

沙棘原花青素软胶囊对酒精性肝损伤的保护作用

Protective effects of sea buckthorn procyanidins soft capsule on ethanol-induced acute liver injury in mice

谭志超^{1,2}

张连富¹

TAN Zhi-chao^{1,2} ZHANG Lian-fu¹

(1. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 北京宝得瑞健康产业有限公司, 北京 101117)

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China;

2. Beijing Powdery Health Industry Co., Ltd., Beijing 101117, China)

摘要:沙棘原花青素软胶囊(沙棘籽提取物、沙棘油、紫苏籽油组)按人群推荐摄入量(人均 3 g/d)确定摄入剂量为 0.05 g/kg·BW(成人体重均值以 60 kg 计),并按照人群推荐日摄入量的 10, 20, 30 倍设置低、中、高 3 个剂量组(即 0.5, 1.0, 1.5 g/kg·BW),连续灌胃 SPF 级昆明种小鼠 30 d 后,以 50% 乙醇建立雄性小鼠化学性肝损伤模型,16 h 后测定各项指标。结果显示各剂量组间小鼠体重增长均无显著性差异($P>0.05$);在模型成立的情况下,高剂量组小鼠肝匀浆中 MDA 和 TG 含量显著降低($P<0.05$),还原性 GSH 含量显著升高($P<0.05$);病理组织学显示,高剂量组能显著减轻肝脏脂肪变性程度($P<0.05$)。说明沙棘原花青素软胶囊对酒精性肝损伤有保护作用。

关键词:沙棘原花青素;沙棘籽提取物;沙棘油;紫苏籽油;酒精性肝损伤

Abstract: The protective effect of sea buckthorn procyanidins soft capsules on acute liver injury induced by alcohol in mice were investigated. The sea buckthorn procyanidins soft capsules were made from sea buckthorn seed extract, sea buckthorn oil and perilla seed oil. The procyanidins concentration was signature component, with regarding to the recommended daily intake (3 g/person/day) and average weight (60 kg) of an adult, the dosage for feeding mice is 0.05 g/kg·BW and is expanded to 10, 20, 30 times as low, medium and high level (0.5, 1.0, 1.5 g/kg·BW) in this study. The mice were intragastrically administered with corresponding drugs, respectively, for 30 days. Then 50% ethanol (14.0 mL/kg·BW) was given to the mice 1 hour after the last administration. All the mice were sacrificed for 16 hours, and their liver samples were collected. The body weight and the contents of malondialdehyde (MDA), reduced

glutathione (GSH) and triglyceride in liver tissues were measured. There was no significant difference on body weight in different groups of mice. However, the MDA, GSH and TG levels in liver tissue were significantly decreased by sea buckthorn procyanidins at the high dosage level. Sea buckthorn procyanidins soft capsule have protective effect on acute alcoholic liver injury.

Keywords: sea buckthorn procyanidins; sea buckthorn seed extract; sea buckthorn oil; perilla seed oil; alcoholic liver injury

随着中国经济发展和生活水平的提高,化学性肝损伤呈现逐年上升趋势,特别是酒精性肝损伤有爆发的势头^[1]。目前已有对酒精性肝损伤保护作用的研究:巴西莓^[2]、北五味子藤茎总三萜^[3]、葛花^[4]、桑葚^[5]、虾青素^[6]、葡萄籽原花青素^[7]均具有抗酒精性肝损伤的作用。沙棘作为中国优势资源的品种,其深加工的产物——沙棘原花青素在抗酒精性肝损伤方面还未见报道。沙棘籽原花青素主要是由儿茶素、表儿茶素、槲儿茶素和表槲儿茶素 4 种单体组成^[8],沙棘籽提取物中聚合度 2~9 的低聚体达到 84% 以上,可能是更好的寡聚原花青素(OPC)来源^[9]。沙棘原花青素具有很强的抗氧化活性,金海英^[10]、樊金玲^[11]等分别报道了沙棘籽原花青素提取物具有抗氧化作用、沙棘籽原花色素抑制氧化的效果强于葡萄籽原花青素。本研究主要是针对沙棘籽提取物、沙棘油和紫苏籽油为主要成分制备的沙棘原花青素软胶囊对酒精性肝损伤的保护作用进行论证,为沙棘原花青素在化学性肝损伤有辅助保护作用的保健食品中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

