

## 海芦笋黄酮的抗氧化作用及对CCl<sub>4</sub>致小鼠急性肝损伤的保护作用

段筱杉, 张朝辉\*, 应锐, 赵腾飞, 刘奥,  
李八方, 赵雪, 侯虎

(中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266003)

**摘要:** 为深入探究海芦笋黄酮的活性作用, 研究海芦笋黄酮在体外的抗氧化作用及其对CCl<sub>4</sub>导致的小鼠急性肝损伤的预防保护作用。通过分析海芦笋黄酮对4种自由基(DPPH自由基、ABTS自由基、羟基自由基及超氧阴离子自由基)的清除能力反映海芦笋黄酮的体外抗氧化能力。将海芦笋黄酮分为低、中、高3个剂量[75、150、300 mg/(kg·d)]对小鼠连续灌胃8 d, 通过腹腔注射CCl<sub>4</sub>建立小鼠急性肝损伤模型, 测定海芦笋黄酮对血清中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)的活性以及肝脏组织中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽(GSH)水平的影响, 观察肝脏病理变化。结果显示, 在体外抗氧化实验中, 海芦笋黄酮对4种自由基都有良好的清除效果。在CCl<sub>4</sub>急性肝损伤模型中, 与模型组对比, 各剂量海芦笋黄酮均能使血清中ALT、AST、ALP酶活性、肝脏MDA含量显著降低; 使肝脏SOD活性、GSH含量显著增加。海芦笋黄酮中、高剂量组与模型组相比, 肝脏CAT活性显著升高。肝脏切片结果显示各剂量组肝组织损伤情况有不同程度改善。海芦笋黄酮对由CCl<sub>4</sub>引起的小鼠急性肝损伤具有一定程度的预防保护作用, 其急性肝损伤保护机制可能与黄酮对脂质过氧化程度的削弱、机体抗氧化能力的提高有关。

**关键词:** 海芦笋; 黄酮; 抗氧化; 四氯化碳; 急性肝损伤

**中图分类号:** S 968.2

**文献标志码:** A

肝脏是人体内最大的代谢器官, 在人体的代谢活动中发挥着重要作用, 绝大多数摄入体内的物质都要通过肝脏的代谢转化。肝脏疾病是人类最常见的疾病之一, 而肝脏损伤是肝水肿、肝硬化、肝炎等多种肝脏疾病的病理基础, 因此研究并开发预防肝脏损伤的活性物质对预防人类肝脏疾病具有重大意义, 也一直广受关注。目前, CCl<sub>4</sub>作为一种研究成熟的亲肝毒物, 其诱导的小鼠急性肝损伤模型广泛用于天然化学提取物及多种动植物来源的保肝药物的保肝活性评价<sup>[1]</sup>。

黄酮类物质广泛分布于多种植物中, 其保

肝作用是近年来肝损伤治疗研究的热点。研究表明, 贡菊<sup>[2]</sup>(*Chrysanthemum morifolium*)、四棱豆<sup>[3]</sup>(*Psophocarpus tetragonolobus*)、毛菊苣(*Cichorium glandulosum*)种子<sup>[4]</sup>、金樱子(*Rosa laevigata*)果<sup>[5]</sup>、含羞草<sup>[6]</sup>(*Mimosa pudica*)等多种植物中的黄酮类化合物对CCl<sub>4</sub>导致的急性肝损伤有不同程度的保护效果。海芦笋(*Salicornia bigelovii*)又名盐角草、海蓬子, 属藜科(Chenopodiaceae)盐角草属(*Salicornia*)植物, 是由中国科学院从北美洲引进并在我国沿海地区广泛种植的一种营养丰富的海水蔬菜<sup>[7]</sup>。国外研究人员对海芦笋黄酮的活性研究开始较早, 目前已有的报道表明, 海芦笋

收稿日期: 2016-11-15 修回日期: 2017-03-06

资助项目: 国家自然科学基金(31272705)

通信作者: 张朝辉, E-mail: zhangzh@ouc.edu.cn

黄酮有预防肥胖<sup>[8]</sup>、防止细胞氧化损伤<sup>[9]</sup>、抑制肿瘤细胞的基质金属蛋白酶<sup>[10]</sup>、降血糖<sup>[11]</sup>等作用, 目前国内对海芦笋黄酮的研究相对较浅, 且主要集中在体外抗氧化<sup>[12]</sup>及抑菌作用<sup>[13]</sup>, 未能将海芦笋中黄酮类物质的作用与价值充分挖掘与利用, 有待深入研究。因此, 本研究将体外抗氧化实验与CCl<sub>4</sub>致小鼠急性肝损伤模型结合, 研究了海芦笋黄酮对小鼠急性肝损伤的预防保护作用, 为深入开发海芦笋的价值、研究肝保护性物质提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验对象

SPF级雄性昆明小鼠(Kunming mice)60只, 购于济南朋悦实验动物繁育有限公司, 适应性灌胃1周后, 体质量(25±2) g。饲养环境: 室温18~24 °C, 12 h照明, 12 h黑暗, 隔天清洁笼具1次, 10只小鼠1笼饲养, 饲养小鼠用标准饲料, 笼内自由饮水、摄食。

### 1.2 实验材料

海芦笋购自盐城绿苑盐土农业科技有限公司, 海芦笋经洗净、烘干、粉碎后置于干燥器内备用。

芦丁标准品由南京替斯艾么中药研究所提供; CCl<sub>4</sub>、无水乙醇、水杨酸、双氧水、七水合硫酸亚铁等均为国产分析纯; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH), Sigma公司、2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS), 北京百灵威科技有限公司; 联苯双酯滴丸, 北京协和药厂; 抗坏血酸, 索莱宝公司; 超氧阴离子试剂盒、谷丙转氨酶(ALT)试剂盒、谷草转氨酶(AST)试剂盒、总蛋白(BCA法)试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒、过氧化氢酶(CAT)试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、碱性磷酸酶(ALP)试剂盒、谷胱甘肽(GSH)试剂盒购于南京建成生物工程研究所。

