

网络出版时间: 2020-12-10 14:22 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20201208.0842.003.html>

芦笋及其不同萃取物对 CCl_4 致急性肝损伤的保护作用的比较

胡亚敏^{1,2}, 李跨越^{1,2}, 刘 兰³, 杜 娜^{1,2}, 潘学胜^{1,2}, 朱月琴^{1,2}, 程文明¹, 吴 丽⁴, 黄 艳^{1,2}

摘要 目的 探讨瓯峰芦笋 95% 乙醇提取物(ETOH) 及其不同组分对四氯化碳(CCl_4) 致小鼠急性肝损伤的预防功效差异。方法 以 CCl_4 致急性肝损伤小鼠模型评价芦笋 ETOH 及各萃取物[石油醚萃取物(PE), 乙酸乙酯萃取物(EE), 正丁醇萃取物(BE)] 药效, 检测小鼠血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆汁酸(TBA) 及肝组织丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD) 的水平, 观察各组小鼠肝脏病理变化, 确证药效部位, 进一步分离并评价药效及分析相关成分。结果 芦笋 ETOH 及 BE 能改善模型小鼠的血清 AST、ALT、TBA 及肝组织 MDA 和 SOD 水平($P < 0.05$); 减轻肝脏病理损伤, 且 BE 效果优于 ETOH。BE 进一步纯化得梯度乙醇洗脱物[50% 乙醇洗脱物(BEA), 50% 乙醇洗脱物(BEB), 70% 乙醇洗脱物(BEC), 90% 乙醇洗脱物(BED)], 药效学评价结果表明 BEA 显著改善模型小鼠的血清 AST、ALT、TBA 及肝组织 MDA 和 SOD 水平($P < 0.05$), 且 BEA 中酚酸和黄酮类物质含量较高。结论

瓯峰芦笋 ETOH、BE、BEA 具有预防 CCl_4 所致急性肝损伤作用, 且以 BEA 效果最好, 这可能与 BEA 中黄酮及酚酸类物质的富集有关。

关键词 芦笋; 肝损伤; 小鼠; 保肝; 四氯化碳

中图分类号 R 281; R 281.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)01-0011-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.01.003

芦笋, 学名石刁柏(*Asparagus officinalis* L.), 天门冬属百合科植物, 药食同源且营养价值丰富, 区别于传统药用植物如何首乌、雷公藤^[1] 等的大毒特性, 芦笋的安全性高。动物实验证明芦笋具有免疫调节^[2]、降糖降脂^[3-4]、抗氧化^[5] 等作用, 鲜榨芦笋

汁具有保肝效果。临床试验确证芦笋胶囊^[6] 可治疗灼口综合征, 芦笋口服液^[7] 可用于癌症辅助治疗。由于芦笋品种及选育年份的差异, 其包含的活性物质含量和种类也存在差异, 且我国自主研发品种瓯峰芦笋尚未有关于保肝药效的相关研究, 故该文以芦笋新品种瓯峰芦笋为研究对象, 以常用保肝药物活性评价^[8-9] 的 CCl_4 诱导的急性肝损伤模型来探讨新品种芦笋制备的提取物是否具有预防 CCl_4 所致急性肝损伤作用及相应的药效部位, 以期为该品种芦笋作为保肝天然产物的开发及保肝药物的添加剂提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级健康昆明小鼠, 体质量(25 ± 2) g, 雄性, 由安徽医科大学动物实验中心提供, 动物房标准饲养条件下饲养。所有实验操作方案经安徽医科大学动物伦理委员会批准。

1.2 主要仪器与材料 提取罐购自上海顺仪厂; 旋转蒸发仪购自德国 IKA 公司; 全自动生化分析仪购自深圳 Mindray 公司; 酶标仪购自美国 Thermo 公司; AB-8 树脂购自东鸿化工有限公司。芦笋干品由江西瓯峰有机芦笋实验基地于 2018 年 5 月提供。

1.3 主要试剂 95% 乙醇、无水乙醇、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇(国产分析纯); 联苯双酯、橄榄油、 CCl_4 购自合肥拜尔迪公司; 丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST) 测定试剂盒购自深圳 Mindray 公司; 丙二醛(malondialdehyde, MDA) 试剂盒、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD) 试剂盒及总胆汁酸(total bile acid, TBA) 试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.4 方法

1.4.1 芦笋全方和不同极性提取部位的制备 取芦笋干品 20 kg 纱布包裹, 提取罐中以 10 倍量的 95% 乙醇 60 °C 条件下加热回流提取 3 h, 回流液蒸发至干, 重复操作 2 次, 得浸膏 2.7 kg, 取少量浸膏冷冻干燥制得芦笋冻干粉样品。剩余芦笋浸膏, 适量水分散, 依次用等体积石油醚、乙酸乙酯、正丁醇

2020-09-12 接收

基金项目: 安徽省高校自然科学基金项目(编号: KJ2017A192); 安徽医科大学基础与临床合作研究提升计划项目(编号: 2019xkjT015); 安徽医科大学青年拔尖人才计划支持项目(编号: 校人字(2014)70 号); 安徽医科大学青年英才双培工程资助项目(编号: 党组字(2018)22 号)

