

朝鲜蓟护肝组方的抗氧化活性及肝保护作用分析

虞世帅^{1,2}, 郝怡宁^{1,2}, 彭勃^{1,2}, 曲丽萍^{1,2,3*}

(1. 云南贝泰妮生物科技集团股份有限公司, 云南昆明 650106)(2. 云南云科特色植物提取实验室有限公司, 云南昆明 650106)(3. 上海贝芙汀科技有限公司, 上海 201700)

摘要: 探究朝鲜蓟和3种药食同源中草药枳椇子、葛根和姜黄联用下的体外抗氧化和抗炎活性及其对斑马鱼肝损伤的保护作用。体外抗氧化研究表明, 护肝组方对DPPH和ABTS⁺自由基的清除能力IC₅₀值分别为80.18 μg/mL和256.15 μg/mL。体外抗炎实验研究表明, 质量浓度为120 μg/mL的护肝组方显著抑制了炎症因子TNF-α、IL-6的表达和NO的分泌($P<0.05$), 抑制率分别为48.12%、31.77%和27.38%。对乙酰氨基酚(APAP)致斑马鱼肝损伤研究表明, 高剂量组(62.5 μg/mL)中斑马鱼肝脏面积增加了30.07%, 肝脏明亮度增加了12.48%, 卵黄囊面积降低了56.16%, 差异均显著($P<0.001$)。低、中、高剂量组(15.6、31.25及62.5 μg/mL)均显著改善肝细胞变性和细胞坏死并降低组织中谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)活力($P<0.05$), 且呈剂量依赖关系。该研究表明, 朝鲜蓟护肝组方具有明确的体外抗氧化和抗炎活性, 对APAP所致斑马鱼肝损伤具有明显的保护作用。

关键词: 朝鲜蓟; 枳椇子; 葛根; 姜黄; 抗氧化; 护肝; 抗炎

文章编号: 1673-9078(2024)09-56-64

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.9.1003

Analysis on Antioxidant Activity and Hepatoprotective Effects of *Cynara Scolymus* L.-Based Herbal Formula

YU Shishuai^{1,2}, HAO Yining^{1,2}, PENG Bo^{1,2}, QU Liping^{1,2,3*}

(1. Yunnan Botanee Bio-technology Group Co. Ltd., Kunming 650106, China)

(2. Yunnan Yunke Characteristic Plant Extraction Laboratory Co. Ltd., Kunming, 650106, China)

(3. Shanghai Beforteen Technology Co. Ltd., Shanghai, 201700, China)

Abstract: Zebrafish studies were conducted to test the *in vitro* antioxidant, anti-inflammatory activity, and hepatoprotective effects of the combined herbal formula of *Cynara scolymus* L. and the three medicine-food homology plants (*Hovenia dulcis*., *Pueraria lobata*, and *Curcuma longa*). The *in vitro* anti-oxidative activity showed that the scavenging capacity values, IC₅₀ of 1-diphenyl-2-trinitrobenzene hydrazine (DPPH) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) free radicals were 80.18 μg/mL and 256.15 μg/mL, respectively. The *in vitro* anti-inflammatory assay showed that the hepatoprotective formula significantly inhibited expression levels and secretion ($P<0.05$) of the inflammation factors, TNF-α, IL-6, and NO, with inhibition rates of 48.12%, 31.77%, and 27.38%, respectively. The results of acetaminophen (APAP)-induced liver injury in zebrafish showed that liver areas increased by 30.07% and liver brightness significantly

引文格式:

虞世帅,郝怡宁,彭勃,等.朝鲜蓟护肝组方的抗氧化活性及肝保护作用分析[J].现代食品科技,2024,40(9):56-64.

YU Shishuai, HAO Yining, PENG Bo, et al. Analysis on antioxidant activity and hepatoprotective effects of *Cynara scolymus* L.-based herbal formula [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(9): 56-64.

收稿日期: 2023-08-25

基金项目: 云南特色植物提取实验室自主研究项目基金(2022YKZY005)

作者简介: 虞世帅(1997-),男,硕士,研究方向:食品生物技术, E-mail: yushishuai@botanee.com

通讯作者: 曲丽萍(1976-),女,博士,高级工程师,研究方向:功效植物研究与开发应用, E-mail: quliping@botanee.com

improved by 12.48%. The vitelline sac areas significantly decreased by 56.16% in the high-dose group (62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ($P<0.001$). The hepatocellular degeneration and cell necrosis were significantly improved in the low-dose, middle-dose, and high-dose groups (15.6, 31.25, and 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively). In the liver tissue, the alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities decreased ($P<0.05$), and showed a dose-dependent relationship. The result of this study showed a *Cynara scolymus* L.-based hepatoprotective herbal formula exhibited significant hepatoprotective effects on APAP-induced liver damage in zebrafish, presenting strong *in vitro* antioxidant activity and anti-inflammatory activity.

Key words: *Cynara scolymus* L.; *Hovenia dulcis*; *Pueraria lobata*; *Curcuma longa*; hepatoprotective effects, antioxidant; anti-inflammatory

肝脏是人体内最大的内脏器官，具有多种生理功能如营养代谢、解毒和调节血容量等。肝脏在药物代谢过程中可能受到的损伤称之为药物性肝损伤 (Drug-induced Liver Injury, DILI)。据研究报道，感染性疾病和心脑血管疾病是 DILI 患者的主要基础疾病，最可能导致肝损伤的药物类型分别为心脑血管及血脂调节药、抗生素和解热镇痛药^[1,2]。对乙酰氨基酚 (APAP) 是临床上广泛使用的解热镇痛药物之一，常规剂量下是安全有效的，但过量或长期服用会导致肝毒性和急性肝衰竭^[3]。N-乙酰半胱氨酸 (N-acetylcysteine, NAC) 是临床上唯一批准可用的解毒剂^[4]，NAC 的肝保护机制依赖于恢复肝细胞内的谷胱甘肽水平，且只在中毒 8 h 内给药才能发挥最大作用^[5]。长期服用药物治疗难免会对患者带来一定的副作用，因此，探索开发具有预防或缓解药物性肝损伤功效的纯天然功能性食品原料具有十分重要的意义。