### 1.3 实验设备

SHA-B恒温振荡器, 江苏常州国华电器有限公司; 紫外可见分光光度计UV-2802型, Unico仪器有限公司; 低温高速离心机, Sigma公司; 酶标仪, 美国BIORAD公司; ME 204 电子天平, 梅特勒托利多(上海)有限责任公司; 蠕动泵, 保

定兰格恒流泵有限公司; 真空冷冻干燥机, 美国SIM公司; 旋涡振荡器、组织匀浆机, IKA公司。

### 1.4 实验方法

**黄酮标准曲线的绘制** 亚硝酸钠—硝酸铝—氢氧化钠比色法<sup>[12]</sup>测定不同浓度芦丁溶液的OD<sub>510 nm</sub>, 芦丁标准品提前置于110 °C烘箱中, 烘至恒重后准确配制浓度为0.200 mg/mL的芦丁标准品溶液, 溶剂为95%乙醇溶液。以芦丁溶液浓度为横坐标, OD值为纵坐标, 得到标准曲线回归方程:

$$Y = 10.17X + 0.004, R^2 = 0.9997 \quad (1)$$

**海芦笋黄酮的制备及黄酮浓度的测定** 按照1:60(M/V)将海芦笋干粉加入到体积分数为65%的乙醇溶液中, 30 °C水浴提取3.5 h, 提取2次, 4200 r/min离心取上清液, 将上清液合并后旋蒸浓缩, 配制成适宜浓度上样, 以聚酰胺树脂、D101-HPD600混合大孔树脂连续纯化, 将纯化后溶液旋蒸浓缩后, 冷冻干燥, 备用。

#### 海芦笋黄酮对ABTS自由基的清除作用

ABTS能够与过硫酸钾反应生成ABTS自由基, 其最大吸收波长为734 nm且性质稳定, 溶液呈蓝绿色, ABTS自由基与抗氧化物质反应后褪色, 褪色程度与抗氧化能力相关。将ABTS溶液(7.4 mmol/L)与相同体积的过硫酸钾溶液(2.6 mmol/L)混合均匀后得到ABTS储备液, 储备液于暗处室温静置15 h后, 加入45~50倍体积的无水乙醇稀释至A<sub>734nm</sub>=0.70±0.02, 此为ABTS工作液。以50%的乙醇溶液为溶剂溶解样品, 取0.6 mL不同浓度的样品溶液置于试管中, 再加入ABTS工作液2.4 mL, 混匀并静置10 min后测定734 nm处吸光值A<sub>1</sub>, 以50%的无水乙醇为空白加入ABTS工作液测定吸光值为A<sub>0</sub>, Vc作为阳性对照物操作同上, 按照公式计算海芦笋黄酮对ABTS自由基的清除率:

$$\text{清除率(\%)} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

#### 海芦笋黄酮对DPPH自由基的清除作用

DPPH作为最广泛应用于体外抗氧化研究的一种单电子自由基, 溶于醇中呈深紫色, 较为稳定, 在517 nm有最大吸收, 抗氧化物质可与其单电子配对使其溶液褪色。参照文献<sup>[14]</sup>, 以Vc为阳性对照, 移取2 mL浓度为0.2 mmol/L的DPPH-乙醇溶液置于试管中, 之后加入不同浓度的样品2 mL, 混合均匀避光反应30 min后于517 nm测定A<sub>1</sub>, 以2 mL

无水乙醇代替DPPH溶液测定 $A_2$ ，以蒸馏水代替样品溶液测定 $A_0$ ，按照公式(3)计算海芦笋黄酮对DPPH自由基的清除率：

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100 \quad (3)$$

海芦笋黄酮对羟基自由基的清除作用 利用水杨酸法<sup>[15]</sup>测定羟基自由基清除率，取6.0 mmol/L的FeSO<sub>4</sub>溶液、水杨酸—乙醇溶液各1 mL加入试管中混匀后，再依次加入不同浓度的样品溶液及6.0 mmol/L的过氧化氢溶液各1 mL，混合均匀，于37 °C反应30 min后，用蒸馏水调零，于510 nm测定不同浓度样品管 $A_1$ ，以1 mL蒸馏水代替样品溶液测定 $A_0$ ，以1 mL蒸馏水代替H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液测定 $A_2$ ，以Vc为阳性对照，按照公式(3)计算海芦笋黄酮对羟基自由基的清除率。

海芦笋黄酮对超氧阴离子自由基的清除作用 以50%(V/V)乙醇作为溶剂将海芦笋黄酮配成不同浓度的溶液，严格按照超氧阴离子自由基测试盒说明书操作，测定黄嘌呤氧化反应体系在550 nm处的吸光值 $A_1$ 、空白管 $A_0$ 、对照管 $A_2$ ，以VC为阳性对照物操作同上，按照公式(3)计算海芦笋黄酮对超氧阴离子自由基的清除率。

动物模型的建立 60只SPF级雄性昆明小鼠经适应性喂养1周后，被随机分为6组，1：BC组(正常组)；2：M组(模型组)每天灌胃生理盐水(0.2 mL/10 g)；3：PC组(阳性对照组)每天灌胃120 mg/kg的阳性药联苯双酯；4：FL组；5：FM组；6：FH组(低、中、高剂量组)每天分别灌胃海芦笋黄酮(75、150和300 mg/kg)，连续进行8 d，各组灌胃量0.2 mL/10 g。末次给药2 h后，除正常组外，按照10 mL/kg的剂量分别给M组、PC组、FL组、FM组、FH组小鼠腹腔注射0.2%(V/V)的CCl<sub>4</sub>花生油溶液，BC组小鼠注射10 mL/kg的花生油。

生化指标测定与病理观察 造模后对小鼠禁食，20 h后，小鼠称重并摘取眼球取血，室温静置并4000 r/min离心10 min后移取血清，严格按照试剂盒的要求检测血清中ALT、AST、ALP酶活性。将小鼠处死并解剖，取肝脏称重，按公式(4)计算肝脏指数：

$$\text{肝脏指数}(\%) = \frac{\text{肝脏质量}(\text{g})}{\text{小鼠处死前体质量}(\text{g})} \times 100 \quad (4)$$

