

苹果渣总三萜对小鼠 CCl₄ 急性肝损伤的保护作用

张爽¹, 任亚梅¹, 刘春利¹, 马婷¹, 陈相杰¹, 任小林²

(1. 西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西杨凌 712100)

(2. 西北农林科技大学园艺学院, 陕西杨凌 712100)

摘要: 本文研究了富士苹果渣中总三萜体外抗氧化活性及其体内对小鼠 CCl₄ 急性肝损伤的保护作用。采用超声波辅助提取、大孔树脂纯化得到苹果渣总三萜, 以抗坏血酸 (Vc) 为对照, 测定苹果渣总三萜清除 DPPH、ABTS⁺、OH 的能力, 评价其体外抗氧化活性; 建立 CCl₄ 急性肝损伤模型, 生化法测定小鼠血清中 ALT、AST 的活性, 肝组织匀浆中 SOD、GSH-Px 的活性及 MDA、IL-6 的含量。结果表明: 苹果渣总三萜具有一定的体外抗氧化能力, 但不及 Vc。在体内实验中与模型组相比, 血清中 ALT、AST 活性显著下降, 最高达 48% 以上; 肝组织中 SOD、GSH-Px 活性显著升高, 最高达 69%; MDA、IL-6 含量显著降低, 最高达 43%。苹果渣总三萜对 CCl₄ 急性肝损伤有明显保护作用, 其机制可能与清除体内自由基, 调节血清酶、抗氧化物酶的活力和含量有关。

关键词: 苹果渣总三萜; 自由基; 抗氧化活性; 四氯化碳; 肝损伤

文章编号: 1673-9078(2015)9-45-50

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.9.008

Protective Effect of Total Triterpenoids in Apple Pomace on CCl₄-induced Liver Injury in Mice

ZHANG Shuang¹, REN Ya-mei¹, LIU Chun-li¹, MA Ting¹, CHEN Xiang-jie¹, REN Xiao-lin²

(1. College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

(2. College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: The *in vitro* antioxidant activity and *in vivo* protective effect of total triterpenoids in Fuji apple pomace (TTAP) on CCl₄-induced acute liver injury in mice were investigated. TTAP was isolated and purified by ultrasonic-assisted extraction and macroporous resin column chromatography, respectively. Using ascorbic acid (Vc) as control, the 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH); 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS⁺), and hydroxyl (·OH) scavenging abilities of TTAP were measured to evaluate its antioxidant activity. A CCl₄-induced acute liver injury mouse model was established. Subsequently, aspartate transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST) activities in serum as well as superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) activity, malondialdehyde (MDA) content and interleukin-6 (IL-6) content in mouse liver homogenates were measured by biochemical assays. TTAP showed lesser extent of *in vitro* antioxidant ability compared with Vc. The *in vivo* study showed that ALT and AST activities in serum declined significantly and the largest decline was more than 48% when compared with the model group. Additionally, SOD and GSH-Px activities in liver homogenates significantly increased, with the highest increase of 69%. MDA and IL-6 contents declined significantly, with the largest decline of 43%. TTAP thus exhibited significant protective effect on CCl₄-induced liver injury mouse model and the underlying mechanism may be related to *in vivo* free-radical scavenging and regulation of serum enzymes, as well as activity and content of antioxidant enzymes.

Key words: total triterpenoids in apple pomace; free radicals; antioxidant activity; carbon tetrachloride; liver injury

四氯化碳 (CCl₄) 是一种对肝细胞有严重毒性的化学物质, 普遍认为 CCl₄ 在肝脏内经细胞色素 P₄₅₀ 代谢产生的毒性代谢产物, 能够造成肝组织脂质过氧

收稿日期: 2014-11-27

基金项目: 农业部现代技术体系苹果专项资助项目 (MATS) (Z225020701);

陕西省农业科技创新与攻关项目 (2015NY004)

作者简介: 张爽 (1989-), 女, 硕士, 研究方向: 天然产物提取

通讯作者: 任亚梅 (1970-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 果品蔬菜贮藏及加工

化增加及肝细胞破裂, 是导致肝损伤的重要原因^[1]。CCl₄ 所致急性肝损伤在形态学、病理生理学的某些方面与人的肝病较为相似, 且 CCl₄ 致急性肝损伤的机制与自由基的传导密切相关。因此, CCl₄ 已被广泛用于研究外源性中毒性肝损伤动物模型, 从而为肝脏疾病的治疗及保健品、药品的开发提供良好的基础。