作者单位: 安徽医科大学¹ 药学院, ² 抗炎免疫药物教育部重点实验室, 合肥 230032

³ 安徽医科大学附属阜阳医院药剂科, 阜阳 236000

⁴ 南京中医药大学药学院, 南京 210029

作者简介: 胡亚敏, 女, 硕士研究生;

黄 艳, 女, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: aydhy@

126.com

各萃取3次,收集各有机溶剂层及剩余水层,溶剂蒸干得相应部位浸膏并冷冻干燥。分别获得石油醚部位浸膏[得率(质量分数)5.47%]、乙酸乙酯部位浸膏(得率1.05%)、正丁醇部位浸膏(得率4.68%)。正丁醇部位采用AB-8树脂进行30%乙醇、50%乙醇、70%乙醇、90%乙醇梯度冲洗,蒸干,冷冻干燥得到相应洗脱物。得率分别是2.36%、1.25%、0.52%、0.21%。

1.4.2 动物灌胃药液的制备 称取芦笋全方冻干粉和各部位冻干粉适量,用蒸馏水加热超声助溶,配制成芦笋提取物全方和不同提取部位药液,用于动物给药。最终配得95%乙醇提取物(extract of the ethanol, ETOH) (40 mg/ml)、石油醚萃取物(petroleum ether extract, PE) (20 mg/ml)、乙酸乙酯萃取物(ethyl acetate extract, EE) (20 mg/ml)、正丁醇萃取物(butanol extract, BE) (20 mg/ml)、30%乙醇洗脱物(30% ethanol eluate of butanol extract, BEA) (10 mg/ml)、50%乙醇洗脱物(50% ethanol eluate of butanol extract, BEB) (10 mg/ml)、70%乙醇洗脱物(70% ethanol eluate of butanol extract, BEC) (10 mg/ml)、90%乙醇洗脱物(90% ethanol eluate of butanol extract, BED) (10 mg/ml)。

1.4.3 动物分组、造模及给药

1.4.3.1 芦笋 ETOH 及其萃取物实验分组 SPF级KM小鼠42只,随机分为正常组、模型组、芦笋 ETOH 给药组及其3个萃取物组(PE给药组、EE给药组、BE给药组)、阳性对照组(联苯双酯)。芦笋各给药组(ETOH、PE、EE、BE)和阳性对照组灌胃给药,每天1次,连续给药7d,正常组小鼠和模型组小鼠给予等体积双蒸水。末次给药2h后,除正常组外,其余各组小鼠均腹腔注射0.25% CCl₄ (0.1 ml/10 g) 溶液制备急性肝损伤模型,正常组小鼠腹腔注射等体积的橄榄油。

1.4.3.2 芦笋正丁醇提取物及其梯度乙醇洗脱物实验分组 SPF级KM小鼠48只,随机分为正常组、CCl₄ 模型组、BE给药组、4个芦笋正丁醇萃取不同洗脱物组[30%乙醇洗脱物(BEA)给药组、50%乙醇洗脱物(BEB)给药组、70%乙醇洗脱物(BEC)给药组、90%乙醇洗脱物(BED)给药组]、阳性对照组(联苯双酯)。小鼠处理方法同1.4.3.1。

1.4.4 血清及肝组织的采集 造模后小鼠禁食不禁水16h,眼眶取血,分离血清,置于-80℃冰箱保存,用于检测血清AST、ALT以及TBA;小鼠采血后颈椎脱臼处死,75%乙醇消毒后,取肝脏标本,经

0.9%氯化钠溶液漂洗后,剩余部分滤纸吸干,迅速冻于-80℃冰箱,用于肝组织SOD、MDA含量的测定。

1.4.5 血清生化指标的测定 经眼眶取血,4℃静置2h,以3000 r/min离心20 min分离血清,按照试剂盒使用说明测定肝脏AST、ALT及TBA含量。

1.4.6 肝组织匀浆生化指标的测定 剪取肝组织0.1 g,0.9%氯化钠溶液漂洗,滤纸吸干,置于2 ml离心管,加入9倍0.9%氯化钠溶液,匀浆机打碎,离心30 min(12000 r/min,4℃),取上清液,按照试剂盒使用说明,测定肝组织中MDA和SOD含量。

1.4.7 肝组织病理形态学观察 眼眶采血后颈椎脱臼处死小鼠,迅速解剖,取出肝脏,取每个样本相同位置的新鲜肝右叶,0.9%氯化钠溶液漂洗,去除胆囊,浸入4%多聚甲醛中固定过夜,经脱水、透明、浸蜡、包埋制备石蜡切片,切片脱蜡至水,经苏木精-伊红染色,流水冲洗,透明,封片。染色结果置于显微镜下观察并采集图像。

