

黄皮果提取物对急性乙醇中毒致小鼠肝损伤的保护作用

官堂明¹, 刘德承¹, 王珺飞¹, 蔡 珊², 林美金², 卢瑞荣², 吴科锋³, 马晓鹏⁴, 吴 铁¹, 李文德^{1,3}

(广东医学院 1. 药理学教研室, 2. 第一临床学院 2008 级本科, 3. 广东天然药物研究与开发重点实验室, 广东 湛江 524023; 4. 附属医院药学部, 广东 湛江 524001)

摘要: 目的 探讨黄皮果提取物(EFCL)对小鼠急性乙醇中毒致肝损伤的保护作用及其可能的作用机制。方法 ICR 小鼠 40 只, 随机分为正常对照、模型及 EFCL 1.5 和 3.0 g·kg⁻¹ 组。EFCL 1.5 和 3.0 g·kg⁻¹ 组小鼠分别 ig 给予相应剂量的 EFCL; 30 min 后 ig 给予 52℃ 二锅头白酒 12 ml·kg⁻¹; 24 h 后处死小鼠, 制备血清, 取肝组织制备 10% 肝组织匀浆, 采用试剂盒方法检测血清丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)活性, 以及肝组织匀浆中超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)和谷胱甘肽(GSH)含量, 常规 HE 染色和淀粉酶-过碘酸希夫法染色观察肝组织病理形态改变, 并用免疫组织化学法测定肝组织中 NF-κB 和 α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)的表达。结果 与正常对照组比较, 模型对照组小鼠血清 ALT 和 AST 活性分别升高 28.0% 和 28.9% ($P < 0.01$), 肝组织匀浆中 SOD 活性和 GSH 含量分别由 (706 ± 46) kU·g⁻¹ 蛋白和 (251 ± 61) mg·g⁻¹ 蛋白降低至 (515 ± 68) kU·g⁻¹ 蛋白和 (126 ± 18) mg·g⁻¹ 蛋白, 而 MDA 含量由 (204 ± 21) μmol·g⁻¹ 蛋白升高至 (258 ± 50) μmol·g⁻¹ 蛋白 ($P < 0.05$); 肝组织中 NF-κB 和 α-SMA 表达增加 ($P < 0.01$)。与模型对照组比较, EFCL 1.5 和 3.0 g·kg⁻¹ 组小鼠血清 ALT 活性分别降低了 18.3% 和 19.8%, 血清中 AST 活性分别降低了 6.4% 和 9.7% ($P < 0.05$, $P < 0.01$); EFCL 3.0 g·kg⁻¹ 组肝组织匀浆中 GSH 水平和 SOD 活性分别升高了 61.4% 和 14.8% ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。肝组织中 NF-κB 和 α-SMA 的表达水平明显低于模型对照组 ($P < 0.01$)。肝组织病理形态检测可见, EFCL 1.5 和 3.0 g·kg⁻¹ 组小鼠对乙醇引起的肝细胞脂肪样变、水样变和炎症细胞浸润等均有明显改善。结论 EFCL 对小鼠急性乙醇中毒所致肝损伤具有保护作用, 其机制可能与升高抗氧化酶活性、促进自由基清除、降低 NF-κB 的表达及抑制肝星状细胞活化有关。

关键词: 黄皮果; 乙醇; 肝损伤; 抗氧化; NF-κB; α-平滑肌肌动蛋白

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1000-3002(2012)06-0829-06

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2012.06.009

急性乙醇中毒又称醉酒, 是指短时间内饮入过量的乙醇或乙醇饮料后所引起的中枢神经系统兴奋及随后的抑制状态。目前, 过量饮酒和酗酒的现象日益增多, 乙醇性肝病发病率也逐年升高^[1]。因此, 开发对急性乙醇性肝损伤, 尤其是对暴发型乙醇性肝损伤具有保护作用的药物意义重大。黄皮果为芸香科黄皮属黄皮 (*Clausena lansium* (Lour.) Skeels) 的果实, 具有健脾开胃和行气解郁之功效。现代药理学研究结果表明, 其中的有效成分黄皮酰胺 (clausenamide) 具有保肝、促智和抗神经细胞凋亡等