朝鲜蓟护肝组方由朝鲜蓟、枳椇子、葛根和姜黄提取物组成。朝鲜蓟 (*Cynara scolymus* L.) 是地中海地区和美洲种植的多年生植物，是地中海饮食的重要组成部分，朝鲜蓟作为酚类化合物、菊粉、纤维和矿物质的重要来源，常被用于缓解消化不良和保护肝脏^[6]，其治疗肝病的特性在于提取物中的洋蓟素可以通过分泌胆汁，排出肝脏毒素和产生新细胞来保护肝脏^[7]。葛根为豆科植物野葛 (*Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi) 的干燥根，素有“亚洲人参”的美称，其黄酮类成分葛根素具有广泛的药理作用，广为报道的保肝活性与增强抗氧化活性减缓氧化应激和线粒体功能障碍有关^[8]。枳椇子为鼠李科植物北枳椇 (*Hovenia dulcis* Thunb.) 的干燥成熟种子，富含黄酮、生物碱、三萜皂苷类等活性成分，其中二氢杨梅素被报道可改善肝细胞坏死和脂肪变性，同时促进肝脏再生缓解肝损伤，还可以通过增加抗炎活性，调节脂质代谢和胰岛素抵抗来改善脂肪

肝^[9]。姜黄 (*Curcuma longa* L.) 为姜科姜黄属植物，姜黄的主要成分为姜黄素和挥发油，现代药理学发现姜黄素具有抗氧化、抗炎、降血压、保肝等功效，其保肝作用主要体现在预防和抑制肝纤维化^[10]。目前，枳椇子、葛根和姜黄均在《既是食品又是药品的物品名单》目录中，三者都属于药食同源类植物，且安全无毒，适合长期服用。

迄今为止，国内外尚未有朝鲜蓟、枳椇子、葛根和姜黄食品级提取物的配伍用于肝损伤的辅助保护报道，相比于单一的提取物，护肝组方具有多成分、多靶点作用的优势。本文研究了朝鲜蓟护肝组方的体外生物活性并探讨了其对 APAP 诱导的斑马鱼肝损伤的保护功效，为药食同源中药材在功能性食品领域中的进一步开发利用提供了理论依据和参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

朝鲜蓟、枳椇子、葛根、姜黄，广东青云山药业有限公司；洋蓟素、姜黄素、葛根素、二氢杨梅素 (HPLC \geq 98%)，上海源叶生物科技有限公司；甲醇、乙腈 (色谱纯)，德国 Fisher 公司；其余试剂均为分析纯；实验用水为经 Mili-Q 纯化的超纯水；二甲基亚砜、脂多糖 (LPS)，美国 Sigma-Aldrich 公司；L-抗坏血酸、地塞米松醋酸钠、对乙酰氨基酚 (APAP)、N-乙酰半胱氨酸 (NAC)、甲基纤维素，上海阿拉丁生化科技股份有限公司；1,1-二苯基-2,2,4,4-四硝基乙烷 (DPPH)、2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 (ABTS)、谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 试剂盒，南京建成生物工程研究所；RAW264.7 细胞，中国科学院上海细胞库；DMEM 培养基、胎牛血清 (FBS)，美国 Gibco 公司；CCK-8 试剂盒，日本同仁化学研究所；肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6 (IL-6) ELISA 试剂盒，

杭州联科生物技术股份有限公司；一氧化氮（NO）试剂盒，碧云天生物科技有限公司；无血清细胞冻存液、4%组织细胞固定液、中性树胶、伊红、苏木素染色液、切片石蜡，北京索莱宝科技有限公司。

1.2 实验动物

野生型 AB 品系斑马鱼，杭州环特生物科技股份有限公司。自然成对交配繁殖，胚胎孵育于 28 ℃ 的养鱼用水中，选取受精 3 d 的斑马鱼幼体开展实验。实验动物使用许可证号为 SYXK（浙）2022-0004。

1.3 主要仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪，安捷伦科技（中国）有限公司；MultiskanSkyHigh 全波长酶标仪、CO₂ 培养箱、高速冷冻离心机、微量离心机、精密电子天平，赛默飞世尔科技（中国）有限公司；解剖显微镜，日本 OLYMPUS 公司；CCD 相机，上海土森视觉科技有限公司；全自动样品快速研磨仪，上海净信实验设备科技部；96 孔板、24 孔板、6 cm 细胞培养皿、10 cm 细胞培养皿，美国 Corning 公司。

1.4 方法

1.4.1 组合物制备

将姜黄、朝鲜蓟、葛根、枳椇子原料打碎成粉后，采用纯水作为溶剂，通过加热回流提取、过滤、旋蒸、喷雾干燥得到提取物粉末，根据各原料每日最大服用量，按 1:2:2:4 的比例，对姜黄、朝鲜蓟、葛根、枳椇子提取物进行配比组合，得到朝鲜蓟护肝组方。

1.4.2 主要活性物含量测定

(1) 总黄酮和总多酚含量测定

参照 GB/T 20574-2006《蜂胶中总黄酮含量的测定方法》，采用分光光度计法测定朝鲜蓟护肝组方中总黄酮含量。参照 GB/T 8313-2018《茶叶中茶多酚和儿茶素类含量的检测方法—茶叶中茶多酚的检测》，采用福林酚法测定护肝组方中总多酚含量。

(2) 洋蓟素、二氢杨梅素、葛根素和姜黄素含量测定

参考文献里的方法稍作修改，采用高效液相色谱法，测定朝鲜蓟护肝组方中洋蓟素^[6]、二氢杨梅素^[11]、葛根素^[12]和姜黄素^[13]的含量。其中 4 种对照品均以单一对照品的形式作为 HPLC 含量测定的定量依据。

