

引用:李堃,周广泉,杨琰,葛飞.健脾醒酒方通过雌激素受体1调控PI3K/Akt通路改善酒精诱导的肝细胞损伤[J].中医导报,2025,31(9):44-49.

健脾醒酒方通过雌激素受体1调控PI3K/Akt通路改善酒精诱导的肝细胞损伤*

李 堃¹,周广泉¹,杨 琰¹,葛 飞²

(1.海安市中医院,江苏 海安 226000;

2.无锡市第二人民医院,江苏 无锡 214043)

[摘要] 目的:研究健脾醒酒方通过雌激素受体1(ESR1)对磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)通路的调控作用,以明确其对酒精诱导肝细胞损伤小鼠的影响及其作用机制。方法:将60只SPF级BALB/c雄性小鼠适应性饲养1周后随机分为空白组、模型组、健脾醒酒方低剂量组、健脾醒酒方高剂量组、阳性药组1和阳性药组2,每组10只。除空白组外各组喂养含乙醇去离子水,从第2天至第5天乙醇体积分数分别从1%逐渐增加至4%,第6天至第13天为5%,第7天开始灌胃0.5 mL 20%乙醇,非酒精喂养组接受等体积去离子水,第8天开始各组小鼠灌胃相应药物7 d,空白组及模型组灌胃等体积去离子水。末次灌胃后0.5 h,摘眼球取血,处死小鼠解剖取肝脏和胃。采用气相色谱法测定乙醇含量;赖氏法检测各组小鼠谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST);比色法检测乙醇脱氢酶(ADH)、乙醛脱氢酶(ALDH)水平;ELISA法检测超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α);Western blotting法检测小鼠肝脏组织中PI3K、Akt、p-PI3K、p-Akt、ESR1、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)表达水平及胃组织中PTPN11表达水平;光学显微镜观察小鼠肝胃组织病理切片。结果:健脾醒酒方低剂量组、健脾醒酒方高剂量组、阳性药组1小鼠血液乙醇含量均低于模型组($P<0.05$);与模型组小鼠比较,健脾醒酒方低剂量组、健脾醒酒方高剂量组、阳性药组1小鼠的ADH、ALDH均升高,ALT、AST均降低($P<0.05$);与模型组小鼠相比,健脾醒酒方低剂量组、健脾醒酒方高剂量组、阳性药组1、阳性药组2的IL-6、TNF- α 、MDA均降低,SOD均升高($P<0.05$);与模型组小鼠相比,健脾醒酒方低剂量组、健脾醒酒方高剂量组ESR1、MMP-2、PTPN11、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt蛋白表达均降低($P<0.05$);肝胃组织病理形态学显示健脾醒酒方高剂量组病理情况明显改善。结论:健脾醒酒方可能通过ESR1调控的PI3K/Akt信号通路,抑制MMP-2、PTPN11蛋白表达,从而降低血液乙醇含量,减轻酒精诱导的肝脏、胃黏膜炎症损伤,缓解轻度酒精中毒。

[关键词] 酒精性肝损伤;健脾醒酒方;雌激素受体1;磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B信号通路;小鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2025)09-0044-06

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.09.007

Jianpi Xingjiu Recipe (健脾醒酒方) Improves Alcohol-Induced Liver Cell Damage by Regulating the PI3K/Akt Pathway through Estrogen Receptor1

LI Kun¹, ZHOU Guangquan¹, YANG Yan¹, GE Fei²

(1.Hai'an Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hai'an Jiangsu 226000, China;

2.Wuxi Second People's Hospital Branch, Wuxi Jiangsu 214000, China)

[Abstract] Objective: To study the regulation of Jianpi Xingjiu recipe through estrogen receptor 1 (ESR1) by phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) pathway to explore its effect on alcohol-induced liver cell injury in mice and its mechanism of action. Methods: Totally 60 SPF grade BALB/c male mice were adaptively raised for 1 week and randomly divided into blank group, model group, Jianpi Xingjiu recipe low-dose group, Jianpi Xingjiu recipe high-dose group, positive drug group 1 and positive drug group 2, 10 rats in each group. Except for the blank group, each group was fed deionized water containing ethanol. From the 2nd to the 5th day, the ethanol concentration gradually increased from 1% to 4%, and from the 6th to the 13th day, the ethanol concentration was 5%. Starting from the 7th day, 0.5 mL of 20% ethanol was administered by intragastric

*基金项目:南通市中医医疗联盟课题(TZYK202318);南通市科学技术局课题(MSZ21006)