作用^[2-6]。本研究以急性乙醇中毒小鼠为模型, 观察黄皮果提取物 (extracts from fruit of *C. lansium* (Lour.) Skeels, EFCL) 对急性乙醇性肝损伤的保护作用, 并进一步探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物、试剂和仪器

健康 ICR 种小鼠, 雌雄各半, 体质量 24 ~ 28 g, 均为清洁级动物, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 动物合格证号: SCXK(湘)2011-0003。52℃ 二锅头白酒为北京红星酒业有限公司产品; Folin-酚试剂盒购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; 丙氨酸转氨酶 (alanine transaminase, ALT)、天冬氨酸转氨酶 (aspartate aminotransaminase, AST) 和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性测定试剂盒, 丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 和谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 含量测定试剂盒和糖原染色

基金项目: 广东省科技项目 (2010A040200005); 广东省科技项目 (2012B040304013); 广东医学院大学生创新实验项目 (09ZZF010)

作者简介: 官堂明 (1988 -), 男, 硕士研究生, 主要从事药理学研究, Tel: 13692395050, E-mail: gtmgdm@139.com; 李文德 (1977 -), 男, 副教授, 硕士, 主要从事药理学研究。

通讯作者: 李文德, E-mail: gdmcli@yahoo.com.cn, Tel: (0769) 2388405

试剂盒购自南京建成生物工程研究所; NF- κ B 抗体、DAB 显色剂和 SABC 试剂盒均购自北京中杉金桥公司; 小鼠抗大鼠 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin α -SMA) 单克隆抗体和辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 抗体购自武汉博士德公司。752N 紫外可见分光光度计, 上海精科实业有限公司; T-500 型电子天平, 常熟双杰测试仪器; 台式离心机, 上海安亭科学仪器公司; DZF-6090 真空干燥箱, 上海精宏实验设备有限公司; BIO-TEK ELX800 酶标仪, 购自北京中杉金桥公司。

1.2 黄皮果提取物的制备

黄皮果购自湛江市益寿堂药店, 产地广东郁南。称取黄皮果干品适量, 粉碎, 过 60 目筛, 备用。准确称取样品 500 g, 90°C 水煎 3 次, 每次 2 h, 过滤, 合并滤液, 真空干燥得棕红色固形物即 EFCL 152 g, 提取率 30.4%。EFCL 与碘化汞钾试剂反应为阴性, 提示无生物碱存在; 与斐林试剂、银氨溶液反应呈阳性, 表明 EFCL 含有可溶性还原性糖; 与铁氰化钾-三氯化铁试剂反应呈阳性, 与溴水反应生成白色沉淀, 表明 EFCL 含有酚酸类物质。采用苯酚-硫酸法在 490 nm 波长处测定 EFCL 中总糖含量不低于 78.5%, 采用 Folin-酚比色法在 760 nm 波长处测定 EFCL 中总酚含量不低于 2.5%。用生理盐水将 EFCL 配制成 100 g·L⁻¹ 的母液, 4°C 保存备用。

1.3 动物分组、给药和急性乙醇中毒模型制备

选取小鼠 40 只, 雌雄各半, 随机分成正常对照、模型和 EFCL 1.5 和 3.0 g·kg⁻¹ 组, 每组 10 只。EFCL 1.5 和 3.0 g·kg⁻¹ 组小鼠分别 ig 给予相应剂量的 EFCL, 正常和模型对照组则 ig 给予等体积生理盐水; 30 min 后正常对照组 ig 给予相应体积的生理盐水, 其余各组分别 ig 给予 52°C 二锅头白酒 12 ml·kg⁻¹; 24 h 后眼球取血, 处死小鼠, 取肝组织备用。

1.4 血清 ALT 和 AST 活性检测

小鼠全血 1006 × g 离心 10 min, 分离血清, -20°C 冰箱保存, 按照试剂盒说明方法检测血中 ALT 和 AST 活性。

1.5 肝组织匀浆 SOD 活性、MDA 和 GSH 含量检测

取肝组织立即放在冰生理盐水中漂洗 2 次, 滤纸吸干, 取相同部位的一小块肝组织用生理盐水制备成 10% 的肝组织匀浆, 1006 × g 离心 10 min, 分离上清液, -20°C 冰箱保存, 按试剂盒说明书测定肝组织 SOD 活性、MDA 和 GSH 含量。