1.4.8 抗氧化物质成分分析 根据文献方法对芦笋已报道的抗氧化物质如酚酸类、黄酮类物质进行检测。

1.4.8.1 没食子酸标准曲线的绘制 称取33.5 mg没食子酸粉末溶于5 ml双蒸水制备没食子酸标准品溶液;取0.3 ml没食子酸标准品溶液加双蒸水至9.095 ml,得母液浓度0.221 mg/ml。分别取适量没食子酸母液0.075、0.150、0.225、0.300、0.375、0.450、0.525、0.600 ml于试管并加双蒸水至0.75 ml,各试管分别加入0.1 mol/L FeCl₃ 溶液0.15 ml、0.008 μmol/L K₃Fe(CN)₆ 溶液0.15 ml、0.1 mol/L HCl 溶液0.15 ml,双蒸水补足至7.5 ml,摇晃混匀,于波长760 nm条件下测量吸光度。以吸光度(A)为纵坐标,没食子酸浓度为横坐标绘制标准曲线。并配置不同浓度的供试品,使其吸光度范围在标准曲线范围内。

1.4.8.2 芦丁标准曲线的绘制 取20 mg芦丁粉末溶于40 ml 70%乙醇,摇匀制备芦丁标准品溶液;取芦丁标准品溶液3 ml稀释至7.5 ml,得母液浓度0.2 mg/ml。分别取芦丁母液0.3、0.6、0.9、1.2、1.5、1.8 ml于10 ml试管,加70%乙醇至1.8 ml,加入5% NaNO₃ 溶液0.3 ml,摇匀静置6 min后,再加入10% Al(NO₃)₃ 溶液0.3 ml,摇匀静置6 min,加入4% NaOH 溶液3 ml,最后补加70%乙醇至7.5 ml,摇晃混匀,于波长510 nm条件下测量吸光度。以吸光度值为纵坐标,芦丁浓度为横坐标,绘制标

准曲线。并配置不同浓度的供试品,使其吸光度范围在标准曲线范围内。

1.5 统计学处理 采用 Graphpad Prism 7 软件进行统计分析,多组数据差异比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 芦笋 ETOH 及其萃取物(PE、EE、BE)对急性肝损伤小鼠血清 AST、ALT 活性的影响 与正常组相比,模型组小鼠血清 AST ($F = 54.93$, $P < 0.001$)、ALT ($F = 32.41$, $P < 0.001$) 升高,结果提示造模成功。与模型组相比,PE 和 EE 给药组小鼠血清 AST、ALT 无统计学差异,联苯双酯可降低模型小鼠血清 AST、ALT 水平($P < 0.001$); ETOH 和 BE 给药组降低 CCl_4 诱导的肝损伤小鼠的血清 AST、ALT 表达水平($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 1。

表 1 芦笋 ETOH 及其萃取物(PE、EE、BE)对 CCl_4 致急性肝损伤小鼠的血清 AST、ALT 活性的影响($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg/kg)	AST (U/L)	ALT (U/L)
正常	-	11.95 ± 3.27	21.93 ± 6.18
模型	-	280.53 ± 26.29 ^{###}	302.04 ± 56.04 ^{###}
PE 给药(200 mg/kg)	200	311.17 ± 50.38	344.72 ± 52.49
EE 给药(200 mg/kg)	200	252.79 ± 22.65	261.93 ± 46.36
BE 给药(200 mg/kg)	200	210.03 ± 25.77 ^{**}	201.65 ± 31.00 ^{**}
ETOH 给药(400 mg/kg)	400	227.00 ± 30.76 [*]	231.10 ± 32.23 [*]
联苯双酯(100 mg/kg)	100	192.00 ± 26.95 ^{***}	183.60 ± 40.31 ^{***}

与正常组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$

2.2 芦笋 ETOH 及其三组萃取物(PE、EE、BE)对急性肝损伤小鼠血清 TBA 以及肝匀浆 MDA、SOD 表达水平的影响 与正常组相比,模型组小鼠血清 TBA 含量升高($F = 15.8$, $P < 0.001$),肝组织匀浆

MDA ($F = 15.83$, $P < 0.001$) 表达水平显著升高, SOD 含量显著下降($F = 22.59$, $P < 0.001$),以上结果提示造模成功;与模型组相比,PE 和 EE 给药组小鼠血清 TBA 及肝组织 MDA、SOD 含量差异无统计学意义;联苯双酯降低模型小鼠血清 TBA 含量($P < 0.001$),降低小鼠肝组织 MDA 和提高 SOD 表达水平($P < 0.001$); ETOH 和 BE 给药组降低 CCl_4 诱导的肝损伤小鼠的血清 TBA 以及肝组织 MDA 表达水平,升高模型小鼠肝组织 SOD 表达水平($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图 1。

2.3 芦笋 ETOH 及其三组萃取物(PE、EE、BE)对急性肝损伤小鼠肝脏病理变化的影响 HE 染色结果显示正常组肝细胞结构完整,排列紧密,肝索结构完整,细胞核质界限较为清晰,未见肝细胞坏死等病理改变。模型组肝细胞结构不完整,肝组织呈现大范围的溃烂,灶状坏死; PE 和 EE 给药组呈现大范围灶状坏死区域以及炎性细胞浸润;与模型组相比, BE、ETOH、联苯双酯给药组灶状坏死区域面积明显减少且炎性细胞浸润状况较轻。见图 2。

