

## • 研究论文 •

## 荒漠肉苁蓉总苷对酒精性肝损伤小鼠的保护作用研究

王富江, 屠鹏飞, 曾克武\*, 姜 勇\*

(北京大学天然药物与仿生药物国家重点实验室, 北京 100191)

**摘要:** 现代药理研究表明荒漠肉苁蓉具有肝保护作用, 但其活性部位及作用机制并不清楚。为了明确荒漠肉苁蓉发挥肝保护作用的活性部位, 本研究建立了急性酒精性肝损伤小鼠模型, 并在此基础上对荒漠肉苁蓉的不同提取物部位 (荒漠肉苁蓉总苷、荒漠肉苁蓉多糖和荒漠肉苁蓉寡糖) 进行肝保护活性筛选。连续灌胃给药 14 天后, 检测小鼠的肝脏病理结构及脂质沉积, 并采用免疫荧光检测核因子 E2 相关因子 (nuclear factor E2 related factors, Nrf-2)、胞质蛋白伴侣分子 (kelch-like ECH-associated protein-1, Keap-1) 及质膜囊泡相关蛋白 1 (plasmalemma vesicle-associated protein-1, PV1) 的蛋白表达, 采用 ELISA 方法检测血清中谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST)、内毒素 (endotoxin, ET)、二胺氧化酶 (diamine oxidase, DAO) 和 D-乳酸 (D-lactic acid, D-LA) 含量, 及肝脏中超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 及过氧化氢酶 (catalase, CAT) 活性和丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量。动物实验操作和福利均遵循北京大学医学部实验动物伦理与动物福利委员会的规定。结果显示, 与模型组相比, 荒漠肉苁蓉总苷能够改善肝脏病理结构及降低肝脏中脂质沉积和血清中 ET、DAO 和 D-LA 含量。同时, 荒漠肉苁蓉总苷能够促进 Nrf-2 入核并降低 Keap-1 和 PV1 表达。由此可见, 荒漠肉苁蓉总苷在 400 mg·kg<sup>-1</sup> 剂量下对急性酒精性肝损伤具有保护作用, 其作用机制可能与激活 Nrf-2/Keap-1 通路和改善肠壁完整性有关。

**关键词:** 肉苁蓉; 酒精性肝损伤; 荒漠肉苁蓉总苷; 肝保护; Nrf-2/Keap-1 通路

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)09-2528-08

## Protective effects of the total glycosides of *Cistanche deserticola* Y. C. Ma in alcoholic liver injury in mice

WANG Fu-jiang, TU Peng-fei, ZENG Ke-wu\*, JIANG Yong\*

(State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, Peking University, Beijing 100191, China)

**Abstract:** Modern pharmacological studies have shown that *Cistanche deserticola* (*C. deserticola*) has a protective effect on the liver, but its active fraction and mechanism are not clear. In order to identify the effective fraction of *C. deserticola* Y. C. Ma, an acute alcoholic liver injury model in mice was established with 56-proof Erguotou and different fractional extracts of *C. deserticola* Y. C. Ma (total glycosides, polysaccharides, and oligosaccharides) were administered. After 14 days of oral administration, liver pathology and lipid deposition were measured and the expression of nuclear factor E2-related factor (Nrf-2), kelch-like ECH-associated protein-1 (Keap-1), and plasmalemma vesicle-associated protein-1 (PV1) were measured by immunofluorescence. The levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), endotoxin (ET), diamine oxidase (DAO), and D-lactic acid (D-LA) in serum, and superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT), and malondialdehyde (MDA) in liver were measured by ELISA. All animal experiments were carried out with approval of the Experimental Animal Welfare Ethics Committee of the Peking University Health Science

收稿日期: 2020-09-26; 修回日期: 2020-11-06.

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFC1702402); 国家自然科学基金资助项目 (81773932).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-82802719, E-mail: ZKW@bjmu.edu.cn; yongjiang@bjmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-1563

Center. The results show that the total glycosides of *C. deserticola* Y. C. Ma (400 mg·kg<sup>-1</sup>) could decrease liver pathology, decrease serum endotoxin, diamine oxidase, and *D*-lactic acid, and reduce hepatic lipid deposition. Total glycosides also promoted Nrf-2 transfer into the nucleus and decreased the expression of Keap-1 and PV1. In summary, the total glycosides of *C. deserticola* Y. C. Ma had a protective effect in acute alcoholic liver injury and the mechanism may be related to the activation of the Nrf-2/Keap-1 pathway, improvement of intestinal wall integrity, and inhibition of the transport of harmful substances into the liver.