1.4.3 体外抗氧化功效活性测定

(1) DPPH 自由基清除能力测定

选用 L-抗坏血酸作为阳性对照，根据 DPPH 自由基清除能力测定试剂盒说明书进行操作，96 孔板于暗处反应 30 min 后，在波长 517 nm 处测定 OD 值，计算公式（1）如下。

$$X = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中：

X——DPPH 自由基清除率，%；

A₁——测得样品组 OD 值；

A₂——测得样品对照组 OD 值；

A₀——测得空白组 OD 值。

(2) ABTS⁺ 自由基清除活性测定

选用 L-抗坏血酸作为阳性对照，根据 ABTS⁺ 自由基清除能力测定试剂盒说明书进行操作，96 孔板于暗处反应 6 min 后，在波长 734 nm 处测定 OD 值，计算公式（2）如下。

$$Y = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (2)$$

式中：

Y——ABTS⁺ 自由基清除率，%；

A₁——测得样品组 OD 值；

A₂——测得样品对照组 OD 值；

A₀——测得空白组 OD 值。

1.4.4 体外抗炎活性测定

采用 CCK-8 法^[14]测定细胞活力，设置样品组、样品对照组和空白组，用酶标仪在 450 nm 处检测各组的 OD 值，细胞存活率计算公式（3）如下。设置空白对照组、LPS 诱导的模型组、地塞米松醋酸钠阳性对照组及样品组，按照 ELISA 试剂盒及 NO 检测试剂盒说明书步骤进行检测，分别检测细胞上清液中 TNF-α、IL-6 及 NO 的含量。

$$Z = \frac{A_1 - A_0}{A_2 - A_0} \times 100\% \quad (3)$$

式中：

Z——细胞存活率，%；

A₁——测得样品组 OD 值；

A₂——测得样品对照组 OD 值；

A₀——测得空白组 OD 值。

1.4.5 药物性肝损伤辅助保护功效评价

每孔随机选取 30 尾斑马鱼幼体于 6 孔板中，每孔容量 3 mL，设立组合物样品组，正常对照组和模型对照组。除正常对照组外，其余各组均给予对乙酰氨基酚建立斑马鱼肝损伤模型。于 28 ℃ 处理

48 h 后测定朝鲜蓟护肝组方的 MTC。

每组随机挑选 10 尾斑马鱼，将其用三卡因麻醉后置于解剖显微镜观察，采用 NIS-Elements D 3.20 高级图像处理软件分析斑马鱼肝脏面积、肝脏明亮度平均值和卵黄囊面积的变化。接着用 3% 甲基纤维素固定 4 d、脱水后用石蜡包埋并用 H&E 进行染色，置于显微镜下观察斑马鱼幼体并记录拍照。最后，通过病理切片观察肝脏的组织病理学改变。根据 ALT 和 AST 试剂盒（酶标仪法）使用说明，测定斑马鱼幼鱼肝组织中 ALT 和 AST 活力，并用多功能酶标仪定量分析。

1.5 统计学分析

文中实验均重复三次，统计学分析采用 SPSS 26.0 软件，图片生成采用 GraphPad Prism 8.0 软件，所有数据采用 *t*-检验或单因素方差分析，均采用 mean±SE 表示，当 *P*<0.05 时，表明差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 主要活性物含量测定结果

朝鲜蓟护肝组方中各成分的含量如表 1 所示，组方中二氢杨梅素、洋蓟素、葛根素、姜黄素的高效液相色谱图及相应化学物质的保留时间见图 1。

表 1 朝鲜蓟护肝组方的主要活性物测定

Table 1 Determination of main active ingredients in CMEC

检测项目	朝鲜蓟护肝组方含量/(mg/g)
总黄酮	187.43 ± 0.03
总多酚	76.65 ± 0.03
二氢杨梅素	28.72 ± 0.02
葛根素	19.23 ± 0.01
姜黄素	18.78 ± 0.01
洋蓟素	6.05 ± 0.02

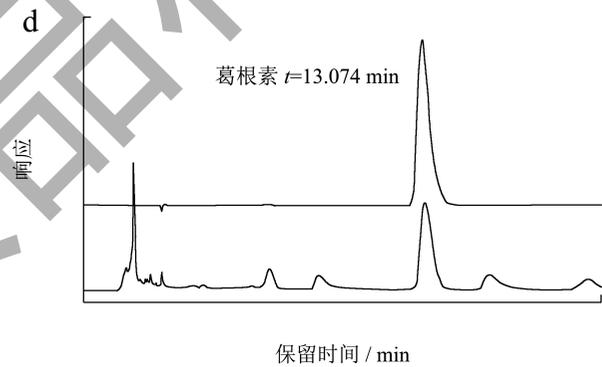
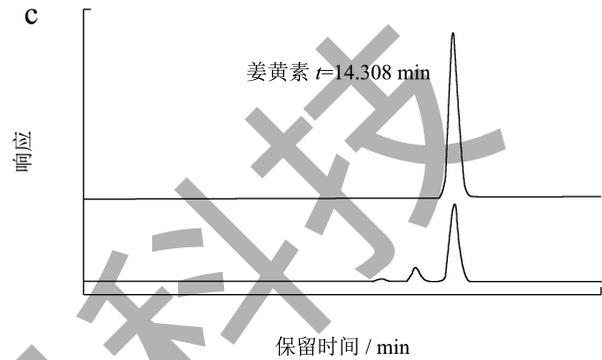
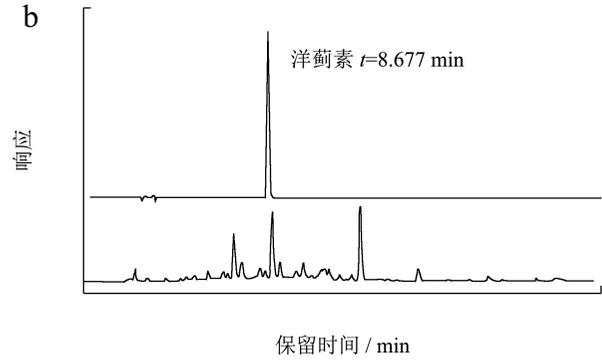
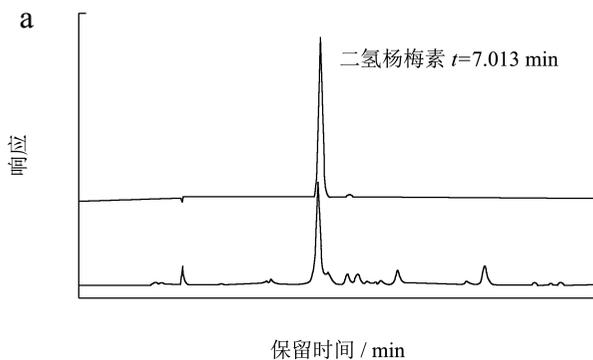


