

## 藏药渣驯及其不同溶剂洗脱组分的肝保护活性研究

林莫迪<sup>1</sup>, 陈智伟<sup>1</sup>, 边巴坚参<sup>2</sup>, 米玛<sup>2</sup>, 次仁<sup>3</sup>, 吉腾飞<sup>1\*</sup>, 孙华<sup>1\*</sup>

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050; 2. 西藏藏医药大学, 西藏 拉萨 850007;  
3. 西藏自治区藏医院, 西藏 拉萨 850002)

**摘要:** 对传统藏药渣驯肝脏病治疗活性进行药效物质基础研究。在本研究中, 首先评价了渣驯总提取物 (Zha Xun, ZX) 对刀豆蛋白 A (concanavalin A, ConA) 和 0.15% 四氯化碳 (0.15% CCl<sub>4</sub>) 诱导 ICR 小鼠急性肝损伤的保护作用, 结果显示, 渣驯总提取物在 ConA 诱导的小鼠急性免疫性肝损伤模型和 CCl<sub>4</sub> 诱导的小鼠急性氧化性肝损伤模型中可显著降低肝损伤小鼠血清谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) 和谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) 水平 ( $P < 0.05$ )。随后评价了渣驯水、95% 乙醇、60% 乙醇、30% 乙醇不同溶剂洗脱组分及渣驯中主要水溶性成分富里酸 (fulvic acid) 对 0.15% CCl<sub>4</sub> 诱导小鼠急性氧化性肝损伤的保护作用, 结果显示, 渣驯不同溶剂洗脱组分均表现一定保肝活性, 其中渣驯水提取物、渣驯 30% 乙醇提取物能显著降低小鼠血清中 ALT、AST、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 水平 ( $P < 0.05$ ), 富里酸可显著降低小鼠血清中 LDH 水平 ( $P < 0.05$ ), 表现显著肝保护活性。进一步利用过氧化氢 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 诱导的肝细胞损伤模型评价渣驯总提取物、渣驯水提取物、渣驯 30% 乙醇提取物及富里酸对体外肝细胞损伤的保护活性及初步机制。结果表明, 各组分均能显著抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的肝细胞损伤, 降低细胞培养上清转氨酶 ALT、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)、LDH 水平, 提高肝细胞存活率, 降低细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 含量。同时可通过提高 Bcl-2/BAX 蛋白表达比例、降低 cleaved caspase-3/procaspase-3 蛋白表达比例, 抑制肝细胞凋亡。本研究表明, 渣驯具有明确的体内外肝保护活性, 渣驯不同溶剂洗脱组分均表现一定肝保护活性, 其中渣驯水提取物、渣驯 30% 乙醇提取物肝保护活性更佳, 渣驯 60% 乙醇提取物活性强于渣驯 95% 乙醇提取物。渣驯及其水溶性洗脱部位通过抑制肝细胞凋亡和氧化应激发挥肝保护作用。本实验所用动物及相关处置符合动物福利的要求, 实验开展前经过中国医学科学院药物研究所实验动物管理和使用委员会的审查批准 (批准号: 00004018)。

**关键词:** 藏医药; 渣驯; 富里酸; 细胞凋亡; 氧化应激; 肝损伤

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)12-3644-11

## Hepatoprotective activity of Zha Xun and its different solvent-eluting components

LIN Mo-di<sup>1</sup>, CHEN Zhi-wei<sup>1</sup>, BIANBA Jian-shen<sup>2</sup>, MI Ma<sup>2</sup>, CI Ren<sup>3</sup>, JI Teng-fei<sup>1\*</sup>, SUN Hua<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2. University of Tibetan Medicine, Lhasa 850007, China; 3. Hospital of Tibetan Traditional Medicine, Lhasa 850002, China)

**Abstract:** A pharmacophore-based study was conducted to investigate the therapeutic activity of the traditional Tibetan medicine Zha Xun (ZX) in liver diseases. In the present study, the protective effect of ZX on the acute liver injury induced by concanavalin A (ConA) and 0.15% carbon tetrachloride (0.15% CCl<sub>4</sub>) in ICR mice

收稿日期: 2023-07-29; 修回日期: 2023-09-19.

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程重大协同创新项目 (2021-I2M-1-028); 西藏自治区科技计划项目 (XZ202201YD0012C).