我国是苹果加工大国, 一般每加工 1000 t 苹果, 可排出约 300 t 鲜果渣, 烘干后得 75 t 左右的干果渣。苹果渣主要由果皮和果肉、果籽、果梗组成, 但是目

前除少量用于饲料及深加工外,绝大部分被遗弃,而苹果渣中含有的多种三萜类化合物具有保肝、抗肿瘤、抗菌消炎、抗病毒、提高机体免疫力、降血糖和降血脂等功效^[2],具有发展成为保健食品、医药和化妆品原料的潜力。目前关于苹果渣三萜类物质的研究主要包括不同品种苹果果皮三萜类化合物的组成和鉴定,以及抗肿瘤、抗炎活性等^[3,4]。由于苹果中的三萜类成分具有一定的体外抗氧化能力,其中的齐墩果酸、熊果酸等化合物已被证明具有明显的保肝作用^[5],而目前关于苹果渣三萜类物质对于肝损伤保护作用的研究尚未见报道,因此开展苹果渣三萜类物质的提取、纯化,抗氧化活性及保肝功效研究,为苹果渣三萜类物质作为一种新的自由基清除剂原料或进一步开发利用成为保健品提供一定的理论和实践依据。

本文以干燥后的富士苹果渣为原料,经提取、除杂、大孔树脂纯化得到苹果渣总三萜(APTT),选取三种常用自由基(DPPH、ABTS⁺、OH),以常用的抗氧化剂抗坏血酸(Vc)为对照,对苹果渣总三萜体外抗氧化能力进行测定;同时建立CCl₄急性肝损伤模型,通过计算肝脏指数,测定小鼠血清中ALT、AST的活性,肝匀浆中SOD、GSH-Px活性及MDA、IL-6含量,探讨APTT对小鼠CCl₄性肝损伤的保护作用及其可能的机制,为苹果渣总三萜的进一步研究和开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

干燥后的富士苹果果渣,含水量为(8.99±0.04)%,2013年11月20日购自咸阳市永寿县阿果安娜果汁有限公司,运回实验室,密封包装后,贮藏于(0±0.5)℃的冷库中。

熊果酸(HPLC>98%),上海金穗生物科技有限公司;DPPH,梯希爱(上海)化成工业发展有限公司;ABTS,上海浩然生物技术有限公司;抗坏血酸,上海谱振生物科技有限公司;四氯化碳(CCl₄),天津博迪化工股份有限公司;水飞蓟素胶囊,德国马博士大药厂;BCA蛋白定量试剂盒,北京康为世纪生物科技有限公司;丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒,南京建成生物工程研究所;小鼠白介素6(IL-6)ELISA试剂盒,上海鑫乐生物科技有限公司。

1.2 实验动物

SPF级雄性BALB/c小鼠,体重(20±2)g,由第四军医大学实验动物研究中心提供,许可证号SCXK(军)2012-0007。饲养条件:温度(22±2)℃,相对湿度(55±5)%,控制照明时间为每天12h,给予标准普通饲料和充足的饮用水,自由进食与饮水,适应性饲养7d。

1.3 主要仪器设备

KQ2200DB数控超声波清洗机,昆山市超声仪器有限公司;UV-2550双光束紫外分光光度计,日本岛津仪器有限公司;HW.SY21-KP4恒温水浴锅,北京长风仪器仪表公司;FW80高速万能粉碎机,天津市泰斯特仪器有限公司;Infinite M200 Pro多功能酶标仪,瑞士TECAN公司。

1.4 试验方法

1.4.1 富士苹果渣总三萜的制备及其质量分数的测定

参考何祥久^[6]专利中的部分方法,将干燥的苹果渣粉碎,取100~120目果渣粉,按照料液比1:12加入无水乙醇,超声波提取温度40℃,提取3次,每次20min,合并滤液,蒸干溶剂后得棕黄色浸膏,用石油醚超声除杂蒸干后,将上述粗提物用D101大孔树脂纯化,上样流速1BV/h,上样量5BV。然后分别用水及40%乙醇溶液对吸附饱和的树脂进行除杂和过渡,用90%乙醇洗脱,洗脱流速1BV/h,洗脱量5BV,洗脱液蒸干后得白色APTT。

