

这与临床皮肤病变改变了屏障完整性和药物通透性的情况不同,因此在重复给药毒性试验中我们增设了破损皮肤动物模型,模拟临床皮肤病变时药物通透性增加的情况,以便能达到更高的暴露,从而能更好地评价药物经皮吸收后产生的系统毒性。

单次给药毒性试验中 2g 生药/mL 的肤康灵喷雾剂 24h 内多次皮肤给药,对家兔完整皮肤仅具有轻度的刺激性,未发现明显的全身毒性反应,同时结果也表明辅料溶液对家兔完整皮肤无明显刺激性。因此,重复给药毒性试验未再设置阴性对照组,仅设辅料对照组。肤康灵喷雾剂以 1、2g 生药/mL 连续给家兔完整及破损皮肤给药 1 个月,结果发现,除了给药部位有皮屑出现外,各组动物均未发现其他与药物有关的毒副作用。

经皮肤过敏试验、皮肤毒性试验证实,肤康灵喷雾剂无皮肤过敏性、刺激性、毒性小,因此,我们认为肤康灵喷雾剂皮肤外用治疗皮炎、皮癣、皮疹、皮肤瘙痒等皮肤疾病是较安全的,建议临床使用浓度不宜超过 2g 生药/mL,并注意观察给药部位皮肤的反应情况。

参考文献

- (1) 国家食品药品监督管理局. 中药、天然药物免疫毒性(过敏性、光过敏反应)研究的技术指导原则(EB/OL). (2007-08-23) [2018-12-29]. <http://www.cde.org.cn/zdzy.do?method=largePage&id=2094>
- (2) 国家食品药品监督管理局. 中药、天然药物急性毒性研究技术指导原则(EB/OL). (2007-08-23) [2018-12-29]. <http://www.cde.org.cn/zdzy.do?method=largePage&id=2086>
- (3) 国家食品药品监督管理局. 中药、天然药物长期毒性研究技术指导原则(EB/OL). (2007-08-13) [2018-12-29]. <http://www.cde.org.cn/zdzy.do?method=largePage&id=1498>
- (4) 赖茂盛, 邵丽宜, 何康, 等. 癣湿药水皮肤用药长期毒性试验(J). 时珍国医国药 2000, 11(2): 100-101.
- (5) 袁伯俊, 廖明阳, 李波. 药物毒理学实验方法与技术(M). 北京: 化学工业出版社, 2007: 235.
- (6) 李波, 袁伯俊, 廖明阳. 药物毒理学(M). 北京: 人民卫生出版社, 2015: 534-535.
- (7) 杨睿. 家兔单侧睾丸升降固定的生精障碍模型建立前后睾丸病理改变和精液变化的研究(D). 昆明: 昆明医科大学, 2012.
- (8) 郑家润. 皮肤局部用药的安全性评价(J). 中国新药杂志, 2005, 14(3): 257-259.

## 黑蒜通过抗氧化对小鼠急性酒精性肝损伤发挥保护作用

张远<sup>1</sup>, 许彬欣<sup>1</sup>, 孙伟<sup>1</sup>, 钟烨文<sup>1</sup>, 袁玲玲<sup>1</sup>, 赵桂溢<sup>1</sup>, 杨再吴<sup>1</sup>, 郑焯新<sup>1</sup>, 张家强<sup>1</sup>, 伍宇平<sup>1</sup>, 杨惠玲<sup>1, 2\*</sup> (1. 中山大学 中山医学院基础医学实验教学中心, 广东广州 510030; 2. 中山大学 中山医学院病理生理教研室, 广东广州 510030)