取小鼠肝脏相同位置组织置于10%福尔马林溶液中固定24 h，制备肝脏病理组织切片，H.E染

色后于光镜下观察肝组织的病理变化。在冰水浴中将剩余肝脏组织与生理盐水按重量比1:9制成10%肝脏组织匀浆，低温离心15 min取上清液分装。严格按照试剂盒说明书步骤测定血清中ALT、AST、ALP活性、肝组织匀浆中MDA、GSH的含量以及CAT、SOD的酶活性。

## 1.5 数据统计

应用SPSS 17.0统计软件进行数据处理，以 $P < 0.05$ 为具有组间显著差异， $P < 0.01$ 为具有组间极显著差异，实验数据都采用mean±SD表示。

## 2 结果

### 2.1 海芦笋黄酮的体外抗氧化活性

化学药物、紫外辐射等诸多因素都将造成自由基在组织内的增多，并进一步引发氧化应激损伤，影响机体健康，因此开发天然抗氧化剂以提高机体抗氧化能力，维护机体平衡一直受到广泛关注。国内外研究人员对多种来源黄酮物质的抗氧化作用都有所研究，其中ABTS自由基法和DPPH自由基法是目前常用的测定体外抗氧化活性的方法<sup>[3, 16]</sup>。

海芦笋黄酮对ABTS自由基的清除效果显著且与其浓度关系紧密(图1-a)。当海芦笋黄酮浓度小于30 μg/mL时，随着海芦笋黄酮浓度的升高，对ABTS自由基的清除率也迅速增加。当浓度为30 μg/mL时，海芦笋黄酮与Vc对ABTS自由基的清除率基本相同，达到99.23%之后，即使浓度再增加，清除率也基本保持平衡，因此，海芦笋黄酮能够有效地清除ABTS自由基。在DPPH体系中，DPPH自由基与来自抗氧化物质的氢原子或电子中和，因此，清除DPPH自由基的能力一定程度上反映抗氧化剂的供氢能力<sup>[16]</sup>。当浓度为2.5~50.0 μg/mL时，海芦笋黄酮的浓度与其DPPH自由基清除能力呈线性关系，但幅度稍小于Vc，这说明海芦笋黄酮对DPPH自由基有着较强的清除效果(图1-b)。

羟基自由基能与活细胞中的大分子反应，从而造成机体的氧化损伤，是公认的毒性最大、活性最强的自由基，而多种物理、化学因子都会促进其形成。超氧自由基作为生物体内第一个氧自由基，是其他活性氧的前体，对生物体内的酶、DNA等多种物质均能产生影响<sup>[17]</sup>。

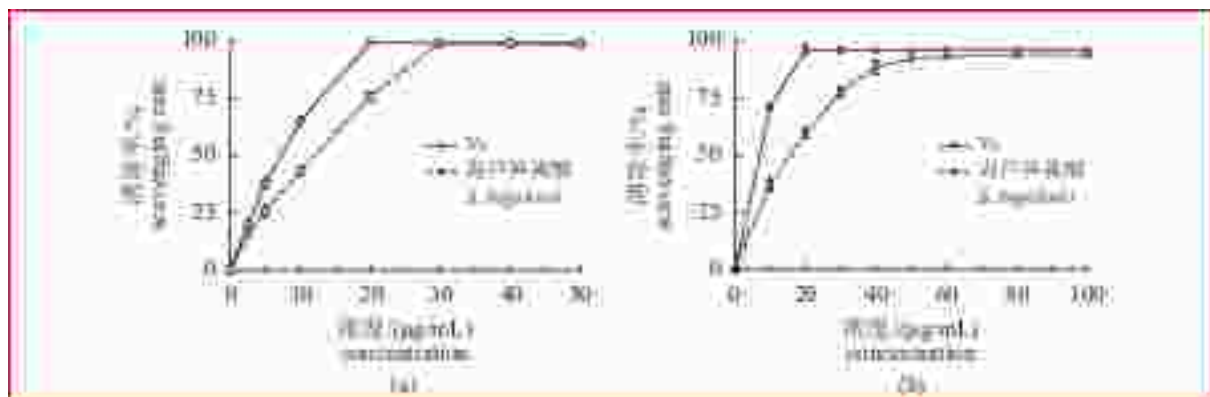


图 1 Vc、海芦笋黄酮对ABTS自由基(a)、DPPH自由基(b)的清除作用

Fig. 1 The scavenging effect of Vc and *S. bigelovii* flavonoids on ABTS<sup>•+</sup> (a) and DPPH<sup>•</sup> (b)

当海芦笋黄酮浓度为25~100 μg/mL时, 其对羟基自由基的清除能力与相同浓度的Vc相当, 之后随着浓度升高海芦笋黄酮的羟基自由基清除效果逐渐增强, 但稍弱于Vc (图2-a)。当浓度小于200 μg/mL时, 海芦笋黄酮对超氧阴离子自由基的清除能力要明显优于Vc, 且随着浓度升高清除效果增强(图2-b)。当浓度超过200 μg/mL, 海芦笋黄酮的清除能力增长缓慢且基本保持平衡。因此, 海芦笋黄酮具备一定的抗氧化能力。

## 2.2 海芦笋黄酮对CCl<sub>4</sub>致急性肝损伤小鼠的影响

**海芦笋黄酮对小鼠肝脏指数的影响** 肝脏指数是CCl<sub>4</sub>致小鼠急性肝损伤模型中反映肝脏是否受损的常用直观指标, M组小鼠的肝脏指数显著高于BC组( $P < 0.01$ ), CCl<sub>4</sub>造成小鼠的肝脏受损肿大; 而海芦笋黄酮的高、中剂量组小鼠的肝脏指数与M组相比都显著降低( $P < 0.05$ ), 低剂量组的肝脏指数与M组相比无显著性, 说明中、