沙棘籽粉:系清洁后的沙棘籽(中国沙棘亚种)经超临界二氧化碳脱脂后的饼粕,残油率 $\leq 1\%$,北京宝得瑞健康产业有限公司;

作者简介:谭志超,男,质量工程师,江南大学在读硕士研究生。

通信作者:张连富(1967—),男,江南大学食品学院教授,博士。

E-mail:lianfu@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2018-01-15

沙棘油:超临界二氧化碳萃取工艺,亚麻酸 $\geq 25\%$ (占脂肪酸比例),维生素 E $\geq 120\text{ mg}/100\text{ g}$,北京宝得瑞健康产业有限公司;

食用酒精:95.0%,梅河口市阜康酒精有限责任公司;
紫苏籽油(苏子油):亚麻酸 $\geq 55\%$ (占脂肪酸比例),吉林圣基实业有限公司。

1.2 试剂

原花青素对照品:葡萄籽原花青素($\geq 95\%$),天津尖峰天然产物有限公司;

丙二醛(MDA)含量检测试剂盒(批号 20151218)、还原型谷胱甘肽(GSH)含量检测试剂盒(批号 20151216);南京建成生物工程研究所;

甘油三酯(TG)含量测定试剂盒(批号 150644);上海丰汇医学科技有限公司。

1.3 设备

闪式提取器:JHBE-50T 型,河南智晶生物科技股份有限公司;

紫外可见分光光度计:UV-1800 型,日本岛津公司;
全自动生化分析仪检测:AU680 型,美国贝克曼公司。

1.4 试验动物

18~22 g 雄性老龄小鼠(SPF 级,昆明种)60 只,由湖北省实验动物研究中心提供,试验动物生产许可证号为 SCXK(鄂)2015-0018,试验动物使用许可证号为 SYXK(鄂)2012-0065,试验动物饲料由武汉万千佳兴生物科技有限公司提供,试验动物饲料生产许可证号为 SYXK(鄂)2011-0011。动物饲养室温度 20~26 ℃,相对湿度 40%~70%。

1.5 试验方法

1.5.1 沙棘原花青素的制备 将 200 g 沙棘籽粕分散于 1 200 mL 乙醇溶液(60%)中,使用闪式提取器在 120 V 常温提取 2 min 后,采用布氏漏斗抽滤,将沙棘籽粕乙醇提取液在 40 ℃ 真空(-0.098 MPa)浓缩至乙醇含量 $\leq 1\%$ 后于 60 ℃ 真空(-0.098 MPa)干燥得沙棘籽提取物,经粉碎过 100 目筛后备用。

1.5.2 沙棘原花青素检测

(1) 试样制备:称取 50~1 000 mg 试样置于 50 mL 容量瓶中,加入 30 mL 甲醇,于超声处理 20 min,放至室温后,加甲醇至刻度,摇匀,取 1 mL 于 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容备用。

(2) 标准曲线制备:配置原花青素对照品 1.0 mg/mL 母

液,吸取该溶液 0.0,0.3,0.8,1.2,1.7,2.1,2.5 mL 置于 10 mL 容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,各取 1 mL 测定。

(3) 试样测定及标准曲线:取 6 mL 正丁醇与盐酸体积比(95:5)混合试剂,再加入 1 mL 试样溶液和 0.2 mL 硫酸铁铵溶液,混匀,置沸水浴($>95\text{ }^{\circ}\text{C}$)回流 40 min 后,立即置冷水中冷却,于 546 nm 波长处测吸光度,计算原花青素含量。

1.5.3 动物试验 按人群日推荐用量 0.05 g/kg·BW 为参考,设计 0.5,1.0,1.5 g/kg·BW(分别相当人群日推荐量的 10,20,30 倍)3 个动物试验剂量组,同时设油对照组和模型对照组。

各剂量组、油对照组、肝损伤模型对照组灌胃容量均为 0.1 mL/10 g·BW,每日经口灌胃相应浓度的受试物和给予等量大豆油,喂养 30 d,在整个喂养试验周期,受试动物的灌胃量按动物的体重(动物每周称重 2 次)变化适量调整。