通信作者:葛飞,男,主任医师,研究方向为中西医结合防治消化系统疾病

administration, and the non-alcohol feeding group received an equal volume of deionized water. Starting from the 8th day, the mice in each group were administered with corresponding drugs for 7 days, and the blank group and model group were administered with an equal volume of deionized water. The eyeballs were removed to collect blood 0.5 h after the last gastric administration. The mice were sacrificed and the liver and stomach were dissected and removed. Gas chromatography was used to determine ethanol content, and Reich's method was used to detect alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST). Colorimetric method was used to detect alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) levels. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method was used to detect superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α). Western blotting method was used to detect the expression levels of PI3K, Akt, p-PI3K, p-Akt, ESR1 and MMP-2 in liver tissue and the expression level of PTPN11 in gastric tissue. The pathological sections of mouse liver and stomach tissue were observed with an optical microscope. Results: The Jianpi Xingjiu recipe low-dose group, Jianpi Xingjiu recipe high-dose group and positive drug group 1 showed lower blood ethanol contents than model group ($P<0.05$). Compared with the model group, ADH and ALDH increased in Jianpi Xingjiu recipe low-dose group, Jianpi Xingjiu recipe high-dose group and positive drug group 1, while ALT and AST decreased ($P<0.05$). Compared with the model group, the IL-6, TNF- α and MDA decreased in Jianpi Xingjiu recipe low-dose group, Jianpi Xingjiu recipe high-dose group, positive drug group 1 and positive drug group 2, while SOD increased ($P<0.05$). Compared with the model group, the protein expressions of ESR1, MMP-2, PTPN11, p-PI3K/PI3K, and p-Akt/Akt were reduced in Jianpi Xingjiu recipe low-dose group and Jianpi Xingjiu recipe high-dose group ($P<0.05$), and liver and stomach tissue pathological morphology showed that the pathological conditions were significantly improved in Jianpi Xingjiu recipe high-dose group. Conclusion: Jianpi Xingjiu recipe may inhibit MMP-2 and PTPN11 protein expression through the PI3K/Akt signaling pathway regulated by ESR1, thereby reducing blood ethanol content, alleviating alcohol-induced liver and gastric mucosal inflammatory damage, and alleviating mild alcoholism.

[Keywords] alcoholic liver injury; Jianpi Xingjiu recipe; estrogen receptor1; phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway; mice

肝作为酒精代谢的主要器官,长期饮酒会使肝脏解毒代谢能力下降,同时酒精可对胃黏膜产生刺激,过量饮酒可导致胃溃疡出血、酒精中毒。酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)是酒精中毒的常见并发症,由长期饮酒超过上限导致,统计学研究显示目前全球6%左右的死亡原因与酒精相关^[1]。急性酒精中毒会导致患者大脑抑制功能减弱、昏睡、呕吐甚至死亡,慢性酒精中毒可发展为慢性肝病、肝纤维化、肝硬化甚至癌变^[2]。西医治疗ALD以戒酒、调整饮食、盐酸纳诺酮等催醒护胃药物为主,患者难以控制,治疗效果有限^[3],因此寻找更多醒酒护肝护胃治疗方案对促进ALD患者改善预后具有重要意义。

中医学针对ALD治疗历史源远流长,如《兰室秘藏》中记载的葛花解醒汤,具有化酒祛湿、温中和胃的功效,现代研究表明葛花解醒汤可通过抑制环氧合酶-2通路、改善氧化应激等发挥解酒护肝的作用^[4]。本院名老中医结合临床经验将葛花解醒汤化裁而成健脾醒酒方,对于轻中度酒精中毒收效显著,本研究意在为健脾醒酒方临床疗效提供确切药理学证据。水飞蓟宾是由中药水飞蓟中提取的活性成分,具有抗炎保肝的作用,对ALD具有一定疗效^[5]。胃泰颗粒常用于治疗慢性胃炎,具有消炎止痛、保护胃黏膜、抗溃疡等作用^[6]。因此本研究以水飞蓟宾、胃泰颗粒为阳性药组,探讨健脾醒酒方护肝护胃效果。磷脂酰肌醇-3激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)信号通路与炎症反

应、细胞自噬密切相关,同时是胃癌细胞的重要调控通路,既往研究发现荆防颗粒解酒保肝机制与雌激素受体1(ESR1)、类金属蛋白酶(MMP)靶点、PI3K/Akt信号通路有关^[7-8]。同时PTPN11基因编码的酪氨酸磷酸酶的破坏可通过调节氧化应激以减轻乙醇在肝脏中的副作用^[9]。因此,本研究基于ESR1、MMP、PTPN11靶点及PI3K/Akt信号通路,探讨健脾醒酒方对酒精诱导肝细胞损伤小鼠的影响及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF级6周龄雄性BALB/c小鼠60只,体质量(35.27 \pm 3.45)g。小鼠均购自上海南方模式生物科技股份有限公司[动物生产许可证号:SCXK(沪)2019-0002;动物质量合格证号:20190002013206]。饲养于苏州大学SPF级动物房[动物使用许可证号:SYXK(苏)2021-0074],环境温度(23 \pm 3) $^{\circ}$ C,相对湿度45%~65%,适应性饲养1周后进行实验。实验过程完全遵守《关于善待实验动物的指导性意见》,并已获得海安中医院伦理委员会的审核批准(伦理批准号:HZYLL2019-025)。

1.2 药物与试剂 葛花(批号:240424)、六神曲(批号:240812)、白术(批号:240919)、白芍(批号:240620)、砂仁(批号:240913)、茯苓(批号:240724)、竹茹(批号:240717)、葛根(批号:240302)、菊花(批号:241015)、黄芩(批号:240509)、牡丹皮(批号:240729)、白及(批号:240904)、佛手(批号:240522)、陈皮(批号:240816)和甘草(批号:240813)均购自南通三越中药饮片有限公司,经苏州大学药学院刘江云教授