高剂量的海芦笋黄酮减轻了小鼠肝脏因注射CCl<sub>4</sub>引起的肿胀情况(图3)。

海芦笋黄酮对CCl<sub>4</sub>致急性肝损伤小鼠血清中ALT、AST、ALP活性的影响 ALT、AST是目前多种实验性肝损伤模型、临床药物安全及临床诊断肝细胞受损的重要检测指标, 主要存在于肝细胞浆和肝细胞的线粒体中。机体正常情况下, 血清中此2种酶活性较低, 肝细胞受损后, 这2种酶进入血液, 因此能够迅速有效地反映肝细胞受损与否及损伤程度, 小鼠注射CCl<sub>4</sub>后, 肝细胞受到严重损伤, ALT、AST大幅升高<sup>[18]</sup>; 而ALP则存在于毛细胆管的微绒毛上, 随胆汁排出, 肝胆管病变阻塞将会引起血清中ALP的明显增加<sup>[19]</sup>。

M组小鼠的血清ALT、AST、ALP酶活性与BC组小鼠相比都极显著地升高( $P < 0.01$ ), 说明CCl<sub>4</sub>致急性肝损伤小鼠模型造模成功(图4), 大量自由基使肝细胞的膜系统受损、部分功能受阻, 从而引起胞内酶大量释放到血液中, 此3种

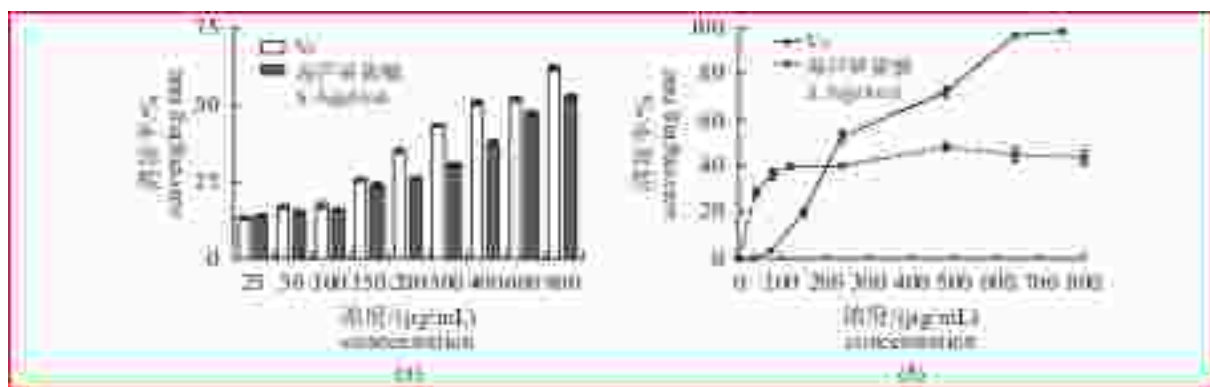


图 2 Vc、海芦笋黄酮对羟基自由基(a)、超氧阴离子自由基(b)的清除作用

Fig. 2 The scavenging effect of Vc and *S. bigelovii* flavonoids on  $\cdot\text{OH}$  (a) and  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (b)

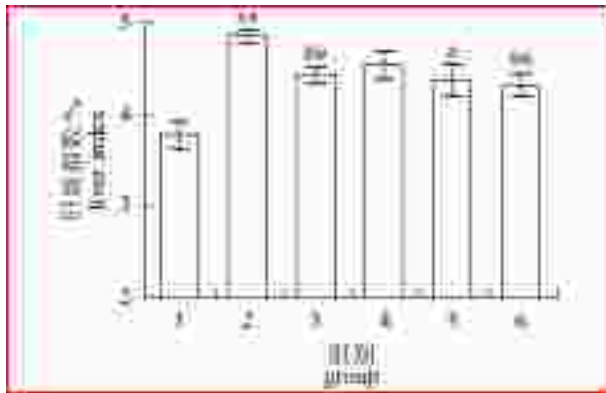


图3 海芦笋黄酮对小鼠肝脏指数的影响

1. BC组(正常组); 2. M组(模型组); 3. PC组(阳性对照组); 4. FL组(低剂量组); 5. FM组(中剂量组); 6. FH组(高剂量组); \*与空白组相比, 差异显著( $P < 0.05$ ); \*\*与空白组相比, 差异极显著( $P < 0.01$ ); #与模型组相比, 差异显著( $P < 0.05$ ); ##与模型组相比, 差异极显著( $P < 0.01$ ), 下同

Fig. 3 Effects of *S. bigelovii* flavonoids on liver index in mice

1. BC(blank control group); 2. M(model group); 3. PC(positive control group); 4. FL(low does group); 5. FM(middle does group); 6. FH(high does group); compared to blank control group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; compared to model group, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , the same below

酶在血清中的活性水平显著增高。另外, 海芦笋黄酮各剂量组小鼠的血清ALT、AST活性显著低于M组, 其中, 中、高剂量组与M组的ALT、AST活性差异极显著( $P < 0.01$ ), 低剂量组与M组的差异显著( $P < 0.05$ ); 不同剂量的海芦笋黄酮均能明显地降低因 $CCl_4$ 损伤所造成的ALP活性升高的现象( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ); 而且中、高剂量组的血清ALT、AST、ALP酶活性水平与阳性对照组相近。结果表明, 海芦笋黄酮明显削弱了肝细胞受损导致的ALT、AST、ALP在血清中的活性升高趋势, 对因 $CCl_4$ 引起的小鼠急性肝损伤具有一定的预防保护效果。

海芦笋黄酮对 $CCl_4$ 致急性肝损伤小鼠肝脏中MDA、SOD、GSH、CAT含量的影响 众多研究表明, 肝损伤是一个由多种因素共同作用造成的复杂过程, 而脂质过氧化以及自由基在其中扮演重要角色, 脂质过氧化反应最终生成的MDA因能与生物大分子共价结合而具有细胞毒性, 肝组织中MDA的含量体现了肝细胞中脂质过氧化的受损程度, 其在组织中含量的上升侧面反映了自由基攻击肝细胞的加剧。GSH在机体内起到清除自由基、抗氧化的重要作用, 发生肝脏病变时, GSH含量下降, 其对肝细胞的保