**Key words:** *Cistanche deserticola* Y. C. Ma; alcoholic liver disease; total glycosides of *C. deserticola* Y. C. Ma; liver protection; Nrf-2/Keap-1 pathway

酒精性肝病 (alcoholic liver disease, ALD) 是指长期大量饮酒导致的肝脏疾病, 初期常表现为酒精性脂肪肝, 进而发展为酒精性肝炎、肝纤维化和肝硬化, 甚至肝功能衰竭<sup>[1]</sup>。近年来, 随着人们生活水平的提高, 酒精性肝病患者比例不断上升, 严重危害人民健康<sup>[2]</sup>。研究发现, ALD 主要是乙醇及其代谢产物直接或间接诱导的炎症反应、氧化应激和肠源性内毒素等多种因素相互作用的结果, 尤其是肠道屏障功能受损引起的肠源性内毒素血症及内毒素激活 Kupffer 细胞在 ALD 的发生和发展中有重要作用<sup>[3]</sup>。

中药肉苁蓉为列当科植物荒漠肉苁蓉 *Cistanche deserticola* (*C. deserticola*) Y. C. Ma 或管花肉苁蓉 *Cistanche tubulosa* (Schenk) R. Wight 干燥带鳞叶的肉质茎。研究表明, 肉苁蓉具有增强机体的免疫功能、抗衰老、抗辐射、抗氧化以及抗脂质过氧化和对酒精肝损伤的保护作用<sup>[4-7]</sup>。以往的研究主要集中于管花肉苁蓉, 关于荒漠肉苁蓉的肝保护作用及其活性成分并不清楚。本文将基于急性酒精性肝损伤模型, 探讨荒漠肉苁蓉不同部位提取物的肝保护作用及其作用机制, 为后期肉苁蓉在肝保护方面的研究和开发提供理论依据。

## 材料与方 法

**实验动物** 健康昆明小鼠, 雄性, 体重 (22 ± 5) g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证编号为 SCXK (京) 2016-0011, 饲养于北京大学医学部动物实验中心, 室温 20~25 °C, 湿度 56%~60%。实验动物所有操作均严格按照北京大学医学部动物伦理委员会标准执行 (LA2019123)。

**肉苁蓉提取物的制备及含量测定** 参照课题组之前报道的肉苁蓉提取物制备方法及含量测定方法<sup>[8-10]</sup>。10 kg 荒漠肉苁蓉经水提醇沉得到 3.7% 多糖, 在经树脂纯化水洗脱液浓缩得到 38% 总寡糖稠膏, 40% 乙醇洗脱干燥得到 3.7% 总苷。分别将这 3 种提取物用于实验研究。

**实验试剂** HE 染色液 (G1120)、油红 O 染色液

(G1260)、谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) 活性检测试剂盒 (批号 BC1555) 及谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) 活性检测试剂盒 (批号 BC1560) 均购于北京索莱宝生物科技有限公司; 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 试剂盒 (批号 A001-3)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 试剂盒 (批号 A005)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒 (批号 A003-1)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 检测试剂盒 (A007-1)、内毒素 (endotoxin, ET) 试剂盒 (E039-1-1)、二胺氧化酶 (diamine oxidase, DAO) 试剂盒 (A088-2-1) 和 *D*-乳酸 (*D*-lactic acid, *D*-LA) 试剂盒 (H263) 均为南京建成生物工程研究所; 联苯双酯 (bifendate, BIF, 批号: S4890) 由上海蓝木化工有限公司提供; 56 度 (酒精含量 56%) 红星二锅头由北京红星股份有限公司提供; 质膜囊泡相关蛋白 1 (plasmalemma vesicle-associated protein-1, PV1) 抗体 (ab32570)、核因子 E2 相关因子 (nuclear factor E2 related factors, Nrf-2) 抗体和胞质蛋白伴侣分子 (kelch-like ECH-associated protein-1, Keap-1) (ab66620) 均购于 Abcam 公司。

**实验仪器** 石蜡切片机 (德国 Leica 公司); Sunrise-Basic 酶标仪 (瑞士 TECAN 公司); 高速冷冻离心机 (美国贝克曼公司); 倒置荧光显微镜 (IX73) (日本 Olympus 公司)。

**急性酒精性肝损伤小鼠模型的制备及分组** 60 只雄性健康昆明小鼠, 称重, 正常组 (normal group, NOR) 10 只, 其余小鼠灌胃红星二锅头<sup>[9]</sup>, 按 0.01 mL·g<sup>-1</sup> 剂量灌胃, 每日 1 次, 连续灌胃 7 天。7 天后, 按体重随机分为模型组 (model group, MOD)、联苯双酯组 (bifendate group, BIF, 0.9 mg·kg<sup>-1</sup>)、荒漠肉苁蓉总苷组 (TGs, 400 mg·kg<sup>-1</sup>)、荒漠肉苁蓉多糖组 (PSs, 400 mg·kg<sup>-1</sup>) 和荒漠肉苁蓉寡糖组 (OSs, 400 mg·kg<sup>-1</sup>) 5 组, 给药剂量根据课题组前期研究设定<sup>[11]</sup>。各组分别灌胃生理盐水、联苯双酯、荒漠肉苁蓉总苷、荒漠肉苁蓉多糖和荒漠肉苁蓉寡糖, 连续给药 14 天, 药物均采用生理盐水配制。由于连续灌胃酒精, 有部分小鼠死亡, 最后给药每组 8 只。

**小鼠各脏器系数检测** 末次给药 30 min 后, 获取各脏器, 并按此公式: 脏器系数 = [脏器湿重 (g)/大鼠体重 (g)] $\times$ 100% 计算各脏器系数, 并用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。

