

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240510005

水飞蓟复方制剂对急性酒精性肝损伤的保护作用研究

和梦杰¹, 魏 嵘¹, 任吴疆¹, 王亭乔¹, 杨 莹¹, 吕梁彧², 赵 建^{1*}

(1. 北京联合大学生物活性物质与功能食品北京市重点实验室, 北京 100191;

2. 东华大学化学化工与生物工程学院, 上海 201620)

摘 要: **目的** 探究水飞蓟复方制剂对急性酒精性肝损伤小鼠的保护作用。**方法** 将 60 只雄性 KM 小鼠随机分为空白对照组, 模型组, 水飞蓟复方制剂低、中、高剂量组, 共 5 组, 每组 12 只。空白对照组和模型组灌胃相同体积的无菌水, 其余各组灌胃对应的水飞蓟复方制剂溶液, 在灌胃的第 28 d, 除空白对照组外, 其余组小鼠每隔 12 h 灌胃 50% 酒精, 共计 3 次, 诱导小鼠急性酒精性肝损伤模型。采用苏木精-伊红(hematoxylin eosin, HE)染色观察小鼠肝脏病理学变化; 测定小鼠肝脏中丙二醛(malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)、甘油三酯(triglyceride, TG)的含量和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、总超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase, T-SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)的活性, 测定小鼠血清中谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)和谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)的活性以及白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的水平。**结果** HE 染色显示水飞蓟复方制剂组中的肝细胞水肿、气球样变现象得到改善; 与模型组相比, 在水飞蓟复方制剂高剂量组中, GSH 含量显著升高($P<0.05$), 在其中剂量组中, T-SOD、CAT 活性显著升高($P<0.05$), MDA 含量显著降低($P<0.05$); 利用生化分析仪测定水飞蓟复方制剂的转氨酶活性, 发现在其中、高剂量组中的 ALT、AST 活性显著降低($P<0.01$); 酶联免疫吸附(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)法测定各组炎症因子水平, 显示水飞蓟复方制剂低剂量组中的 IL-1 β 水平和中、低剂量组中 TNF- α 水平显著降低($P<0.01$)。**结论** 水飞蓟复方制剂通过提高肝脏的抗氧化能力、降低血液中转氨酶活性、抑制促炎细胞因子的产生, 从而在急性酒精性肝损伤中发挥一定的保护作用, 为相关保健食品的研发应用提供一定价值的数据支持。

关键词: 水飞蓟; 复方制剂; 急性酒精性肝损伤

Research on the protective effects of silymarin compound preparation on acute alcoholic liver injury

HE Meng-Jie¹, WEI Rong¹, REN Wu-Jiang¹, WANG Ting-Qiao¹, YANG Ying¹,
LV Liang-Yu², ZHAO Jian^{1*}

(1. Beijing Key Laboratory of Bioactive Substances and Functional Food, Beijing Union University, Beijing 100191, China; 2. College of Chemistry, Chemical Engineering and Bioengineering of Donghua University, Shanghai 201620, China)

基金项目: 北京市教委 2022 年度分类发展项目

Fund: Supported by the Beijing Municipal Education Commission 2022 Classification Development Project

*通信作者: 赵建, 工程师, 主要研究方向为保健食品功能与安全评价。E-mail: 386681913@qq.com

*Corresponding author: ZHAO Jian, Engineer, Beijing Key Laboratory of Bioactive Substances and Functional Food, Beijing Union University, Beijing 100191, China. E-mail: 386681913@qq.com

ABSTRACT: Objectives To investigate the protective effects of silymarin compound preparation on acute alcoholic liver injury in mice. **Methods** The 60 male KM mice were randomly divided into 5 groups of 12 mice each, including the blank group, model group, silymarin compound preparation low-dose group, medium-dose group, high-dose group. The blank group and model group were gavaged with the same volume of sterile water, and the remaining groups were gavaged with the corresponding silymarin compound preparation solution, on the 28th day of gavage, except for the blank group, the rest of the groups of mice were gavaged with 50% alcohol every 12 h for a total of 3 times to induce the acute alcoholic liver injury model in mice. Hematoxylin eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of mouse liver; the content of malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) and triglyceride (TG) and the activities of glutathione peroxidase (GSH-Px), total superoxide dismutase (T-SOD) and catalase (CAT) in mouse liver were determined, and the activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) as well as the levels of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) levels were determined. **Results** HE staining showed that hepatocyte oedema and balloon-like changes were improved in the group of silymarin compound preparation; compared with the model group, GSH content was significantly higher in the high dose group of silymarin compound preparation ($P<0.05$), and in its middle dose group, the activities of T-SOD and CAT were significantly higher ($P<0.05$), and the content of MDA was significantly lower ($P<0.05$); the levels of transcripts were determined by using a biochemical analyzer to determine the transaminase activity of the silymarin compound preparation, found that in its medium and high dose groups, ALT and AST activity was significantly reduced ($P<0.01$); The level of inflammatory factors in each group was determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) method, showed that the level of IL-1 β in the low dose group of the silymarin compound preparation and the level of TNF- α in the medium and low dose group were significantly reduced ($P<0.01$). **Conclusion** Silymarin compound preparation can play a certain protective role in acute alcoholic liver injury by improving the antioxidant capacity of the liver, reducing the activity of transaminases in the blood, and inhibiting the production of pro-inflammatory cytokines, thus providing some valuable data support for the research and development application of the relevant health food.