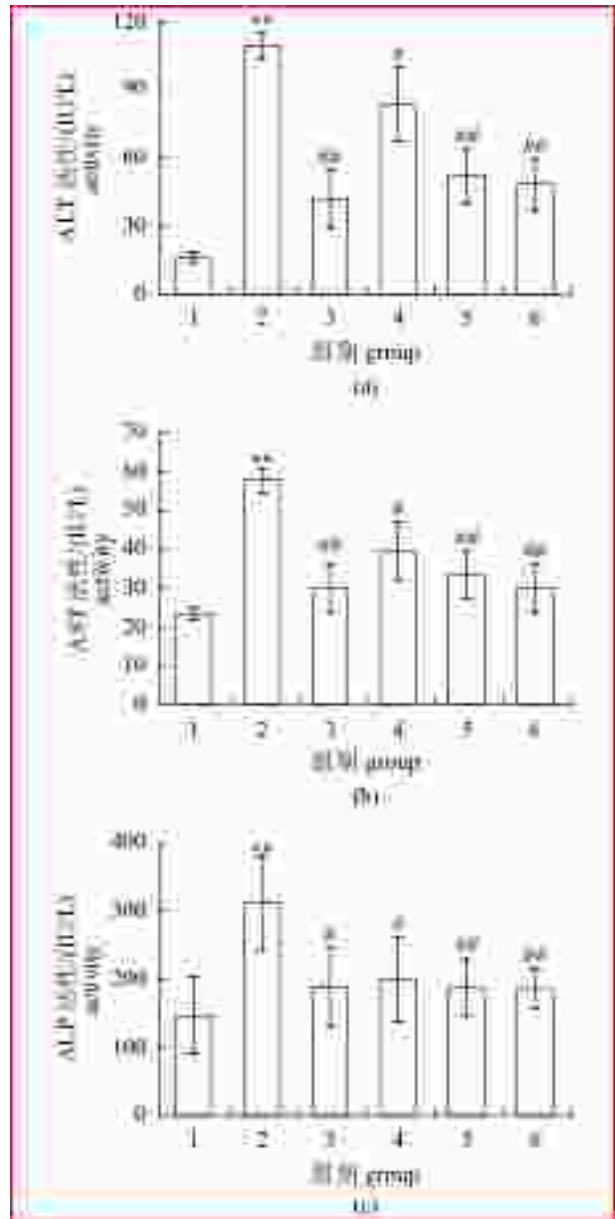


图4 海芦笋黄酮对血清ALT(a)、AST(b)、ALP(c)的影响

Fig. 4 Effects of *S. bigelovii* flavonoids on the serum ALT (a), AST (b), ALP (c) in mice

护作用亦降低, 加剧受损情况; 作为体内的重要抗氧化酶, SOD、CAT共同参与氧自由基等的清除, 能够间接反映机体对自由基的清除能力, 抗氧化酶系与抗氧化物质在机体内共同组成的氧化与抗氧化系统通过清除过量自由基, 维持机体自由基平衡<sup>[19-20]</sup>。

与BC组相比, M组小鼠肝脏MDA的含量增加了87.70%, 而SOD活性、GSH含量、CAT活性分别下降了10.75%、48.03%、21.69%(图5), 差异

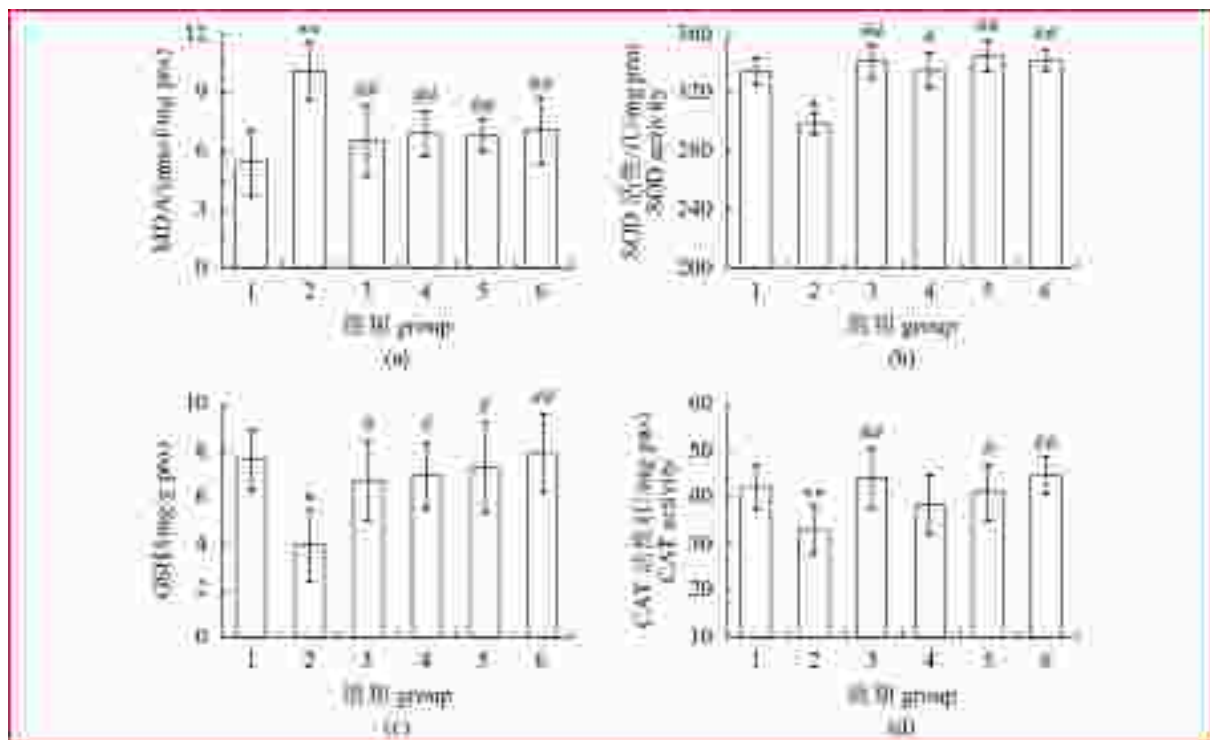


图5 海芦笋黄酮对小鼠肝脏MDA(a)、SOD(b)、GSH(c)、CAT(d)的影响

Fig. 5 Effects of *S. bigelovii* flavonoids on the liver MDA (a), SOD (b), GSH (c), CAT (d) in mice