**HE 染色** 上述肝组织经组织固定液固定后, 常规石蜡包埋切片, 进行苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色后, 在光学显微镜下观察组织病理变化。

**指标检测** 取各组小鼠血清, 按照试剂盒说明书检测 ALT、AST、ET、DAO 和 D-LA 含量, 处死小鼠取出肝脏, 制备肝组织匀浆, 按照试剂盒说明书检测 CAT、SOD、GSH-Px 活性及 MDA 含量。

**油红 O 染色** 取固定好的小鼠肝脏组织, 置于 30% 蔗糖溶液中, 待肝脏组织沉底后, 转移至 20% 蔗糖溶液中, 待沉底后, 改刀包埋, 冰冻切片切片机切片, 片厚 100  $\mu$ m。滴加 1 $\times$ PBS 洗涤 10 min, 放入 60% 异丙醇浸洗 20~30 s; 然后加入改良油红 O 染色液中, 密闭染色 10~15 min; 放入 60% 异丙醇溶液中稍洗以便去除染液, 自来水漂洗 10 min, 甘油明胶封片, 显微镜下观察拍照。

**免疫荧光化学染色** 石蜡切片脱蜡复水, 柠檬酸钠抗原修复, 滴加一抗 PV1 (1:200)、Nrf-2 (1:100) 及 Keap-1 (1:200), 4  $^{\circ}$ C 过夜, PBS 冲洗, 滴加 TRITC 荧光二抗 (1:100), 避光室温孵育 1 h。Hoechst 33258 染核, 抗荧光衰减封片剂避光封片, 荧光显微镜拍照。

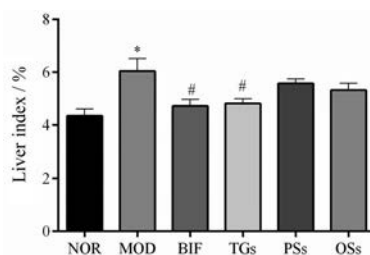
**TUNEL 染色** 石蜡切片脱蜡复水, 滴加 20  $\mu$ g $\cdot$ mL $^{-1}$  不含 DNase 的蛋白酶 K 稀释液, 于 37  $^{\circ}$ C 下反应 30 min, 再滴加 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液于室温下孵育 20 min, 随后用 0.01 mol $\cdot$ L $^{-1}$  PBS 缓冲溶液洗涤 3 次; 滴加 50  $\mu$ L 生物素标记液, 于 37  $^{\circ}$ C 下孵育 60 min, 终止反应; 再滴加 50  $\mu$ L streptavidin-TRITC 工作液, 避光室温孵育 30 min, DAPI 染核, 封片, 显微镜下观察, 荧光显微镜拍照。

**统计学处理** 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。计量资料以均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 正态分布计量资料组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 组间两两比较若方差齐采用 SNK 法, 若方差不齐采用 Dunnett's T3 法, 计数资料采用卡方检验 (chi-square test), 采用 GraphPad Prism 5 进行数据作图, 最小显著差异水平设定为  $P < 0.05$ 。

## 结果

### 1 TGs 能够显著降低酒精性肝损伤小鼠肝脏系数

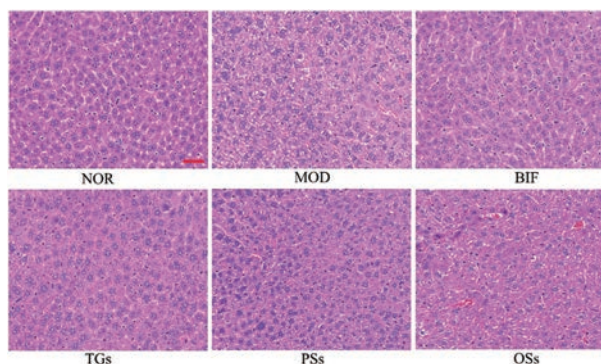
如图 1 所示, 与 NOR 组相比, MOD 组肝脏系数明显增加; 与 MOD 组比较, TGs 干预后, 肝脏系数明显降低, 而 PSs 和 OSs 对肝脏系数无影响, TGs 与 BIF 相比无显著差异。



**Figure 1** Effects of extracts of *C. deserticola* Y. C. Ma on liver index in alcoholic liver injury mice.  $n = 8$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$  vs NOR; # $P < 0.05$  vs MOD. NOR: Normal group; MOD: Model group; BIF: Bifendate group; TGs: Total glycosides group; PSs: Polysaccharides group; OSs: Oligosaccharides group

### 2 TGs 能够显著改善酒精性肝损伤小鼠肝脏组织病理形态

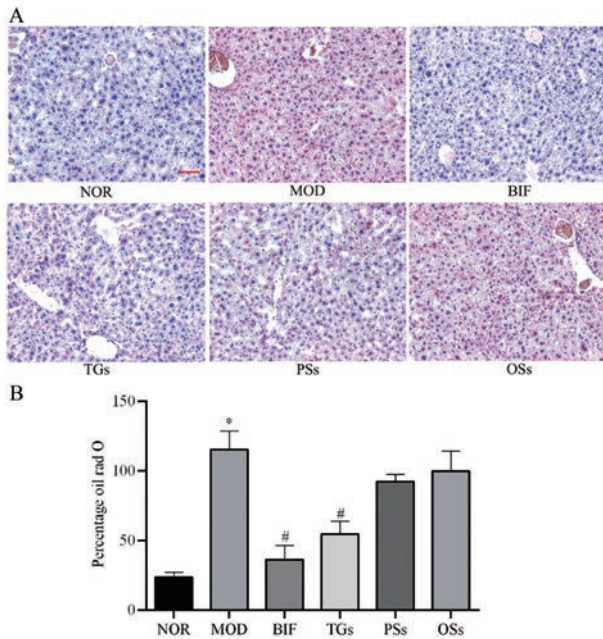
HE 染色结果显示, NOR 组肝脏组织细胞形态正常, 细胞排列整齐, 染色均匀, 细胞结构完整, 细胞间隙致密; MOD 组结构紊乱, 细胞排列不规则, 细胞间隙疏松, 细胞界限不清; BIF 和 TGs 干预后细胞形态改变明显好于模型组, 细胞数量较模型组多, TGs 与 BIF 相比无显著差异, PSs 和 OSs 组对肝脏的病理形态都没有显著的改善作用, 说明 TGs 具有肝保护作用, 而 PSs 和 OSs 无明显改善作用, 如图 2 所示。



