

苦荞提取物对正常小鼠乙醇代谢酶的影响

陈志元¹, 鲁晓佳², 余小玲¹, 杨跃军¹, 金悠²

(1. 劲牌有限公司中药保健食品与安全湖北省重点实验室, 大冶 435100; 2. 华中科技大学同济医学院药理学系, 武汉 430030)

摘要 目的 观察苦荞提取物灌胃后对小鼠体内乙醇代谢酶的影响, 并探讨其可能机制。方法 以雄性昆明种小鼠为实验对象, 设阴性对照组、小剂量苦荞组、中剂量苦荞组、大剂量苦荞组, 2 h 后取肝脏组织。一部分肝脏组织用于提 mRNA, 并用荧光实时定量 qPCR 技术检测与乙醇和乙醛代谢密切相关的 4 个酶, 即乙醇脱氢酶 (ADH)、乙醛脱氢酶 (ALDH)、过氧化物酶 (POD)、细胞色素 P4502E1 (CYP2E1) 的基因表达水平。另一部分组织则用相关的酶活性试剂盒检测上述 4 种酶活性的改变。结果 小、中、大剂量苦荞提取物不改变小鼠肝脏内 ADH 的基因表达水平, 但中、大剂量组明显增加其活性; 小、中、大剂量苦荞提取物均促进小鼠肝脏内 ALDH 的基因表达水平, 且小、中剂量组明显增加其活性; 小、中、大剂量苦荞提取物不改变小鼠肝脏内 POD 基因表达, 但大剂量组增加其活性; 小、中、大剂量苦荞提取物对肝脏 CYP2E1 酶的基因表达和活性均无明显影响。结论 苦荞可以促进酒精的代谢, 加速酒精的排泄, 起到解毒作用, 并降低对各种细胞器和酶功能损伤的作用。

关键词 苦荞; 乙醇脱氢酶; 乙醛脱氢酶; 过氧化物酶; 细胞色素 P4502E1

中图分类号 R285.5; R575.5 **文献标识码** A **文章编号** 1004-0781(2018)04-0438-03

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2018.04.007

Effect of Fagopyrum Tatarium Gaertn Extractive on Alcohol Metabolism in Normal Mice

CHEN Zhiyuan¹, LU Xiaojia², YU Xiaoling¹, YANG Yuenian¹, JIN You² (1. Hubei Province Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine, Health Food and Safety, Jing Brand Co., Ltd, Daye 435100, China; 2. Department of Pharmacology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

ABSTRACT Objective To study the effects of *Fagopyrum tatarium* Gaertn extractive on metabolism of alcohol and its underlying mechanisms. **Methods** Male Kunming mice were intragastrically administrated with three different doses (low, median or high) of *Fagopyrum tatarium* Gaertn extractive or vehicle control, then their liver tissue was collected after 2 h. The gene expression level of alcohol dehydrogenase (ADH), acetaldehyde dehydrogenase (ALDH), peroxidase and cytochrome P4502E1 (CYP2E1) in the liver were detected by real-time qPCR, and the enzyme activity was also detected using their respective activity kits. **Results** *Fagopyrum tatarium* Gaertn extractive elevated the gene expression level of ALDH but not ADH, peroxidase or CYP450. The activity of ADH was increased after median or high dose treatment, the activity of ALDH was enhanced after low or median dose treatment, while the activity of peroxidase was elevated only by high dose treatment. However, *Fagopyrum tatarium* Gaertn extractive did not influence the activity of CYP. **Conclusion** *Fagopyrum tatarium* Gaertn extractive promotes the metabolism and excretion of alcohol, thus will exerts protective effects on organelles and enzymes associated with cell physiological functions.