图 1 护肝组方中二氢杨梅素、洋蓟素、姜黄素、葛根素高效液相色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of dihydroquercetin, cynarin, curcumin and puerarin in CMEC

2.2 体外抗氧化功效活性测定结果

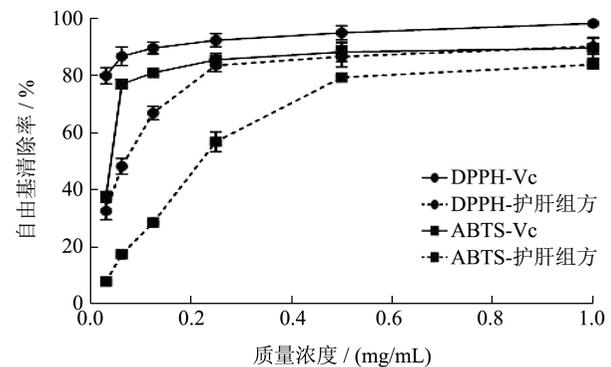


图 2 朝鲜蓟护肝组方的体外抗氧化活性

Fig.2 In vitro antioxidant activity of CMEC

由图 2 可知, 在 0.03~1 mg/mL 质量浓度范围内, 组合物对 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基清除能力随着质量浓度的上升而提高, IC₅₀ 值分别为 80.18 μg/mL 和 256.15 μg/mL。当质量浓度达到 1 mg/mL 时, 组合物的 DPPH 自由基清除率达到了 90.35%, ABTS⁺ 自由基清除率达到了 83.95%。

2.3 体外抗炎活性测定结果

由图 3 可知, 相比较于仅用完全培养基处理的空白组, 不同浓度组合物处理下的吸光度值均更高, 且随着质量浓度升高, 细胞活力增强。表明组合物在 500 μg/mL 质量浓度下, 对 RAW264.7 细胞的生长没有毒性作用, 反而可以促进细胞增殖, 最终选取中间质量浓度为 120 μg/mL 的样品进行后续实验。相比于空白组, LPS 诱导的模型组中 NO 分泌量和 IL-6、TNF-α 相对表达量均显著提高 ($P < 0.001$), 说明造模成功。与模型组相比较而言, 护肝组方对 NO 分泌和 IL-6、TNF-α 表达均有显著抑制效果 ($P < 0.05$), 且对 TNF-α 的抑制结果优于阳性对照地塞米松醋酸钠 ($P < 0.01$), 抑制率分别为 27.38%、31.77% 和 48.12%。

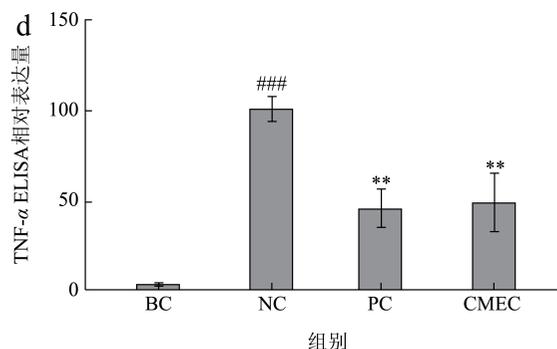
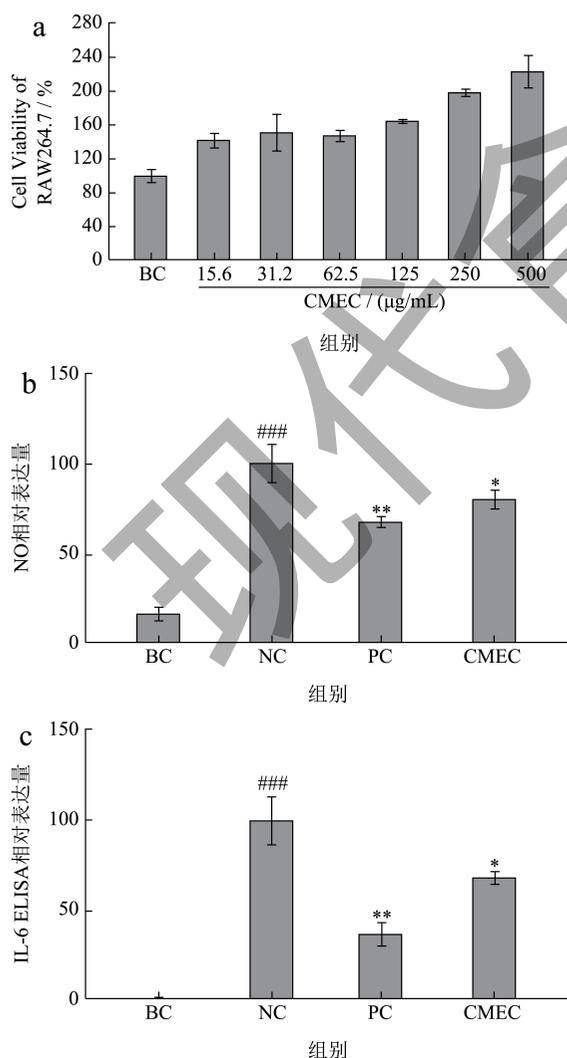


图 3 朝鲜蓟护肝组方对 RAW264.7 细胞活力 (a)、NO 分泌量 (b)、IL-6 (c) 和 TNF-α (d) 表达量的影响

Fig.3 Effects of CMEC on RAW 264.7 cell activity (a) and NO (b), IL-6 (c), TNF-α (d) levels

注: BC 为空白组, NC 为 LPS 诱导的模型组, PC 为阳性对照组, MEC 为样品组; 与 BC 组比较: ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; 与 NC 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.4 药物性肝损伤辅助保护功效评价结果

2.4.1 最大耐受浓度 (MTC) 测定结果

相比于正常组, 模型组中的斑马鱼幼鱼体内具有肝脏毒性, 但未出现死亡。相比于模型组, 在 31.20~250 μg/mL 质量浓度范围内斑马鱼幼鱼体内出现与模型组状态相似的情况, 且未出现死亡。当组合物浓度提高到 500 μg/mL 时, 20 尾斑马鱼死亡, 死亡率为 67%。组合物对斑马鱼药物性肝损伤模型 MTC 为 62.50 μg/mL。详情见表 2。