KEY WORDS: silymarin; compound preparation; acute alcoholic liver injury

0 引 言

酒精性肝损伤(alcoholic liver disease, ALD)是一种由于大量饮酒导致的肝损伤型疾病^[1]。世界卫生组织(World Health Organization, WHO)提到,每年全球死于不健康饮酒的人数有 300 万, 占有死亡人数的 5.3%^[2]。与一般人群相比,ALD 患者死亡风险增加近 5 倍^[3]。早期阶段, 通常会出现酒精性脂肪肝, 如果没有得到有效治疗, 就会向酒精性肝炎发展, 最终演变成肝纤维化、肝硬化, 甚至更严重的肝细胞癌^[4]。由于 ALD 发病机制复杂, 可能与肝脂质代谢功能障碍、氧化应激以及过度激活的先天免疫信号传导炎症反应有关^[5]。目前, 临床上没有有效的治疗药物和方法, 戒酒、营养疗法、药物疗法和联合疗法等仍为主要治疗途径。此外, 由于人们心理和身体对酒精具有一定的依赖性以及社会人际交往的需要, 人们很难放弃饮酒, 而现代医学治疗需要长期服用的保肝药物存在一定副作用。因此, 亟需发现保肝活性好且副作用较小的天然产物, 并将其转化为具有解酒保肝功效的功能性产品对预防和改善 ALD 具有重要意义。中草药具有多靶点、多途径、低毒性

等优点, 在治疗 ALD 过程中易被大众接受。

水飞蓟[Silybum marianum (L.) Gaertn.]是菊科水飞蓟属一年生或二年生草本植物, 营养成分丰富, 数千年来一直被用于治疗肝病^[6]。从水飞蓟中提取的水飞蓟素有 4 种同分异构体, 分别为水飞蓟宾、异水飞蓟宾、水飞蓟素和异水飞蓟素^[7]。其中, 水飞蓟宾浓度最高, 它可以减少细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生, 维持线粒体膜电位平衡, 调节细胞信号通路以及抑制促炎介质的产生^[8-10]。同样, 作为药食同源植物的灵芝(Ganoderma lucidum)是多孔菌科真菌赤芝或紫芝的干燥子实体, 可以通过清除机体过多的氧自由基, 降低肝脏 ROS 水平, 抑制炎症小体通路相关蛋白的表达及降低促炎细胞因子的水平, 减轻线粒体损伤及抑制凋亡等机制保护肝脏^[11]。药食同源植物姜黄(Curcuma longa L.)是一种具有抗炎活性的药食同源植物, 也是一种良好的肝保护剂, 能通过抑制细胞色素 P450 家族成员 2E1 (cytochrome P450 2E1, CYP2E1)、固醇调节元件结合蛋白-1c (sterol regulatory element binding protein, SREBP-1c)的产生, 升高腺苷酸活化蛋白激酶[adenosine 5'-monophosphate (AMP)-

activated protein kinase, AMPK]、过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator activated receptor α , PPAR- α)、肉碱棕榈酰转移酶 1 (carnitine palmitoyl transferase 1, CPT-1) 水平来调节脂肪酸合成和氧化, 预防小鼠酒精性脂肪肝^[12-13]。丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)是由唇形科植物丹参的根和根茎晒干后制备成的中草药^[14]。从丹参根中提取分离的丹参提取物, 具有多种生物学活性, 可抑制脂质过氧化以及丝裂原活化蛋白激酶、核因子- κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) 和核苷酸结合寡聚结构域 (nucleotide-binding oligomerization domain, leucine-rich repeat and pyrin domain-containing 3, NLRP3) 炎症小体的激活, 起到保护肝细胞的作用^[15-16]。

目前, 有关水飞蓟、灵芝、姜黄、丹参等中草药的提取物单一使用的作用效果已有文献报道^[17-19], 但关于其复方制剂的作用及量效关系的研究鲜有报道。为了探究水飞蓟复方制剂对急性 ALD 的保护作用, 本研究主要从氧化应激、转氨酶活性以及炎症反应等方面探究由水飞蓟、灵芝、姜黄和丹参组成的复方制剂对急性 ALD 小鼠的护肝效果, 为水飞蓟复方制剂在护肝保健食品的研发与应用提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

水飞蓟复方制剂为水飞蓟 90%乙醇提取物+灵芝(水提、药渣 60%乙醇提取)提取物+姜黄 7%乙醇提取物+丹参水提取物组成, 配方中草药由 INDENA S.P.A 提供。

丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒 (批号 20211211)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 试剂盒 (批号 20211203)、总超氧化物歧化酶 (total superoxide dismutase, T-SOD) 试剂盒 (批号 20210110)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 试剂盒 (批号 20220111)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 试剂盒 (批号 20220112)、无毒环保苏木素染液 (批号 20181130)、伊红染液 (批号 20190103) (南京建成生物工程研究所); 谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) 试剂盒 (批号 215632)、谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) 试剂盒 (批号 214041)、甘油三酯 (triglyceride, TG) 试剂盒 (批号 21807) (中生北控生物科技股份有限公司); 白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 试剂盒 (批号 Jan 2022)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 试剂盒 (批号 Jan 2022)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 试剂盒 (批号 Jan 2022) (上海酶联生物科技有限公司)。

1.2 仪器与设备

ASP200 全自动组织脱水机、1150C 组织包埋机、RM2245 组织切片机、ST5010 全自动组织染色机、CV5030

全自动封片机 (德国 Leica 公司); AU480 全自动生化分析仪 (美国 Beckman Coulter 公司); XSP-12CA 生物显微镜 (上海光学仪器一厂)。