酒精性肝损伤模型建立及作用评价:试验第 30 天时,模型组及各剂量组一次性灌胃 50%乙醇 14 mL/kg·BW,油对照组给予等体积的大豆油,禁食 16 h 称重后颈椎脱臼处死后解剖,称重肝脏并计算脏/体比值,同时取 0.5 g 肝脏制备肝匀浆后进行 MDA、还原型 GSH、TG 等指标的检测及油红 O 脂类染色观察肝脏病理组织学变化。

1.5.4 统计分析 试验结果以平均值 $\pm$ 均方差表示,应用 SPSS 11.5 统计软件统计,组间差异采用 Q 检验进行比较,P 取 0.05。

2 结果与分析

2.1 沙棘原花青素软胶囊中的沙棘原花青素含量

沙棘原花青素软胶囊内容物含沙棘原花青素为(8.72 $\pm$ 0.074) g/100 g。

2.2 沙棘原花青素软胶囊对小鼠体重的影响

与模型对照组和油对照组比较,受试物对各剂量组小鼠体重均无明显影响(P >0.05),见表 1。说明沙棘原花青素软胶囊对小鼠的身体机能无影响。

2.3 沙棘原花青素软胶囊对老龄小鼠肝脏 MDA、还原型 GSH、TG 的影响

根据表 2 结果所示,使用 50%酒精,按 14 mL/kg·BW 的剂量给予老龄小鼠灌胃 16 h 后与对照组比较,肝损伤模型组小鼠肝匀浆中 MDA、TG 含量升高,还原型 GSH 降低,且均有显著性差异(P <0.01 或 P <0.05),说明本次试验小鼠

表 1 沙棘原花青素软胶囊对小鼠体重的影响[†]

Table 1 Effect of sea buckthorn procyanidin soft capsule on the body weight of mice

组别	剂量/(g·kg ⁻¹ ·BW)	0 周重/g	1 周重/g	2 周重/g	3 周重/g	4 周重/g
油对照组	0.0	20.0 $\pm$ 1.1	30.2 $\pm$ 1.1	36.2 $\pm$ 1.7	41.1 $\pm$ 1.9	44.0 $\pm$ 2.0
模型对照组	0.0	20.2 $\pm$ 0.9	30.8 $\pm$ 1.3	35.6 $\pm$ 1.9	40.4 $\pm$ 2.0	43.3 $\pm$ 1.6
低剂量组	0.5	19.8 $\pm$ 0.8	30.7 $\pm$ 1.2	35.2 $\pm$ 1.2	40.8 $\pm$ 2.8	43.5 $\pm$ 3.1
中剂量组	1.0	19.8 $\pm$ 1.1	30.2 $\pm$ 0.9	35.8 $\pm$ 1.8	39.9 $\pm$ 2.1	42.8 $\pm$ 2.0
高剂量组	1.5	20.5 $\pm$ 1.0	30.9 $\pm$ 1.3	35.2 $\pm$ 1.4	41.5 $\pm$ 1.3	44.5 $\pm$ 1.7

[†] 每组 12 只。

表 2 各组老龄小鼠肝匀浆中 MDA、还原型 GSH、TG 测定值[†]

Table 2 Effect of sea buckthorn procyanidin soft capsule on MDA, GSH and TG in alcoholic liver injury in mice

组别	剂量/(g·kg ⁻¹ ·BW)	MDA/(nmol·mL ⁻¹)	还原型 GSH /(μmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)
油对照组	0.0	6.63±1.20 * *	7.40±0.92 *	0.74±0.13 * *
模型对照组	0.0	8.52±0.89	5.81±1.16	1.25±0.47
低剂量组	0.5	7.83±1.08	5.96±1.58	1.09±0.28
中剂量组	1.0	7.22±1.70	6.90±1.72	1.14±0.35
高剂量组	1.5	6.86±1.24 *	7.27±1.05 *	0.86±0.26 *