APTT中总三萜质量分数的测定方法参照HE^[7]的方法进行测定。

1.4.2 富士苹果渣总三萜体外抗氧化活性的测定

1.4.2.1 清除DPPH的能力

取质量浓度为0.25、0.50、0.75、1.00、1.25、1.50、1.75、2.00mg/mL的APTT样品溶液2.0mL与0.1mmol/L DPPH溶液2.0mL混合均匀后,室温下避光静置30min,于517nm下测定吸光度(A_Y)。以DPPH溶液与95%乙醇的混合液为空白(A_D),按下式计算样品对DPPH的清除率及IC₅₀值。另以1、2、3、4、5、6μg/mL的Vc标准溶液对DPPH的清除能力为对照,计算Vc的IC₅₀值。

$$\text{清除率}/\% = (A_D - A_Y) / A_D \times 100$$

1.4.2.2 清除ABTS⁺的能力

取1.4.2.1的APTT样品溶液1.0mL,加入ABTS溶液2.0mL,混匀,室温下避光静置5min,734nm下测定吸光度(A_Y),以ABTS溶液与95%乙醇的混

合液为空白(A_D),计算样品对 $ABTS^+$ 的清除率及 IC_{50} 值, $ABTS^+$ 的清除率计算公式同上式, 另以 2、4、6、8、10、12 $\mu\text{g/mL}$ 的 Vc 标准溶液对 $ABTS^+$ 的清除能力为对照, 计算 Vc 的 IC_{50} 值。

1.4.2.3 清除 OH 的能力

取 1.4.2.1 的 APTT 样品溶液 1.0 mL, 依次加入 1.0 mL 6 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1.0 mL 6 mM 水杨酸及 1.0 mL 6 mM H_2O_2 , 混合均匀, 37 $^\circ\text{C}$ 下避光加热 30 min, 4000 r/min 下离心 5 min, 取上清液于 510 nm 下测定吸光度 (A_Y)。以 95% 乙醇溶液代替样品溶液为空白 (A_D), 以等体积蒸馏水代替 H_2O_2 为样品本底吸光度 (A_B), 按下式计算样品对 OH 的清除率及 IC_{50} 值。另以 0.40、0.45、0.50、0.55、0.60、0.65 $\mu\text{g/mL}$ 的 Vc 标准溶液对 OH 的清除能力为对照, 计算 Vc 的 IC_{50} 值。

$$\text{清除率}/\% = \frac{A_D - A_Y + A_B}{A_D} \times 100$$

1.4.3 富士苹果渣总三萜对小鼠 CCl_4 急性肝损伤保护作用测定

1.4.3.1 小鼠 CCl_4 急性肝损伤模型的建立^[8]

小鼠随机分成正常组, 模型组, APTT 低 (15 mg/kg)、中 (30 mg/kg)、高 (60 mg/kg) 剂量组及水飞蓟素 (30 mg/kg) 组, 每组 10 只。正常对照组和模型组小鼠每天灌胃生理盐水配制的 5% 吐温 80 (0.1 mL/20 g bw), 其余各组灌胃相应剂量上述溶剂溶解的样品及水飞蓟素, 各组每天均灌胃一次, 连续 5 d。末次给药 1 h 后, 除正常对照组腹腔注射等量橄榄油 (0.1 mL/10 g bw) 外, 其余各组均腹腔注射含 CCl_4 0.11% 的橄榄油, 腹腔注射后禁食不禁水。24 h 后对各组小鼠称重, 摘眼球取血, 收集血液, 放置 30 min 后, 3600 r/min 离心 10 min, 分离血清于 1.5 mL 离心管中, 4 $^\circ\text{C}$ 保存。小鼠颈椎脱臼处死后解剖取肝脏, 用 4 $^\circ\text{C}$ 预冷的生理盐水冲净表面浮血, 滤纸拭干, 称重, 将肝脏保存于 -80 $^\circ\text{C}$ 。