1.3 实验动物

60 只雄性昆明属小鼠, SPF 级, 体质量 18~22 g, 6~8 周龄, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司 [许可证号: SCXK(京)2019-0008], 将其饲养于北京联合大学应用文理学院保健食品功能检测中心 SPF 级动物室 [许可证号: SYXK(京)2017-0038], 实验动物伦理委员会意见书编号 20211202。

1.4 急性 ALD 模型建立与给药

60 只雄性 KM 小鼠采用随机数字法随机分为空白对照组、模型组、水飞蓟复方制剂低 (0.118 g/kg BW)、中 (0.235 g/kg BW)、高 (0.705 g/kg BW) 剂量组, 共 5 组, 每组 12 只。受试人体体重按 60 kg 计, 水飞蓟复方制剂的人体推荐剂量 1.41 g/d, 按人体推荐量的 5 倍、10 倍、30 倍设置复方制剂低、中、高 3 个剂量组。空白对照组和模型组灌胃相同体积的无菌水, 其余各组灌胃对应的样品溶液, 灌胃体积为 10 mL/kg BW。在灌胃第 28 d, 除空白对照组外, 其余组小鼠每隔 12 h 灌胃 50% 酒精 (12 mL/kg BW), 共计 3 次, 建立急性 ALD 模型小鼠^[20]。

1.5 实验方法

1.5.1 脏器指数的测定

末次灌胃后禁食不禁水 12 h, 完成各组小鼠的体重的称量, 进行小鼠摘眼球取血后颈椎脱臼处死并解剖, 取肝脏和脾脏, 擦拭掉表面残留的血液和其他组织, 称重, 通过公式 (1)(2) 计算小鼠脏器系数。

$$\text{肝脏指数 (mg/g)} = \frac{\text{肝脏质量 (mg)}}{\text{体质量 (g)}} \quad (1)$$

$$\text{脾脏指数 (mg/g)} = \frac{\text{脾脏质量 (mg)}}{\text{体质量 (g)}} \quad (2)$$

1.5.2 肝组织病理学观察

取同一位置的肝脏组织固定 24 h 后, 经酒精、二甲苯脱水透明, 石蜡包埋, 制成 5 μ m 厚的切片, 进行苏木精-伊红 (hematoxylin eosin, HE) 染色, 通过显微镜观察肝脏病理学变化。

1.5.3 生化指标检测

取一定量的肝脏组织, 制备成不同浓度的组织匀浆, 根据试剂盒操作步骤检测 MDA、GSH、TG 的含量以及 GSH-Px、T-SOD、CAT 的活性。取已解冻的血清, 利用生化分析仪测定小鼠血清中 ALT 和 AST 的活性。根据酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒说明书提示, 测定血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平, 具体操作步骤依据各试剂盒说明书对照进行。

1.6 数据处理

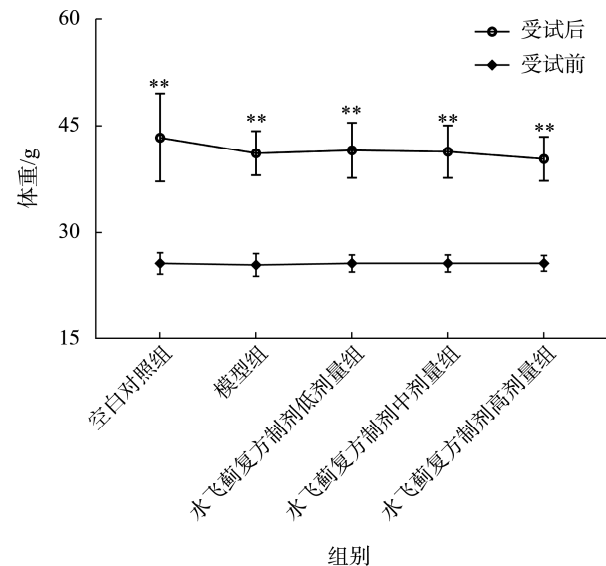
所得数据经采用 SPSS 19.0 统计软件进行显著性分析, 采用独立样本 t 检验比较两组之间的差异, $P < 0.05$ 表示存

在显著性, 结果采用平均值±标准偏差形式表示, 绘图采用 Graphpad Pism 9.5 软件进行。

2 结果与分析

2.1 水飞蓟复方制剂对急性 ALD 小鼠体重的影响

本研究中, 各组之间小鼠体重均无明显差异 ($P>0.05$)。与空白对照组比较, 模型组小鼠体重有所降低 ($P>0.05$); 与模型组比较, 水飞蓟复方制剂各剂量组体重有所升高 ($P>0.05$)。体重是评估小鼠生长状况的重要指标, 这一结果提示随着小鼠的生长, 体重也在增长 ($P<0.01$), 水飞蓟复方制剂灌胃未对小鼠的生长造成影响(图 1)。



注: **表示同组中受试前后具有极显著性差异, $P<0.01$ 。

图1 各组小鼠体重情况

Fig.1 Body weight of mice in each group

2.2 水飞蓟复方制剂对急性 ALD 小鼠脏器系数的影响

本研究中, 与空白对照组相比, 模型组小鼠肝、脾脏器系数有所下降 ($P>0.05$); 与模型组相比, 水飞蓟复方制剂小鼠肝脏器系数有所上升 ($P>0.05$)。脏器系数可以间接反映出受试物对小鼠脏器的影响情况, 这一结果提示水飞蓟复方制剂灌胃未对小鼠肝脏和脾脏功能造成影响(图 2)。