1.6 肝组织病理形态检测

取部分肝组织用 10% 甲醛固定 36 h, 石蜡包

埋, 切片, 常规 HE 染色和 D-PAS 染色后于光学显微镜下观察肝组织病理改变; 根据肝组织病变程度以半定量方法积分, 并按各种病变重要性乘以不同加权数。加权数: 肝细胞坏死 × 3, 肝细胞水样变 × 1, 淤血、出血 × 1, 炎症细胞浸润 × 1。计算每只小鼠肝组织病变的总积分, 进行统计学分析。

1.7 免疫组化染色测定肝组织 NF- κ B 和 α -SMA 蛋白表达

肝组织石蜡包埋、切片, 二甲苯透明, 常规脱蜡至水, 3% 过氧化氢孵育 10 min, PBS 洗 3 次, 每次 3 min, 微波修复 15 min; 加入正常山羊血清封闭液, 37°C 孵育 15 min, 然后加入一抗 (1:100 稀释), 4°C 过夜, PBS 洗 3 次, 每次 3 min; 加入二抗, 37°C 孵育 15 min, PBS 洗 3 次, 每次 3 min; 最后加入辣根过氧化物酶标记链霉卵白素 (SABC) 工作液, 37°C 孵育 15 min, PBS 洗 3 次, 每次 3 min; DAB 显色, 显微镜下控制显色时间, 自来水冲洗, 苏木紫复染, 中性树脂胶封片。每组均用 PBS 代替一抗作为阴性对照。肝组织中 NF- κ Bp65 及 α -SMA 免疫组织化学染色图像, 用 Image-Pro Plus 6.0 分析软件进行图像分析, 每张切片取 5 个视野测定 NF- κ B 和 α -SMA 蛋白阳性反应产物的积分吸光度 (integrated absorbance, IA) 值, 取平均值表示 NF- κ B 和 α -SMA 蛋白表达水平。IA 值越大表示目的蛋白表达越强。

1.8 统计学分析

实验结果数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析, 多组间比较用方差分析。方差齐性时, 采用 LSD 检验比较; 方差不齐时, 采用 Dunnett *t* 检验比较。

2 结果

2.1 EFCL 对急性乙醇中毒小鼠血清 ALT 和 AST 活性的影响

与正常对照组比较, 模型对照组小鼠血清 ALT 和 AST 活性分别升高 28.0% 和 28.9% ($P < 0.01$), 表明大剂量的乙醇摄入可使肝功能受损。与模型对照组相比, EFCL 1.5 和 3.0 g·kg⁻¹ 组小鼠血清 ALT 活性分别降低 18.3% 和 19.8%, AST 活性分别降低 6.4% 和 9.7%, 表明 EFCL 能明显拮抗乙醇对肝的损伤 (表 1)。

2.2 EFCL 对急性乙醇中毒小鼠肝组织匀浆中 SOD 活性、MDA 和 GSH 含量的影响

与正常对照组相比, 模型组 SOD 活性和 GSH 含量明显降低, MDA 含量升高 ($P < 0.01$), 表明大剂量

Tab. 1 Effect of extracts from fruit of *C. lansium* (Lour.) Skeels(EFCL) on activity of alanine transaminase (ALT) and aspartate aminotransaminase (AST) of mice with acute alcoholism

Group	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹
Normal	55.8 ± 4.0	92 ± 4
Model	71.5 ± 11.2 ^{**}	119 ± 6 ^{**}
EFCL 1.5	58.4 ± 1.7 ^{##}	111 ± 5 [#]
3.0	57.4 ± 6.1 ^{##}	108 ± 12 ^{##}

The mice in EFCL groups were ig given EFCL 1.5 and 3.0 g·kg⁻¹, 30 min later, wine (52℃) 12 ml·kg⁻¹ was ig given to the mice in model and EFCL groups. All the mice were sacrificed 24 h after wine administration. $\bar{x} \pm s$, n = 10. ^{**} P < 0.01, compared with normal group; [#] P < 0.05, ^{##} P < 0.01, compared with model group.