**Figure 2** Effects of extracts of *C. deserticola* Y. C. Ma on histopathological changes of liver in alcoholic liver injury mice.  $n = 5$ . Scale bar = 100  $\mu$ m

### 3 TGs 能够显著降低酒精性肝损伤小鼠肝脏组织脂质沉积

油红 O 染色结果显示, NOR 组有少量的脂质沉积, 而 MOD 组脂质沉积明显增加; 与 MOD 组相比, TGs 干预后脂质沉积明显减少; TGs 与 BIF 相比无显著差异; PSs 和 OSs 对脂质在肝脏的沉积并没有显著改变。实验结果说明 TGs 能够减轻酒精性肝损伤小鼠肝脏脂质沉积, 而 PSs 和 OSs 对酒精性肝损伤小鼠肝脏脂质沉积并没有改善, 无降脂作用 (图 3)。



**Figure 3** Effects of extracts of *C. deserticola* Y. C. Ma on lipid deposition of liver in alcoholic liver injury mice. A: Oil red O staining; B: Quantitative analysis of lipid deposition in different groups.  $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$  vs NOR; # $P < 0.05$  vs MOD. Scale bar = 100  $\mu\text{m}$

#### 4 TGs能够显著降低酒精性肝损伤小鼠肝脏ALT和AST水平

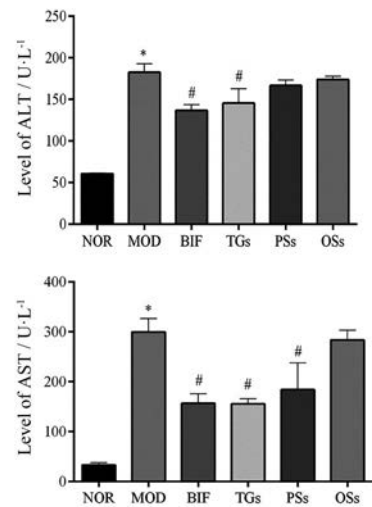
如图4结果显示,与NOR组相比,MOD组ALT和AST水平明显增加;与MOD组相比,TGs组ALT和AST水平明显降低;TGs与BIF相比无显著差异;而PSs和OSs组ALT和AST水平并没有显著变化,说明TGs抑制肝脏损伤,具有肝保护作用。

#### 5 TGs能够显著抑制酒精性肝损伤小鼠肝脏细胞凋亡

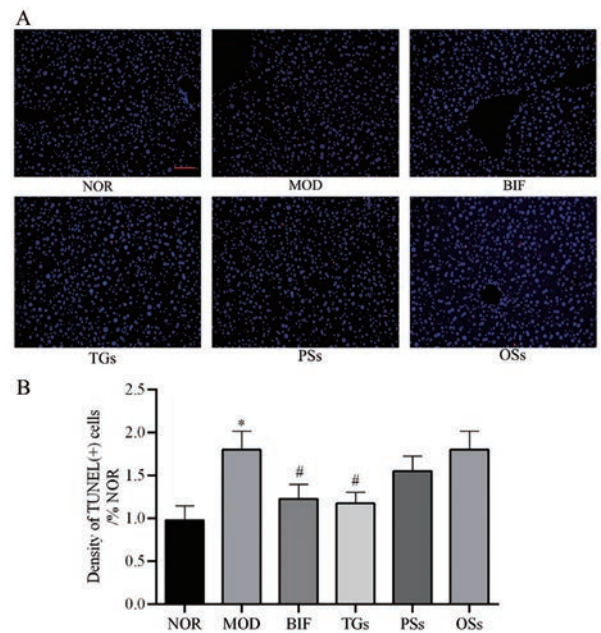
酒精对肝细胞造成损伤后,细胞核内的DNA发生断裂,TUNEL染色呈现阳性表达。如图5所示,MOD组肝脏中有大量细胞发生凋亡,与MOD组相比,TGs组细胞凋亡明显减少,TGs与BIF相比无显著差异;而PSs和OSs组细胞凋亡情况并没有显著变化,说明TGs能够抑制细胞凋亡。

#### 6 TGs能够显著改善酒精性肝损伤小鼠小肠病理形态

HE染色结果显示,NOR组小肠组织细胞形态正常,绒毛排列整齐,肠壁均匀,细胞结构完整,细胞间隙致密;MOD组结构紊乱,绒毛排列不规则,断裂状,肠壁变薄;BIF和TGs干预后细胞形态得到明显改变,肠壁增厚,PSs和OSs组对小肠病理形态都没有显著的改善作用,说明TGs对肠壁和绒毛完整性具有保护作用,



**Figure 4** Effects of extracts of *C. deserticola* Y. C. Ma on alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in alcoholic liver injury mice.  $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$  vs NOR; # $P < 0.05$  vs MOD