2.3 水飞蓟复方制剂对急性 ALD 小鼠肝脏病理组织学的影响

肝脏脂肪变性是酒精暴露的初始阶段, 大量的脂质堆积会对肝脏造成严重的损伤^[21]。本研究中, 小鼠肝脏 HE 染色结果显示, 空白对照组的肝脏组织结构未见异常, 模型组中的肝细胞严重水肿, 呈气球样变, 并且可见部分肝细胞小灶状坏死并伴有炎细胞浸润。在水飞蓟复方制剂低、中剂量组中, 肝细胞水肿、气球样变随剂量组有所改善,

但仍可见到个别肝细胞点状坏死并伴有炎细胞浸润; 在水飞蓟复方制剂高剂量组中, 肝细胞水肿、气球样变现象得到明显改善, 并且未出现明显炎细胞浸润现象。这一结果提示虽然灌胃酒精对小鼠肝脏组织结构造成了损害, 但在水飞蓟复方制剂高剂量组的帮助下, 酒精导致的肝细胞水肿、气球样变病理状况得到有效改善, 并减轻了炎症症状, 说明水飞蓟复方制剂高剂量组对酒精造成的急性肝损伤具有一定的改善作用(图 3)。

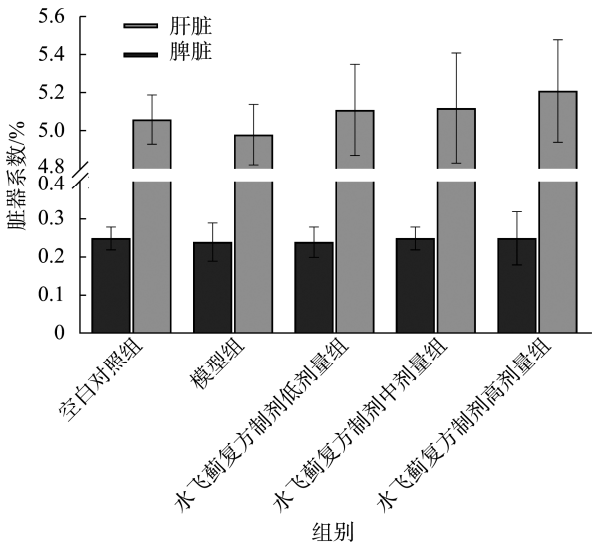
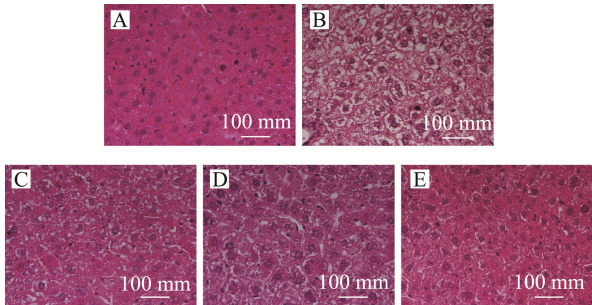


图2 各组小鼠肝、脾脏系数情况

Fig.2 Liver and spleen coefficients of mice in each group



注: A. 空白对照组; B. 模型组; C. 水飞蓟复方制剂低剂量组; D. 水飞蓟复方制剂中剂量组; E. 水飞蓟复方制剂高剂量组。

图3 各组小鼠肝组织HE染色(400×)

Fig.3 HE staining of liver tissues of mice in each group (400×)

2.4 水飞蓟复方制剂对急性 ALD 小鼠肝脏抗氧化指标的影响

机体大量摄入酒精后, 微粒体酶氧化系统会产生大量的 ROS, 消耗脂质抗氧化酶 SOD 和抗氧化物质 GSH, 同时还会大量生成脂质过氧化产物 MDA, 对细胞的细胞膜造成破坏, 引起细胞代谢功能障碍^[22]。GSH 作为机体中常见的自由基清除剂, 能够清除机体新陈代谢过程中产生的 ROS 以及其他有害物质^[23]。GSH、SOD 和 CAT 等指标可

以反映机体的抗氧化能力,间接地反映肝细胞受到的脂质过氧化损害^[24]。据报道,进行急性乙醇灌胃的小鼠,会引起肝脏轻度坏死和肝脏脂肪变性,诱导肝脏 GSH 浓度降低,脂质过氧化水平增加,水飞蓟素的治疗可以有效缓解肝脏 GSH 的下降,增强肝脏 GSH 的生成,减轻急性乙醇诱导的小鼠肝损伤,对小鼠肝脏起到保护作用^[25]。此外,灵芝子实体浓缩胶囊能够明显降低 ALD 小鼠肝组织 MDA 的含量,提高肝组织中 GSH 水平,其保护机制可能与增强机体自由基的清除能力,抑制自由基反应以及抗脂质过氧化相关^[26]。

本研究中,与空白对照组比较,模型组肝组织中 GSH 含量大幅降低($P<0.05$),GSH-Px、T-SOD、CAT 活性明显降低($P<0.05$),并且 MDA 含量大幅升高($P<0.05$)。与模型组比较,水飞蓟复方制剂高剂量组 GSH 含量显著升高($P<0.05$)、T-SOD 活性大幅升高($P<0.05$)、MDA 含量明显下降($P<0.05$);水飞蓟复方制剂低、中剂量组 T-SOD 和 CAT 活性大幅升高($P<0.05$);另外,水飞蓟复方制剂中剂量组 MDA 含量明显下降($P<0.05$)。此外,与模型组比较,水飞蓟复方制剂各剂量组 GSH-Px 的活性也有所升高($P>0.05$)。这一结果提示水飞蓟复方制剂不同程度地逆转了酒精对肝脏的损害,通过降低过氧化产物堆积、肝细胞内 ROS 水平,增强机体自由基的清除能力,促进肝脏抗氧化物质的产生,从而降低酒精对肝脏造成的氧化损伤(表 1)。