的乙醇摄入导致肝内抗氧化能力显著下降。与模型对照组相比, EFCL 3.0 g·kg⁻¹ 组小鼠肝 GSH 水平和 SOD 活性分别升高 61.4% 和 14.8%, EFCL 3.0 g·kg⁻¹ 组小鼠肝 MDA 含量降低 12.9%, 表明 EFCL 能增强急性乙醇中毒小鼠肝的抗氧化能力 (表 2)。

Tab. 2 Effect of EFCL on activity of superoxide dismutase (SOD), contents of malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) in liver tissue of mice with acute alcoholism

Group	SOD/ kU·g ⁻¹ protein	MDA/ μmol·g ⁻¹ protein	GSH/ mg·g ⁻¹ protein
Normal	706 ± 46	204 ± 21	251 ± 61
Model	515 ± 68 ^{**}	258 ± 50 ^{**}	126 ± 18 ^{**}
EFCL 1.5	547 ± 86	232 ± 26	188 ± 58 [#]
3.0	635 ± 14 ^{##}	225 ± 26 [#]	218 ± 79 ^{##}

See Tab. 1 for the mouse treatment. $\bar{x} \pm s$, n = 10. ^{*} P < 0.05, ^{**} P < 0.01, compared with normal group; [#] P < 0.05, ^{##} P < 0.01, compared with model group.

2.3 EFCL 对急性乙醇中毒小鼠肝组织病理变化的影响

正常对照组小鼠肝小叶结构清晰, 肝细胞索排列整齐, 肝细胞无明显变性、坏死, 无炎症细胞浸润 (图 1A)。模型对照组小鼠肝可见肝小叶中央静脉和汇管区周围有大量肝细胞水样变, 肝细胞脂肪样变明显, 肝细胞索排列紊乱, 可见炎症细胞浸润 (图 1B)。与模型组相比, EFCL 1.5 和 3.0 g·kg⁻¹ 组小鼠肝细胞水样变、脂肪样变以及炎症细胞浸润均明显减轻 (图 1C, D), 其中以 EFCL 3.0 g·kg⁻¹ 组效果更显著。D-PAS 染色结果显示, 模型组小鼠肝内多处可见蜡质样细胞沉积 (库普弗细胞吞噬坏死肝细胞残骸脂褐素胞体肿大), 呈品红色 (图 2B); 而正常

对照组和 EFCL 3.0 g·kg⁻¹ 组未发现有蜡质样细胞明显沉积 (图 2A, D, 表 3)。

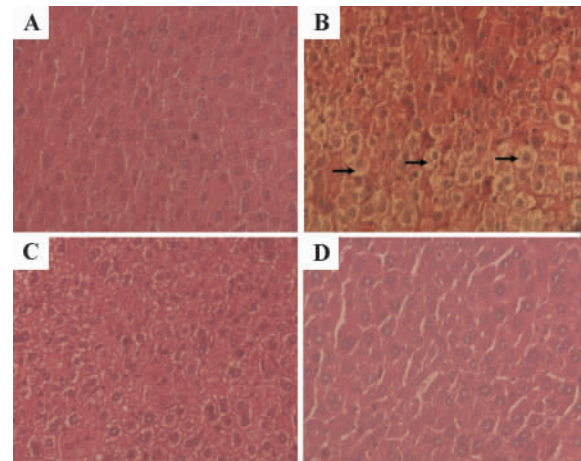


Fig. 1 Effect of EFCL on pathological changes in liver tissue of mice with acute alcoholism (HE × 400). See Tab. 1 for the mouse treatment. A: normal; B: model; C: EFCL 1.5 g·kg⁻¹; D: model + EFCL 3.0 g·kg⁻¹. Arrows: hydropic cells.