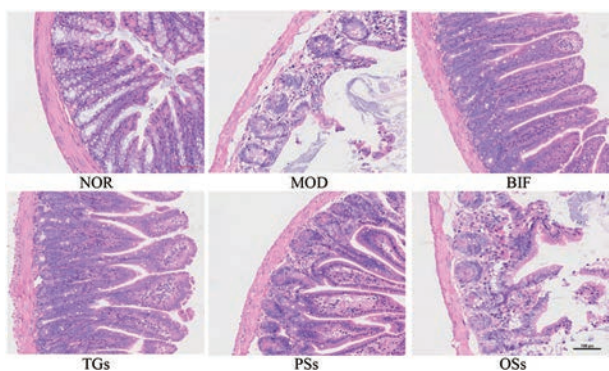


**Figure 5** Effects of extracts of *C. deserticola* Y. C. Ma on apoptosis in alcoholic liver injury mice. A: TUNEL staining of liver sections; B: Quantitative analysis of apoptosis in different groups.  $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$  vs NOR; # $P < 0.05$  vs MOD. Scale bar = 100  $\mu\text{m}$

如图6所示。

#### 7 TGs显著降低酒精性肝损伤小鼠小肠壁PV1蛋白表达

PV1蛋白是一种II型整合膜糖蛋白,是肠血管屏障通透性指标,免疫荧光染色检测其表达,以观察荒漠肉苁蓉提取物对肠壁通透性的影响。如图7所示,与NOR组相比,MOD组小肠壁中PV1蛋白表达水平显



**Figure 6** Effects of extracts of *C. deserticola* Y. C. Ma on histopathological changes of small intestine in alcoholic liver injury mice.  $n = 5$ . Scale bar = 100  $\mu\text{m}$

著增加; 与MOD组相比, TGs组PV1蛋白表达量明显降低; TGs与BIF相比具有显著差异; 而PSs和OSs组PV1蛋白表达并没有显著变化, 说明TGs能够促进小肠壁修复。

### 8 TGs能够显著改善酒精性肝损伤小鼠血清ET、DAO和D-LA含量

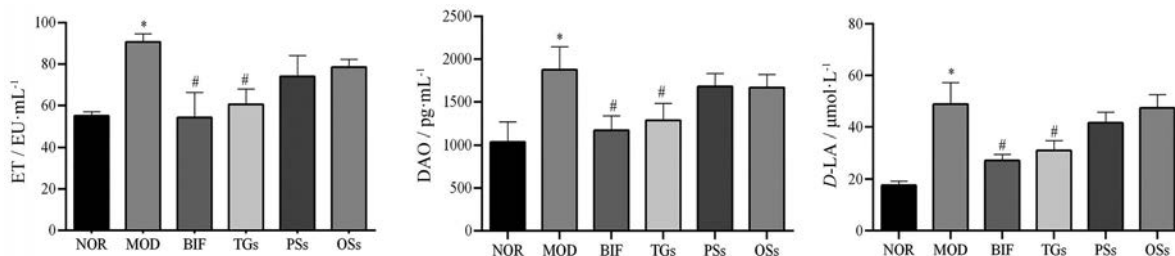
如图8结果显示, 与NOR组相比, MOD组血清中ET、DAO和D-LA含量显著增加; 与MOD组相比, TGs组ET、DAO和D-LA含量明显降低; 而PSs和OSs组这些指标的含量并没有显著变化。

### 9 TGs激活酒精性肝损伤小鼠肝脏组织Nrf-2/Keap-1信号通路

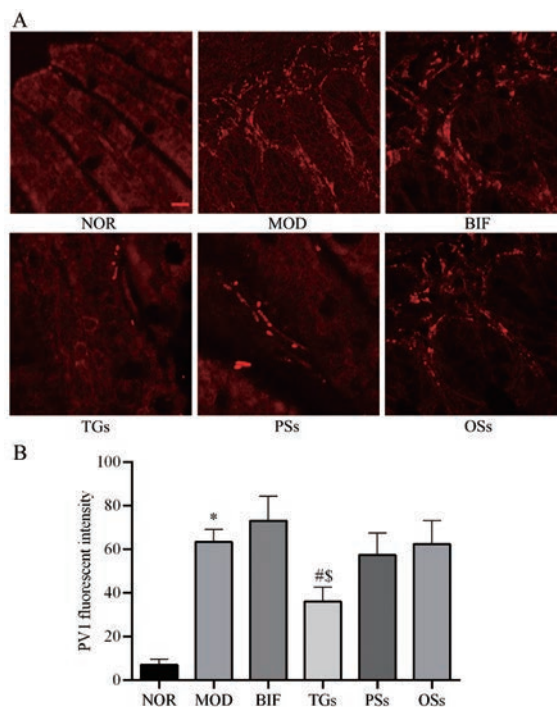
免疫荧光染色结果可见, 与NOR组相比, MOD组肝脏中Nrf-2入核率显著降低; Keap-1蛋白表达水平显著上升; 与MOD组相比, TGs组Nrf-2入核率显著增加; Keap-1蛋白表达水平明显降低; TGs与BIF相比无显著差异; PSs和OSs组对Nrf-2入核和Keap-1表达并没有显著影响, 如图9所示。