**摘要:** 目的 初探黑蒜对急性酒精性肝损伤的保护作用及其机制。方法 小鼠分 5 组, 用高和低浓度黑蒜溶液、生理盐水(阴性对照)、水飞蓟素片溶液(阳性对照)分别灌胃一周, 采用 50% 酒精灌胃的方法构建小鼠的急性酒精性肝损伤模型, 另有一组小鼠以生理盐水灌胃一周后不建立模型, 为空白对照。各组小鼠取血清测定 ALT、SOD 活性及取肝切片观察组织学改变, 将实验组与各对照组小鼠对比, 以初探黑蒜对急性酒精性肝损伤的保护作用及其机制。结果 阴性对照与空白对照相比, 小鼠血清 ALT 水平显著升高( $P \leq 0.01$ ), 肝切片见明显组织损伤, SOD 活性明显降低( $P \leq 0.05$ )。高剂量黑蒜实验组的血清 ALT 较阴性组有显著降低( $P \leq 0.01$ ), 肝切片可见组织损伤程度显著降低, SOD 活性明显升高( $P \leq 0.05$ )。结论 50% 酒精灌胃可建立小鼠急性酒精性肝损伤模型, 高浓度黑蒜通过抗氧化对小鼠急性酒精性肝损伤发挥保护作用。

**关键词:** 黑蒜; 小鼠急性肝损伤; 保护; 抗氧化

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 1006-3765(2019)-10-03094-0024-04

## Protective Effect of Black Garlic on Alcoholic Hepatic Injury through Antioxidation in Mice

ZHANG Yuan<sup>1</sup>, XU Bin-xin<sup>1</sup>, SUN Wei<sup>1</sup>, ZHONG Ye-wen<sup>1</sup>, YUAN Ling-ling<sup>1</sup>, ZHAO Gui-yi<sup>1</sup>, YANG Zai-wu<sup>1</sup>, ZHENG Ye-xin<sup>1</sup>, ZHANG Jia-qiang<sup>1</sup>, WU Yu-ping<sup>1</sup>, YANG Hui-ling<sup>1, 2\*</sup> (1. Experimental center for basic medical teaching, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510030, China; 2. Department of pathophysiology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510030, China)

作者简介: 张远, 女(1998-), 中山大学光华口腔医学院 2016 级本科生。口腔医学(5+3)专业。

通讯作者: 杨惠玲。职称: 教授。

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To explore whether black garlic has preventive and protective effect against acute alcoholic hepatic injury and its mechanism our group conducted an experiment in vivo. **METHODS** Mice were divided into 5 groups ( blank control group ,negative control group ,positive control group ,black garlic at low and high concentration groups) and gavaged for 7 days. 50% ethyl alcohol was chosen to set up model of acute hepatic injury. Content of ALT and T-SOD in blood of mice along with histological sections in each group were measured and analysed. **RESULTS** Compared with blank control group without alcohol ,negative control group showed significant rise in ALT(  $P \leq 0.01$  ) and sharp drop in SOD(  $P \leq 0.05$  ). Compared with negative control group ,which gavaged with normal saline ,black garlic at high concentration could reduce the ALT significantly(  $P \leq 0.01$  ). Histological sections showed the same result. **CONCLUSION** 50% ethyl alcohol can set up the model of acute hepatic injury in mice; black garlic at high concentration has protective effect against acute alcoholic hepatic injury through antioxidation.

**KEY WORDS:** Black garlic; Alcoholic hepatic injury; Protect; Antioxidation

酒为现代社交生活中一大媒介,但过量饮酒可导致肝炎甚至肝硬化、肝癌,酒精性肝损伤危害人们的生命健康<sup>[1]</sup>。黑蒜是新鲜大蒜经加工形成的新型制品,具有非常强的抗氧化活性,有文献探究黑蒜对肝细胞膜的保护作用显示黑蒜可以抑制过氧化酶从而减轻肝细胞膜结构的损伤<sup>[2]</sup>。同时,有研究发现黑蒜能显著降低肝脏组织中丙二醛的含量并提高SOD和GSH-Px的活性并提升肝脏的解毒功能<sup>[3]</sup>。此外,黑蒜中还有较多氨基酸,如丙氨酸、天冬酰胺等能增强肝脏功能,起到保肝护肝的作用<sup>[4]</sup>。水飞蓟素是从植物乳蓟中提取的一种抗氧化剂<sup>[5]</sup>,现在临床上用于治疗中毒性肝脏损害和辅助治疗肝硬化等<sup>[6]</sup>。但现有文献未将黑蒜对肝脏的保护作用和及其机制进行系统性探究,亦未引入组织学切片作为指标。

因此我们通过构建小鼠急性酒精性肝损伤模型,以小鼠血清ALT活性、肝切片的镜下组织变化为指标,系统地探究黑蒜对急性酒精性肝损伤是否具有保护作用;以血清SOD活性为指标探究抗氧化作用在黑蒜对急性酒精性肝损伤的保护中起的作用,阐明黑蒜对急性酒精性肝损伤的保护机制。