鉴定为正品。健脾醒酒方组成：葛花30 g，焦六神曲10 g，白术12 g，白芍20 g，砂仁(后下)6 g，茯苓20 g，姜竹茹10 g，葛根30 g，菊花12 g，黄芩10 g，牡丹皮15 g，白及3 g，佛手10 g，陈皮6 g，甘草6 g，由海安市中医院中药制剂室纯水煎煮浓缩后得到生药质量浓度1.0 g/mL的药液；无水乙醇(泉州Ruixinbio公司，批号：E20230913-RX202414M)；谷草转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷丙转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADH)、乙醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase, ALDH)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)试剂盒(武汉Servicebio公司，批号：CR2312073)；水飞蓟宾(江苏天士力帝益药业有限公司，批号：H20040336)；胃泰颗粒(深圳华润三九医药股份有限公司，批号：Z44020705)；去离子水(武汉ABelonal公司，批号：4000000174)；PI3K、Akt、ESR1、MMP-2、PTPN11—抗、二抗，内参GAPDH(武汉Servicebio公司，批号：2A7A3220224)；苏木精-伊红染液(hematoxylin-eosin staining, HE)(武汉Servicebio公司，批号：AC2311261)。

1.3 主要仪器 D3024R台式高速冷冻离心机(北京DragonLab公司)；AF-630A气相色谱仪(北京北分瑞利仪器有限公司)；SVE-2垂直电泳仪(武汉Servicebio公司)；ChemiSciope 6100T化学发光仪(上海CLINX公司)；T18匀浆机(德国IKA公司)；UV-2450紫外分光光度计(日本岛津公司)；OLYMPUS光学显微镜(北京普瑞赛斯仪器有限公司)；ImageLab凝胶分析系统(美国BioRad公司)；AU5800全自动生化分析仪(美国贝克曼库尔特股份有限公司)。

1.4 分组与造模 60只SPF级6周龄雄性BALB/c小鼠适应性饲养1周后，采用慢性酒精诱导肝细胞损伤小鼠模型，随机分为6组，每组10只，分为空白组、模型组、健脾醒酒方低剂量组、健脾醒酒方高剂量组、阳性药组1、阳性药组2，每日监测小鼠体质量，除空白组外其余各组每日喂养含乙醇去离子水0.5 mL，2~5 d间乙醇体积分数从1%增加到4%，6~13 d喂养5%乙醇，第7天开始灌胃0.5 mL 20%乙醇，非酒精喂养组接受等体积去离子水。

1.5 实验给药 造模成功后(第8天)，各组小鼠灌胃相应药物7 d，空白组及模型组灌胃等体积去离子水。按临床用药剂量经动物与人体间的等效剂量换算公式^[10]，健脾醒酒方低剂量组小鼠剂量为1.6 g/kg，健脾醒酒方高剂量组小鼠剂量为5.2 g/kg。健脾醒酒方低剂量组小鼠予健脾醒酒方混悬液(1.6 g/kg)灌胃，健脾醒酒方高剂量组小鼠予健脾醒酒方混悬液(5.2 g/kg)灌胃，阳性药组1小鼠予水飞蓟宾(54.6 mg/kg)灌胃，阳性药组2小鼠予胃泰颗粒(20.0 mg/kg)灌胃，给药体积为50 mL/kg，1次/d；模型组和空白组小鼠给予等量去离子水，50 mL/kg，1次/d。末次灌胃后0.5 h，通过腹腔注射戊巴比妥钠溶液(30 mg/kg)麻醉后摘眼球取血，通过二氧化碳吸入处死小鼠，解剖取肝脏和胃组织，以4%多聚甲醛固定部分肝脏及胃组织，留待病理检测，其余部分冻入-80℃冰箱，备用。小鼠血液样本在4℃离心机中离心10 min(3 000 r/min，离心半径为8 cm)后取上层血清备用。

1.6 观察指标

1.6.1 血液乙醇含量测定 量取2.540 mL无水乙醇放置100 mL

容量瓶中加超纯水至刻度线，摇匀配置成20 mg/mL混合标准溶液，再分别量取0.625、1.250、2.500、5.000、12.500、25.000 mL混合标准溶液分别放入6个50 mL容量瓶加超纯水至刻度混匀，配置标准系列溶液，再各量取100 μ L置于顶空瓶，采用气相色谱法分离测定建立乙醇标准曲线。除空白组外各组分别将小鼠血液取出600 μ L加入0.5 μ L肝素钠置于顶空瓶中，30 min内检测各组乙醇含量。

1.6.2 肝组织中ADH、ALDH、ALT、AST活性检测 称取小鼠肝组织，冰上匀浆，随后在4℃离心机中离心15 min(4 000 r/min，离心半径为8 cm)后取上清液，按照检测试剂盒说明测定乙醇相关酶ADH、ALDH、ALT、AST活性，ADH为紫外比色法，ALDH为比色法，ALT、AST为赖氏法。