\*通讯作者 Tel: 86-10-63165203, E-mail: sunhua@imm.ac.cn;

Tel: 86-10-63165226, E-mail: jitf@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0920

was evaluated, and the results showed that ZX significantly reduced serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in the ConA-induced acute immune liver injury model and the  $\text{CCl}_4$ -induced acute oxidative liver injury model ( $P < 0.05$ ). Subsequently, the protective effects of aqueous, 95% ethanol, 60% ethanol and 30% ethanol eluting fractions of ZX, and fulvic acid, the main water-soluble constituent of ZX, were evaluated against acute oxidative liver injury induced by 0.15%  $\text{CCl}_4$  in mice. The results showed that different solvent-eluting fractions of ZX showed certain hepatoprotective activities, among which the aqueous extract of ZX and 30% ethanol extract of ZX significantly reduced the serum levels of ALT, AST, and lactate dehydrogenase (LDH) in mice ( $P < 0.05$ ), and the serum levels of LDH in mice were significantly reduced by fulvic acid ( $P < 0.05$ ), which showed significant hepatoprotective activity. The protective activities and preliminary mechanisms of the total extract of ZX, the aqueous extract of ZX, the 30% ethanol extract of ZX, and fulvic acid against hepatocellular injury *in vitro* were further evaluated by using the  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced hepatocellular injury model. The results showed that the components could significantly inhibit  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced hepatocellular injury, reduce the levels of ALT, alkaline phosphatase (ALP), and LDH, improve the survival rate of hepatocellular cells, and reduce the content of intracellular reactive oxygen species (ROS) in cell culture. At the same time, it can inhibit hepatocyte apoptosis by increasing the expression ratio of Bcl-2/BAX protein and decreasing the expression ratio of cleaved caspase-3/pro caspase-3 protein. The present study showed that ZX has clear hepatoprotective activity *in vitro* and *in vivo*, and the different solvent elution fractions of ZX showed certain hepatoprotective activity, among which the aqueous extract of ZX, 30% ethanol extract of ZX had better hepatoprotective activity, and the activity of 60% ethanol extract of ZX was stronger than that of 95% ethanol extract of ZX. The activity of ZX and its water-soluble elution site exerted hepatoprotective effects by inhibiting hepatocyte apoptosis and oxidative stress. The animals used in this experiment and related disposal meet the requirements of animal welfare, and have been reviewed and approved by the Laboratory Animal Management and Use Committee of the Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences (approval number: 00004018).

**Key words:** Tibetan medicine; Zha Xun; fulvic acid; apoptosis; oxidative stress; liver injury

肝脏是机体合成营养物质、代谢毒性物质、促进造血的重要器官<sup>[1]</sup>。病毒性感染、服用具有肝毒性的药物、误食有毒物质等多种因素均能引起急性肝功能损伤。急性肝损伤是临床上多种急、慢性肝病的共同病理基础,反复持续的肝损伤最终会进展为肝硬化、肝癌甚至肝功能衰竭,从而降低人们的生活质量,对社会造成了巨大的经济负担<sup>[2]</sup>。藏医是我国医学宝库中的重要组成部分,具有悠久的历史、鲜明的民族特征及独特的治疗作用。传统藏医学认为,肝病属于“赤巴病”的范畴,其源于胆腑,主要由于饮食不洁、饮食不当、消化不良、恚怒引起,疾病一旦产生,将波及全身<sup>[3]</sup>。

传统藏药渣驯 (Zha Xun, ZX), 藏译音“渣”是高山及岩石的名称,“驯”为岩石中流出的岩汁或液体,意译为“岩石的精华”,亦称为“岩精”。在印度语中也可称为 shilajit, 音译为喜来芝。渣驯作为传统藏药应用已有 1 300 多年历史。在藏药中,渣驯归属土类或精华药部,在藏药典籍《月王药诊》、《四部医典》、《四部甘露藏》和《无垢晶曼》均有记载。其源自石山,岩石经过日晒融化其精华凝结为渣驯<sup>[4]</sup>,主产于喜马拉雅山脉海拔 1 000~5 000 米的山区,味甘、苦,性凉,功能清热。在《部版藏药标准》收录的 201 个成方制剂中,有 42 个