表 2 朝鲜蓟护肝组方最大耐受浓度 (MTC) 测定结果

Table 2 Results of maximum tolerated concentration (MTC) of CMEC (n=30)

组别	质量浓度 / (μg/mL)	死亡数 / 尾	死亡率 / %	表型
正常对照组	—	0	0	未见明显异常
模型对照组	—	0	0	具有肝脏毒性
朝鲜蓟护肝组方	31.20	0	0	与模型组状态相似
	62.50	0	0	与模型组状态相似
	125.00	0	0	较模型组状态更严重
	250.00	0	0	较模型组状态更严重
	500.00	20	67	—

2.4.2 肝脏面积, 肝脏明亮度平均值和卵黄囊面积测定

相比于正常对照组, 模型对照组中斑马鱼

幼鱼肝脏面积、肝脏明亮度平均值均有显著下降 ($P < 0.001$), 卵黄囊面积显著增大 ($P < 0.001$), 说明建模成功。相比于模型组, 阳性对照组中以上三项指标均有显著改善 ($P < 0.05$)。随着护肝组方质量浓度升高, 以上三项指标的改善越显著, 尤其是当质量浓度达到 $62.50 \mu\text{g/mL}$ 时, 组合中斑马鱼幼鱼肝脏面积、肝脏明亮度及卵黄囊面积均得到了显著改善且结果优于阳性对照 ($P < 0.001$)。其中斑马鱼肝脏面积增加了 30.07% , 显著缓解了肝脏萎缩; 肝脏明亮度增加了 12.48% , 显著缓解了肝脏变性; 卵黄囊面积降低了 56.16% , 显著缓解了卵黄囊吸收延迟。详见图 4 和图 5。

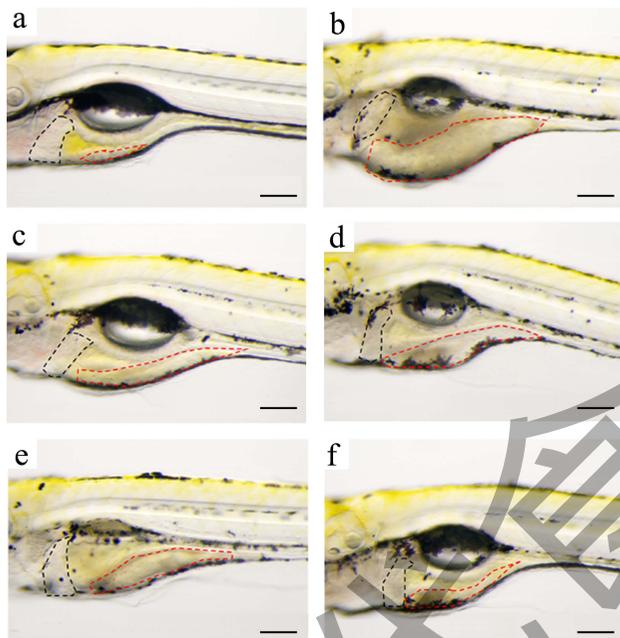


图 4 朝鲜蓟护肝组方处理后斑马鱼肝脏和卵黄囊典型图 (放大倍数 $60\times$, 标尺长度 $100 \mu\text{m}$)

Fig.4 Visual phenotype of hepatotoxicity in zebrafish treated with CMEC (magnification $60\times$, scale length $100 \mu\text{m}$)

注: (a) 正常对照组; (b) 模型对照组; (c) NAC $1.60 \mu\text{g/mL}$; (d) 护肝组方 $15.6 \mu\text{g/mL}$; (e) 护肝组方 $31.2 \mu\text{g/mL}$; (f) 护肝组方 $62.5 \mu\text{g/mL}$ 。红色虚线框为卵黄囊, 黑色虚线框为肝脏。

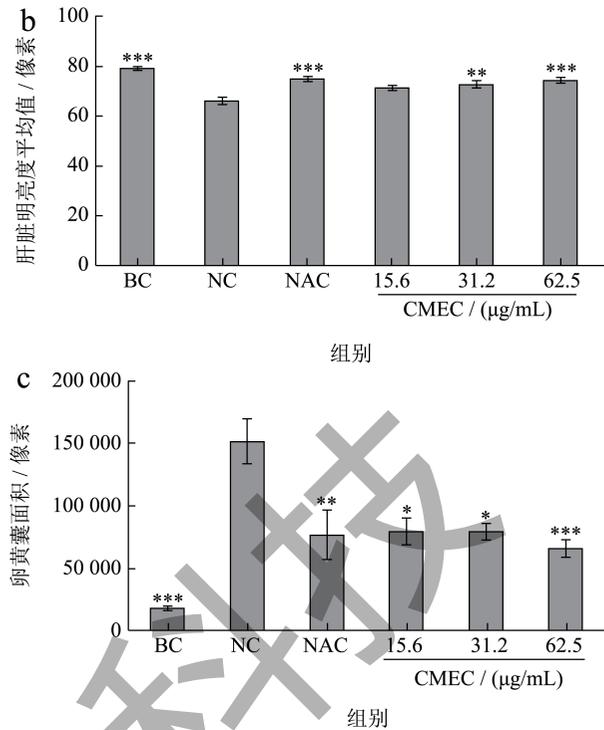
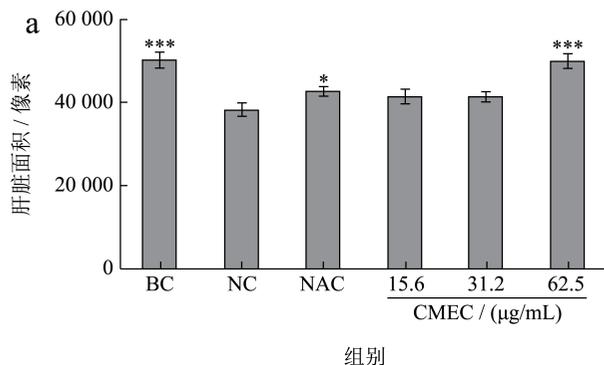