### 10 TGs能够显著改善酒精性肝损伤小鼠肝脏组织氧化应激因子水平

本实验研究显示, 与NOR组相比, MOD组SOD、CAT和GSH-Px活性显著降低, MDA含量显著升高; 与MOD组相比, BIF和TGs干预后SOD、CAT和GSH-



**Figure 8** Effects of extracts of *C. deserticola* Y. C. Ma on contents of endotoxin (ET), diamine oxidase (DAO), and D-lactic acid (D-LA) in alcoholic liver injury mice.  $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$  vs NOR; # $P < 0.05$  vs MOD

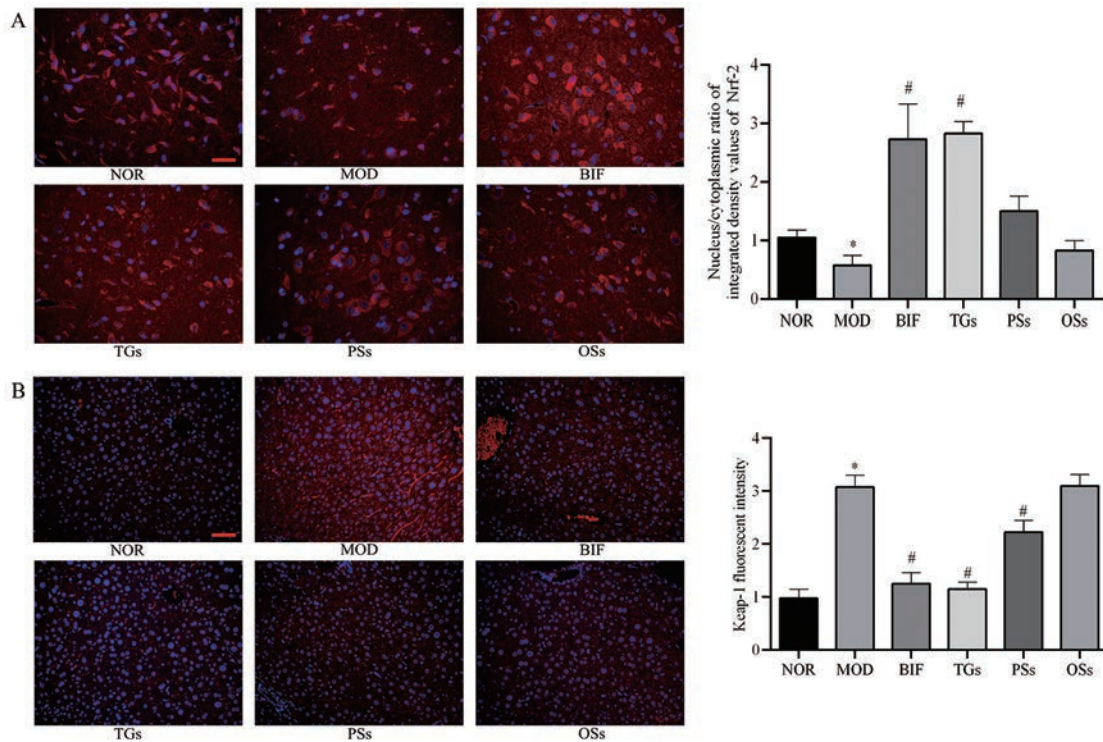


**Figure 7** Effects of extracts of *C. deserticola* Y. C. Ma on the expression of plasmalemma vesicle-associated protein-1 (PV1) in alcoholic liver injury mice. A: Immunofluorescence staining of small intestine sections; B: Bar graph showed a quantification of the expression of PV1. \* $P < 0.05$  vs NOR; # $P < 0.05$  vs MOD; \$ $P < 0.05$  vs BIF.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . Scale bar = 100  $\mu\text{m}$

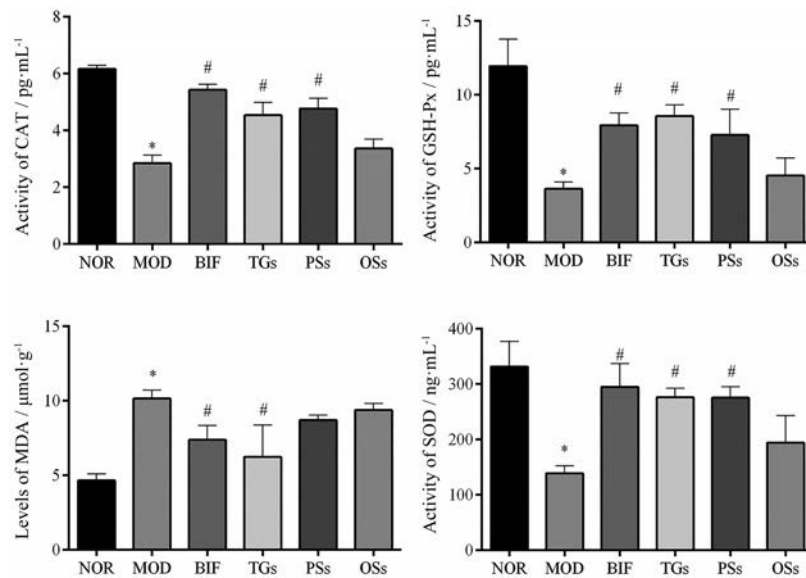
Px活性显著升高, MDA含量显著降低, 如图10所示。

## 讨论

本研究采用急性酒精性肝损伤小鼠模型, 考察荒漠肉苁蓉不同部位提取物给药14天对急性酒精性肝损伤的影响, 结果发现荒漠肉苁蓉总苷能够降低急性酒精性肝损伤小鼠的肝脏系数、血清中ALT和AST含量及肝脏组织中的MDA含量, 显著升高抗氧化酶SOD、CAT和GSH-Px活性, 改善肝脏组织形态结构及肠壁通透性, 降低血清中ET、DAO和D-LA含量, 抑制细菌次级代谢产物向肝脏转移。同时, 荒漠肉苁蓉总苷能够显著促进Nrf-2入核; 抑制Keap-1蛋白及肠壁