显著( $P<0.05$ ),说明注射CCl<sub>4</sub>引起了自由基在体内的急剧增加,进而造成了小鼠体内脂质过氧化程度增大,用于抵御自由基损伤的抗氧化酶活性的降低,动物模型建立成功。

海芦笋黄酮各剂量组小鼠的肝脏MDA含量极显著低于M组小鼠( $P<0.01$ ),海芦笋黄酮对肝细胞内过氧化反应程度起到了削弱作用;FM、FH组小鼠的肝脏SOD活性极显著高于M组( $P<0.01$ ),FL组的肝脏SOD活性显著高于M组( $P<0.05$ );各剂量组的肝脏CAT活性随剂量增加而升高,其中FM组显著高于M组, FH组极显著高于M组,说明海芦笋黄酮增强了模型小鼠肝脏内抗氧化酶的活性。与M组相比,FL、FM、FH组的肝脏GSH含量分别升高了83.29%、84.38%、107.17%,差异显著( $P<0.05$ ),表明海芦笋黄酮减轻了因造模引起的肝脏内GSH的减少。因此,海芦笋黄酮对CCl<sub>4</sub>导致的小鼠急性肝损伤的保护机制,可能与其提高机体抗氧化能力,减缓肝脏内脂质氧化的程度相关。

**H.E染色结果** BC组小鼠肝脏切片的肝小叶结构清晰,肝细胞形态正常,并以中央静脉为中心呈放射状排列,细胞核大而圆,核膜清晰(图版-1);而M组切片中肝小叶结构模糊,肝

细胞索紊乱,细胞胞浆疏松,部分发生气球样变,并伴有炎细胞浸润,细胞核不同程度固缩、染成黑色(图版-2);海芦笋黄酮各剂量组及阳性对照组切片中肝小叶结构趋于正常,与M组相比,气球样变、炎细胞浸润、细胞水肿等现象都有所改善,核固缩情况减少,其中FL组仍存在细胞坏死、炎细胞浸润现象,FM、FL组也有部分的细胞水肿、样变,效果略低于阳性对照组(图版-3~6)。

### 3 讨论

清除自由基是体外抗氧化作用的主要研究方法之一,黄酮类物质可通过其自身所富含的酚羟基作为供氢体与多种自由基的单电子结合,起到清除自由基的作用;同时,黄酮也可与金属离子螯合使自由基的产生受阻。在岳秀洁等<sup>[22]</sup>的研究中,0.5 mg/mL的辣木(*Moringa oleifera*)叶黄酮对DPPH和ABTS自由基清除率分别为79%、99%;50 μg/mL海芦笋黄酮的DPPH清除率为93%,ABTS自由基清除率为99%;海芦笋黄酮的羟基自由基、超氧阴离子自由基最大清除率分别为52%、45%,低于柿叶黄酮的羟基自

由基与超氧阴离子自由基清除率(65%、85%)<sup>[18]</sup>。

作为经典的肝毒性药物, CCl<sub>4</sub>进入机体以后, 经过肝微粒体中的细胞色素氧化酶P450激活, 首先产生·CCl<sub>3</sub>, 之后迅速与氧反应, 产生更为活泼的CCl<sub>3</sub>O·及一系列氧活性物。这些自由基可以与巯基反应, 继而与细胞内的多种大分子发生交联, 并攻击肝细胞膜, 引起脂质过氧化, 造成膜完整性破坏、脂质流动性降低等, 最终使肝脏受损<sup>[21]</sup>。在Zhang等<sup>[5]</sup>的研究中, 金樱子果黄酮显著削弱了因CCl<sub>4</sub>诱导的肝脏指数、AST、ALT升高趋势, 并使肝脏抗氧化酶活性增强; 而黄小波等<sup>[3]</sup>发现四棱豆黄酮减缓了肝细胞脂质过氧化反应, 从而使肝脏MDA明显降低, 同时提高了SOD、CAT活性及GSH含量, 其均对CCl<sub>4</sub>导致的小鼠急性肝损伤有良好的保护效果。

本研究通过测定海芦笋黄酮在体外对4种自由基的清除率, 以反映其抗氧化效果, 并通过测定它对血清中ALT、AST、ALP活性及肝组织匀浆SOD、CAT活性, MDA、GSH含量变化的影响和病理学改变, 来反映造模后小鼠的肝损伤情况及海芦笋黄酮对肝脏的保护作用。研究表明, 海芦笋黄酮对4种自由基均能起到清除效果, 具有一定的抗氧化能力; 能够减缓血清ALT、AST、ALP水平的升高, 减少MDA产生并提高SOD、CAT、GSH水平, 对CCl<sub>4</sub>小鼠模型中因自由基增加、脂质过氧化加剧造成的急性肝损伤起到了一定预防保护作用, 而保护机制与金樱子果黄酮、四棱豆黄酮等相似, 可能与其调节体内抗氧化体系活性, 使小鼠体内氧化与抗氧化平衡趋于正常, 进而减轻肝组织氧化应激, 缓解脂质过氧化等作用相关, 但具体的作用机制仍需进一步研究。本研究为进一步探索海芦笋的生理活性、综合利用海芦笋资源、拓宽天然保肝活性物质的来源提供了重要理论依据。