2.4 BE 及其各梯度乙醇洗脱物(BEA、BEB、BEC、BED)对 CCl_4 致急性肝损伤小鼠的血清 AST 和 ALT 酶活力的影响 与正常组相比,模型组小鼠血清 AST 酶水平升高($F = 23.17$, $P < 0.001$), ALT 酶活力上调($F = 33.59$, $P < 0.001$),结果说明造模成功。与模型组相比,联苯双酯、BE 和 BEA 给药组降低 CCl_4 诱导的肝损伤小鼠的血清 AST、ALT 酶活力($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)且 BEA 给药组较 BE 组效果显著,而 BEB、BEC 和 BED 三组未显示出统计学差异。见表 2。

2.5 BE 及其各梯度乙醇洗脱物对 CCl_4 致急性肝损伤小鼠的血清 TBA 以及肝匀浆 MDA、SOD 表达水平的影响 与正常组相比,模型组小鼠血清 TBA 含量升高($F = 10.03$, $P < 0.001$),肝组织 MDA 水

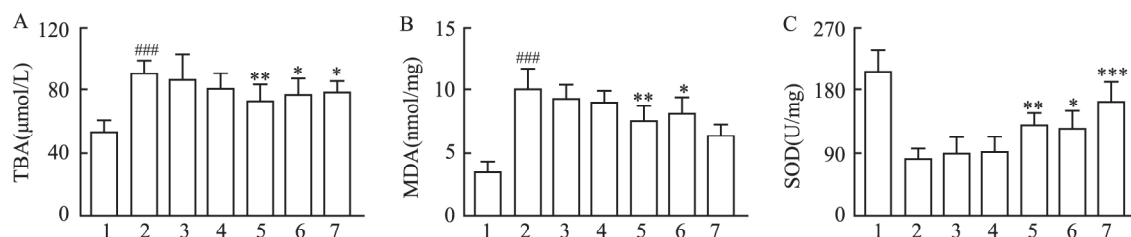


图 1 芦笋 ETOH 及其萃取物(PE、EE、BE)对急性肝损伤小鼠血清 TBA 以及肝匀浆 MDA、SOD 表达水平的影响

A: 对急性肝损伤小鼠血清 TBA 含量的影响; B: 对急性肝损伤小鼠肝匀浆 MDA 含量的影响; C: 对急性肝损伤小鼠肝匀浆 SOD 含量的影响; 1: 正常组; 2: 模型组; 3: PE 给药组(200 mg/kg); 4: EE 给药组(200 mg/kg); 5: BE 给药组(200 mg/kg); 6: ETOH 给药组(400 mg/kg); 7: 联苯双酯给药组(100 mg/kg); 与正常组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$

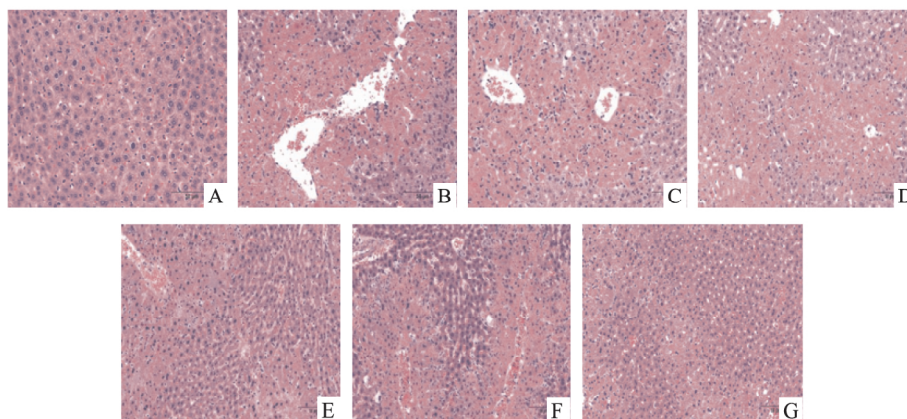


图2 ETOH及三组萃取物给药组小鼠的病理变化 HE ×400

A: 正常组; B: 模型组; C: PE 组; D: EE 组; E: BE 组; F: ETOH 组; G: 联苯双酯组

表2 BE及其各梯度乙醇洗脱物对CCl₄致急性肝损伤小鼠的血清AST、ALT酶活力的影响($n=6, \bar{x} \pm s$)