**Figure 9** Effects of extracts of *C. deserticola* Y. C. Ma on nuclear factor E2 related factors (Nrf-2)/kelch-like ECH-associated protein-1 (Keap-1) pathway in alcoholic liver injury mice. A: Immunofluorescence staining and quantitative statistics of Nrf-2, scale bar = 50  $\mu\text{m}$ ; B: Immunofluorescence staining and quantitative statistics of Keap-1, scale bar = 100  $\mu\text{m}$ .  $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$  vs NOR; # $P < 0.05$  vs MOD



**Figure 10** Effects of extracts of *C. deserticola* Y. C. Ma on oxidative stress of liver in alcoholic liver injury mice.  $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$  vs NOR; # $P < 0.05$  vs MOD. CAT: Catalase; GSH-Px: Glutathione peroxidase; MDA: Malondialdehyde; SOD: Superoxide dismutase

上的PV1蛋白表达,表明荒漠肉苁蓉总苷可以通过激活Nrf-2/Keap-1信号通路及修复肠壁损伤以达到肝保护的作用。

中药肉苁蓉为荒漠肉苁蓉或管花肉苁蓉干燥带鳞叶的肉质茎,而这两种肉苁蓉药材在肝保护方面目前研究比较多的为管花肉苁蓉。研究显示,管花肉苁蓉

总苷可以改善纤维化大鼠肝组织形态,降低纤维化程度<sup>[12]</sup>。罗慧英课题组<sup>[13]</sup>对荒漠肉苁蓉进行了一些研究,结果显示,荒漠肉苁蓉总苷可以增强酒精性肝损伤小鼠肝组织中SOD、GSH-Px和CAT活性,这跟本研究结果相同。而二者化学成分仅苯乙醇苷的含量不同,管花肉苁蓉的肝保护成分主要就是苯乙醇苷,但荒漠

肉苁蓉由于苯乙醇苷含量低于管花肉苁蓉, 研究的人不多, 因此本文就考察了荒漠肉苁蓉在苯乙醇苷含量低于管花肉苁蓉的情况下, 是否仍具有肝保护作用。并对其他组分做了比较性研究, 以更加明确肝保护成分, 同时也为荒漠肉苁蓉在肝保护方面的作用提供实验依据, 为后期的产品开发提供理论基础。

肝脏疾病的发展过程与 Nrf-2/Keap-1 信号通路密切相关, 尤其是酒精性肝损伤。研究发现, 乙醇可以诱导 Nrf-2<sup>-/-</sup>小鼠胆固醇调节元件结合蛋白 1 (sterol regulatory element binding protein 1, SREBP-1) 的表达, 也可以显著增加血清中甘油三酯含量<sup>[14]</sup>。长期饮酒可导致小鼠肝脏中 Nrf-2 被激活, 从而减轻乙醇诱导的氧化应激。氧化应激也与肝脏疾病的发生发展密切相关, 当机体处于氧化应激状态时, Nrf-2 与核抗氧化反应元件 (antioxidant response element, ARE) 结合继而启动了下游抗氧化基因的表达。相比于野生型小鼠, Nrf-2<sup>-/-</sup>小鼠由于抗氧化能力降低, 易受外界刺激而使得肝损伤更加敏感, 比如, 给予咪喃苯胺酸 24 h 后, Nrf-2<sup>-/-</sup>小鼠出现明显肝损伤; 而过度表达 Nrf-2 蛋白, 肝损伤却不明显<sup>[15]</sup>, 由此可见, Nrf-2 的激活可能是肝损伤新的潜在治疗靶点和途径。本研究通过比较肉苁蓉 3 种提取物对急性酒精性肝损伤的影响发现, 肉苁蓉总苷可以通过激活 Nrf-2/Keap-1 信号通路, 增加抗氧化酶 SOD、CAT 和 GSH-Px 活性, 起到肝保护的作用。

酗酒是造成酒精性肝损伤的一个主要的因素, 而酒精可促进慢性肝损伤患者肠道中革兰阴性菌过度生长, 同时, 酒精可破坏肠道完整性, 使肠道内细菌代谢产物进入体循环, 通过门静脉到达肝脏, 进而加重肝脏损伤<sup>[16]</sup>。研究发现, 在 ALD 患者和动物模型中, 酒精及代谢产物乙醛均会增加肠道通透性, 使有害物质如脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 和 D-LA 等进入血液<sup>[17]</sup>。本研究发现, 肉苁蓉总苷可以通过降低酒精在肠道的通透性, 进而降低血液中 LPS、DAO 和 D-LA 含量, 防止有害物质通过门静脉进入肝脏, 进而起到肝保护的作用。