1.6.3 肝组织中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、血清中IL-6、TNF- α 活性检测应用全自动生化分析仪检测肝组织匀浆中SOD、MDA活性水平，应用ELISA法测定血清IL-6、TNF- α 水平。

1.6.4 肝脏组织PI3K、Akt、p-PI3K、p-Akt、ESR1、MMP-2及胃组织中PTPN11蛋白表达水平 取冻存肝、胃组织，提取总蛋白，BCA法检测总蛋白浓度，将蛋白溶液的终浓度配置为2 μ g/mL，置于热水中煮沸10 min后，保存在-20℃冰箱中，取30 μ g的蛋白样品进行电泳，200 V电压，转移蛋白样品至PVDF膜上，用5%脱脂奶粉封闭PVDF膜1 h，将一抗PI3K、AKT、p-PI3K、p-AKT、ESR1、MMP-2(1:1 000)加入到PVDF膜上，4℃孵育过夜，冲洗PVDF膜后加入二抗(1:1 000)，室温孵育2 h，洗膜后加入用电化学发光液(ECL)，曝光显影后用Image Lab软件分析条带灰度值，以GAPDH为内参，磷酸化蛋白以对应总蛋白为参照，计算蛋白相对表达量。

1.6.5 肝脏、胃组织病理切片的观察 小鼠肝胃组织切成1 cm \times 1 cm \times 1 cm方块，生理盐水清洗后以4%多聚甲醛固定24 h，进行脱水、包埋制作石蜡切片，石蜡切片脱蜡至水，进行HE染色，脱水封片后，显微镜观察并拍照。

1.7 统计学方法 使用SPSS 25.0统计学软件进行分析。计量资料以“均数 \pm 标准差”($\bar{x}\pm s$)表示，数据满足正态性和方差齐性，多组间比较采用单因素方差分析，多重比较采用LSD- t 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组小鼠血液乙醇含量比较 健脾醒酒方低剂量组、健脾醒酒方高剂量组、阳性药组1小鼠血液乙醇含量均低于模型组($P<0.05$)。(见表1)

表1 各组小鼠血液乙醇含量比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	血液乙醇含量/(mg/mL)
模型组	10	5.02 \pm 1.37
健脾醒酒方低剂量组	10	3.84 \pm 1.05 ^a
健脾醒酒方高剂量组	10	3.36 \pm 0.83 ^a
阳性药组1	10	3.23 \pm 0.75 ^a
阳性药组2	10	4.68 \pm 1.14
<i>F</i>		5.713
<i>P</i>		0.001

注：与模型组比较，^a $P<0.05$ 。

2.2 各组小鼠肝组织中ADH、ALDH、ALT、AST比较 与空白组比较，模型组小鼠肝组织中ADH、ALDH降低，ALT、AST升高

($P<0.05$);与模型组比较,健脾醒酒方低剂量组、健脾醒酒方高剂量组、阳性药组1小鼠肝组织中ADH、ALDH均升高,ALT、AST均降低($P<0.05$)。(见表2)

表2 各组小鼠肝组织中ADH、ALDH、ALT、AST比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	ADH/(U/mg)	ALDH/(U/mg)	ALT/(U/L)	AST/(U/L)
空白组	10	135.68±10.31	157.19±10.75	25.42±5.94	30.43±6.03
模型组	10	70.65±8.83 ^a	42.68±6.34 ^a	51.27±7.83 ^a	47.89±6.98 ^a
健脾醒酒方低剂量组	10	80.19±8.92 ^b	76.15±8.17 ^b	37.78±7.25 ^b	39.15±7.43 ^b
健脾醒酒方高剂量组	10	89.84±9.18 ^b	108.64±10.34 ^b	30.12±5.18 ^b	32.58±6.17 ^b
阳性药组1	10	90.16±9.23 ^b	115.74±10.39 ^b	28.14±6.51 ^b	31.43±6.59 ^b
阳性药组2	10	76.78±8.36	46.54±7.22	45.76±7.36	43.67±7.14
F		65.137	241.132	23.726	11.219
P		0.000	0.000	0.000	0.000

注:与空白组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

2.3 各组小鼠血清IL-6、TNF- α 及肝组织SOD、MDA水平比较 与空白组比较,模型组小鼠血清IL-6、TNF- α 及肝组织MDA水平升高,SOD水平降低;与模型组比较,健脾醒酒方低剂量组、健脾醒酒方高剂量组、阳性药组1、阳性药组2小鼠血清IL-6、TNF- α 及肝组织MDA水平均降低,SOD水平均升高。(见表3)