#### 参考文献:

- [1] 朱安妮, 李蕊, 刘三海, 等. 四氯化碳诱导小鼠急性肝损伤模型的建立和优化[J]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2014, 6(1): 27-31.
- Zhu A N, Li R, Liu S H, *et al.* Establishment of carbon tetrachloride-induced acute liver injury murine model[J]. Chinese Journal of Liver Diseases (Electronic Version), 2014, 6(1): 27-31(in Chinese).
- [2] 张宽朝, 文汉, 胡雅萍, 等. 贡菊黄酮抗小鼠急性肝损伤作用的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(2): 183-187.
- Zhang K C, Wen H, Hu Y P, *et al.* Effects of flavonoids of *Chrysanthemum Morifolium* cv. Gongju against acute liver injury of mice[J]. Natural Product Research and Development, 2014, 26(2): 183-187(in Chinese).
- [3] 黄小波, 付明, 陈东明. 四棱豆总黄酮抗氧化和抗肝损伤作用研究[J]. 食品科学, 2015, 36(15): 206-211.
- Huang X B, Fu M, Chen D M. Antioxidant activity and hepatoprotective activity of total flavonoids from *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC. seeds[J]. Food Science, 2015, 36(15): 206-211(in Chinese).
- [4] Tong J, Yao X C, Zeng H, *et al.* Hepatoprotective activity of flavonoids from *Cichorium glandulosum* seeds *in vitro* and *in vivo* carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2015, 174: 355-363.
- [5] Zhang S, Lu B N, Han X, *et al.* Protection of the flavonoid fraction from *Rosa laevigata* Michx fruit against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice[J]. Food and Chemical Toxicology, 2013, 55: 60-69.
- [6] 伍小燕, 唐爱存. 含羞草总黄酮对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 实用临床医药杂志, 2010, 14(19): 9-11.
- Wu X Y, Tang A C. Protective effects of total flavonoids of *Mimosa pudica* L on CCl<sub>4</sub>-induced acute liver injury in mice[J]. Journal of Clinical Medicine in Practice, 2010, 14(19): 9-11(in Chinese).
- [7] 王楠. 海蓬子标准组分制备及其物质基础研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
- Wang N. Preparation of the standard components and the study of the material basis of the *Salicornia bigelovii* Torr[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014 (in Chinese).
- [8] Kong C S, Seo Y. Antiadipogenic activity of isohamnetin 3-O-β-D-glucopyranoside from *Salicornia herbacea*[J]. Immunopharmacology and Immunotoxicology, 2012, 34(6): 907-911.
- [9] Kong C S, Kim J A, Qian Z J, *et al.* Protective effect of isorhamnetin 3-O-β-D-glucopyranoside from *Salicornia herbacea* against oxidation-induced cell damage[J]. Food and Chemical Toxicology, 2009, 47(8): 1914-1920.
- [10] Kong C S, Kim Y A, Kim M M, *et al.* Flavonoid glyco-

- sides isolated from *Salicornia herbacea* inhibit matrix metalloproteinase in HT1080 cells[J]. *Toxicology in Vitro*, 2008, 22(7): 1742-1748.
- [11] Lee Y S, Lee S, Lee H S, *et al.* Inhibitory effects of isorhamnetin-3-*O*- $\beta$ -D-glucoside from *Salicornia herbacea* on rat lens aldose reductase and sorbitol accumulation in streptozotocin-induced diabetic rat tissues[J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2005, 28(5): 916-918.
- [12] 李仁伟, 何键东, 徐青, 等. 海芦笋黄酮类化合物抗氧化活性研究[J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(28): 13989-13992.
- Li R W, He J, Xu Q, *et al.* Study on anti-oxidative activities of flavones extract from sea asparagus[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2012, 40(28): 13989-13992(in Chinese).
- [13] 李仁伟, 王朋, 徐青, 等. 海芦笋黄酮化合物抑菌效果研究[J]. *浙江海洋学院学报(自然科学版)*, 2012, 31(2): 138-141.
- Li R W, Wang P, Xu Q, *et al.* Effect of flavone compound on antibacterial of *Salicornia bigelovii* Torr[J]. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science Edition)*, 2012, 31(2): 138-141(in Chinese).
- [14] Kishk Y F M, Al-Sayed H M A. Free-radical scavenging and antioxidative activities of some polysaccharides in emulsions[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2007, 40(2): 270-277.
- [15] 陈佳, 徐怀德, 米林峰, 等. 洋葱皮总黄酮纤维素酶法提取及抗氧化研究[J]. *食品科学*, 2011, 32(4): 37-41.
- Chen J, Xu H D, Mi L F, *et al.* Enzymatic extraction and antioxidant activity of onion peel flavonoids[J]. *Food Science*, 2011, 32(4): 37-41(in Chinese).
- [16] 郭雪峰, 岳永德, 汤锋, 等. 用清除有机自由基DPPH法评价竹叶提取物抗氧化能力[J]. *光谱学与光谱分析*, 2008, 28(7): 1578-1582.
- Guo X F, Yue Y D, Tang F, *et al.* Detection of antioxidative capacity of bamboo leaf extract by scavenging organic free radical DPPH[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2008, 28(7): 1578-1582(in Chinese).
- [17] 李静, 张朝辉, 段筱杉, 等. 大叶藻黄酮对酒精性肝损伤的保护作用[J]. *水产学报*, 2016, 40(5): 799-806.
- Li J, Zhang Z H, Duan X S, *et al.* Protective effect of flavonoids from *Zostera marina* against chronic alcohol hepatic injury in mice[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(5): 799-806(in Chinese).
- [18] 张艳. 柿叶黄酮体外抗氧化活性及对小鼠急性肝损伤保护作用的研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2011.
- Zhang Y. Study on antioxidant activity and protective effect of acute liver injury in mice of Persimmon leaf flavonoids[D]. Xi'an: Shaanxi Normal University, 2011 (in Chinese).
- [19] 王佳佳, 赵莎莎, 杨最素, 等. 文蛤寡肽对小鼠急性肝损伤的保护作用[J/OL]. *食品科学*, 2016, <http://www.spkx-net.cn/CN/abstract/abstract39495.shtml>.
- Wang J J, Zhao S S, Yang Z S, *et al.* Protective effect of *Meretrix meretrix* oligopeptides on acute liver injury in mice[J/OL]. *Food Science*, 2016, <http://www.spkx.net.cn/CN/abstract/abstract39495.shtml> (in Chinese).
- [20] 齐艳萍. 鹿茸对小鼠急性肝损伤的修复作用及相关机理研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2008.
- Qi Y P. The recovery effects and mechanism of velvet on acute liver injury in rats[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2008 (in Chinese).
- [21] 王晓洁, 史倩, 张晨晨, 等. 中国蛤蚧水提取物对小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. *食品科学*, 2011, 32(19): 205-208.
- Wang X J, Shi Q, Zhang C C, *et al.* Protective effect of water extract from *Maetra chinensis* against acute hepatic injury of mice[J]. *Food Science*, 2011, 32(19): 205-208(in Chinese).
- [22] 岳秀洁, 李超, 扶雄. 超声提取辣木叶黄酮优化及其抗氧化活性[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(1): 226-231.
- Yue X J, Li C, Fu X. Optimization of ultrasonic extraction of flavonoids from *Moringa stenopetala* leaves and their antioxidant activities[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(1): 226-231(in Chinese).