图 5 朝鲜蓟护肝组方处理后斑马鱼肝脏面积 (a)、肝脏明亮度平均值 (b) 和卵黄囊面积 (c)

Fig.5 Results of the liver area (a), mean of liver brightness (b) and yolk sac area (c) in zebrafish treated with CMEC

注: BC 为空白组, NC 为 APAP 诱导的模型组, NAC 为阳性对照组, CMEC 为样品组; 与模型对照组比较, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, 下同。

2.4.3 对肝脏组织结构的影响结果

由图 6 可知, 正常对照组中斑马鱼肝脏病理组织学检查显示肝细胞核规则清晰, 无可见肿大与空泡, 肝细胞结构正常, 边缘清晰。模型对照组中肝组织出现大量脂肪空泡样变性 (黑色箭头所指), 肝脏结构紊乱, 表明模型建立成功。相对于正常组而言, 阳性对照组 (NAC $1.60 \mu\text{g/mL}$) 斑马鱼肝脏组织空泡和坏死细胞减少, 肝脏结构较模型对照组有改善。朝鲜蓟护肝组方 3 个质量浓度组中斑马鱼肝脏组织空泡和坏死细胞明显减少, 尤其在 $62.50 \mu\text{g/mL}$ 质量浓度下肝脏结构较模型组有明显改善。

2.4.4 ALT和AST活力测定结果

如图 7 所示, 相比于正常对照组, 模型组斑马鱼肝组织中 ALT 和 AST 活力显著升高 ($P < 0.001$), 表明建模成功。相比于模型组, 随着质量浓度上升, 组合中斑马鱼肝组织中的 ALT 和 AST 活力逐渐下降, 当质量浓度达到 $62.50 \mu\text{g/mL}$ 时, ALT 和 AST 活力最低, 抑制效果优于阳性对照 ($P < 0.001$), 抑制率分别为 24.44% 和 22.19% 。

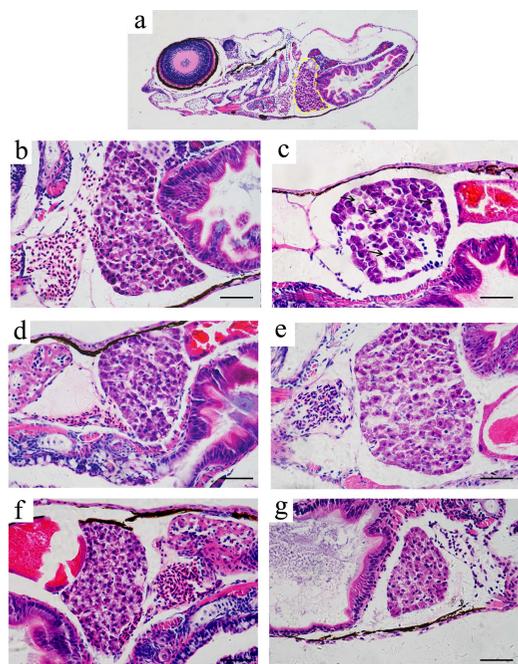


图6 朝鲜蓟护肝组方处理后斑马鱼肝脏病理改变典型图
(放大倍数 400×, 标尺长度 20 μm)

Fig.6 Visual phenotype of pathological changes of zebrafish liver treated with CMEC (Magnification 400×, scale length 20 μm)

注:(a) 分析示例图;(b) 正常对照组;(c) 模型对照组;(d) NAC 1.60 μg/mL;(e) 护肝组方 15.6 μg/mL;(f) 护肝组方 31.2 μg/mL;(g) 护肝组方 62.5 μg/mL;黄色方框为肝脏,黑色箭头指向空泡变性。

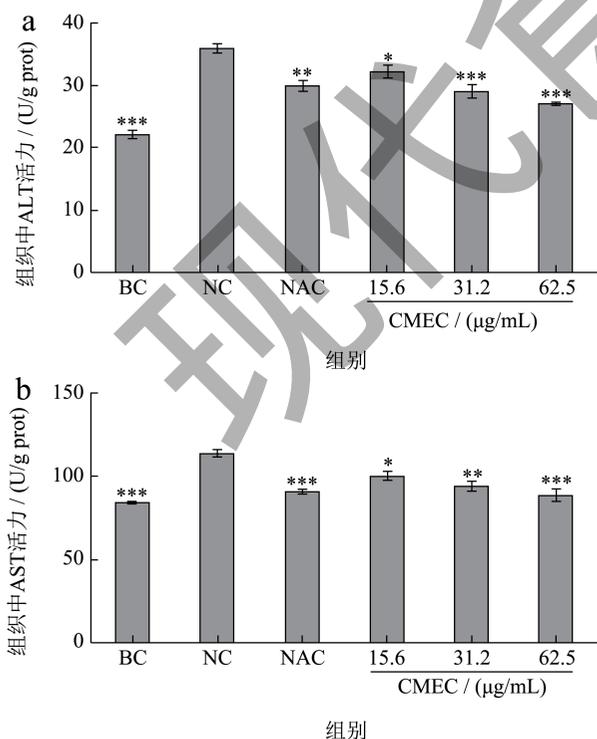


图7 朝鲜蓟护肝组方处理后斑马鱼肝组织中 ALT 和 AST 活力
Fig.7 The activity of ALT and AST in zebrafish liver treated with CMEC