1.4.3.2 小鼠肝脏指数的计算

肝脏指数 (g/kg) = 小鼠肝脏重量 (g) / 小鼠体重 (g) $\times 1000$

1.4.3.3 小鼠血清转氨酶的检测

取血清上清液, 按试剂盒说明书操作步骤对 ALT、AST 的活力值进行测定。

1.4.3.4 小鼠肝组织匀浆生化指标的检测

小鼠肝脏准确称重, 制备 10% 肝脏生理盐水匀浆, 冷冻离心后取上清液。按照试剂盒说明进行肝组织匀浆生化指标的测定。

1.4.4 统计分析

数据采用 SPSS 18.0 软件进行统计和差异显著性分析, 结果以平均值 \pm 标准差表示, $P < 0.05$ 为显著性差异。体外抗氧化实验均重复 3 次; 动物实验中多样本均数比较用单因素方差分析, 各组间的两两比较用最小显著差法分析。

2 结果与讨论

2.1 富士苹果渣中总三萜的质量分数

通过超声波辅助提取、石油醚超声除杂及大孔树脂纯化工艺得到 APTT, 提取率为 (1.65 \pm 0.39)%。由于 APTT 中含有的三萜类物质达到二十多种, 要对其一一分析比较困难, 而三萜类化合物由于具有相同显色基团, 在无水条件下与强酸作用, 会产生颜色变化, 且 APTT 主要成分为熊果酸^[9], 因此, 以熊果酸作为标准品, 选择分光光度法对苹果渣中总三萜进行检测, 由标准曲线可得回归方程为: $y = 0.0506x - 0.0106$ ($R^2 = 0.9981$), 式中, x 为熊果酸标准溶液质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$), y 为吸光值。由上述回归方程计算得 APTT 中总三萜的质量分数为 (87.46 \pm 3.54)%。

2.2 富士苹果渣总三萜体外抗氧化活性的比较

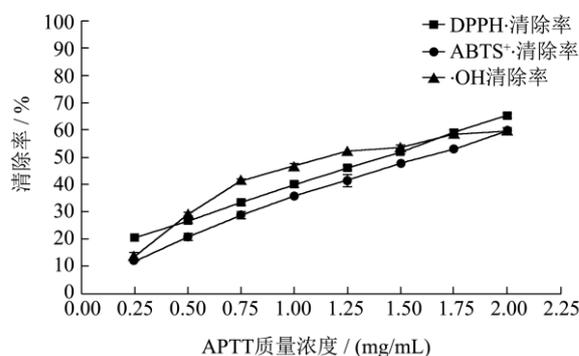


图 1 APTT 对 DPPH、 $ABTS^+$ 和 OH 清除能力比较

Fig.1 Comparison of DPPH[·], $ABTS^+$, and $\cdot\text{OH}$ scavenging abilities of TTAP

图 1 可见, 随着 APTT 溶液质量浓度的增加, 其对 DPPH、 $ABTS^+$ 和 OH 的清除能力均逐渐增强。APTT 质量浓度在 0.25~2.00 mg/mL, 其对 DPPH 和 $ABTS^+$ 清除能力呈良好线性正相关, 回归方程分别为 $y = 25.626x + 13.930$ ($R^2 = 0.9995$) 和 $y = 26.393x + 7.708$ ($R^2 = 0.9933$)。随着 APTT 质量浓度的增加, DPPH 清除率由 (20.13 \pm 0.06)% 增加到 (65.19 \pm 0.01)%, $ABTS^+$ 清除率由 (12.12 \pm 0.77)% 增加到 (59.51 \pm 1.17)%。当 APTT 质量浓度为 0.25~0.75 mg/mL 时, 其 OH 清除率显著

增加($P<0.05$),由(13.32±2.02)%上升至(41.17±0.92)% ,增长了 2.1 倍,随着 APTT 质量浓度的进一步提高,OH 清除率增长变缓,当 APTT 质量浓度达到 2.00 mg/mL 时,OH 的清除率为(59.54±0.27)%。说明随着 APTT 质量浓度的升高,其清除 DPPH、ABTS⁺ 和 OH 的能力均有所增强。表明 APTT 具有一定的清除这三种自由基的能力。