2.5 水飞蓟复方制剂对急性 ALD 小鼠肝脏中 TG 含量的影响

TG 是由甘油和长链脂肪酸组成的脂肪分子,也是脂肪酸在细胞内和血浆中储存和运输的主要形式。肝脏是参与人体内酒精和脂肪代谢的主要器官^[27]。酒精进入机体后,在乙醇脱氢酶的作用下,经过脱氢氧化生成大量的乙醛,使三羧酸循环障碍,脂肪酸氧化水平下降,从而促进 TG 的合成^[28]。TG 和胆固醇的过度合成会加速代谢相关脂肪肝中肝脂肪变性^[29]。当 TG 含量过高时,会导致脂肪在肝细胞内沉积,影响肝脏脂代谢,引发脂肪肝等疾病。凌云等^[30]对灵芝孢子油提取物研究时,发现其可以降低 ALD 小鼠肝组织中 TG、MDA 含量,减少肝脏中脂肪的沉

积,显示出较好的护肝作用。

本研究中,与空白对照组比较,急性 ALD 小鼠肝脏中 TG 含量明显升高($P<0.05$)。与模型组比较,水飞蓟复方制剂各剂量组肝脏中 TG 含量有所下降($P>0.05$)。这一结果提示水飞蓟复方制剂能够改善酒精引起的脂质代谢紊乱,具有良好的降脂保肝开发潜力(图 4)。

2.6 水飞蓟复方制剂对急性 ALD 小鼠血清中转氨酶的影响

ALT 和 AST 是两种存在于肝细胞中主要的转氨酶。在机体健康状态下,只有少量的 ALT 和 AST 会释放到血液中。当机体被大量酒精刺激时,酒精会改变肝细胞膜的通透性,大量的 ALT 和 AST 便会通过肝血窦进入血液中,导致血清中 ALT 和 AST 水平急剧升高,因此,常用血液中 ALT 和 AST 的水平评价肝脏的损伤程度^[31]。FENG 等^[32]认为水飞蓟和葛根组合可以降低 ALD 小鼠血液中 ALT、AST 含量。在探究灵芝多糖对 ALD 小鼠肝脏脂肪沉积及减轻炎症的作用效果时,研究人员发现灵芝多糖可以明显降低血液中 AST、ALT 的含量,并且减轻机体炎症的同时还减少了肝脏脂肪沉积,有效减轻了肝组织损伤^[33]。

本研究中,与空白对照组相比,模型组小鼠血清中 ALT、AST 活性显著升高($P<0.01$)。与模型组相比,水飞蓟复方制剂中、高剂量中的 ALT、AST 活性均大幅降低($P<0.01$)。这一结果提示水飞蓟复方制剂降低血清中 ALT、AST 活性的可能机制为其与肝细胞膜蛋白结合,稳定细胞膜的通透性,从而对大量饮酒后引起的急性肝损伤起到一定的保护作用(图 5)。

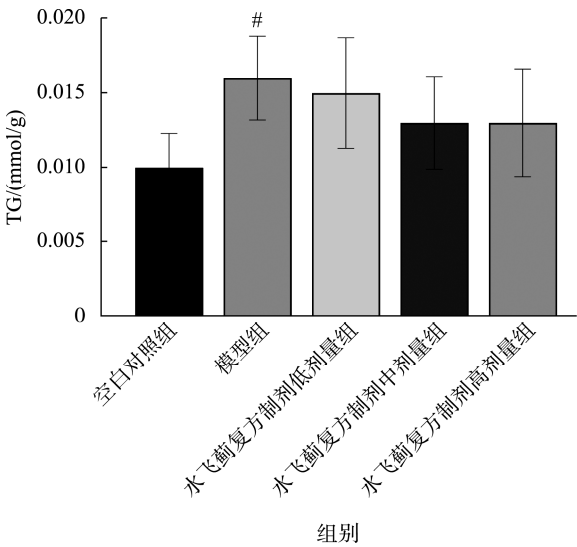
2.7 水飞蓟复方制剂对急性 ALD 小鼠血清中细胞因子水平的影响

酒精的过量摄入会间接激活肝细胞,使其产生 ROS 和一系列促炎细胞因子以及趋化因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6^[34]。促炎因子及炎性介质会进一步导致肝细胞坏死、凋亡,损伤肝脏,并促进肝脏纤维化。CARVALHO 等^[35]的研究结果显示,ALD 发病机制可能与肝脏和全身促炎级联反应的激活有关,大量饮酒可以引起 ALD 患者肝脏中 IL-1 β 水平升高,对肝脏组织和细胞造成损伤。研究发现,

表 1 水飞蓟复方制剂对肝脏抗氧化指标的影响
Table 1 Effects of silymarin compound preparation on antioxidant indexes of the liver

组别	GSH /(mg GSH/mg·prot)	GSH-Px /(U/mg·prot)	T-SOD /(U/mg·prot)	CAT /(U/mg·prot)	MDA /(nmol/mg·prot)
空白对照组	7.98±2.84	393.6±98.1	192.5±49.0	37.78±5.73	0.144±0.029
模型组	5.39±1.05 [#]	288.5±84.1 [#]	141.6±34.7 [#]	28.92±8.44 [#]	0.208±0.045 [#]
水飞蓟复合制剂低剂量组	5.82±1.59	331.0±54.6	195.6±26.4 [*]	47.66±11.39 [*]	0.169±0.039
水飞蓟复合制剂中剂量组	6.35±1.94	304.2±56.3	180.5±16.7 [*]	41.67±10.33 [*]	0.163±0.048 [*]
水飞蓟复合制剂高剂量组	7.49±2.25 [*]	301.5±86.7	177.9±30.8 [*]	36.89±9.72	0.135±0.036 [*]