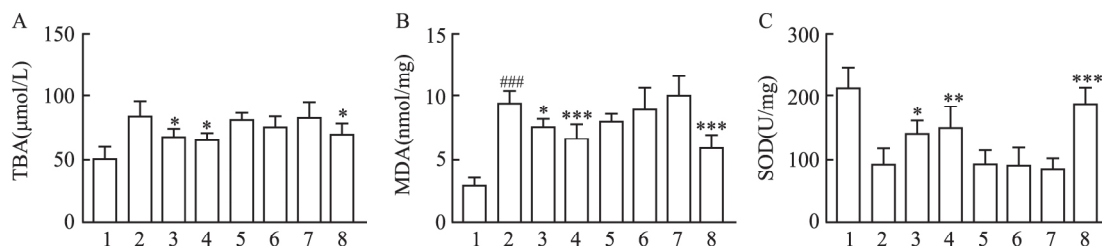
组别	剂量 (mg/kg)	AST (U/L)	ALT (U/L)
正常	-	18.21 ± 3.86	18.58 ± 6.95
模型	-	172.95 ± 25.67 ^{###}	188.87 ± 24.25 ^{###}
BE 给药(200 mg/kg)	200	125.10 ± 23.76 [*]	137.09 ± 22.05 [*]
BEA 给药(100 mg/kg)	100	106.20 ± 18.53 ^{**}	110.10 ± 17.49 ^{**}
BEB 给药(100 mg/kg)	100	146.03 ± 24.03	185.55 ± 25.87
BEC 给药(100 mg/kg)	100	175.45 ± 35.55	206.52 ± 34.50
BED 给药(100 mg/kg)	100	146.10 ± 34.71	220.07 ± 35.77
联苯双酯(100 mg/kg)	100	107.03 ± 14.08 ^{**}	125.27 ± 19.85 ^{**}

与正常组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$

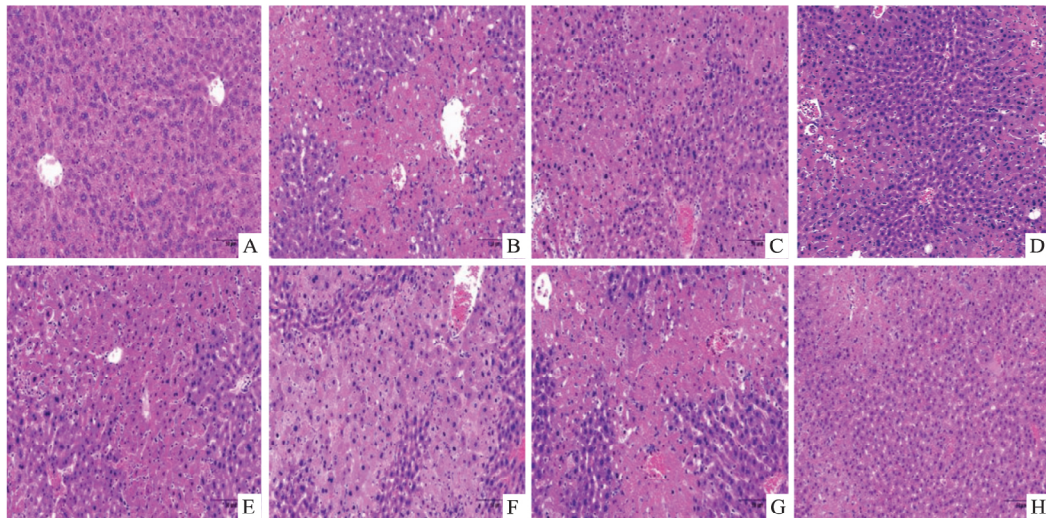
平升高($F = 24.65$, $P < 0.001$), SOD 活力下降($F = 21.07$, $P < 0.001$), 结果表明造模成功; 与模型组相比, BEB、BEC、BED 三个给药组小鼠血清 TBA 含量及肝组织 MDA、SOD 含量未显示统计学差异; 阳性药联苯双酯降低小鼠血清 TBA 及肝组织 MDA, 升高 SOD 含量($P < 0.05$, $P < 0.001$); BE、BEA 给药组小鼠血清 TBA 及肝组织 MDA、SOD 与模型组相比差异显著($P < 0.05$) 且 BEA 给药组较 BE 给药组差异更大。见图 3。

2.6 BE 及其各梯度乙醇洗脱物对 CCl₄ 致急性肝损伤小鼠肝脏病理变化的影响 由病理切片可知, 正常组肝细胞结构完整, 排列紧密, 肝索结构完整, 肝细胞核质较分明; 模型组肝细胞结构不完整, 肝组织呈现大范围的灶状坏死以及炎性细胞浸润并伴随脂肪空泡; 与模型组相比, BEB、BEC、BED 三个给药组肝脏病理组织呈现大范围灶状坏死区域, 无明显区别; BE、BEA 给药组及联苯双酯给药组灶状坏死区域面积减少, 肝细胞排列相对完整紧密。见图 4。