含有渣驯膏,在 711 个藏药成方制剂和医院制剂中,其使用频率排名第六,足见其在藏医药中的重要地位<sup>[5]</sup>。渣驯主要用于肝热、肾热、胃热等热性疾病,以及木布病、痛风、眼疾、热性水肿、体虚等<sup>[6]</sup>。在藏医经典《四部医典·论说续》第 20 章“药物功效讲解”中“土类药”中记载:“渣驯对诸热病等有效,清除胃肝肾热效最优”。其能治疗陈旧性的肝病,尤其以治疗肝热病效果最佳。肝热病是因湿热疫毒之邪侵及中焦,郁蒸肝胆、肝失疏泄、脾失健运所致,临床表现为湿热蕴结和肝火上扰。病毒、酒精、饮食不当及内心郁结,均可引起肝热病。现代药理学研究亦显示,渣驯具有抗炎、免疫调节、抗肿瘤、抗氧化、抗癫痫、治疗溃疡性结肠炎等多种药理学活性<sup>[7-14]</sup>。有研究表明,渣驯正丁醇部位对刀豆蛋白 A (concanavalin A, ConA)、对乙酰氨基酚 (paracetamol, APAP)、四氯化碳 ( $\text{CCl}_4$ ) 诱导的急性肝损伤具有保护作用<sup>[15,16]</sup>。渣驯也可改善非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)<sup>[17]</sup>。富里酸 (fulvic acid) 也称为黄腐酸,是已有研究中渣驯的组成成分之一,具有水溶性,在渣驯中含量为 19.69%~41.43%<sup>[18]</sup>,研究显示,富里酸可调节肝细胞的物质代谢,在  $\text{CCl}_4$  诱导的大鼠肝纤维化模型及  $\text{CCl}_4$  联合肝脏缺血再灌注损伤大鼠模型中,表现出降低谷

丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) 的肝保护活性<sup>[19-22]</sup>。但目前对渣驯的研究均不深入, 近年来渣驯相关论述和使用亦出现归属不明、来源混乱等问题, 严重影响到相关藏药的生产使用。明确渣驯肝保护活性药效物质基础和可能的机制, 以此建立质量标准体系, 对于渣驯的清本正源和安全有效用药至关重要。

本研究采用 ConA 诱导的小鼠急性免疫性肝损伤模型、CCl<sub>4</sub> 诱导的小鼠急性氧化性肝损伤模型和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HepG2 细胞损伤模型, 较系统评价了渣驯总提取物及其不同溶剂洗脱组分的肝保护活性及初步机制, 进一步明确了渣驯具有显著的保肝活性, 同时不同溶剂洗脱组分肝保护活性不同, 渣驯治疗肝脏病的主要活性组分存在于水提取物和 30% 乙醇提取物, 富里酸仍可能是渣驯的活性成分之一。同时发现, 渣驯肝保护活性的主要机制与抗氧化及降低线粒体膜电位、抑制肝细胞凋亡有关。本研究为传统藏医药渣驯肝脏病治疗的药效物质基础和初步机制提供了数据参考, 为渣驯藏药材安全有效用药及衍生品研究提供科学依据。

## 材料与amp;方法

**药物及主要试剂** 渣驯总提取物 (ZX)、渣驯水提取物 [ZX (water)]、渣驯 95% 乙醇提取物 [ZX (95% ethanol)]、渣驯 60% 乙醇提取物 [ZX (60% ethanol)]、渣驯 30% 乙醇提取物 [ZX (30% ethanol)]、富里酸由中国医学科学院药物研究所吉腾飞课题组提供, 渣驯药材来源于四川甘孜州。ConA (SLBX7517) 购自 Sigma 公司; CCl<sub>4</sub> (20190516) 购自北京化工厂; 双环醇 (20180428) 由北京协和药厂提供; 还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH) (G8180)、DMEM 高糖培养基 (12100-500)、胰蛋白酶-EDTA 消化液 (T1300) 购自北京索莱宝科技有限公司; 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒 (S0033S) 购自碧云天生物技术公司; ALT (210931)、天冬氨酸转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) (210907)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) (220921)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) (231191) 检测试剂盒购自中生北控生物科技股份有限公司; Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒 (AP101)、线粒体膜电位检测试剂盒 (MJ101) 购自 Multi Science 公司; Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, BAX) (4000000164)、B 淋巴瘤瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) (4000000173)、剪切体半胱天冬酶 3 (cleaved caspase-3) (3523011331)、前体胱天蛋白酶 3 (pro caspase-3) (3560394016) 抗体购于 ABclonal 公司。

**实验动物及饲养条件** 无特定病原体级 (specific

pathogen free, SPF) 雄性 ICR 小鼠 (20~22 g), 由北京华阜康生物科技股份有限公司提供, 动物许可证号: SCKX (京) 2019-0008。动物饲养于中国医学科学院药物研究所 GLP 动物实验中心。室温 22~24 °C, 相对湿度 40%~60%。最小换气次数为每小时 20 次, 间隔 12 h 开灯光照。动物饲养于聚丙烯小鼠群养笼中, 每笼 4~5 只。所有动物均由培训合格的人员进行饲养管理, 整个饲养过程中保持动物饮食和活动自由。本实验所用动物及相关处置符合动物福利的要求, 实验开展前经过中国医学科学院药物研究所实验动物管理和使用委员会 (IACUC) 的审查批准 (批准号: 00004018)。