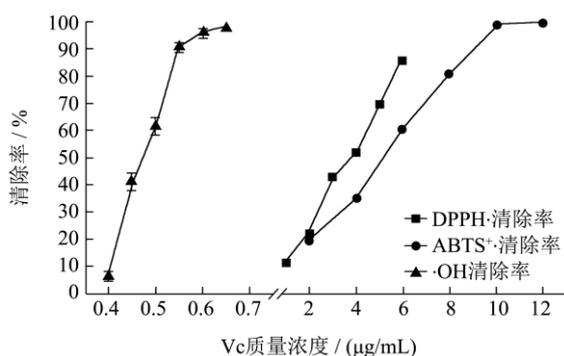


图 2 Vc 对 DPPH、ABTS⁺ 和 OH 清除能力比较

Fig.2 Comparison of DPPH, ABTS⁺ and ·OH scavenging abilities of Vc

图 2 为阳性对照 Vc 清除 DPPH、ABTS⁺ 和 OH 的变化趋势图。随着 Vc 质量浓度的升高,其对 DPPH、ABTS⁺ 和 OH 的清除能力均显著增强 ($P<0.01$)。当 Vc 质量浓度分别达到 6 µg/mL、10 µg/mL 及 0.65 µg/mL 时, DPPH、ABTS⁺ 和 OH 的清除率分别达到 (85.82±0.97)%、(99.49±0.55)% 和 (98.01±0.99)%。表明 Vc 具有很强的清除 DPPH、ABTS⁺ 和 OH 的能力。

为了更准确地评价 APTT 清除自由基的能力,对 APTT 及 Vc 清除 DPPH、ABTS⁺、OH 的 IC₅₀ 值进

行统计,结果见表 1。APTT 清除 DPPH 的 IC₅₀ 是 Vc 的 378 倍,清除 ABTS⁺ 的 IC₅₀ 是 Vc 的 316 倍,清除 OH 的 IC₅₀ 是 Vc 的 2447 倍。表明 APTT 具有一定的清除 DPPH、ABTS⁺、OH 的能力,但远不如 Vc。

表 1 APTT 对 DPPH、ABTS⁺、OH 清除能力的比较

Table 1 Comparison of DPPH, ABTS⁺, and ·OH scavenging abilities of TTAP

溶液种类	IC ₅₀ / (mg/mL)		
	DPPH ·	ABTS ⁺ ·	OH
APTT	1.42	1.60	1.15
Vc	3.76×10 ⁻³	5.06×10 ⁻³	0.47×10 ⁻³

由于 Vc 自身结构中含有多个羟基,而环上和链上的羟基都易失去电子而显还原性,同时环上两个相邻的烯醇式羟基易分解释放氢自由基从而清除体内有害自由基。目前已有报道表明不同品种苹果果皮中三萜类化合物主要为五环三萜,包括乌苏烷型和齐墩果烷型,而这些化合物的结构中均没有酚羟基,但 APTT 却具有一定的抗氧化活性,因此推测苹果渣中三萜的抗氧化活性部位可能在这些三萜类化合物不同部位的脂羟基,以及其中某些三萜类物质所含的羧基上。由于脂羟基提供质子与电子后不能形成稳定的自由基^[10],因此 APTT 清除自由基的能力相比 Vc 较弱。

2.3 富士苹果渣总三萜对小鼠 CCl₄ 急性肝损伤的保护作用

2.3.1 富士苹果渣总三萜对 CCl₄ 急性肝损伤小鼠肝脏指数、血清 ALT 和 AST 活性的影响

表 2 APTT 对各实验组小鼠肝脏指数、血清 ALT 和 AST 活性的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of TTAP effect on liver indices as well as serum ALT and AST activities in mice from each experimental group

组别	剂量/(mg/kg)	肝脏指数/(g/kg)	ALT 活力/(U/L)	AST 活力/(U/L)
正常组		41.79±1.05	37.70±3.91	126.28±11.99
模型组		45.92±2.58 ^{##}	2277.58±690.00 ^{##}	1001.65±251.15 ^{##}
水飞蓟素组	30	42.80±0.95 ^{**}	1475.60±609.10 [*]	842.75±166.52 [*]
APTT 低剂量组	15	43.34±1.09 [*]	1268.30±41.14 ^{**}	560.75±60.32 ^{**}
APTT 中剂量组	30	42.95±1.79 [*]	1280.20±15.20 ^{**}	650.40±330.93 ^{**}
APTT 高剂量组	60	42.41±2.21 ^{**}	1174.80±145.95 ^{**}	532.60±81.23 ^{**}

注:与空白组比较: # $P<0.05$, ## $P<0.01$;与模型组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。下同。