KEY WORDS *Fagopyrum tatarium* Gaertn; Alcohol dehydrogenase; Acetaldehyde dehydrogenase; Peroxidase; Cytochrome P4502E1

苦荞 (*Fagopyrum tatarium* Gaertn) 是我国独特的药食两用农作物, 喜凉爽, 耐瘠薄, 多生长在高寒山区, 属蓼科荞麦属双子叶植物, 是谷类作物中不属于禾本科的谷类粮食, 也是我国西南边远地区彝族人的主要粮食之一, 其药用价值和营养价值越来越受人们重视。

收稿日期 2017-01-13 修回日期 2017-03-30

作者简介 陈志元 (1976-), 男, 湖北罗田人, 工程师, 学士, 研究方向: 中药现代化。电话: 0714-3188779, E-mail: czyuan889@21cn.com。

通信作者 金悠 (1972-), 女, 湖北安陆人, 主管技师, 硕士, 研究方向: 神经药理。电话: 027-83691760, E-mail: jinyou81@163.com。

实验证明, 苦荞能够有效降低人体内血脂、血糖^[1-4], 还具有抗氧化^[5-6]、保护红细胞^[6]、清除 DPPH 自由基^[7]、保护大鼠脑缺血-再灌注损伤^[8], 对 α -淀粉酶也有抑制作用^[9]。目前, 苦荞提取物已经广泛用于多种保健食品和保健酒的制备中。然而, 苦荞提取物是否影响乙醇或乙醛在体内的代谢, 笔者目前未见报道。本研究拟通过给不同剂量的苦荞提取物后小鼠肝脏内与乙醇和乙醛代谢密切相关的 4 个酶, 即: 乙醇脱氢酶 (alcohol dehydrogenase, ADH)、乙醛脱氢酶 (acetaldehyde dehydrogenase, ALDH)、过氧化物酶 (peroxidase, POD)、细胞色素 P4502E1 (cytochrome P4502E1, CYP2E1) 基因表达和活性的改变, 来观察苦荞对酒精

代谢的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性清洁级成年昆明种小鼠, 体质量 18~22 g; 均购自武汉生物制品研究所有限责任公司, 证书编号: 42009800001189。

1.2 试剂 苦荞提取物, 黄色粉末, 实验时取不同质量的苦荞提取物溶于相同剂量的 0.9% 氯化钠溶液, 涡旋振荡, 分别配制成不同浓度的苦荞混悬液。ADH、POD 活性测定试剂盒均购自南京建成生物试剂公司, CYP2E1 活性测定试剂盒购自上海杰美公司, ALDH 活性测定试剂盒购自 Biovision 公司。ADH、ALDH、POD、CYP2E1 引物均购自英潍捷基贸易有限公司。

1.3 仪器 EL204 型天平 [梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司, 感量: 0.01 mg]; 福马 88000 系列低温冰箱 [美国热电 (上海) 科技仪器有限公司]; ELx800 型酶标仪 (美国伯腾仪器有限公司); SHZ-A 型水浴恒温振荡器 (上海博迅实业有限公司医疗设备厂)。

1.4 动物分组及给药 雄性清洁级成年昆明种小鼠 40 只, 按体质量随机分为 4 组, 即小剂量苦荞组 (苦荞 60 mg · kg⁻¹), 中剂量苦荞组 (苦荞 120 mg · kg⁻¹), 大剂量苦荞组 (苦荞 240 mg · kg⁻¹), 以及阴性对照组 (0.9% 氯化钠溶液), 每组 10 只, 灌胃 2 h 后, 处死动物并取肝脏组织, 于 -80 °C 冰冻保存。

1.5 检测指标 按试剂盒说明书操作, 测定小鼠肝脏内 ADH、ALDH、POD、CYP2E1 活性。其中, ADH 活性 = 吸光度值的变化量 × 反应液总体积 / 样本量 / 反应时间 / 待测样本蛋白浓度 × 1 000; POD 活性 = 吸光度值的变化量 × 反应液总体积 / 样本量 / 反应时间 / 待测样本蛋白浓度 × 1 000; CYP2E1 活性计算 = 实际吸光度值 × 反应液总体积 × 稀释倍数 / 样本量 / 反应时间 / 纳摩尔吸光度系数 × 1 000。荧光实时定量 qPCR 实验从上述小鼠肝脏组织提取 mRNA, 用 Takara 公司逆转录试剂

