智媛,等. 大豆活性成分研究进展 [J]. 大豆科学,2018,37(6):975-983.