2.7 有效部位的成分分析 酚酸类物质以没食子酸为标准, 没食子酸标准浓度在 0.021 1 ~ 0.126 6 之间与吸光度成线性, ETOH、BE 及 BEA 在浓度分别为 6.7、6.7、0.872 mg/ml 时吸光度在标准曲线范围内, 结果测得 ETOH 和 BE 及 BEA 中酚酸浓度分别为 1.38%、1.39%、7.23%。见表 3、4 及图 5。黄酮类化合物以芦丁为标准得芦丁浓度在 0.2 ~ 1.2 mg/ml 之间与吸光度成正比, ETOH、BE 及 BEA 在浓度为 5 mg/ml 时, 吸光度在标准曲线范围内, 结果测得 ETOH、BE 及 BEA 黄酮类化合物浓度分别为 5.20%、7.06%、13.80%。见表 5、表 6、图 6。

图3 BE及其各梯度乙醇洗脱物对CCl₄致急性肝损伤小鼠的血清TBA以及肝组织匀浆MDA和SOD含量变化的影响

A: 小鼠血清 TBA 含量的变化; B: 小鼠肝匀浆 MDA 含量的变化; C: 小鼠肝匀浆 SOD 含量的变化; 1: 正常组; 2: 模型组; 3: BE 给药组(200 mg/kg); 4: BEA 给药组(100 mg/kg); 5: BEB 给药组(100 mg/kg); 6: BEC 给药组(100 mg/kg); 7: BED 给药组(100 mg/kg); 8: 联苯双酯组(100 mg/kg); 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$; 与正常组比较: ^{###} $P < 0.001$

图4 BE及BEA、BEB、BEC、BED对CCl₄致小鼠急性肝损伤的病理影响 HE×400

A: 正常组; B: 模型组; C: BE 给药组; D: BEA 给药组; E: BEB 给药组; F: BEC 给药组; G: BED 给药组; H: 联苯双酯组

表3 没食子酸标准曲线浓度

没食子酸溶液编号	浓度(mg/ml)	吸光度值
1	0.021 1	0.138 3
2	0.042 2	0.254 7
3	0.063 3	0.397 9
4	0.063 3	0.512 1
5	0.105 5	0.643 9
6	0.126 6	0.795 4

表4 ETOH、BE、BEA 三类样品中没食子酸测定浓度及含量

组别	样品浓度(mg/ml)	吸光度值	酚酸含量(%)
ETOH	6.7	0.567 9	1.38
BE	6.7	0.572 8	1.39
BEA	0.872	0.389 3	7.23

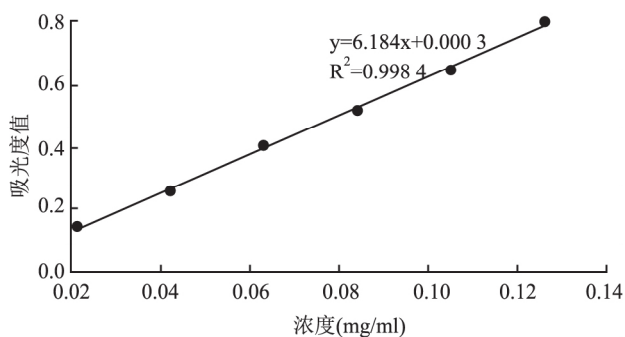


图5 没食子酸标准曲线

表5 芦丁标准曲线浓度

芦丁溶液编号	浓度(mg/ml)	吸光度值
1	0.2	0.075 1
2	0.4	0.156 9
3	0.6	0.247 5
4	0.8	0.324 3
5	1.0	0.395 7
6	1.2	0.535 6

表6 ETOH、BE、BEA 三类样品中没食子酸测定浓度及含量

组别	样品浓度(mg/ml)	吸光度值	芦丁含量(%)
ETOH	5	0.286 0	5.20
BE	5	0.135 7	7.06
BEA	5	0.094 7	13.80

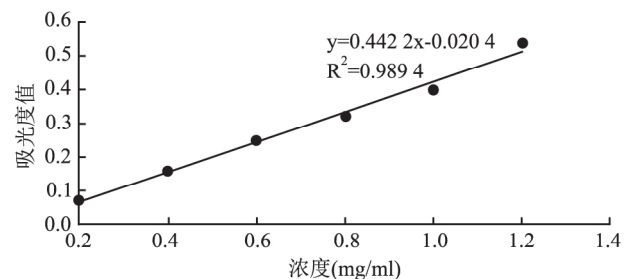


图6 芦丁标准曲线

3 讨论

CCl₄ 制备的急性肝损伤模型能准确反映肝细胞受损时各种生理病理变化。CCl₄ 在细胞色素酶 CYP450 作用下,生成三氯甲基(·CCl₃)等自由基直接改变或破坏细胞膜,使位于肝细胞内大量 AST、ALT 释放到外周循环血液中,因此外周血清中 ALT、AST 活力升高与肝组织损伤程度与范围呈直接相关性。TBA 是胆汁的主要成分,由肝细胞合成并随胆汁分泌到十二指肠,通过肝肠循环再次被重吸收入肝。当肝细胞损伤时,会引起胆汁酸的代谢障碍,血清中 TBA^[4] 浓度随着肝细胞损害程度而升高,TBA 也可在一定程度上反应肝损伤程度。