## 1 材料与方法

**1.1 试剂** 森弗 SCIPHAR 黑蒜粉,50%酒精,蒸馏水,0.9%生理盐水,Legation 水飞蓟素片(70mg/片),丙氨酸氨基转移酶(谷丙转氨酶/ALT/GPT)测试盒,总超氧化物歧化酶(T-SOD)测试盒(测试盒均购自南京建成公司)。

**1.2 仪器** 紫外分光光度计(上海元析UV-5200 PC型),台式离心机(上海安亭TDL-4),恒温水箱(金坛市富华仪器有限公司),移液枪(200 $\mu$ L、1000 $\mu$ L),灌胃针(自制),注射器(5mL、10mL),烧杯,试管。

**1.3 动物与分组** 昆明种小白鼠60只,SPF级,体重15~25g,雌雄各半,由中山大学动物实验中心提供。生产许可证号:SCXK(粤)2016-0029,实验单位使用许可证号:SYXK(粤)2015-0107。动物室温度:22 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C,相对湿度:55%~70%。实验小鼠适应性喂养3天。

小鼠分5组,每组12只。对照组:①空白对照组;②阴性对照组(生理盐水组);③阳性对照组(水飞蓟素60mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup>)。实验组:④黑蒜低剂量组(黑蒜溶液120mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup>);

⑤黑蒜高剂量组(黑蒜溶液1200mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup>)。

**1.4 急性酒精性肝损伤模型建立** 采用50%乙醇按6g $\cdot$ kg<sup>-1</sup>一次性灌胃方法建立小鼠急性酒精性肝损伤模型<sup>[7]</sup>。

**1.5 给药方案** 本实验采取首剂加倍的方案进行给药,每天给药1次,连续给药7天。给药方法均为灌胃。

**1.6 实验指标检测** 生化指标:血清ALT和T-SOD活性。各组于酒精灌胃第1.5h后眼眶取血0.2mL,离心后测定血清T-SOD的浓度;第6h后眼眶取血0.2mL,离心后测定血清中ALT的浓度;各组分别制备肝切片并观察。分组记录。(注:每次取血液0.2mL,静置10min,3000r $\cdot$ min<sup>-1</sup>离心15min,分离血清。)

组织形态学观察:切下肝脏组织标本经福尔马林固定24h以上,石蜡包埋,切片厚度4 $\mu$ m。随后,切片用苏木素伊红染色。光镜下进行组织病理学分析,评价肝脏炎症和组织损伤程度,考察肝窦充血、肝脏细胞胞浆空泡化和实质坏死的程度。

**1.7 统计学处理** 本实验结果中所有数据均以平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,应用SPSS 25.0统计软件进行统计学处理,通过单因素ANOVA检验分析统计学差异, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义, $P < 0.01$ 认为差异具有显著统计学意义。

## 2 结果

**2.1 50%酒精灌胃可复制小鼠急性酒精性肝损伤模型** 对比50%酒精灌胃对空白组小鼠和阴性对照组小鼠的血清ALT和SOD活性的影响,阴性对照组血清ALT水平较空白组有显著上升( $P < 0.01$ )(见表1)。对比正常组和阴性对照组肝切片结果,阴性对照组小鼠肝病理改变明显,肝细胞明显肿胀,界限不清,内有大小不一、数量不等的脂滴,肝窦狭窄,可见较多炎症细胞浸润,肝小叶结构轻微紊乱,肝细胞索排列不规则(见图1-B);而正常组小鼠肝叶结构清晰,肝细胞索以中央静脉为中心放射状排列,肝小叶内网状纤维支架结构完整,分布规则,汇管区及其周围无炎症细胞浸润,肝细胞无明显脂肪变性、水肿和坏死等,排列整齐(见图1-A)。同时,阴性组血清SOD水平较空白组有明显下降( $P < 0.05$ )。由此可见,50%酒精灌胃可复制小鼠急性酒精性肝损伤模型。