† 每组 12 只;各剂量组与模型对照组比较,* 表示在 P<0.05 水平差异显著;* * 表示在 P<0.01 水平差异显著。

的酒精性肝损伤模型造模成功。沙棘原花青素软胶囊高剂量组与模型组比较发现:小鼠肝匀浆中 MDA 和 TG 含量显著性降低,还原性 GSH 含量显著升高(P<0.05)。根据肝匀浆中 MDA 的浓度水平,并结合灌胃的实际沙棘籽原花青素水平,发现沙棘籽原花青素与报道的葡萄籽原花青素对急性酒精性肝损伤保护作用相当^[12]。

酒精在体内 90%通过肝脏代谢,其代谢主要有 3 种形式^[13]:① 线粒体中乙醇脱氢酶、乙醛脱氢酶生成乙酸,再经过三羧酸循环生成水、二氧化碳和能量,伴随着乙醇氧化会产生超氧阴离子自由基;② 内质网中线粒体的乙醇氧化系统,此过程会产生大量的乙醛和活性氧;③ 过氧化物体中的过氧化氢酶系统,过氧化氢氧化乙醇同时生成氧自由基;氧自由基可以抑制呼吸链的传递,加剧线粒体功能障碍,降低脂肪酸 β 氧化,促进了脂肪肝的发生^[14]。另外,酒精的代谢也与心血管疾病相关^[15]。因此,有效消除乙醇氧化过程中产生的大量自由基,可以降低肝脏损伤。沙棘原花青素被证实具有强的清除自由基能力,可以快速消除自由基和活性氧,从而达到保护肝脏的作用。表 2 结果显示,高剂量组沙棘原花青素对小鼠酒精性肝损伤有保护作用。

2.4 沙棘原花青素软胶囊对小鼠肝脏组织的影响

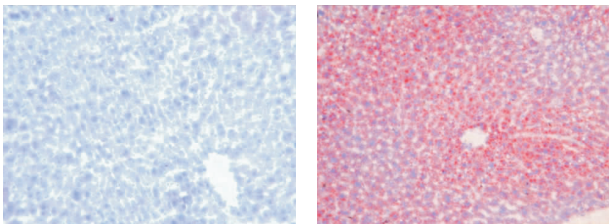
根据表 3 结果,模型组小鼠肝脏脂肪细胞的变性评分与对照组比较,在统计学上有极显著差异(P<0.01),从而再次证明小鼠酒精性肝损伤模型造模成功。与模型组比较,高剂量沙棘原花青素软胶囊组肝细胞脂肪变性程度明显减轻,统计学上有显著性差异(P<0.05),判断为阳性;各试验组小鼠肝脏的代表性病理组织学检查图片见图 1,正常的肝组织细胞并不会被油红 O 染料染色,而模型组中几乎被橘红色占据,肝脏受损严重。低剂量组和中剂量组的肝脏组织中被染色的橘红色肝细胞与模型组相当,肝脏受损严重,低剂量组

表 3 沙棘原花青素软胶囊对小鼠肝脏病理组织学的影响[†]

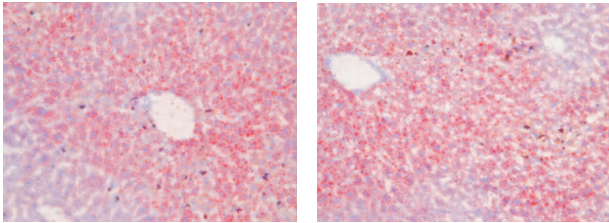
Table 3 Effect of sea buckthorn procyanidin soft capsule on the hepatic tissue of mice

组别	剂量/(g·kg ⁻¹ ·BW)	切片评分	P
油对照组	0.0	1.03±0.69	0.000
模型对照组	0.0	3.20±0.63	—
低剂量组	0.5	2.82±0.59	0.138
中剂量组	1.0	2.73±0.78	0.121
高剂量组	1.5	2.63±0.67	0.044

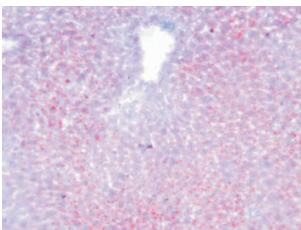
† 每组 12 只。



(a) 油对照组 (b) 酒精性肝损伤模型组



(c) 沙棘原花青素软胶囊低剂量组 (d) 沙棘原花青素软胶囊中剂量组



(e) 沙棘原花青素软胶囊高剂量组

图 1 小鼠肝脏组织油红 O 染色切片

Figure 1 Pathological slices of the mice hepatic tissue (×200)