3 讨论

APAP 诱导的肝损伤机制非常复杂, *N*-乙酰苯醌亚胺 (N-acetylbenzoquinone Imide, NAPQI) 是 APAP 的毒性代谢产物, 通过消耗谷胱甘肽 (Glutathione, GSH), 打破体内的氧化和抗氧化平衡, 从而引发氧化应激、线粒体功能障碍以及细胞凋亡, 最终导致肝损伤^[15-17]。DPPH 和 ABTS⁺ 自由基清除能力的强弱常被用来衡量原料是否具有抗氧化活性^[18]。本文研究结果显示, 朝鲜蓟护肝组方具有较强的抗氧化能力, 这可能归因于组合物富含的总多酚与总黄酮, 两者已被证实与 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基清除呈显著的量效关系^[19-22]。氧化应激引发的 DILI 会激活并释放炎症因子和趋化因子, 进一步导致严重的急性肝炎^[16]。炎症反应过程中, 肝细胞中过多的 NO 可与活性氧反应生成毒性很强的过氧亚硝酸盐 (ONOO⁻), 进一步导致肝细胞线粒体蛋白质的硝化作用^[23]和线粒体 DNA 的损伤^[24]。炎症因子 TNF- α 可以通过细胞毒性导致肝细胞坏死, 也可以通过影响肝脏内微循环, 诱导肝脏局部坏死^[25]。IL-6 参与了炎症反应和免疫应答等多种生物活动, TNF- α 的表达可以诱导 IL-6 的生成, 并相互作用进一步加重肝脏受损^[26]。LPS 诱导的 RAW264.7 细胞抗炎实验结果显示朝鲜蓟护肝组方可同时下调 TNF- α 、IL-6 的表达和抑制 NO 的分泌, 具有显著的抗炎活性。已有研究发现, 黄酮类化合物可以通过抑制调节酶或转录因子来调控炎症介质, 其抗炎活性的主要机制是通过抑制 NF- κ B 信号通路^[27]。朝鲜蓟护肝组方表现出的强抗氧化活性和显著的抗炎活性与其提取物中含有的大量多酚和黄酮相关。

本实验以总黄酮和总多酚含量作为量化指标, 首次将朝鲜蓟、葛根、枳椇子和姜黄进行科学配比, 组成具有强抗氧化和抗炎功效的朝鲜蓟护肝组方。为探究其潜在的护肝活性, 本文构建了 APAP 诱导的斑马鱼肝损伤模型进行验证。通过观察斑马鱼表型变化, 发现朝鲜蓟护肝组方显著改善了斑马鱼肝脏萎缩、肝脏变性和肝脏代谢。病理切片结果显示, 朝鲜蓟护肝组方显著改善了肝细胞变性和细胞坏死并下调了 ALT 和 AST 活性。推测该护肝组方改善肝损伤的机制可能为: 朝鲜蓟、葛根、枳椇子和姜黄中的多酚和黄酮类物质联合发挥抗氧化、抗炎作用, 通过调控氧化应激水平和炎症介质, 改善 APAP 诱导的药物性肝损伤。张晓文等^[28]研究了

朝鲜蓟中的洋蓟素对 APAP 诱导的大鼠肝损伤, 发现其除发挥抗氧化功效减缓氧化应激外, 还通过下调炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的水平, 减缓炎症反应来改善肝损伤。Kawasaki 等^[29]和陈园^[30]对姜黄提取物的研究发现, 姜黄提取物在 300 $\mu\text{g/mL}$ 和 600 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度下可显著抑制 NO 的分泌, 其主要是通过下调 TNF- α 和 IL-1 β 的相对表达量起到抗炎的作用, 但对 IL-6 的抑制效果并不显著, 而朝鲜蓟护肝组方仅在 120 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度下即可同时下调 TNF- α 、IL-6 的表达并抑制 NO 的分泌, 表现出更好的抗炎活性。屠梦钰等^[31]和蒙锦燕等^[32]的研究发现, 葛根中的葛根素与枳椇子中的二氢杨梅素还可以通过调控线粒体凋亡通路, 调控细胞凋亡, 缓解 APAP 所致小鼠急性肝损伤。侯景龙等^[33]研究了以葛根素和总黄酮含量作为量化指标进行科学配伍后的葛根枳椇子组合物的抗氧化效果, 结果显示葛根枳椇子组合物的 DPPH 自由基清除能力 IC₅₀ 值为 38 $\mu\text{g/mL}$, 而朝鲜蓟护肝组方的 IC₅₀ 值为 80.18 $\mu\text{g/mL}$, 造成这一差异的原因可能是不同提取工艺导致的活性物含量不同, 以乙醇为溶剂提取得到的组合中葛根素含量为 72.24 mg/g, 而以水为溶剂提取得到的护肝组方中葛根素含量为 19.23 mg/g。潘钰等^[34]研究了葛根、姜黄、沙棘组合物对 CCl₄ 诱导的小鼠肝损伤的保护作用, 结果显示组合物的抗氧化能力和对肝损伤的保护效果优于三者单独作用的效果, 提示葛根和姜黄的配伍可能会通过增强抗氧化能力, 缓解氧化应激造成的肝损伤。本朝鲜蓟护肝组方富含多种活性成分, 它们组合在一起可发挥更好的功效, 通过调控氧化应激水平, 炎症介质和细胞凋亡, 显著改善了由 APAP 诱导的斑马鱼肝损伤。

4 结论

综上所述, 由朝鲜蓟、枳椇子、葛根和姜黄组成的朝鲜蓟护肝组方具有较强的 DPPH \cdot 、ABTS $^{+}$ 清除效果并可以显著抑制炎症因子 TNF- α 、IL-6 的表达和 NO 的分泌; 在 APAP 诱导的斑马鱼肝损伤模型中, 朝鲜蓟护肝组方显著减缓了斑马鱼肝脏萎缩, 肝脏变性及肝功能代谢异常; 改善了肝细胞变性和细胞坏死; 降低了肝脏组织中 ALT 和 AST 水平。朝鲜蓟护肝组方的护肝功效可能与其发挥自身的抗氧化和抗炎活性来减缓氧化应激、炎症反应相关。服用药食同源类中草药来预防和缓解疾病是一种新的研究方向, 本研究为药物性肝损伤的预防和