表1 急性酒精灌胃后小鼠血清的ALT和SOD水平 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	ALT 活性 ( $U \cdot L^{-1}$ )	SOD 添生 ( $U \cdot mL^{-1}$ )
正常组	1.28 ± 0.45	148.96 ± 2.90
阴性对照组	40.24 ± 8.39**	100.24 ± 24.74*

注:与正常组相比,\* $P < 0.05$ ;与正常组相比,\*\* $P < 0.01$

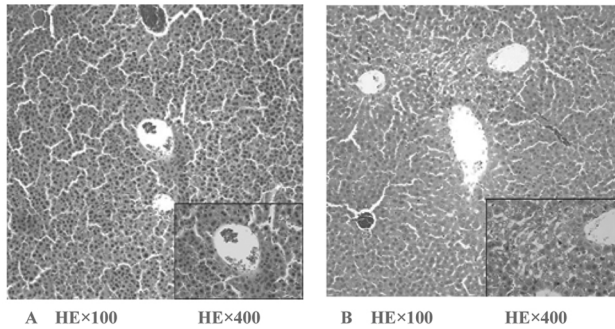


图1 正常组(A)和阴性对照组(B)肝脏形态学变化

2.2 低剂量黑蒜用药对50%酒精灌胃小鼠肝保护效果不明显,高剂量用药效果明显。

2.2.1 低剂量黑蒜用药对小鼠血清ALT水平、肝组织学和SOD水平的影响与阴性对照组相比没有统计学差异(见表2);肝切片上,小鼠肝细胞肿胀程度较阴性对照组有所减轻,肝小叶、肝窦等结构有所改善,但能看见部分肝细胞内大量小脂滴,炎症细胞浸润减轻(见图2-A)。

高剂量组血清ALT水平较阴性对照组显著降低( $P < 0.01$ )较阳性对照组略低,但差异没有统计学意义(见表2);从肝切片上看,高剂量组小鼠肝脂肪变性几乎不可见或仅局限于汇管区周边个别细胞,细胞肿胀不明显,肝脏内排列较为整齐,组织结构趋于正常(见图2-B)。阳性对照组小鼠无典型肝脂肪变性,仅在中央静脉周围可见少量细胞内含细小脂滴,肝窦内少量炎症细胞浸润,肝小叶结构完整(见图2-C)。

2.2.2 低剂量组血清SOD活性与阴性对照组相比没有统计学差异。高剂量组血清SOD活性较阴性对照组明显升高( $P < 0.05$ )较阳性对照组略高,但差异没有统计学意义(见表2)。

表2 各实验组小鼠血清的ALT和SOD水平 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	ALT 活性 ( $U \cdot L^{-1}$ )	SOD 添生 ( $U \cdot mL^{-1}$ )
对照组	阴性对照组	40.24 ± 8.39
	阳性对照组	14.23 ± 3.14**
实验组	黑蒜氏低浓度组	35.02 ± 9.63
	黑蒜氏高浓度组	10.03 ± 4.44**

注:与阴性对照组相比,\* $P < 0.05$ ;与阴性对照组相比,\*\* $P < 0.01$

### 3 讨论

3.1 成功构建小鼠急性酒精性肝损伤模型 本实验采用50%乙醇 $6g \cdot kg^{-1}$ 一次性灌胃方法建立小鼠急性酒精性肝损伤模型。与空白对照组相比,阴性组小鼠血清中ALT水平显著升高,肝脏组织病理学镜下可见细胞病理改变明显,且SOD水平明显下降。在生化及病理指标上印证模型建立成功。