## Antioxidant and protective effect of flavonoids from *Salicornia bigelovii* against CCl<sub>4</sub>-induced acute hepatic injury in mice

DUAN Xiaoshan , ZHANG Zhaohui\* , YING Rui , ZHAO Tengfei , LIU Ao ,  
LI Bafang , ZHAO Xue , HOU Hu

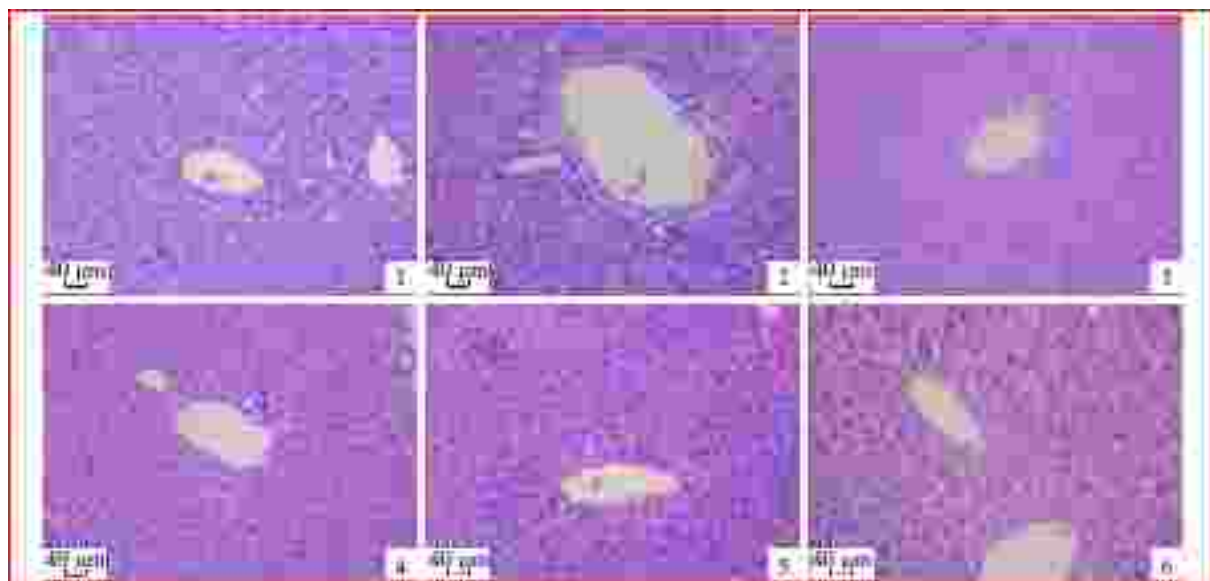
(College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** To investigate the antioxidant effects and the protective effects of the flavonoids from *Salicornia bigelovii* on CCl<sub>4</sub>-induced acute hepatic injury in mice, the scavenging DPPH, ABTS, hydroxyl free radicals and superoxide anion free radicals abilities of the flavonoids from *S. bigelovii* were studied to show its antioxidant ability in vitro. Mice with acute hepatic injury were simulated by intraperitoneal injecting CCl<sub>4</sub>. Before simulation, mice were administered with the flavonoids everyday at doses of 75, 150, 300 mg/(kg·d) for 8 days. After that, mice in each group were sacrificed to determine the indexes including the enzyme activity of ALT, AST, ALP in the serum and MDA, GSH, CAT, SOD in the hepatic tissue. Meanwhile, the pathological changes in the hepatic tissues of each group were determined. In the experimental concentration range, the flavonoids from *S. bigelovii* have a good effect on scavenging four free radicals. Compared with the simulation group, the level of serum ALT, AST, ALP and liver MDA in each dose decreased significantly, and levels of SOD, GSH rose. The level of liver CAT in high and middle dose group was higher than that in the simulation group significantly. The result of the tissue section after H.E staining showed that the damage of liver tissues in each dose had different degrees of improvement. *S. bigelovii* flavonoids can obviously protect against CCl<sub>4</sub>-induced acute liver injury in mice, and the protective mechanism is related to the fact that flavonoids can enhance antioxidant capacity and relieve membrane lipid per-oxidation.

**Key words:** *Salicornia bigelovii*; flavonoids; antioxidant; CCl<sub>4</sub>; acute hepatic injury

**Corresponding author:** ZHANG Zhaohui. E-mail: zhangzh@ouc.edu.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31272705)



图版 小鼠肝脏病理切片观察结果(H.E×40)

1. BC组; 2. M组; 3. PC组; 4. FL组; 5. FM组; 6. FH组

**Plate Pathologic observation of liver in mice (H.E×40)**

1. BC; 2. M; 3. PC; 4. FL; 5. FM; 6. FH