表 2 所示,与正常组相比,模型组小鼠的肝脏指数极显著升高 ($P<0.01$),说明 CCl₄ 能够使小鼠发生肝肿胀现象;与模型组相比,水飞蓟素组及 APTT 低、中、高剂量组小鼠肝脏指数均显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$),表明阳性药物及 APTT 能够显著降低小鼠的肝脏指数。此外,在解剖过程中发现,正常组小鼠肝脏色泽暗红,具有良好的光泽,质地柔软且有弹性;

而模型组小鼠肝脏颜色变暗,质地较硬且弹性较差,肝脏表面有颗粒状黄色斑点、淤血,可以推测模型组小鼠肝脏受到损伤;而阳性对照组及 APTT 低、中、高剂量组小鼠肝脏颜色、质地较模型组有所改善。表明阳性药物及不同质量浓度 APTT 对小鼠 CCl₄ 急性肝损伤均具有一定疗效。

模型组小鼠血清 ALT 和 AST 活性与正常组相比

均极显著升高 ($P<0.01$), 分析原因主要是由于 CCl_4 在肝微粒体细胞色素 P_{450} 酶激活下产生活性自由基 CCl_3 与 CCl_3COO , 干扰肝细胞内蛋白质的合成, 或与肝细胞膜不饱和脂肪酸发生脂质过氧化, 导致肝细胞肿胀坏死^[11], 进而破裂。由于 ALT 和 AST 属胞内酶, 当肝细胞受到破坏时, 胞浆中的 ALT、AST 便大量释放到血液中, 使血清中这两种酶的活性增高。水飞蓟素组和 APTT 低、中、高剂量组小鼠血清 ALT 和 AST 活性与模型组相比均显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 表明阳性药物及三个剂量 APTT 均能在一定程度上减小 CCl_4 造成的急性肝损伤, 且 APTT 高剂量组相比低、中剂量组及水飞蓟素组, 对 ALT 和 AST 活性下降更多。

2.3.2 富士苹果渣总三萜对 CCl_4 急性肝损伤小鼠 SOD、GSH-Px 活性及 MDA、IL-6 含量的影响

SOD 是机体内重要的抗氧化酶, 能有效清除生物氧化产生的氧自由基, 其活力大小反映了机体抗氧化、清除自由基的能力^[12]。GSH-Px 是机体内广泛存在的一种重要的催化过氧化氢分解的酶, 它能催化还原性 GSH 对过氧化氢的还原反应, 从而减少自由基, 保护细胞膜结构与功能的完整。因此, 通过测定小鼠肝组织中 SOD 和 GSH-Px 的活性, 可以反映机体过氧化损伤程度, 进而初步确定药物是否具有肝保护作用。与正常组相比, 模型组小鼠肝脏中 SOD 及 GSH-Px 活性极显著降低 ($P<0.01$), 说明 CCl_4 诱导的小鼠急性肝损伤模型建立成功, 结果见表 3; 与模型组相比, 水飞蓟素组能够显著升高肝损伤小鼠肝脏 SOD 活性

($P<0.05$) 及 GSH-Px 活性 ($P<0.01$); APTT 低、中、高剂量组相比于模型组, SOD 活性显著升高 ($P<0.05$), 但效果不及水飞蓟素组; APTT 低、高剂量组 GSH-Px 活性相比模型组有极显著升高 ($P<0.01$), 与水飞蓟素组效果相当。说明 APTT 可以清除细胞内自由基, 激活体内具有自由基清除作用的酶类, 如 SOD 和 GSH-Px, 使自由基对细胞的破坏作用降低。

由于机体内存在着大量多不饱和脂肪酸, 极易受到氧化作用的损伤, 产生有细胞毒性的脂质过氧化物, 如 MDA。因此 MDA 水平的变化能反映脂质过氧化损伤的程度, 进而反映出肝脏的损伤程度。表 3 可见, 模型组小鼠 MDA 含量显著高于正常组 ($P<0.05$); 与模型组相比, 水飞蓟素组 MDA 含量显著下降 ($P<0.05$), APTT 低、中、高剂量组 MDA 含量均显著降低 ($P<0.05$), 且 APTT 中剂量组效果最好。说明 APTT 低、中、高剂量组及水飞蓟素组均能在一定程度上减轻肝脏脂质过氧化程度。