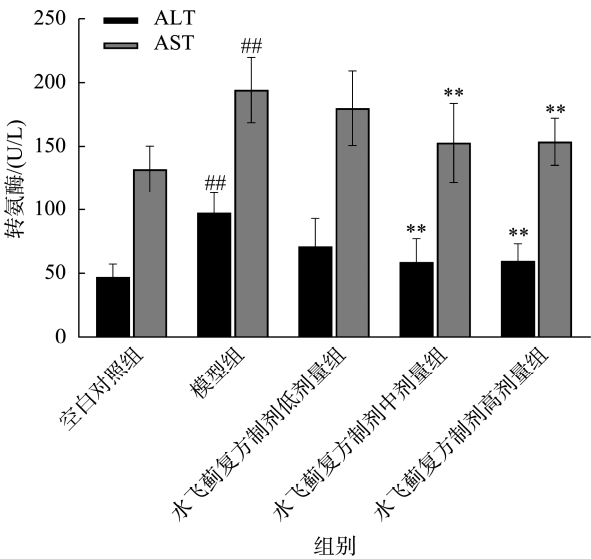
注:与空白对照组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$ 。



注:与空白对照组比较,[#] $P<0.05$ 。

图4 各组小鼠肝脏中TG水平

Fig.4 TG levels in serum of mice in each group



注:与空白对照组比较,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$,图6同。

图5 各组小鼠血清中转氨酶水平

Fig.5 Transaminase levels in serum of mice in each group

龙胆水乙醇提取物能抑制酒精诱导的 Huh-7 细胞内 ROS 的产生和炎症反应,此外,胆水乙醇提取物还能下调肝脏中纤维化标志物和炎症标志物的表达^[36]。

本研究中,与空白对照组相比,模型组血清中的 IL-1 β 、TNF- α 水平明显升高($P<0.01$),说明机体出现了炎症反应。与模型组相比,水飞蓟复方制剂低剂量显著降低了 IL-1 β 、TNF- α 水平($P<0.01$);其中,水飞蓟复方制剂中剂量组也显著降低了 TNF- α 水平($P<0.01$)。这一结果提示除水飞蓟复方制剂高剂量组外,水飞蓟复方制剂能够降低

急性 ALD 小鼠血清中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 水平,缓解大量摄入酒精引起的炎症反应,表现出良好的抗炎作用(图 6)。

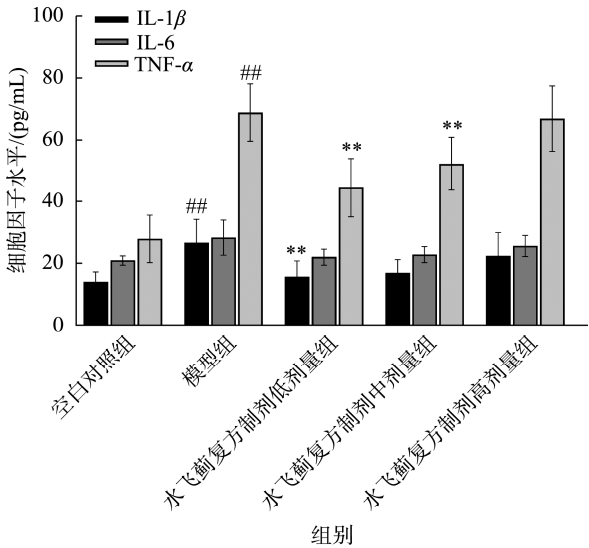


图6 各组小鼠血清中细胞因子水平

Fig.6 Cytokine levels in serum of mice in each group

3 结 论

近年来,急性 ALD 的发病率逐年升高,全球 50%以上的肝病与过度饮酒有关,成为引起肝损伤的重要原因。氧化应激、脂肪代谢紊乱、转氨酶活性异常以及炎症反应等在急性 ALD 中发挥至关重要的作用^[37]。由此推断,水飞蓟复方制剂对急性 ALD 小鼠肝脏的保护机制可能是减轻氧化损伤、调节脂质代谢以及减轻机体炎症反应,从而达到对肝脏的保护作用。

本研究以水飞蓟复方制剂作为研究对象探讨了其对急性 ALD 小鼠的改善作用,并为开发具有护肝、解酒功效的功能性产品奠定了理论和实验基础,也为以水飞蓟、灵芝、姜黄、丹参提取物为有效成分的复方制剂治疗 ALD 的保健食品的研发提供了配伍依据和量效的数据支持,深化了水飞蓟复方制剂在护肝方面的研究,为其应用拓宽了道路,但关于其作用机制的探索尚未进行深入研究,因此,可在后续研究中,增加 Western Blot 实验、实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)及相关通路的检测,从蛋白和 mRNA 水平方面探索其机制,深入阐述水飞蓟复方制剂预防和改善急性 ALD 的作用机制。

参考文献

[1] LAI W, ZHOU S, BAI Y, *et al.* Glucosamine attenuates alcohol-induced acute liver injury via inhibiting oxidative stress and inflammation [J]. Curr