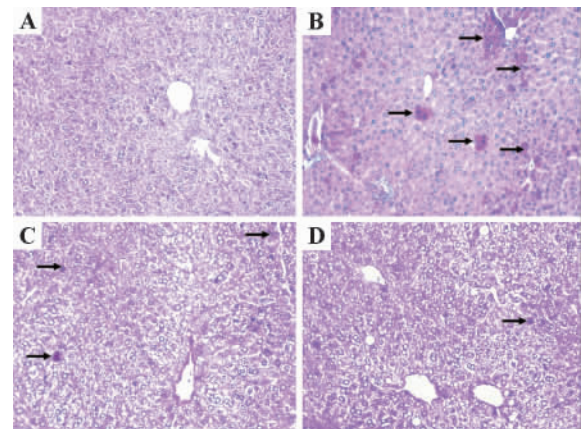


Fig. 2 Effect of EFCL on pathological changes in liver tissue of mice with acute alcoholism (D-PAS × 200). See Tab. 1 for the mouse treatment. A: normal; B: model; C: EFCL 1.5 g·kg⁻¹; D: model + EFCL 3.0 g·kg⁻¹. Arrows: necrotic/waxy cells.

Tab. 3 Effect of EFCL on pathological changes in liver of mice with acute alcoholism

Group	Score of liver injury
Normal	0.9 ± 0.3
Model	2.4 ± 0.8 ^{**}
EFCL 1.5	1.7 ± 0.8 [#]
3.0	1.1 ± 0.6 ^{##}

See Tab. 1 for the mouse treatment. Liver pathological changes were scored as follows: steatosis = 1; hydropic cells = 1; inflammation = 1; and necrosis = 3. One point was given for each grade of severity of histological abnormality and a total score was calculated for each liver. $\bar{x} \pm s$, n = 10. ^{**} P < 0.01, compared with normal group; [#] P < 0.05, ^{##} P < 0.01, compared with model group.

2.4 EFCL 对急性乙醇中毒小鼠肝组织 NF-κB 和 α-SMA 蛋白表达的影响

光镜下,小鼠肝组织 NF-κB 阳性细胞呈明显的棕黄色或深棕色,分布于细胞质和细胞核,表达强度不一,以中央静脉周围表达较多(图 3A)。肝组织中 α-SMA 表达以肝细胞胞浆为主,着色为黄色或棕黄色,以中央静脉壁和周围血管壁表达较多(图 4A)。与正常对照组比较,模型对照组中 NF-κB 和 α-SMA 表达均明显升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,EFCL 1.5 和 3.0 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组 NF-κB 和 α-SMA 表达均明显减弱 ($P < 0.01$)。其中以 EFCL 3.0 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组作用更为明显(图 3 和 4 表 4)。

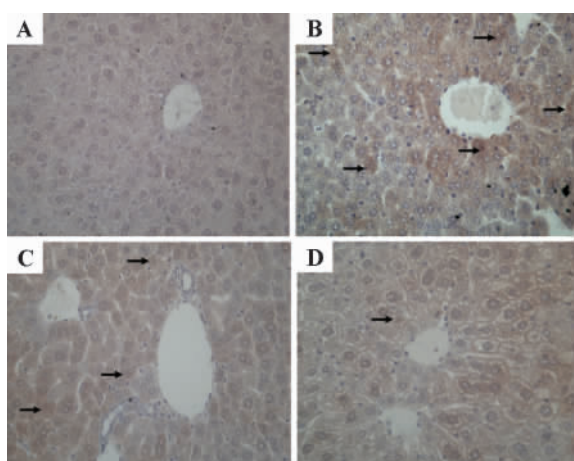


Fig. 3 Effect of EFCL on NF-κB expression in liver tissue of mice with acute alcoholism (Immunostaining $\times 400$). See Tab. 1 for the mice treatment. A: normal; B: model; C: EFCL 1.5 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$; D: EFCL 3.0 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. Arrows: NF-κB positive cells.