表3 各组小鼠血清IL-6、TNF- α 及肝组织SOD、MDA水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	IL-6/(pg/mL)	TNF- α /(pg/mL)	SOD/(U/mg)	MDA/(nmol/mg)
空白组	10	92.16±17.08	80.19±14.35	892.09±154.72	0.98±0.09
模型组	10	164.62±28.57 ^a	159.73±25.84 ^a	550.83±41.09 ^a	1.73±0.35 ^a
健脾醒酒方低剂量组	10	140.45±21.16 ^b	138.56±17.93 ^b	597.87±43.45 ^b	1.36±0.28 ^b
健脾醒酒方高剂量组	10	113.27±19.58 ^b	108.73±18.96 ^b	685.29±58.68 ^b	1.07±0.13 ^b
阳性药组1	10	125.56±23.05 ^b	134.38±20.53 ^b	637.39±55.26 ^b	1.28±0.15 ^b
阳性药组2	10	132.51±24.13 ^b	125.65±21.78 ^b	612.75±44.18 ^b	1.34±0.10 ^b
F		11.886	18.363	25.353	14.359
P		0.000	0.000	0.000	0.000

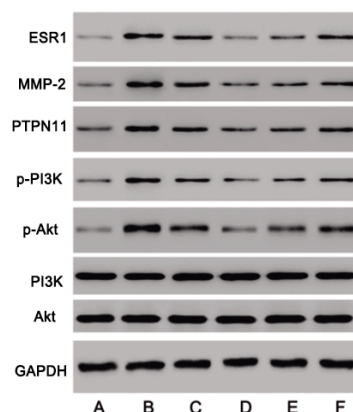
注:与空白组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

2.4 各组小鼠肝组织PI3K、Akt、p-PI3K、p-Akt、ESR1、MMP-2及胃组织中PTPN11表达水平比较 与空白组比较,模型组小鼠肝组织ESR1、MMP-2、p-PI3K、p-Akt及胃组织中PTPN11蛋白表达均升高($P<0.05$);与模型组比较,健脾醒酒方低剂量组、健脾醒酒方高剂量组小鼠肝组织ESR1、MMP-2、p-PI3K、p-Akt及胃组织中PTPN11蛋白表达均降低($P<0.05$)。(见表4、图1)

表4 各组小鼠肝脏组织PI3K、Akt、p-PI3K、p-Akt、ESR1、MMP及胃组织中PTPN11蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	ESR1	MMP-2	PTPN11	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt
空白组	10	0.12±0.03	0.13±0.02	0.09±0.02	0.15±0.04	0.20±0.03
模型组	10	0.65±0.08 ^a	0.71±0.07 ^a	0.85±0.09 ^a	0.73±0.05 ^a	0.91±0.05 ^a
健脾醒酒方低剂量组	10	0.41±0.06 ^b	0.55±0.09 ^b	0.38±0.07 ^b	0.36±0.05 ^b	0.43±0.06 ^b
健脾醒酒方高剂量组	10	0.24±0.05 ^b	0.27±0.08 ^b	0.22±0.05 ^b	0.22±0.02 ^b	0.31±0.04 ^b
阳性药组1	10	0.58±0.07	0.36±0.06 ^b	0.55±0.09 ^b	0.29±0.05 ^b	0.37±0.02 ^b
阳性药组2	10	0.59±0.06	0.65±0.08	0.73±0.08 ^b	0.68±0.09	0.85±0.08
F		125.525	104.839	171.079	207.648	341.052
P		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

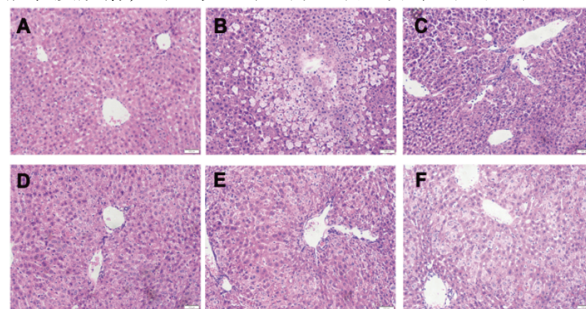
注:与空白组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。



注:A.空白组;B.模型组;C.健脾醒酒方低剂量组;D.健脾醒酒方高剂量组;E.阳性药组1;F.阳性药组2。

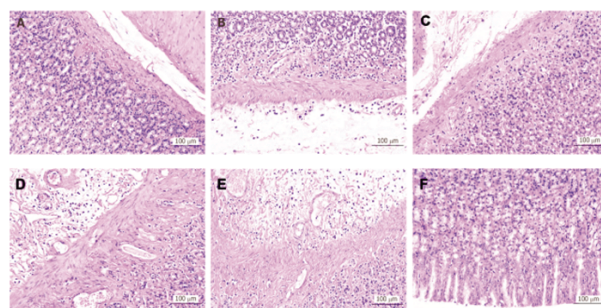
图1 6组小鼠肝脏组织PI3K/Akt通路、ESR1、MMP-2及胃组织PTPN11蛋白印迹图