- Res Food Sci, 2024, 8: 100699.
- [2] World Health Organization. Global status report on alcohol and health 2018 [R]. Geneva: WHO, 2018.
 - [3] HAGSTRÖM H, THIELE M, ROELSTRAETE B, *et al.* Mortality in biopsy-proven alcohol-related liver disease: A population-based nationwide cohort study of 3453 patients [J]. Gut, 2021, 70(1): 170–179.
 - [4] LUYAO X, WENHAI G, JIAYING D, *et al.* Hydrogen gas alleviates acute ethanol-induced hepatotoxicity in mice via modulating TLR4/9 innate immune signaling and pyroptosis [J]. Int Immunopharmacol, 2023, 127: 111399.
 - [5] YAN J, NIE Y, LUO M, *et al.* Natural compounds: a potential treatment for alcoholic liver disease? [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 694475.
 - [6] ABENAVOLI L, IZZO AA, MILIĆ N, *et al.* Milk thistle (*Silybum marianum*): A concise overview on its chemistry, pharmacological, and nutraceutical uses in liver diseases: Milk thistle and liver diseases [J]. Phytother Res, 2018, 32(11): 2202–2213.
 - [7] EL-GAZAYERLY ON, MAKHLOUF AIA, SOELM AMA, *et al.* Antioxidant and hepatoprotective effects of silymarin phytosomes compared to milk thistle extract in CCl₄ induced hepatotoxicity in rats [J]. J Microencapsul, 2014, 31(1): 23–30.
 - [8] DING Y, ZHANG S, SUN Z, *et al.* Preclinical validation of silibinin/albumin nanoparticles as an applicable system against acute liver injury [J]. Acta Biomater, 2022, 146: 385–395.
 - [9] FEDERICO A, DALLIO M, LOGUERCIO C. Silymarin/silybin and chronic liver disease: A marriage of many years [J]. Molecules, 2017, 22(2): 191.
 - [10] BIJAK M. Silybin, a major bioactive component of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.)-chemistry, bioavailability, and metabolism [J]. Molecules, 2017, 22(11): 1942.
 - [11] 刘洋, 韩忠明, 张瑞, 等. 灵芝保肝作用的研究进展[J]. 特产研究, 2023, 45(6): 159–165.
LIU Y, HAN ZM, ZHANG R, *et al.* Research progress on the hepatoprotective effect of *Ganoderma lucidum* [J]. Spec Wild Economic Anim Plant Res, 2023, 45(6): 159–165.
 - [12] 许龙, 郑丽君, 马海然, 等. 葛根姜黄复合物解酒护肝效果[J]. 食品工业, 2023, 44(3): 164–168.
XU M, ZHENG LJ, MA HR, *et al.* The effect of the compound of pueraria and turmeric to relieve hangover and protect liver [J]. Food Ind, 2023, 44(3): 164–168.
 - [13] LEE HY, LEE GH, HOANG TH, *et al.* Turmeric extract (*Curcuma longa* L.) regulates hepatic toxicity in a single ethanol binge rat model [J]. Heliyon, 2022, 8(9): e10737.
 - [14] 谭靛, 李珊平, 吴梦茹, 等. 丹参注射液对小鼠急性酒精性肝损伤保护作用研究[J]. 现代医药卫生, 2013, 29(15): 2276–2277.
TAN L, LI SP, WU MR, *et al.* Study on protective effects of Danshen injection on acute ethanol-induced liver injury in rats [J]. J Mod Med Health, 2013, 29(15): 2276–2277.
 - [15] LIU H, ZHAN X, XU G, *et al.* Cryptotanshinone specifically suppresses NLRP3 inflammasome activation and protects against inflammasome-mediated diseases [J]. Pharmacol Res, 2021, 164: 105384.
 - [16] YIN HQ, CHOI YJ, KIM YC, *et al.* *Salvia miltiorrhiza* Bunge and its active component cryptotanshinone protects primary cultured rat hepatocytes from acute ethanol-induced cytotoxicity and fatty infiltration [J]. Food Chem Toxicol, 2009, 47(1): 98–103.
 - [17] LI X, LIU Y, YUE W, *et al.* A compound of Chinese herbs protects against alcoholic liver fibrosis in rats via the TGF- β 1/smad signaling pathway [J]. Evid Based Compl Alternat Med, 2019, 2019: 1–11.
 - [18] 刘甜甜, 杨舒涵, 颜梅, 等. 柠檬提取物和水飞蓟素对大鼠急性酒精性肝损伤的保护作用研究[J]. 西南医科大学学报, 2021, 44(2): 105–109.
LIU TT, YANG SH, YAN M, *et al.* Protective effects of lemon extract and silymarin against acute alcoholic liver injury in rats [J]. J Southwest Med Univ, 2021, 44(2): 105–109.
 - [19] 潘钰, 于冲, 夏海华, 等. 葛根素、姜黄素、沙棘黄酮复合物对乙醇致小鼠肝损伤的保护作用[J]. 黑龙江科学, 2020, 11(6): 4–7.
PAN Y, YU C, XIA HH, *et al.* Liver protective effect of puerarin, curcumin and seabuckthorn flavonoids on liver injury induced by ethanol in mice [J]. Heilongjiang Sci, 2020, 11(6): 4–7.
 - [20] WANG D, LV J, FU Y, *et al.* Optimization of microwave-assisted extraction process of total flavonoids from *Salicornia bigelovii* Torr. and its hepatoprotective effect on alcoholic liver injury mice [J]. Foods, 2024, 13(5): 647.
 - [21] LIU R, MO C, WEI X, *et al.* Hepatoprotective effect of *Annulohypoxylon sygium* melanin on acute alcoholic liver injury in mice [Z]. 2024.
 - [22] NENCINI C, GIORGI G, MICHELI L. Protective effect of silymarin on oxidative stress in rat brain [J]. Phytomedicine, 2007, 14(2-3): 129–135.
 - [23] 王书庆, 刘烨, 徐思, 等. 葛根素联合美他多辛对急性酒精性肝损伤的保护作用研究[J]. 现代医院, 2020, 20(12): 1838–1840, 1844.
WANG SQ, LIU Y, XU S, *et al.* Study on the protective effect of puerarin combined with metadoxin on acute alcoholic liver injury [J]. Mod Hosp, 2020, 20(12): 1838–1840, 1844.
 - [24] YUAN R, TAO X, LIANG S, *et al.* Protective effect of acidic polysaccharide from *Schisandra chinensis* on acute ethanol-induced liver injury through reducing CYP2E1-dependent oxidative stress [J]. Biomed Pharm, 2018, 99: 537–542.
 - [25] SONG Z, DEACIUC I, SONG M, *et al.* Silymarin protects against acute ethanol-induced hepatotoxicity in mice [J]. Alcohol Clin Exp Res, 2006, 30(3): 407–413.
 - [26] 陈岷, 唐艳斌, 朴玮, 等. 灵芝子实体浓缩胶囊对小鼠急性酒精性肝损伤的保护作用[J]. 中国食物与营养, 2019, 25(2): 54–58.
CHEN D, TANG YB, PIAO W, *et al.* Protective effect of *Ganoderma* fruit body concentrated capsule on acute alcoholic liver injury in mice [J]. Food Nutr China, 2019, 25(2): 54–58.
 - [27] 张兴敏, 黄月昌, 陈柏忠, 等. 陈皮酵素对小鼠酒精性肝损伤及肠道菌群的调节作用[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(8): 85–95.
ZHANG XM, HUANG YC, CHEN BZ, *et al.* Regulatory effect of *Pericarpium citri reticulatae* fermentation liquor on alcoholic liver disease and gut microbiota in mice [J]. J Food Saf Qual, 2024, 15(8): 85–95.
 - [28] SONG H, SONG C, YAN C, *et al.* Sea cucumber polysaccharide from *Stichopus japonicus* and its photocatalytic degradation product alleviate acute alcoholic liver injury in mice [J]. Foods, 2024, 13(6): 963.
 - [29] XIA Q, LU F, CHEN Y, *et al.* 6-Gingerol regulates triglyceride and cholesterol biosynthesis to improve hepatic steatosis in MAFLD by activating the AMPK-SREBPs signaling pathway [J]. Biomed Pharm, 2023, 170: 116060.
 - [30] 金凌云, 黄祥增, 吴长辉, 等. 灵芝孢子油提取物复合制剂对酒精性肝损伤的保护作用[J]. 中国食用菌, 2016, 35(6): 34–37.