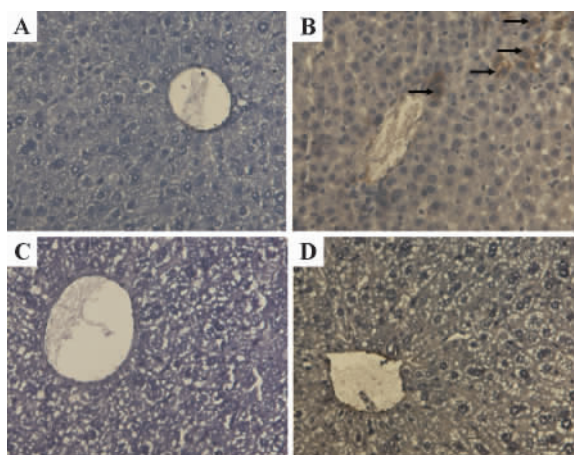


Fig. 4 Effect of EFCL on α-smooth muscle actin(α-SMA) expression in liver tissue of mice with acute alcoholism (Immunostaining $\times 400$). See Tab. 1 for the mice treatment. A: normal; B: model; C: EFCL 1.5 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$; D: EFCL 3.0 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. Arrows: α-SMA positive cells.

Tab. 4 Effect of EFCL on NF-κB and α-SMA protein expression in liver tissue of mice with acute alcoholism

Group	Protein expression (IA)	
	NF-κB	α-SMA
Normal	5.7 ± 0.9	1.8 ± 0.2
Model	16.6 ± 1.7**	3.7 ± 0.2**
EFCL 1.5	10.1 ± 1.2##	2.4 ± 0.2##
3.0	8.3 ± 1.0##	2.2 ± 0.2##

See Tab. 1 for the mice treatment. The integral absorbance (IA) was quantitated by Image-Pro Plus 6.0 analysis. $\bar{x} \pm s$, $n = 10$. ** $P < 0.01$, compared with normal group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with model group.

3 讨论

乙醇进入体内后 90% 以上是在肝代谢,急性乙醇中毒时,乙醇直接刺激、损伤肝细胞,肝细胞发生变性、坏死,影响肝对蛋白质和脂肪的正常代谢及解毒功能^[7]。本研究结果显示,灌酒 24 h 后,模型对照组小鼠血清 ALT 和 AST 活性显著升高,表明小鼠肝细胞已受损伤;EFCL 1.5 和 3.0 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组小鼠血清 ALT 和 AST 活性明显低于模型对照组,提示 EFCL 可减轻乙醇引起的肝损伤。

大量乙醇摄入可刺激肝细胞产生氧自由基,导致肝脂质过氧化增加,从而对肝等器官造成损伤^[8]。因此,获得有效自由基清除剂及提高体内清除自由基的酶类活性物质是解酒保肝的研究重点。SOD 对机体的氧化和抗氧化平衡起着至关重要的作用,此酶能清除超氧阴离子自由基,保护细胞免受损伤。MDA 是脂质过氧化的终产物,其含量高低可反映氧自由基水平和脂质过氧化强度。GSH 是一种低分子清除剂,对脂自由基及脂质过氧化自由基等具有较强的清除作用。机体氧化反应亢进时, GSH 不断被消耗;而乙醇代谢产物乙醛又通过损害线粒体脂肪酸的 β 氧化,引起脂质过氧化反应,抑制 GSH 的生物合成,使非酶抗氧化物 GSH 含量以及抗氧化物酶 SOD、过氧化氢酶、谷胱甘肽还原酶和 GSH-px 的活性均显著降低,降低机体抗氧化功能^[9]。本研究结果发现,EFCL 1.5 和 3.0 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组均能提高小鼠肝组织中 SOD 活性,降低 MDA 含量,同时减少乙醇所致肝 GSH 耗竭,从而增强机体对自由基的清除作用,减轻乙醇对肝的脂质过氧化损伤,改善肝细胞的脂肪样变,降低脂肪在肝细胞内的沉积,维持机体正常代谢。这与 HE 染色和 D-PAS 染色观察到的结果相符。模型对照组肝细胞出现明显的脂肪样变、水样变、炎症细胞浸润以及较多的库普