2.5 各组小鼠肝脏、胃组织病理形态学改变 空白组小鼠肝组织结构完整,肝小叶轮廓清晰,肝索排列整齐,肝细胞无明显变性坏死,无炎症细胞浸润及纤维组织增生。模型组小鼠脂肪小滴积累,出现脂肪空泡;健脾醒酒方高剂量组、阳性药组1肝细胞饱满圆润,未见明显炎症细胞浸润,低剂量组小鼠肝细胞细胞质略疏松。(见图2)空白组小鼠胃黏膜结构正常,未见充血及炎症细胞浸润,黏膜上皮腺细胞均正常;模型组小鼠胃黏膜下层充血,黏膜上皮细胞近胃腔端腺上皮脱落;健脾醒酒方低剂量、高剂量组小鼠胃黏膜各层结构正常,低剂量组小鼠近胃腔端出现轻度脱落,高剂量组小鼠未见充血、腺上皮脱落;阳性药组1小鼠胃黏膜轻度充血,近胃腔端腺上皮细胞轻度脱落;阳性药组2小鼠未见明显异常。(见图3)



注:A.空白组;B.模型组;C.健脾醒酒方低剂量组;D.健脾醒酒方高剂量组;E.阳性药组1;F.阳性药组2。

图2 健脾醒酒方对小鼠酒精性肝损伤后肝脏组织病理学影响



注:A.空白组;B.模型组;C.健脾醒酒方低剂量组;D.健脾醒酒方高剂量组;E.阳性药组1;F.阳性药组2。

图3 健脾醒酒方对小鼠酒精性肝损伤后胃组织病理学影响

3 讨论

世界卫生组织调查显示过量饮酒导致的ALD患病率为4%,病死率则为3.2%,严重危害人体健康^[1]。大量饮酒易造成急性酒精中毒、肝脏脂肪变性,导致酒精性脂肪肝向酒精性肝炎转变,同时因乙醇消耗内源性抗氧化剂导致肝脏氧化应激反应,造成肝细胞损伤^[2]。研究认为ESR1过度表达与肝脏脂肪堆积有关,而肝脏脂肪堆积过多会引发氧化应激反应,损伤肝细胞的同时激活炎症反应,形成慢性炎症状态,PI3K/Akt信号通路传导是氧化应激的重要通路之一,在多种肝脏疾病中发挥关键作用^[3]。研究表明PTPN11是编码酪氨酸磷酸酶的原癌基因,相关磷酸酶活性与细胞活性调节相关,同时蛋白酪氨酸磷酸酶2参与PI3K通路的激活和信号传导^[4]。葛花解醒汤因其具有不良反应较少、疗效显著等优势,本院名老中医结合临床经验将其化裁为健脾醒酒方,临床应用于轻中度酒精中毒收效显著。网络药理学研究显示ALD核心靶点为ESR1,葛花、枳椇子可直接干预PI3K/Akt、TNF- α 信号通路发挥抗肝纤维化、肝硬化作用,同时破坏蛋白酪氨酸磷酸酶1B可减轻酒精诱导ALD模型小鼠的肝损伤、炎症及脂肪变性^[5-6]。基于此,本研究意在研究健脾醒酒方通过ESR1调控PI3K/Akt通路,探讨其对酒精诱导肝细胞损伤小鼠的影响及其作用机制。

中医学根据ALD的临床症状将其归属为“酒癖”“酒疸”等范畴,患者若长期嗜酒无度、饮食不节损伤脾胃,运化失职,湿浊内生,郁而化热,湿热酒毒之邪蕴阻中焦,壅滞气机,水谷精微失于输布,肝疏泄功能失常,肝气郁滞发为胸胁脘腹胀满疼痛、呕恶吐酸等症状,治疗宜以调和肝脾、解酒祛毒化湿为主。健脾醒酒方中以葛花为君药,醒酒健脾,臣以焦神六曲消食和胃,白术健脾燥湿,白芍柔肝养肝,砂仁开胃醒脾,茯苓利水渗湿,佐以竹茹化痰止呕,葛根生津止渴,菊花、黄芩、牡丹皮清热解毒,白及护胃生津,佛手和胃止痛,陈皮理气化痰,使以甘草调和诸药,共同发挥清热解酒祛湿、健脾护肝、消食和胃的功效。乙醇经肝脏进行代谢降解,通过ADH将乙醇代谢为乙醛,经ALDH形成乙酸后排出体外^[7]。本实验结果发现健脾醒酒方低剂量组、健脾醒酒方高剂量组、阳性药组1小鼠血液乙醇含量均低于模型组,且健脾醒酒方低剂量组、健脾醒酒方高剂量组、阳性药组1小鼠肝组织中ADH、ALDH均升高,表明健脾醒酒方与水飞蓟宾均具有解酒作用。分析其中原因,健脾醒酒方中重用葛花为君,其提取物异黄酮复配对ADH激活率高达175.38%,解酒效果显著^[8]。

当肝细胞受到酒精损害,ALT、AST分散到血液中呈现异常升高水平,可反映肝损伤情况,SOD作为清除氧化自由基酶类,其活性降低导致自由基蓄积诱导肝细胞损伤,MDA可与酶和蛋白质交联,可反应氧化应激对肝脏的损伤程度^[9]。同时酒精会损伤肠道黏膜导致肠道内有毒物质进入肝脏,诱导细胞活化释放炎症因子如IL-6、TNF- α 引发肝脏炎症,加剧酒精性肝细胞损伤进展^[10]。本实验结果显示与模型组比较,健脾醒酒方低剂量组、健脾醒酒方高剂量组、阳性药组1小鼠肝组织中ALT、AST均降低,健脾醒酒方低剂量组、健脾醒酒方高剂量组、阳性药组1、阳性药组2小鼠血清IL-6、TNF- α 及肝组织MDA