缓解提供了新思路, 也为药食同源类原料在功能性食品领域的进一步开发与应用提供了理论依据和科学支持。

参考文献

- [1] YU Y C, MAO Y M, CHEN C W, et al. CSH guidelines for the diagnosis and treatment of drug-induced liver injury [J]. *Hepatology International*, 2017, 11(3): 221-241.
- [2] 陈崇泽, 李婕, 旷炼, 等. 448 例住院患者药物性肝损伤相关不良反应特征分析 [J]. *中国药物警戒*, 2023, 20(6): 697-704.
- [3] REUBEN A, TILLMAN H, FONTANA R J, et al. Outcomes in adults with acute liver failure between 1998 and 2013: An observational cohort study [J]. *Annals of Internal Medicine*, 2016, 164(11): 724-32.
- [4] LARSEN F S, WENDON J. Understanding paracetamol-induced liver failure [J]. *Intensive Care Medicine*, 2014, 40(6): 888-890.
- [5] GHALLAB A, HASSAN R, HOFMANN U, et al. Interruption of bile acid uptake by hepatocytes after acetaminophen overdose ameliorates hepatotoxicity [J]. *Journal of Hepatology*, 2022, 77(1): 71-83.
- [6] 曹佩琴, 黄建安, 李银花, 等. 高效液相色谱法同时测定朝鲜蓟叶中绿原酸和洋蓟素含量 [J]. *湖南农业科学*, 2014, 7: 8-10.
- [7] AL AMRANI H A, KHALAF ANEED I. Artichoke and health (food and medicine): A review [J]. *Journal of Genetic and Environmental Resources Conservation*, 2023, 11(2): 114-124.
- [8] ZHOU W, HE H, WEI Q, et al. Puerarin protects against acetaminophen-induced oxidative damage in liver through activation of the Keap1/Nrf2 signaling pathway [J]. *Food Science & Nutrition*, 2023, 11(10): 6604-6615.
- [9] CHEN J, WANG X, XIA T, et al. Molecular mechanisms and therapeutic implications of dihydromyricetin in liver disease [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, 142: 111927.
- [10] 袁鹏, 陈莹, 肖发, 等. 姜黄素的生物活性及在食品中的应用 [J]. *食品工业科技*, 2012, 33(14): 371-375.
- [11] 申向荣. 枳椇子的化学成分研究及有效成分的含量测定 [D]. 广州: 广东药学院, 2007.
- [12] 黄绮敏, 刘贤钊, 冯华业, 等. 不同产地葛根提取物中葛根素含量测定 [J]. *现代食品*, 2021, 21: 183-186.
- [13] NOORI S, KIASAT A R, KOLAH M, et al. Determination of secondary metabolites including curcumin in *Rheum ribes* L. and surveying of its antioxidant and anticancer activity [J]. *Journal of Saudi Chemical Society*, 2022, 26(3): 101479.
- [14] SUN S P, ZHANG J H, LI H X, et al. Anti-inflammatory

- activity of the water extract of *Chloranthus serratus* roots in LPS-stimulated RAW264. 7 cells mediated by the Nrf2/HO-1, MAPK and NF- κ B signaling pathways [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, 271: 113880.
- [15] LIU C H, LI X Z, GAO M, et al. Downregulation of hepatic METTL3 contributes to APAP-induced liver injury in mice [J]. *JHEP Reports*, 2023, 5(8): 100766.
- [16] DONATO M T, TOLOSA L. High-content screening for the detection of drug-induced oxidative stress in liver cells [J]. *Antioxidants*, 2021, 10(1): 106.
- [17] SEEN, S. Chronic liver disease and oxidative stress-a narrative review [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 15(9): 1021-1035.
- [18] RUMPF J, BURGER R, SCHULZE M. Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 233: 123470.
- [19] 杨美莲,程桂广,蔡圣宝,等.朝鲜蓟叶多酚提取及抗氧化活性研究[J].*现代食品科技*,2019,35(4):157-165,21.
- [20] 范琳,沈颖昕,严铭铭,等.葛根不同提取物体外抗氧化性及 α -葡萄糖苷酶抑制作用的研究[J].*粮食与油脂*,2021, 34(6):150-154.
- [21] 谢三都,陈惠卿,张颖,等.枳椇子总黄酮提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J].*保鲜与加工*,2021,21(10):56-63.
- [22] MALEK S J, CRESPO J F, CABANILLAS B. Anti-inflammatory effects of flavonoids [J]. *Food Chemistry*, 2019, 299: 125124.
- [23] AGARWAL R, MACMILLAN-CROW L A, RAFFERTY T M, et al. Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice occurs with inhibition of activity and nitration of mitochondrial manganese superoxide dismutase [J]. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2011, 337(1): 110-118.
- [24] COOVER C, MANSOURI A, KNIGHT T R, et al. Peroxynitrite-induced mitochondrial and endonuclease-mediated nuclear DNA damage in acetaminophen hepatotoxicity [J]. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2005, 315(2): 879-87.
- [25] CAO Y H, LIU M, WU S Y, et al. Kupffer cells play a crucial role in monocrotaline-induced liver injury by producing TNF- α [J]. *Toxicology*, 2022, 468: 153101.
- [26] ZHANG J X, YANG Y, HUANG H, et al. TNF- α /TNFR1 regulates the polarization of Kupffer cells to mediate trichloroethylene-induced liver injury [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 230: 113141.
- [27] VAN DE WIER B, KOEK G H, BAST A, et al. The potential of flavonoids in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2017, 57(4): 834-855.
- [28] 张晓文,郑思琪,马应卓,等.洋蓟素对乙酰氨基酚诱导的大鼠药物性肝损伤的影响[J].*中国免疫学杂志*,2020, 36(17):2096-2099.
- [29] KAWASAKI K, OKUDA-HANAFUSA C, AOYAGI M, et al. Inhibitory effect of the compounds from the water extract of *Curcuma longa* on the production of PGE2 and NO in a macrophage cell line stimulated by LPS [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2018, 82(12): 2109-2117.
- [30] 陈园.姜黄提取物、姜黄素对脂多糖诱导人肝癌HepG2细胞炎症因子表达的对比研究[D].长沙:湖南中医药大学,2016.
- [31] 屠梦珏,魏进歌,陈鑫,等.二氢杨梅素对APAP诱导小鼠急性肝损伤的保护作用[J].*中国药理学通报*,2018,34(12): 1707-1712.
- [32] 蒙锦燕,徐百昌,司红彬.葛根素对乙酰氨基酚诱导的急性肝损伤的保护作用研究[J].*中国畜牧兽医*,2022, 49(11):4457-4465.
- [33] 侯景龙,毛跟年,胡媛,等.葛根、枳椇子解酒组合物体外抗氧化活性的研究[J].*动物医学进展*,2020,41(2):63-69.
- [34] 潘钰,夏海华,于冲,等.葛根、姜黄、沙棘提取物复合护肝功效研究[J].*云南中医中药杂志*,2022,43(12):72-76.