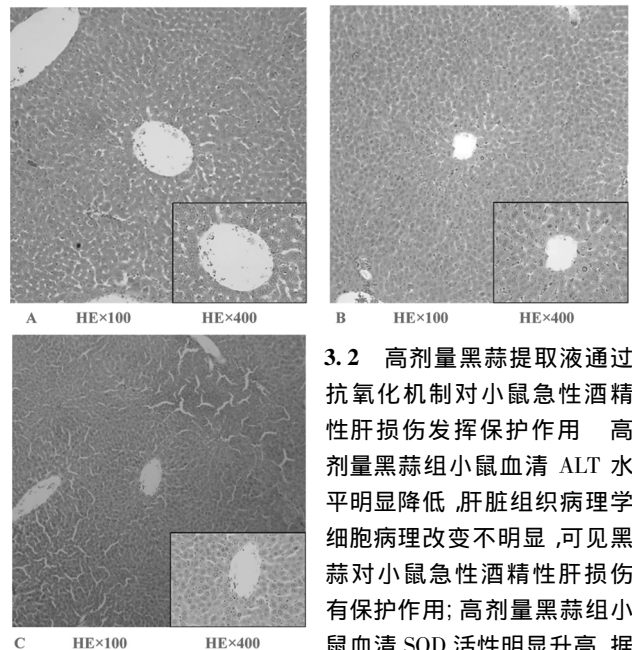


图2 低剂量(A)、高剂量(B)黑蒜实验组以及阳性对照组(C)肝脏形态学变化

3.2 高剂量黑蒜提取液通过抗氧化机制对小鼠急性酒精性肝损伤发挥保护作用 高剂量黑蒜组小鼠血清ALT水平明显降低,肝脏组织病理学细胞病理改变不明显,可见黑蒜对小鼠急性酒精性肝损伤有保护作用;高剂量黑蒜组小鼠血清SOD活性明显升高,据此可推测黑蒜通过抗氧化作用对急性酒精性肝损伤起保护作用。

肝脏急性酒精性肝损伤

受多因素的影响,与氧化应激炎症反应以及线粒体功能障碍关系密切。乙醇在肝脏代谢时产生大量自由基,自由基过量则可引起肝细胞膜脂质生成过氧化产物及终产物丙二醛(MDA),自由基和MDA造成SOD的耗竭,同时破坏肝细胞膜和细胞器结构,使肝细胞内大量的ALT释放入血。王崇屹<sup>[2]</sup>等人对黑蒜保护膜结构作用的研究发现黑蒜可有效提高SOD活力并抑制MDA对膜结构的损伤,从而保护细胞。祝炳俏等<sup>[8]</sup>对黑蒜抗氧化活性的研究发现黑蒜中含有大量抗氧化物质,如多酚类物质含量是鲜蒜的5倍,并以SOD与GSH-Px为指标,发现和鲜蒜相比,黑蒜能使两者活性明显增高,并提高肝脏中丙二醛的含量,解释了黑蒜抗氧化的机制。本实验对通过血清ALT为指标反映肝脏细胞损伤程度,发现高剂量黑蒜实验组血清SOD活性较对照组有显著提升,并在肝组织切片中发现黑蒜可有效地保护肝组织结构,系统地探究了黑蒜对急性酒精性肝损伤的保护作用及机制,说明黑蒜可通过抗氧化作用保护肝细胞的结构和功能。此外,有研究发现黑蒜中含有较多氨基酸如丙氨酸、天冬酰胺等,亦能增强肝脏作用,其具体机制及保护效果有待进一步探讨。

3.3 黑蒜有广泛的应用前景 在实验中发现高剂量黑蒜对急性酒精性肝损伤有一定的保护作用,而相比于作为处方药各类护肝药,作为保健品的黑蒜更加容易获取,价格也更加低廉。其次,在为期超过一周的实验中已经显示了明显对抗急性酒精性肝损伤的作用,可见黑蒜作为长期使用的护肝保健品前景良好。此外,对于黑蒜中抗氧化活性最高的物质亟待继续探究,可以与现有护肝药配伍使用或作为辅助用药等。

综上,黑蒜可提高肝脏SOD活性,通过其抗氧化作用保

护肝细胞及细胞器,有效地缓解小鼠急性酒精性肝损伤,为黑蒜在保健品中的应用提供一定的参考意见。

参考文献

- (1) 赵珊珊,李娜. 解酒饮品的进展(J). 新工艺,新设备,新技术, 2013 (1): 91-92.
- (2) 王崇屹,姜红,王义善. 黑蒜提取液对大鼠缺血再灌注的保护作用及机制研究(J). 中华中医药杂志 2016 31(8): 3305-3307.
- (3) 安东,李新胜,马超,等. 黑蒜成分及功能的研究进展(J). 中国果蔬 2014 (10): 51-54.
- (4) Vargas-Mendoza N, Madrigal-Santillan E, Mo-Rales-Gonzalez A, et