均降低,SOD均升高,与吴洁等^[21]发现水飞蓟宾可缩短ALD模型小鼠醉酒期,降低ALT、AST含量,魏晴等^[22]发现胃泰颗粒可降低胃溃疡模型小鼠MDA、TNF- α ,升高SOD等结果相符。本次研究表明健脾醒酒方可通过提高抗氧化酶SOD活性、降低MDA水平抵御氧化应激损伤,调控炎症因子活化从而缓解酒精性肝损伤。其原因可能与陈皮中陈皮苷可调控凋亡基因表达,葛根中异黄酮类化合物通过抗氧化、抗炎等作用减轻酒精引发的急性肝损伤^[23]有关。本研究发现与模型组相比,健脾醒酒方低剂量组、健脾醒酒方高剂量组ESR1、MMP-2、PTPN11、p-PI3K、p-Akt蛋白表达均降低。ESR1、MMP-2、PTPN11在肿瘤细胞分化侵袭中发挥重要作用,MMP-2同时发挥促纤维化作用,本研究结果与KONERU M等^[24]学者的研究结论相近,提示健脾醒酒方可能通过ESR1调控PI3K/Akt信号通路,抑制PTPN11、MMP-2蛋白活性从而发挥抑制肝纤维化、调控肝细胞分化等作用。肝胃组织病理形态学显示健脾醒酒方高剂量组病理情况明显改善,进一步佐证了健脾醒酒方治疗ALD的效果,表明健脾醒酒方治疗酒精性肝损伤具有一定剂量-效应关系,解酒护肝护胃效果较好,其原因可能与茯苓、菊花中所富含的玉米黄质通过调控MMP类、PI3K/Akt基因表达以减少胃黏膜、肝细胞损伤及炎症细胞浸润^[25]有关。然而,健脾醒酒方的药理学成分尚不清晰,仍需进一步开展基础实验,从氧化应激、炎症反应及抑制纤维化等作为切入点着手开展深入研究。

综上所述,健脾醒酒方可通过降低血液乙醇含量,减轻酒精诱导的肝脏、胃黏膜炎症损伤,缓解轻度酒精中毒症状。其机制可能在于健脾醒酒方通过ESR1调控PI3K/Akt信号通路相关蛋白分子的表达,抑制PTPN11、MMP-2蛋白活性,调节ADH、ALDH乙醇代谢酶,减少IL-6、TNF- α 、MDA分泌,而改善肝细胞纤维化、氧化应激、炎症浸润损伤。

参考文献

- [1] BAJAJ J S. Alcohol, liver disease and the gut microbiota[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2019, 16(4): 235-246.
- [2] POHL K, MOODLEY P, DHANDA A D. Alcohol's impact on the gut and liver[J]. Nutrients, 2021, 13(9): 3170.
- [3] 蔡世焮,周素芳,周丽芳,等.参苓白术散调控TLR4/NLRP3通路对酒精性肝病治疗作用的机制研究[J].中国中药杂志, 2024, 49(5): 1275-1285.
- [4] 王夕丹,周悦,路旭,等.基于环氧合酶-2通路探讨葛花解醒汤治疗慢性酒精中毒的作用机制[J].世界中医药, 2022, 17(11): 1584-1589.
- [5] 南然,李宜璇.清肝化湿活血汤联合水飞蓟宾胶囊对酒精性肝病患者肝纤维化指标的影响[J].实用医学杂志, 2022, 38(8): 1022-1026.
- [6] 王亮,韩凌,邵平.基于网络药理学和分子对接的三九胃泰颗粒抗炎镇痛作用机制研究[J].成都中医药大学学报, 2023, 46(3): 40-47.
- [7] 王新安,李杰,谢经武.PI3K/Akt通路蛋白表达对胃癌术后1年内骨转移的预测分析[J].中国现代普通外科进展, 2021,