CCl_4 造成的肝损伤中,氧化应激^[11-12]在其中扮演重要角色。MDA 是脂质过氧化反应的终产物之一,攻击生物膜,导致细胞肿胀、坏死,常作为脂质过氧化的指标,其含量的高低反映了组织过氧化的损伤程度。SOD 是体内清除自由基、抑制自由基反应最重要的抗氧化酶之一,它可减少自由基的生成进而减少肝细胞的损伤。

本研究通过 CCl_4 致损伤急性肝损伤模型,观察芦笋提取物各不同极性组分对其保护作用的差异。模型组小鼠血清 ALT、AST、TBA 水平均显著增加,肝脏病理切片显示肝细胞大范围破碎、坏死,表明造模成功。与模型组比较,PE 及 EE 给药组 AST、ALT、TBA 无明显差异,肝匀浆 MDA、SOD 含量亦无明显差异,整体角度上 PE、EE 给药组没有预防 CCl_4 致肝损伤作用,可能是因为其中存在活性物质,但含量很低,在混合物复合效应的掩盖下没有呈现。有文献^[13]报道乙酸乙酯萃取物中存在含量极低的药效成分(22E,24S)- $5\alpha,8\alpha$ -epidioxy-24-methylcholesta-6,22-dien-3 β -ol 和 $5\alpha,8\alpha$ -epidioxy-(20S,22E,24R)-ergosta-6,22-dien-3 β -ol,二者可明显抑制肝星状细胞的增殖,也可能在 CCl_4 诱导的肝损伤方面发挥作用。然而,在整体动物模型中尚未显示出 EE 给药后的保肝活性,究其原因可能是二者原材料来源不同。文献报道来源为山东曹县提供的芦笋,本实验所用芦笋为瓯峰商业有机芦笋,且为去除芦笋顶端部位,在相关药物成分的含量上二者可能有所差异。

有文献^[3-4]报道上海蔬菜园提供的芦笋副产品正丁醇部 50% 乙醇冲洗部位能明显改善高脂饮食饲养的小鼠肝脏氧化程度。为了进一步探究瓯峰商业有机芦笋正丁醇部位是否存在药效更好组分以及是否 50% 乙醇冲洗部位为抗 CCl_4 致急性肝损伤活性部位,正丁醇部位用 AB-8 树脂进一步细分,以 30% 乙醇、50% 乙醇、70% 乙醇、90% 乙醇进行梯度冲洗,得到相应组分(BEA、BEB、BEC、BED)。药效学评价结果显示江西瓯峰商业芦笋 BEA 组分具有最佳预防 CCl_4 所致急性肝损伤的作用。然而其 50% 乙醇冲洗部位未呈现药效,究其原因除芦笋原材料来源不同,提取方法不同进而导致提取物相应成分在种类以及含量上的差异。上海蔬菜园来源的芦笋采用 70% 乙醇,在 80 °C 条件下提取,过大孔树脂柱时仅有水和 50% 乙醇进行冲洗;而本实验采用

的江西商业有机芦笋在 95% 乙醇,60 °C 条件下提取,极大地保存了物质的丰度和含量,同时过大孔树脂柱时在水和 50% 乙醇冲洗之间加了 30% 乙醇进行冲洗,可能导致原本在 50% 乙醇富集成分物质相关浓度未达到所需药效浓度从而未展现出相应的防治 CCl_4 所致急性肝损伤的作用;同时二者选用模型的不同也是差异的关键,该文选用的为 CCl_4 致急性肝损伤模型,在肝脏损伤程度上较高脂诱导的肝损伤要更为严重。

大量文献^[14-15]表明,芦笋中已发现抗氧化活性物质也主要为酚酸类、黄酮类两大类物质,故对此有效部位进行这两类物质的检测。结果表明芦笋 ETOH、BE 及 BEA 在酚酸含量和黄酮含量上存在一定程度的富集。这也间接解释了芦笋 ETOH 以及 BE、BEA 呈梯度性保肝效果的原因。ETOH 中黄酮含量 5.20%,而 BE 中黄酮含量 7.06%,黄酮类物质的富集可能是 BE 药效高于 ETOH 原因之一。BE 和 BEA 在酚酸和黄酮含量均有不同——BE 中酚酸含量 1.39%,黄酮含量 7.06%;而 BEA 中酚酸含量 7.23%,黄酮含量 13.80%。酚酸和黄酮类物质的富集可能是芦笋 BEA 在预防 CCl_4 诱导的肝损伤上效果优于 BE 原因之一。

综上所述,江西商业新品种芦笋 ETOH 具有预防 CCl_4 诱导的肝损伤作用,且药效部位集中在极性较大组分 BEA。BEA 的初步保肝效果可能是通过抗氧化应激、降低胆汁酸方面发挥保护作用,但 BEA 组分具体药效机制有待在后续的实验中进一步探究。