和中剂量组对酒精性肝损伤保护不明显;高剂量组肝脏组织中被染色的橘红色肝细胞与模型组比较稍明显,说明高剂量组沙棘原花青素对小鼠的酒精性肝损伤具有保护作用。

3 结论

老龄小鼠肝脏 MDA、GSH 和 TG 3 项指标呈阳性,并且病理组织学检验呈阳性,判定沙棘原花青素软胶囊对小鼠酒精性肝损伤有保护作用,为其保健功能提供了依据。本研究的结果将沙棘籽原花青素的应用推进到了抗酒精性肝损伤领域。沙棘籽提取物更加广泛和深入的应用,还需对其纯度和毒理学进行评价。

参考文献

[1] 徐正婕, 陆伦根. 酒精性肝病的流行病学和自然史[J]. 中国处方药, 2010(1): 32-33.

表 4 巴戟天多糖对 NIH 小鼠血清尿素氮、血乳酸和肝糖元的影响[†]

Table 4 Effects of polysaccharide of *Morinda officinalis* How on NIH mice serum urea nitrogen, blood lactic acid, and hepatic glycogen levels (*n* = 10)

组别	BUN 值/ (mmol · L ⁻¹)	LACT 值/ (mmol · L ⁻¹)	HG 值/ (mg · g ⁻¹)
高剂量组	7.96±1.50 * *	9.06±2.96 *	6.67±1.73 *
中剂量组	8.35±1.22 *	8.09±3.03 * *	4.94±1.34
低剂量组	8.67±1.24	9.91±2.41	4.67±0.22
对照组	9.94±2.00	12.94±2.88	4.39±0.25

[†] * . 与对照组比较,差异显著(P<0.05); * * . 与对照组比较,差异极显著(P<0.01)。

的影响,且不同成熟度的巴戟天其多糖的生理活性也不尽相同,在后续的研究中,种植条件及加工方法对巴戟天多糖含量和生理活性的影响还有待探索。

参考文献

[1] 崔妮,史辑,贾天柱. 巴戟天不同炮制品 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药, 2014, 45(13): 1 871-1 875.

[2] 何传波,李琳,汤凤霞,等. 巴戟天多糖的提取及纯化研究[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 326-329.

[3] ZHANG Jian-hua, XIN Hai-liang, XU Yue-ming, et al. *Morinda officinalis* How. a comprehensive review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2018, 213: 230-255.

[4] 魏京邑,岳广欣. 巴戟天抗抑郁成分药理机制研究进展[J]. 中医药通报, 2017, 16(2): 67-69.

[5] LI Yun-feng, LI Yuan, XU Yu-kun, et al. Antistress effect of oligosaccharides extracted from *Morinda officinalis* in mice and rats[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2001, 22(12): 1 084-1 088.

[6] 朱孟勇,赫长胜,王彩娇. 巴戟天多糖对骨质疏松大鼠骨密度及

血清微量元素的影响[J]. 中草药, 2010, 41(9): 1 513-1 515.

[7] 刘霄. 巴戟天多糖的降血糖和抗氧化作用研究[J]. 中药材, 2009, 32(6): 949-951.

[8] 李翠丽,王炜,张英,等. 中药多糖提取,分离纯化方法的研究进展[J]. 中国药房, 2016, 27(19): 2 700-2 703.

[9] 程力惠,王建壮,卢丽霞. 正交设计优选巴戟天中多糖提取工艺[J]. 中药材, 2010, 33(1): 125-127.

[10] 沈英超. 巴戟天活性物质的研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2008: 34-47.

[11] 陈忠,刘琳玲,何猛雄,等. 南药巴戟天多糖提取方法的比较研究[J]. 科技通报, 2004, 20(6): 546-548.

[12] 李妍,曾玩芸. 酶法辅助提取巴戟天多糖的工艺研究[J]. 食品与机械, 2010, 26(1): 95-97.