盒逆转录成 cDNA, 通过设计引物和荧光实时定量 qPCR 实验技术, 检测 ADH、ALDH、POD 和 CYP2E1 的表达。引物信息: ADH: Forward: TCTCAACTGGCTATGGCTCTG, Reverse: AAAAGTCCACCCCTCCGTC; POD: Forward: GACCTCAAAGTATCCAAAAGCA, Reverse: CAGCGACCAGATGAAGCAG; CYP2E1: Forward: CAGTAGCACCTCCTTGACAGC, Reverse: GCCACCCCTCCTCTCGTA; ALDH: Forward: CCTCAGGTGGATGAAACTC, Reverse: CTTCGCCCTTCTTGTTG。

1.6 统计学方法 用 SPSS V13.0 版统计软件, 采用各实验组与阴性对照组均数比较的方差分析对数据进行处理。以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 苦荞对小鼠肝脏 ADH、ALDH、POD、CYP2E1 基因表达的影响 结果显示, 给予小、中、大剂量苦荞并没有改变小鼠肝脏内 ADH、POD 和肝脏 CYP2E1 酶的基因表达。3 个剂量的苦荞均使小鼠肝脏内 ALDH 表达增加, 差异有统计学意义 (P < 0.01)。见表 1。

2.2 苦荞对小鼠肝脏内 ADH、ALDH、POD、CYP2E1 活性的影响 结果显示, 与阴性对照组比较, 小剂量苦荞组 ALDH 活性增加 (P < 0.05); 中剂量苦荞 ADH 和 ALDH 活性增加 (P < 0.05); 大剂量苦荞 POD 活性增加 (P < 0.05)。3 个剂量苦荞对 CYP2E1 酶的活性与阴性对照组比较, 差异无统计学意义。见表 2。

3 讨论

在肝内乙醇有 4 条代谢途径: ①ADH 的乙醇氧化体系; ②滑面内质网上的微粒体乙醇氧化酶系统 (microsomal ethanol oxidizing system, MEOS); ③烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 氧化酶-POD 体系; ④黄嘌呤氧化酶-POD 体系。在这 4 条代谢途径中又以前两种为主。通常, 少量乙醇在肝脏中主要通过 ADH 氧化体系代

表 1 4 组小鼠肝脏 ADH、ALDH、POD、CYP2E1 基因表达的比较

Tab.1 Comparison of gene expression of ADH, ALDH, POD and CYP2E1 among four groups of mice

$\bar{x} \pm s, n = 10$

组别	剂量/ (mg · d ⁻¹ · kg ⁻¹)	ADH	ALDH	POD	CYP2E1
阴性对照组		0.68±0.07	1.01±0.03	1.16±0.05	1.13±0.08
小剂量苦荞组	60	0.67±0.05	1.88±0.14 ^{*1}	1.13±0.05	1.22±0.15
中剂量苦荞组	120	0.90±0.09	1.31±0.05 ^{*1}	1.21±0.15	1.09±0.10
大剂量苦荞组	240	0.70±0.03	1.42±0.11 ^{*1}	1.03±0.05	1.01±0.04
F		2.33	15.35	0.736	0.640

与阴性对照组比较, ^{*1}P < 0.01

Compared with negative control group, ^{*1}P < 0.01

表 2 4 组小鼠对肝脏 ADH、ALDH、POD、CYP2E1 活性的比较

Tab.2 Compared of *Macaca fascicularis* the activity of ADH,ALDH,POD and CYP2E1 among four groups of mice $\bar{x} \pm s, n = 10$

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$)	ADH	POD	ALDH/	CYP2E1/
		($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)		($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$)	($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)
阴性对照组		4.71±0.62	0.91±0.02	0.43±0.05	0.18±0.02
小剂量苦荞组	60	4.89±0.92	0.96±0.05	0.57±0.03 ^{*1}	0.14±0.01
中剂量苦荞组	120	7.10±0.96 ^{*1}	0.96±0.02	0.54±0.04 ^{*1}	0.16±0.02
大剂量苦荞组	240	7.34±0.89 ^{*1}	1.09±0.06 ^{*1}	0.45±0.04	0.17±0.01
<i>F</i>		2.14	3.39	2.03	1.02

与阴性对照组比较, ^{*1} $P < 0.01$ Compared with negative control group, ^{*1} $P < 0.01$