NF- κ B 是一种调控炎症和免疫反应转录激活剂, CCl_4 导致急性肝损伤时, 会产生大量自由基, 激活 NF- κ B 的表达, 诱导和调控白细胞介素类细胞因子, 如 IL-6 的释放, 促使肝脏炎症损伤加大^[13]。表 3 可见, 模型组小鼠 IL-6 含量显著高于正常组 ($P<0.01$), 表明模型组小鼠肝脏出现炎症; 与模型组相比, 水飞蓟素组与 APTT 低、中、高剂量组小鼠 IL-6 含量均极显著下降 ($P<0.01$), 且 APTT 中剂量组效果最好, 表明阳性药物及不同剂量 APTT 均能有效缓解小鼠肝脏炎症损伤。

表 3 APTT 对各实验组小鼠 SOD、GSH-Px 活性和 MDA、IL-6 含量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of TTAP effect on SOD, GSH-Px activities and MDA, IL-6 contents in mice from each experimental group

组别	剂量/(mg/kg)	SOD/(U/mg pro)	GSH-Px/(活力单位)	MDA/(nmol/mg pro)	IL-6/(ng/L)
正常组		18.10±0.97	329.95±8.64	7.07±1.48	135.69±6.00
模型组		8.57±1.41 ^{###}	230.45±3.85 ^{###}	10.66±2.91 [#]	170.46±13.23 ^{###}
水飞蓟素组	30	15.42±0.55 [*]	284.29±0.90 ^{**}	7.24±2.97 [*]	135.66±16.04 ^{**}
APTT 低剂量组	15	14.09±4.30 [*]	295.09±56.97 ^{**}	6.30±0.36 [*]	142.66±3.72 ^{**}
APTT 中剂量组	30	14.38±2.80 [*]	270.66±41.18 [*]	6.12±1.46 [*]	130.02±9.28 ^{**}
APTT 高剂量组	60	14.51±1.22 [*]	282.03±34.46 ^{**}	6.79±0.04 [*]	132.01±9.63 ^{**}

3 结论

3.1 本试验通过超声波辅助提取、大孔树脂纯化等工艺对苹果渣中三萜类物质进行提取、纯化, 得到 APTT, 对其体外抗氧化作用进行了研究, 结果表明 APTT 具有清除 DPPH、ABTS⁺、OH 的能力, 但效果不如 Vc。建立 CCl_4 急性肝损伤模型, 与正常组相比, 模型组小鼠血清中 ALT 和 AST 活性极显著升高

($P<0.01$), 肝组织 SOD 和 GSH-Px 活性均极显著降低 ($P<0.01$), MDA、IL-6 含量显著升高 ($P<0.05$), 表明造模成功; 给予不同剂量 APTT 后, ALT 和 AST 均显著性降低 ($P<0.01$), 说明 APTT 能够减轻或阻断由过氧化引起的肝细胞膜损伤导致的肝细胞坏死, 从而达到降低 ALT 和 AST 的效果; 同时三个剂量组小鼠肝组织中的 SOD 和 GSH-Px 活性与模型组相比, 均显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), MDA 含量显著下降

($P<0.05$),说明 APTT 能够通过增强 SOD 及 GSH-Px 的活性,减少细胞膜脂质过氧化产物 MDA 的含量,促使肝细胞的抗氧化能力增强,从而抵御脂质过氧化,降低肝细胞受损程度,达到保肝护肝的目的;各剂量组相比于模型组,IL-6 含量极显著降低($P<0.01$),提示 APTT 能有效降低 CCl₄所致急性肝损伤小鼠炎症因子水平,对肝脏具有较好的保护作用。

3.2 综上所述,与正常组比较,CCl₄肝损伤模型组的肝脏指数及各项生化指标均有显著性改变,说明本试验建立的急性肝损伤模型成功。APTT 低、中、高剂量组均能够显著降低急性肝损伤小鼠血清中 ALT、AST 水平及肝脏 MDA、IL-6 含量,并能使肝脏中 SOD 及 GSH-Px 活性显著升高。表明在机体遇到自由基损害时,APTT 可以在细胞水平减轻 CCl₄引起的急性肝损伤,对肝脏及其功能有保护作用,因此苹果渣总三萜可以作为一种具有潜力的护肝保健品原料。