[13] 陈素艳,彭爱红,吴升山,等. RSM 优化巴戟天多糖的超声波辅助提取工艺[J]. 华侨大学学报: 自然科学版, 2008, 29(1): 76-79.

[14] 龙碧波,张新定,徐海衡,等. 巴戟天水提液对耐力运动小鼠的抗氧化作用研究[J]. 现代预防医学, 2013, 40(15): 2 880-2 882.

[15] 郝建东. 巴戟天提取物对大强度耐力训练大鼠心肌组织抗氧化能力影响的实验研究[J]. 陕西中医, 2008, 29(10): 1 428-1 429.

[16] 龙碧波,徐海衡,张新定. 巴戟天抗疲劳药理活性的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2013(2): 298-300.

[17] ZHANG Zhong-qi, LI Yuan, YANG Ming, et al. The effect of *Morinda officinalis* How, a Chinese traditional medicinal plant, on the DRL 72-s schedule in rats and the forced swimming test in mice[J]. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 2002, 72(1/2): 39-43.

[18] 孟繁磊,陈瑞战,张敏,等. 刺五加多糖的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2010, 31(10): 168-174.

[19] 王金华,杜超,梁晨,等. 贵长猕猴桃多糖提取工艺及体外抗氧化功能[J]. 食品科学, 2016, 37(20): 19-23.

[20] 王庆,李丹丹,潘芸芸,等. 提取方法对天麻多糖提取率及其抗氧化活性的影响[J]. 食品与机械, 2017, 33(9): 146-150.

(上接第 150 页)

[2] 屈胜胜,张建军,李艳霞,等. 巴西莓对大鼠慢性酒精性肝损伤的保护作用及对炎症细胞因子的影响[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(24): 4 869-4 872.

[3] 孟宪军,邓静,朱力杰,等. 北五味子藤茎总三萜对小鼠酒精性肝损伤的保护作用[J]. 食品科学, 2013, 34(15): 228-231.

[4] 苗彦妮,钟赣生. 葛花对大鼠酒精性肝损伤的预防作用研究[J]. 科技导报, 2008, 26(15): 60-65.

[5] 邓青芳,周欣,陈华国. 桑葚抗酒精性肝损伤活性部位筛选研究[J]. 贵州师范大学学报: 自然科学版, 2014, 32(5): 107-110.

[6] 裴凌鹏,惠伯棣. 虾青素对小鼠急性乙醇肝损伤的保护作用[J]. 江苏大学学报: 医学版, 2008, 18(4): 303-306.

[7] 邹金发,刘晓光,齐凤杰,等. 葡萄籽原花青素减轻小鼠急性化学性肝损伤[J]. 基础医学与临床, 2012, 32(10): 1 198-1 201.

[8] 樊金玲,罗磊,要萍,等. 沙棘籽原花色素组成和结构的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(1): 244-249.

[9] 刘朵花,李伟,吴仲. 沙棘和葡萄籽中原花青素的对比研究[J]. 沙棘, 2000, 13(1): 35-38.

[10] 金海英. 沙棘籽原花青素提取物抗氧化作用研究[J]. 沙棘, 2005, 18(1): 35-37.

[11] 樊金玲,罗磊,武涛,等. 沙棘籽原花色素与葡萄籽原花青素抗氧化活性的比较[J]. 食品与机械, 2007, 23(2): 26-30.

[12] 张波,沈新南,张亚东,等. 原花青素对小鼠乙醇性肝损伤的保护作用机制[J]. 卫生研究, 2007, 36(3): 295-297.

[13] 赵敏菁. 葛花及葛根提取物对乙醇在大鼠体内药代动力学过程的影响及机制研究[D]. 广州: 中山大学, 2009: 1-56.

[14] MEIR P, SEITZ H K. Age, alcohol metabolism and liver disease[J]. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care, 2008, 11: 21-26.

[15] DI CASTELNUOVO A, COSTANZO S, DONATI M B, et al. Alcohol consumption and cardiovascular risk: an epidemiological perspective[J]. Nutrition Metabolism and Cardiovascular DiseasesNmcd, 2007, 17(8): 561-564.