- JIN LY, HUANG YZ, WU CH, *et al.* Effects of *Ganoderma lucidum* spore oil and extract complex preparation on mice with alcoholic liver injury [J]. *Edible Fungi China*, 2016, 35(6): 34–37.
- [31] LI Y, WANG H, LENG X, *et al.* Polysaccharides from *Eucommia ulmoides* Oliv. leaves alleviate acute alcoholic liver injury by modulating the microbiota-gut-liver axis in mice [J]. *Foods*, 2024, 13(7): 1089.
- [32] FENG R, CHEN JH, LIU CH, *et al.* A combination of *Pueraria lobata* and *Silybum marianum* protects against alcoholic liver disease in mice [J]. *Phytomedicine*, 2019, 58: 152824.
- [33] 孙艳辉, 张宏波. 灵芝多糖对急性酒精性肝损伤小鼠肝脏脂肪沉积及 NLRP3 炎性小体表达的影响[J]. *世界中医药*, 2020, 15(6): 842–845.
- SUN YH, ZHANG HB. Effects of *Ganoderma* polysaccharide on liver fat deposits and NLRP3 inflammatory corpuscle expression of mice with acute liver injury [J]. *World Chin Med*, 2020, 15(6): 842–845.
- [34] 胡光民, 张磊, 刘向国, 等. 新型姜黄素对小鼠急性酒精性肝损伤预防和保护作用[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2017, 19(11): 29–31.
- HU GM, ZHANG L, LIU XG, *et al.* Preventive and protective effects of curcumin on with acute alcoholic liver injury [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*, 2017, 19(11): 29–31.
- [35] CARVALHO RM, SZABO G. Role of the inflammasome in liver disease [J]. *Annu Rev Pathol*, 2022, 17: 345–365.
- [36] CHOUBEY P, SHARMA V, JOSHI R, *et al.* Hydroethanolic extract of *Gentiana kurroo* royle rhizome ameliorates ethanol-induced liver injury by reducing oxidative stress, inflammation and fibrogenesis in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 325: 117866.
- [37] SHEN Y, ZHAO Y, ZHONG C, *et al.* Primary study on the effects and mechanisms of separate and combined decoctions of *Scutellaria baicalensis* Georgi-*Coptis chinensis* Franch extracts in relieving acute alcoholic liver injury in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 324: 117790.

(责任编辑: 于梦娇 韩晓红)

作者简介



和梦杰, 硕士研究生, 主要研究方向为天然活性物质的功效研究。
E-mail: 1824206294@qq.com



赵 建, 工程师, 主要研究方向为保健食品功能与安全评价。
E-mail: 386681913@qq.com