谢。它在肝脏内先被 ADH 氧化成乙醛,然后被 ALDH 氧化成乙酸,最后分解为二氧化碳和水。而慢性习惯性饮酒时,其高血浓度的乙醇则可诱导 CYP2E1 活性参与乙醇代谢^[10]。在这些代谢产物中,乙酸是乙醇被吸收后产生的唯一有营养价值的物质,它可以提供人体需要的热量,而各种途径产生的乙醛则可以损伤各种细胞器和酶的功能,同时又能够刺激免疫系统诱发免疫反应性肝损伤。另外,乙醛还可通过扩张血管、刺激呕吐中枢、敏化疼痛相关神经环路等,引起头痛、头胀、眼胀、神经痛、呕吐等“酒上头”症状。乙醇在肝细胞内通过 CYP2E1 和 ADH 介导的氧化反应产生很多自由基,对细胞内物质造成氧化损伤。故肝脏中的 ADH、ALDH 和 CYP2E1 是乙醇及其代谢产物乙醛代谢非常重要的 3 种酶。

由于乙醇“上头”是喝酒后立刻产生的快速反应,故本实验采用雄性昆明种小鼠的一部分肝脏组织用于提取 mRNA,并用荧光实时定量 qPCR 技术检测与乙醇和乙醛代谢密切相关的 4 种酶,即:ADH、ALDH、POD、CYP2E1 的基因表达水平。另一部分组织则用相关的酶活性试剂盒检测上述 4 种酶活性的改变。结果表明:小、中、大剂量苦荞不改变小鼠肝脏内 ADH 的表达,但中、大剂量组明显增加其活性;小、中、大剂量苦荞均促进小鼠肝脏内 ALDH 的表达,且小中剂量组明显增加其活性;小、中、大剂量苦荞不改变小鼠肝脏内 POD 基因表达,但大剂量组增加其活性;小、中、大剂量苦荞对肝脏 CYP2E1 酶的表达和活性无明显影响。

从上述结果可知,摄入苦荞提取物后会通过增加小鼠 ADH 的活性使乙醇代谢为乙醛的能力增强,同时 ALDH 活性的增加,使乙醛更快被代谢为乙酸,起到解

毒作用,降低对各种细胞器和酶功能的损伤,也解除乙醛致头痛、头胀、眼胀、神经痛等“酒上头”症状。同时,大剂量苦荞也会通过增加肝脏内 POD 的活性进一步促进乙醇代谢为其他无毒物质,加速乙醇的排泄。

参考文献

- [1] 牛秀明.苦荞生物类黄酮药理作用研究进展[J].山东医学高等专科学校学报,2008,30(6):470-472.
- [2] 薛长勇,张月红,刘英华,等.苦荞黄酮降低血糖和血脂的作用途径[J].中国临床康复,2005,9(35):111-113.
- [3] 刘巍,胡汉昆,刘薇芝,等.苦荞提取物对 2 型糖尿病大鼠胰岛细胞凋亡的干预作用[J].中国药师,2014,17(1):1-4.
- [4] 童红莉,田亚平,汪德清,等.苦荞壳提取物对大鼠血脂的调节作用[J].第四军医大学学报,2006,27(2):120-122.
- [5] 李丹,丁霄霖.苦荞黄酮抗氧化作用的研究[J].食品科学,2001,22(4):22-24.
- [6] 王敏,魏益民,高锦明.苦荞黄酮的抗脂质过氧化和红细胞保护作用研究[J].中国食品学报,2006,6(1):278-283.
- [7] 谭萍,方玉梅,王毅红,等.苦荞种子黄酮类化合物清除 DPPH 自由基的作用[J].食品研究与开发,2008,29(12):20-23.
- [8] 黄叶梅,黎霞,张丽.苦荞黄酮对大鼠脑缺血-再灌注损伤的保护作用[J].四川师范大学学报(自然科学版),2006,29(4):499-501.
- [9] 王斯慧,白银花,黄琬凌,等.苦荞黄酮对 α -淀粉酶的抑制作用研究[J].食品工业,2012,3:109-111.
- [10] 郑莉莉,仲英娜.乙醇脱氢酶和乙醛脱氢酶及细胞色素 P4502E1 基因多态性与酒精性肝病易感性的研究[J].中国肝脏病杂志(电子版),2008,1(1):59-62.