弗细胞在坏死带积聚, EFCL 1.5 和 3.0 g·kg⁻¹ 组均未发现有上述现象。

乙醇还可能通过肝损伤产生的炎症因子以及相关的生物活性因子刺激肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC) 活化^[10-11]。HSC 的活化可伴有 NF-κB 等转录因子的激活及 *c-myb* 基因表达的增强, 而 c-MYB 蛋白可结合 α-SMA 基因调控区^[12-13] 表达 α-SMA (α-SMA 是 HSC 活化的主要标志物, 与 HSC 活化的程度及数量呈正相关)。活化的 HSC 和 NF-κB 继而引发一系列级联放大反应, 产生急性期蛋白、酶类、细胞因子、化学因子、黏附因子以及生长因子等, 导致急性肝损伤^[14-16]。本研究结果表明, 乙醇使模型对照组小鼠肝组织 NF-κB 表达升高, 激活炎症反应, 使 HSC 活化, 而活化的 HSC 内 NF-κB 表达也增高, 释放多种炎症细胞因子, 正反馈放大炎症反应; 同时乙醇还通过激活机体内脂质过氧化反应, 引起肝内 GSH 含量和 SOD 活性显著降低, 进一步加重肝细胞内炎症应激反应和组织损伤。EFCL 1.5 和 3.0 g·kg⁻¹ 组小鼠肝组织中的 NF-κB 和 α-SMA 的表达与模型对照组小鼠相比明显下降, 表明 EFCL 保护急性乙醇中毒所致肝损伤的作用机制主要与抑制 NF-κB 活化、降低肝内脂质过氧化反应, 从而减轻乙醇对肝细胞的损伤、避免 HSC 活化有关。

参考文献:

- [1] Zhuang H. Epidemiology of alcoholic liver diseases [J]. *Chin J Hepatol* (中华肝病杂志), 2003, **11**(11): 689-691.
- [2] Pan RL, Zhu ZY. Research progress of the medicinal plants in *Clausena* [J]. *World Notes Plant Med* (国外医药植物药分册), 1990, **5**(6): 243-247.
- [3] Huang XS, Luo LJ. Determination of clausenamide in *Clausena lansium* (Lour.) Skeels fresh pulp and nut [J]. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2006, **27**(6): 172-173, 176.
- [4] Wu YQ, Liu LD, Wei HL, Liu GT. Different effects of nine clausenamide enantiomers on liver glutathione biosynthesis and glutathione S-transferase activity in mice [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, **27**(8): 1024-1028.
- [5] Hu JF, Chu SF, Ning N, Yuan YH, Xue W, Chen NH, et al. Protective effect of (-) clausenamide against Abeta-induced neurotoxicity in differentiated PC12 cells [J]. *Neurosci Lett*, 2010, **483**(1): 78-82.
- [6] Wang RS. Studies on the antiapoptotic effect of (-) clausenamide and its mechanisms of action [(-) 黄皮酰胺的抗细胞凋亡作用及其作用机制研究] [D]. Beijing: Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College, 2000.
- [7] Ishii H, Horie Y, Tomita K, Yamagishi Y. Recent progress in alcoholic liver diseases [J]. *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi*, 2003, **100**(10): 1187-1197.
- [8] Conde de la Rosa L, Moshage H, Nieto N. Hepatocyte oxidant stress and alcoholic liver disease [J]. *Rev Esp Enferm Dig*, 2008, **100**(3): 156-163.
- [9] Zhao Q. Protective effect of bicyclol on acute alcohol-induced liver injury and hepatocyte apoptosis in mice and related mechanisms (双环醇对小鼠急性乙醇性肝损伤和肝细胞凋亡的保护作用及机制研究) [D]. Beijing: Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, 2009.
- [10] Poli G. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress [J]. *Mol Aspects Med*, 2000, **21**(3): 49-98.
- [11] Mormone E, George J, Nieto N. Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches [J]. *Chem Biol Interact*, 2011, **193**(3): 225-231.
- [12] Buck M, Kim DJ, Houghlum K, Hassanein T, Chojkier M. c-Myb modulates transcription of the alpha-smooth muscle actin gene in activated hepatic stellate cells [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000, **278**(2): G321-G328.
- [13] Vasiliou V, Lee J, Pappa A, Petersen DR. Involvement of p65 in the regulation of NF-κB in rat hepatic stellate cells during cirrhosis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **273**(2): 546-550.
- [14] Huang JJ, Li B, Cao LB, Ouyang LQ, Liu SK. The effect and mechanism of alcohol on liver injury in hepatitis B virus transgenic mice [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2010, **26**(3): 372-376.
- [15] Wu GL, Chen J, Yu GY, Li JP, Lu WW. Effect of puerarin on levels of TGF-β₁ and α-SMA in rats with alcoholic injury liver [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2008, **33**(19): 2245-2249.
- [16] Kang XL, Xue YZ, Xu XJ, Liu HL. Blunted the increased hepatic nuclear factor-κB activity can influence hepatic CYP3A metabolism activity [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2010, **26**(9): 1216-1219.