- 24(10):782–785,790.
- [8] 高铭,杨若聪,刘洪,等.基于生物信息技术探究荆防颗粒解酒保肝的作用机制[J].中国中药杂志,2021,46(21):5683–5692.
- [9] HSU M F, LEBLEU G, FLORES L, et al. Hepatic protein tyrosine phosphatase Shp2 disruption mitigates the adverse effects of ethanol in the liver by modulating oxidative stress and ERK signaling[J]. *Life Sci*,2024,340:122451.
- [10] REAGAN-SHAW S, NIHAL M, AHMAD N. Dose translation from animal to human studies revisited[J]. *FASEB J*,2008,22(3):659–661.
- [11] 罗苑,段小花,陈普.四大民族医药治疗酒精性肝病的研究进展[J].中医药导报,2021,27(12):65–69.
- [12] 孙敏,刘玉龙,刘科,等.丹皮酚通过调控JAK2/STAT3信号通路改善酒精性肝损伤小鼠肝脏炎症与氧化应激损伤[J].中国药理学通报,2023,39(6):1078–1084.
- [13] 王铭,马丽.基于网络药理学与实验验证的丹葛解醒汤干预酒精性肝病机制研究[J].中西医结合肝病杂志,2023,33(8):716–722.
- [14] 林琳,钟烁.SHP-2调控STAT3-PI3K-AKT信号通路对CNE-1细胞生物学行为的影响及其相关机制[J].川北医学院学报,2024,39(6):721–725,736.
- [15] 魏爽,付强,李冀,等.基于网络药理学探讨葛花-枳椇子药对治疗酒精性肝病的作用机制[J].中西医结合肝病杂志,2022,32(2):161–166.
- [16] HSU M F, KOIKE S, MELLO A, et al. Hepatic protein-tyrosine phosphatase 1B disruption and pharmacological inhibition attenuate ethanol-induced oxidative stress and ameliorate alcoholic liver disease in mice[J]. *Redox Biol*, 2020,36:101658.
- [17] 陶施民,卢贤欢,郭雅娟,等.葛根枳椇子栀子胶囊解酒护肝功效研究[J].中医药导报,2018,24(10):19–22,27.
- [18] 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.
- [19] ZHANG X, DONG Z C, FAN H, et al. Scutellarin prevents acute alcohol-induced liver injury via inhibiting oxidative stress by regulating the Nrf2/HO-1 pathway and inhibiting inflammation by regulating the AKT, p38 MAPK/NF- κ B pathways[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*,2023,24(7):617–631.
- [20] HE Y, HWANG S, AHMED Y A, et al. Immunopathology and therapeutic targets related to cytokines in liver diseases[J]. *Cell Mol Immunol*,2021,18(1):18–37.
- [21] 吴洁,田亚丽,伍宏宇,等.包葛颗粒剂对小鼠醒酒防醉及急性酒精性肝损伤保护作用的研究[J].新疆医科大学学报,2019,42(7):861–864.
- [22] 魏晴,梁珊珊,熊瑞,等.艳山姜提取物对急性胃溃疡模型小鼠的保护作用研究[J].中国药房,2020,31(18):2190–2195.
- [23] 王艳丽,宁宇,丁莹.中医药治疗酒精性肝病研究进展[J].中医药信息,2022,39(9):80–84.
- [24] KONERU M, SAHU B D, GUDEM S, et al. Polydatin alleviates alcohol-induced acute liver injury in mice: Relevance of matrix metalloproteinases (MMPs) and hepatic antioxidants[J]. *Phytomedicine*,2017,27:23–32.
- [25] ELHADIDY M G, EL NASHAR E M, ALGHAMDI M A, et al. A novel gastroprotective effect of zeaxanthin against stress-induced gastritis in male rats targeting the expression of HIF-1 α , TFF-1 and MMP-9 through PI3K/Akt/JNK signaling pathway[J]. *Life Sci*,2021,273:119297.

(收稿日期:2024-10-15 编辑:李海洋)

- (上接第43页)ciliary beating of human respiratory epithelial cells[J]. *J Clin Invest*, 2001,108(12):1817–1824.
- [23] 唐学武,王文革.SUMF在哮喘发病机制中作用的研究进展[J].东南大学学报(医学版),2019,38(6):1103–1106.
- [24] 刘胜楠,刘洋,吴传安,等.SUMF2对炎症的影响[J].现代生物医学进展,2019,19(23):4586–4588,4581.
- [25] 江畅,姜晓峰.硫酸酯酶代谢障碍所致疾病的研究进展[J].国际检验医学杂志,2020,41(16):2016–2020.
- [26] BUONO M, COSMA M P. Sulfatase activities towards the regulation of cell metabolism and signaling in mammals[J]. *Cell Mol Life Sci*,2010,67(5):769–780.
- [27] FANG C F, LI X X, LIANG H Y, et al. Downregulation of SUMF2 gene in ovalbumin-induced rat model of allergic inflammation[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015,8(10):12053–12063.
- [28] 李秀丽,徐文龙,梁红艳,等.SUMF2在支气管哮喘中的作用[J].现代生物医学进展,2017,17(34):6798–6800,6759.
- [29] 张华,李晓明,王强.感染后咳嗽大鼠SUMF2/IL-13信号通路的调控机制及中药干预研究[J].中国中药杂志,2024,49(10):2105–2112.
- [30] 王胜,张曦煜,郑莉莉.基于TRPV1探讨调气止咳方改善感染后咳嗽大鼠气道神经源性炎症的机制[J].时珍国医国药,2023,34(11):2615–2619.
- [31] 项艳,胡珍,孙亮,等.桂枝温肺化痰汤对呼吸道感染后咳嗽及气道炎症和免疫功能的影响[J].中华中医药学刊,2021,39(4):184–187.
- [32] 刘靖雷,罗银河,王孟清,等.小儿久咳合剂对感染后咳嗽大鼠肺组织MCP-1、MIP-1 β 表达的影响[J].时珍国医国药,2024,35(5):1097–1100.

(收稿日期:2025-02-24 编辑:罗英姣)