参考文献

- [1] DENG Xinyu, WU Kunwei, WAN Jingyuan, et al. Aminotriazole Attenuated Carbon Tetrachloride-induced Oxidative Liver Injury in Mice [J]. Food and Chemical Toxicology, 2012, 50(9): 3073-3078
- [2] CHEN Jihang, WONG Hoishan, LEUNG Hoiyan, et al. An Ursolic Acid-enriched Extract of Cynomorium Songaricum Protects Against Carbon Tetrachloride Hepatotoxicity and Gentamicin Nephrotoxicity in Rats Possibly through A Mitochondrial Pathway: A Comparison with Ursolic Acid [J]. Journal of Functional Foods, 2014, 7: 330-341
- [3] FRIGHETTO R T S, WELENDORF R M, NIGRO E N, et al. Isolation of ursolic acid from apple peels by high speed counter-current chromatography [J]. Food Chemistry, 2008, 106(2): 767-771
- [4] ANNA S, CEZARY P, FLORA P, et al. Fruit cuticular waxes as a source of biologically active triterpenoids [J]. Phytochemistry Reviews, 2012, 11(2-3): 263-284
- [5] 林艳芹,郑薇,黄鹤光.熊果酸对急性肝损伤动物模型作用的研究[J].福建医药杂志,2014,36(4): 63-65
LIN Yan-qin, ZHENG Wei, HUANG He-guang. Effects of Acute Liver Injury Animal Model by Ursolic Acid [J]. Fujian Medical Journal, 2014, 36(4): 63-65
- [6] 何祥久,胡慧,吴意轩.一种苹果总三萜的制备方法及应用该法制备的苹果总三萜:中国,101810696[P], 2010-04-28
HE Xiang-jiu, HU Hui, WU Yi-xuan. A Preparation Method of Apple Total Triterpenoids: China, 101810696 [P], 2010-04-28
- [7] HE Xiangjiu, WANG Yihai, HU Hui, et al. *In vitro* and *in vivo* antimammary tumor activities and mechanisms of the apple total triterpenoids [J]. Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(37): 9430-9436
- [8] 李晓斐,李志珂,武双婵,等.红花红色素对小鼠急性 CCl₄ 肝损伤的作用[J].现代食品科技,2013, 29(7): 1569-1573
LI Xiao-fei, LI Zhi-ke, WU Shuang-chan, et al. Effect of Safflower Red Pigment on Acute Liver Injury Induced by CCl₄ in Mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2013,29(7): 1569-1573
- [9] HE Xiangjiu, LIU Ruihai. Phytochemicals of apple peels: Isolation, structure elucidation, and their antiproliferative and antioxidant activities [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(21): 9905-9910
- [10] 戴云,邱晓燕,何耀莹,等.齐墩果酸和熊果酸对 DPPH 自由基的清除作用[J].云南民族大学学报:自然科学版,2012, 21(6):395-398
DAI Yun, QIU Xiao-yan, HE Yao-ying, et al. Effects of Scavenging DPPH Free Radical by Oleanolic Acid and Ursolic Acid [J]. Journal of Yunnan University of Nationalities (Natural Sciences Edition), 2012, 21(6): 395-398
- [11] 贺菊萍,潘迎捷,赵勇.牛蒡提取物对四氯化碳诱导肝损伤小鼠的保护作用[J].现代食品科技,2014, 30(11): 6-11
HE Ju-ping, PAN Ying-jie, ZHAO Yong. Hepatoprotective Effect of Burdock Concentrate against Carbon tetrachloride-induced Liver Damage in Rats [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(11): 6-11
- [12] 陆艳艳,邱细敏,刘湘,等.人工虫草多糖对小鼠 CCl₄ 肝损伤的保护作用[J].食品科学,2011,32(7):319-322
LU Yan-yan, QIU Xi-min, LIU Xiang, et al. Protective Effect of Polysaccharides from Different Parts of Cultured Cordyceps Sinensis on CCl₄- induced Liver Damage in Mice [J]. Food Science, 2011, 32(7): 319-322
- [13] 于伟凡.马鞭草总黄酮对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的影响[J].医药导报,2013,32(10):1289-1292
YU Wei-fan. Protective Effect of Total Flavones of *Herba Verbena* Against Carbon Tetrachloride-induced Acute Liver Injury in Mice [J]. Herald of Medicine, 2013, 32(10): 1289-1292