Protective effect of extract from fruit of *Clausena lansium* (Lour.) Skeels against acute alcohol-induced hepatotoxicity in mice

GUAN Tang-ming¹, LIU De-cheng¹, WANG Jun-fei¹, CAI Shan², LIN Mei-jin²,
LU Rui-rong², WU Ke-feng³, MA Xiao-hi⁴, WU Tie¹, LI Wen-de^{1,3}

(1. Department of Pharmacology, 2. Grade 2008, the First Clinical Medical School, 3. Guangdong Key Laboratory for Research and Development of Natural Drugs, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China; 4. Department of Pharmacy, the Affiliated Hospital, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524001, China)

Abstract: **OBJECTIVE** To study the protective effect of the extract from fruit of *Clausena lansium* (Lour.) Skeels (EFCL) against acute alcohol-induced hepatotoxicity in mice. **METHODS** The mouse model was established to use Red Star wine, its ethanol content was 52% by volume. Forty ICR mice were divided into four groups randomly: normal, model, EFCL 1.5 and 3.0 g·kg⁻¹ groups. The mice in EFCL groups were ig given EFCL 1.5 and 3.0 g·kg⁻¹, respectively. Thirty minutes later, wine 12 ml·kg⁻¹ was administered to mice except in normal group. The activity of alanine transaminase (ALT) and aspartate aminotransaminase (AST) was detected in serum and the level of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) was tested in the liver tissue with kits 24 h after wine administration. The pathological changes were observed after HE and amylose-periodic acid Schiff (D-PAS) staining, and the NF-κB and α-smooth muscle actin (α-SMA) expression was detected by using immunohistochemical method. **RESULTS** Compared with normal group, the activities of ALT and AST were increased by 28.0% and 28.9% ($P < 0.01$) in model group; while SOD and GSH level decreased from 706 ± 46 to (515 ± 68) kU·g⁻¹ protein, and (251 ± 61) to (126 ± 18) mg·g⁻¹ protein; MDA content increased from (204 ± 21) to (258 ± 50) μmol·g⁻¹ protein ($P < 0.01$); and the expression of NF-κB and α-SMA significantly increased ($P < 0.01$). Compared with model group, the activity of ALT decreased by 18.3% and 19.8%, and the activity of AST decreased by 6.4% and 9.7% in EFCL 1.5 and 3.0 g·kg⁻¹ groups ($P < 0.01$, $P < 0.05$), respectively; while the levels of SOD and GSH in EFCL 3.0 g·kg⁻¹ group averagely increased by 61.4% and 14.8% ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Furthermore, the severe hepatic lesions as well as neutrophilic infiltration and ballooning degenerations of hepatocytes induced by ethanol were considerably reduced in EFCL 1.5 and 3.0 g·kg⁻¹ groups, and the expression of NF-κB and α-SMA was significantly downregulated ($P < 0.01$). **CONCLUSION** EFCL has protective effect against acute alcohol-induced liver damage, which may be related with its downregulating the expression of NF-κB and inhibiting the proliferation of hepatic satellite cells.

Key words: *Clausena lansium* (Lour.) Skeels; ethanol; liver injury; antioxidation; NF-κB; α-smooth muscle actin

Foundation item: The project supported by Science and Technology Project of Guangdong Province (2010A040200005); Technology Project of Guangdong Province (2012B040304013); and College Student's Innovation Project of Guangdong Medical College (09ZZF010)

Corresponding author: LI Wen-de, E-mail: gdmcli@yahoo.com.cn, Tel: (0769) 2388405

(收稿日期: 2012-03-25 接受日期: 2012-09-19)

(本文编辑: 齐春会)