联苯双酯是我国首创的一种治疗肝炎的药物, 具有降酶、抗氧化和免疫调节等药理作用, 本研究也发现联苯双酯在脂质沉积方面有显著作用, 其作用可能与其抗氧化作用有关, 使受损的肝组织得以改善, 进而改善肝脏中的脂质代谢, 但其是否直接调控脂质代谢, 目前并没有研究报道。同时, 本结果可以看出, 荒漠肉苁蓉总苷的肝保护作用与联苯双酯无显著差异, 也都具有抗氧化和降低血清中 ET、DAO 和 D-LA 含量的作用, 意味着荒漠肉苁蓉总苷与联苯双酯具有类似的肝保护作用机制, 但也观察到联苯双酯对 PV1 的表达跟总苷

存在差异, 这点说明联苯双酯与降低肠壁通透性并无显著作用, 其降低血清中 ET、DAO 和 D-LA 的机制还有待进一步研究。

综上所述, 肉苁蓉总苷是中药肉苁蓉发挥肝保护作用的活性部位, 其可以降低肝脏氧化应激及抑制肠道有害物质进入肝脏, 对急性酒精性肝损伤起到保护作用, 其机制可能与激活 Nrf-2/Keap-1 信号通路有关; 而肉苁蓉多糖和寡糖对急性酒精性肝损伤没有保护作用。相关研究结果为肉苁蓉的进一步研究和开发提供了有益参考。

**作者贡献:** 王富江负责完成文中实验部分及撰写文章; 屠鹏飞和姜勇设计文章思路; 曾克武和姜勇指导实验和数据处理, 并修改文章。

**利益冲突:** 所有作者对文章数据已知晓, 无利益冲突。

## References

- [1] Zhang YW, Li YJ, Hu BF, et al. Evaluation on three short-term animal models of alcoholic liver disease [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2018, 53: 236-243.
- [2] Vonghia L, Leggio L, Ferrulli A, et al. Acute alcohol intoxication [J]. Eur J Intern Med, 2008, 19: 561-567.
- [3] Hou J, Lu Y, Zhang DK. Association between intestinal dysbacteriosis and liver diseases [J]. J Clin Hepatol, 2018, 34: 1128-1132.
- [4] Liu Y, Wang H, Yang M, et al. *Cistanche deserticola* polysaccharides protects PC12 cells against OGD/RP-induced injury [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 99: 671-680.
- [5] Song DZ, Cao Z, Liu ZB, et al. *Cistanche deserticola* polysaccharide attenuates osteoclastogenesis and bone resorption via inhibiting RANKL signaling and reactive oxygen species production [J]. J Cell Physiol, 2018, 233: 9674-9684.
- [6] Zhang AL, Yang XM, Li QX, et al. Immunostimulatory activity of water-extractable polysaccharides from *Cistanche deserticola* as a plant adjuvant *in vitro* and *in vivo* [J]. PLoS One, 2018, 13: e0191356.
- [7] Zhang H, Xiang Z, Duan X, et al. Antitumor and anti-inflammatory effects of oligosaccharides from *Cistanche deserticola* extract on spinal cord injury [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 124: 360-367.
- [8] Li RY, Zhao MB, Tu PF, et al. Simultaneous determination of five phenylethanoid glycosides in *Cistanches Herba* using quantitative analysis of multi-components by single marker [J]. J Chin Pharm Sci, 2019, 28: 537-546.
- [9] Li SQ, Lu HJ, Wang P, et al. Study on the time of cell apoptosis in alcoholic liver injury in mice [J]. Chin J Clin Pharmacol (中国临床药理学杂志), 2017, 33: 2154-2157.
- [10] Shi ZY, Wu Y, Zhu YM, et al. Quantitative determination of betaine, mannitol, fructose, glucose and sucrose in *Cistanches Herba* by HPLC-ELSD [J]. Mod Chin Med (中国现代中药),

- 2019, 21: 1641-1646.
- [11] Gao YJ, Jiang Y, Dai F, et al. Study on laxative constituents in *Cistanche deserticola* Y. C. Ma [J]. Mod Chin Med (中国现代中药), 2015, 17: 307-310.
- [12] You SP, Zhao J, Ma L, et al. Effect and mechanism of *Cistanche* phenylethanoid glycosides on rats with immunological liver fibrosis [J]. Chin J Pharmacol Toxicol (中国药理学与毒理学杂志), 2016, 30: 504-510.
- [13] Luo HY, Liu Y, Xi GZ, et al. Protective effect of Cistanchis glycosides on ethanol-induced liver damage in mice [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther (中国临床药理学与治疗学), 2009, 14: 1225-1228.
- [14] Wu KC, Liu J, Klaassen CD. Role of Nrf2 in preventing ethanol-induced oxidative stress and lipid accumulation [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2012, 262: 321-329.
- [15] Qu Q, Liu J, Zhou HH, et al. Nrf2 protects against furosemide-induced hepatotoxicity [J]. Toxicology, 2014, 324: 35-42.
- [16] Zhang L, Zu XP, Xie HS, et al. Research progress in mechanism of intestinal microorganisms in human diseases [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2016, 51: 843-852.
- [17] Parlesak A, Schäfer C, Schütz T, et al. Increased intestinal permeability to macromolecules and endotoxemia in patients with chronic alcohol abuse in different stages of alcohol-induced liver disease [J]. J Hepatol, 2000, 32: 742-747.