- al. Hepatoprotective effect of silymarin (J). World J Hepatol 2014 6 (3): 144-149.
- (5) 李青权,周强,牛俊奇,等. 水飞蓟素药理机制新进展和临床价值再讨论(J). 临床肝胆病杂志 2015 (2): 315-316.
- (6) 祝炳俏,吴海歌,刘媛媛,等. 黑蒜抗氧化活性研究(J). 视频研究与开发 2005 (10): 58-60.
- (7) 张鑫,陈浏丹,侯颖,等. 黑大蒜和鲜大蒜提取物对小鼠细胞免疫功能影响的比较(J). 中国医药导报 2012 (14): 31-34.
- (8) 苗明三,康乐,方晓艳,等. 酒精性肝损伤动物模型制备规范(草案) (J). 中华中医药杂志 2018 33(03): 1000-1003.

## 獭兔在药品热原检查实验中的应用研究

翁顺太<sup>1</sup>,李鸣<sup>2\*</sup>,傅鸿鸿<sup>2</sup>,林惺栋<sup>2</sup>,郑立锋<sup>1</sup>,郑忠东<sup>1</sup>(1. 福建省人兽共患病研究重点实验室(福建省疾病预防控制中心) 福建福州 350001; 2. 福建省食品药品质量检验研究院 福建福州 350001)

**摘要:**目的 研究獭兔在药品质量检验热原检查项目中的应用前景。方法 按中国药典(2015年版)分别用普通级獭兔和新西兰兔进行市售药品甘油果糖注射液等4种供试品进行热原检查以及细菌内毒素国家标准品(灵敏度测试)的热原实验,观察比较实验兔的体温变化。结果 市售4种注射液分别用獭兔和New Zealand兔进行热原检查结果均符合规定,细菌内毒素国家标准品按 $5\text{EU}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $10\text{EU}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量静脉注射给药,獭兔、New Zealand兔均有升温超过 $0.6^{\circ}\text{C}$ ,且无明显差别。结论 獭兔可应用于药品检验中的热原检查实验。

**关键词:** 獭兔; 新西兰兔; 热原实验; 细菌内毒素国家标准品

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 1006-3765(2019)-10-02031-0027-04

## Application of Rex Rabbit in Pyrogen Test

WENG Shun-tai<sup>1</sup>, LI Ming<sup>2\*</sup>, FU Hong-hong<sup>2</sup>, LIN Xing-dong<sup>2</sup>, ZHENG Li-feng<sup>1</sup>, ZHENG Zhong-dong<sup>1</sup> (1. Fujian Key Laboratory of Zoonosis Research (Fujian Center for Disease Control and Prevention), Fuzhou 350001, China; 2. Fujian Institute For Food and Drug Quality Control, Fuzhou 350001, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To study the application prospects of Rex Rabbit in pyrogen test items of drug quality inspection. **METHODS** According to the Chinese Pharmacopoeia (2015 edition), the pyrogen test of four kinds of commercial drugs such as glycerol and fructose injection, and the pyrogen test of the national standard of bacterial endotoxin (sensitivity test) were carried out with conventional Rex Rabbits and New Zealand rabbits respectively. The temperature changes of experimental rabbits were observed and compared. **RESULTS** The pyrogen test results of four kinds of injections sold in the market were all in accordance with the regulations. The national standard of bacterial endotoxin was given intravenously at doses of  $5\text{EU}\cdot\text{kg}^{-1}$  and  $10\text{EU}\cdot\text{kg}^{-1}$ . The temperature of Rex rabbit and New Zealand rabbit was over  $0.6^{\circ}\text{C}$ , and there was no significant difference. **CONCLUSION** Rex Rabbit can be used in pyrogen test in drug testing.

**KEY WORDS:** Rex rabbit; New Zealand rabbit; Pyrogen test; National standard for bacterial endotoxin

作者简介: 翁顺太,男(1966.10- )。学历:本科。职称:主任技师。实验动物科研与管理。

通讯作者: 李鸣,男(1961.06- )。学历:本科。职称:主任药师。药品检验。

### 1 材料与方法

**1.1 实验器材** BGG-9245A 电热鼓风干燥箱,上海一恒科学仪器有限公司; ZRY-2D 智能热原仪,天津大学无线电厂。

### 1.2 实验动物