参考文献

- [1] 杨新华,夏宏光,金涌.雷公藤甲素通过抑制细胞色素 P450 3A4 酶增强肝损伤研究[J].安徽医科大学学报,2020,55(4):496-502.
- [2] 刘发生,王荣春,郭敬兰,等.利用斑马鱼模型研究芦笋有效成分对免疫功能的调节作用[J].山东中学,2017,30(6):29-34.
- [3] Zhu X L,Zhang W,Zhao J J,et al. Hypolipidaemic and hepatoprotective effects of ethanolic and aqueous extracts from *Asparagus officinalis* L. by-products in mice fed a high-fat diet[J]. J Agric Food Chem, 2010, 90(7): 1129-35.
- [4] Zhu X, Zhang W, Pang X, et al. Hypolipidemic effect of n-butanol extract from *Asparagus officinalis* L. in mice fed a high-fat diet[J]. Phytother Res, 2011, 25(8): 1119-24.
- [5] 马朝阳,马淑凤,王芳,等.芦笋提取物的抗氧化作用的研究[J].食品工业科技,2012,33(22):365-8.

- [6] 王莉,王亦菁,董婷婷. 芦笋胶囊治疗灼口综合征49例疗效评价[J]. 中国药业,2018,27(6):60-2.
- [7] 谢雪园. 芦笋口服液对晚期非小细胞肺癌患者免疫功能影响的临床研究[D]. 合肥:安徽中医药大学,2017.
- [8] Wang W, Wang S, Liu J, et al. Sesquiterpenoids from the root of *Panax Ginseng*, protect CCl_4 -induced acute liver injury by anti-inflammatory and anti-oxidative capabilities in mice[J]. *Biomed Pharmacother*,2018,102:412-9.
- [9] Zhang D G, Zhang C, Wang J X, et al. Obeticholic acid protects against carbon tetrachloride-induced acute liver injury and inflammation[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2017, 314:39-47.
- [10] 杨智才. 血清TBA、AST、ALT与AST/ALT联合检测在诊断急性肝炎中的应用价值[J]. 当代医药论丛,2019,17(15):167-8.
- [11] He Y, Li S, Tang D, et al. Circulating Peroxiredoxin-1 is a novel damage-associated molecular pattern and aggravates acute liver injury via promoting inflammation[J]. *Free Radic Biol Med*,2019, 137:24-36.
- [12] Li S, Tan H Y, Wang N, et al. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases[J]. *Int J Mol Sci*,2015,16(11):26087-124.
- [13] Zhong C, Jiang C, Xia X, et al. Antihepatic fibrosis effect of active components isolated from green asparagus (*Asparagus officinalis* L.) involves the inactivation of hepatic stellate cells[J]. *J Agric Food Chem*,2015,63(26):6027-34.
- [14] Fan R, Yuan F, Wang N, et al. Extraction and analysis of antioxidant compounds from the residues of *Asparagus officinalis* L. [J]. *J Food Sci Technol*, 2015, 52(5):2690-700.
- [15] Lee J W, Lee J H, Yu I H, et al. Bioactive compounds, antioxidant and binding activities and spear yield of *Asparagus officinalis* L. [J]. *Plant Foods Hum Nutr*,2014, 69(2):175-81.

Comparison of protective effects in *Asparagus officinalis* L. and its extracts on CCl_4 induced acute liver injury

Hu Yamin^{1,2}, Li Kuayue^{1,2}, Liu lan³, et al

(¹*School of Pharmacy*; ²*Key Laboratory of Anti-Inflammatory and Immune Drugs, Ministry of Education, Anhui Medical University, Hefei 230032*;

³*Dept of Pharmacy, Fuyang Hospital of Anhui Medical University, Fuyang 236000*)

Abstract Objective To investigate the preventive effect of ETOH from *Asparagus officinalis* L. and its different purified components on carbon tetrachloride (CCl_4) induced acute liver injury in mice. **Methods** Effects of ETOH and its components as petroleum ether extract (PE), ethyl acetate extract (EE), butanol extract (BE) were evaluated by CCl_4 induced acute liver injury model in mice. Levels of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total bile acid (TBA) and Malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) in liver tissue as well as the pathology of HE were detected to find out the pharmacodynamic components, with which were further separated and evaluated. **Results** Levels of serum AST, ALT, TBA, MDA and SOD improved in the group of ETOH and BE ($P < 0.05$), and the effect of BE was better than ETOH. Components of 30% ethanol eluate of butanol extract (BEA), 50% ethanol eluate of butanol extract (BEB), 70% ethanol eluate of butanol extract (BEC) and 90% ethanol eluate of butanol extract (BED) were further purified by BE. Pharmacodynamic evaluation showed that BEA improved the levels of AST, ALT, TBA in serum, and improved MDA and SOD in liver tissue ($P < 0.05$). Content of phenolic acid and flavonoids in BEA was higher compared to that in BE. **Conclusion**

Components named with ETOH, BE and BEA of *Oufeng Asparagus officinalis* L. can prevent CCl_4 induced acute liver injury, and the best pharmacodynamic components is BEA, which may be related to the enrichment of flavonoids and phenolic acids.

Key words *Asparagus officinalis* L.; liver injury; mice; hepatoprotective; carbon tetrachloride