**ConA 模型:** 动物适应环境后根据体重随机分为 5 组, 分别为空白对照组、ConA 模型组、阳性对照组双环醇 200 mg·kg<sup>-1</sup> 组、渣驯总提取物 500 mg·kg<sup>-1</sup> 组、渣驯总提取物 1 000 mg·kg<sup>-1</sup> 组, 每组 8~11 只。药物均采用 0.5% CMC-Na 配置成混悬液, 各组动物每天 1 次灌胃给予相应药物, 共给药 5 次。在末次给药 2 h 后, 除空白对照组给予溶剂对照外, 其余各组尾静脉注射给予 20 mg·kg<sup>-1</sup> ConA 生理盐水溶液。随后, 小鼠禁食不禁水 16 h 后, 收集动物血清。

**0.15% CCl<sub>4</sub> 模型:** ① 动物适应环境后根据体重随机分为 4 组, 分别为空白对照组、0.15% CCl<sub>4</sub> 模型组、阳性对照组双环醇 200 mg·kg<sup>-1</sup> 组、渣驯总提取物 500 mg·kg<sup>-1</sup> 组, 每组 7~9 只。化合物分别于造模前 4 天灌胃给药, 每天 1 次, 双环醇 200 mg·kg<sup>-1</sup> 组于造模前一天的下午, 当日的上、下午各灌胃给药 1 次, 空白对照组及模型组动物给予同等剂量的生理盐水。末次给药 2 h 后, 除空白对照组, 各组小鼠腹腔注射 0.15% CCl<sub>4</sub> 10 mL·kg<sup>-1</sup> (花生油配制) 一次, 空白对照组腹腔注射同等剂量花生油。小鼠禁食不禁水 16 h 后, 收集动物血清。② 动物适应环境后随机分为 8 组, 分别为空白对照组、0.15% CCl<sub>4</sub> 模型组、阳性对照药双环醇 200 mg·kg<sup>-1</sup> 组、渣驯水提取物 500 mg·kg<sup>-1</sup>、渣驯 95% 乙醇提取物 500 mg·kg<sup>-1</sup>、渣驯 60% 乙醇提取物 500 mg·kg<sup>-1</sup>、渣驯 30% 乙醇提取物 500 mg·kg<sup>-1</sup>、富里酸 500 mg·kg<sup>-1</sup>, 每组 5~7 只。各提取物和双环醇组, 每日灌胃给药一次, 空白对照组及模型组动物给予同等剂量的双蒸水, 共计 5 天。末次给药 2 h 后, 除空白对照组, 各组小鼠腹腔注射 0.15% CCl<sub>4</sub> 10 mL·kg<sup>-1</sup> (花生油配制) 一次, 空白对照组腹腔注射同等剂量花生油。小鼠禁食不禁水 16 h 后, 收集动物血清。

**细胞系** 人肝癌 HepG2 细胞为本实验室传代保存, 用含 100 u·mL<sup>-1</sup> 青霉素 (penicillin)、100 μg·mL<sup>-1</sup> 链霉素 (streptomycin) 及 10% 灭活新生牛血清的 DMEM 高糖培养基, 在 37 °C、含 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。细

胞约每隔2~3天传代。取对数生长期的细胞开始实验。

**血清转氨酶检测** 收集小鼠血清,采用全自动生化分析仪(TBA-40FR,日本东芝株式会社)检测血清中ALT、AST、LDH含量。

**细胞毒性分析** 采用MTT法检测渣驯总提取物、渣驯水提取物、渣驯30%乙醇提取物、富里酸的细胞毒性。取对数生长期HepG2细胞以8 000个/孔接种于96孔板中,培养24 h后,加入不同浓度渣驯总提取物、渣驯水提取物、渣驯30%乙醇提取物、富里酸的细胞毒性作用24 h,弃去培养液,每孔加入100  $\mu\text{L}$  0.5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  MTT,继续培养4 h,弃去MTT液,每孔加入150  $\mu\text{L}$  二甲基亚砷(DMSO),于酶标仪(Multiskan FC,赛默飞世尔科技中国有限公司)570 nm波长处测定吸光度(OD)值。细胞存活率(%)=(给药细胞OD平均值/溶剂对照细胞OD平均值) $\times 100\%$ 。

**细胞存活率检测** HepG2细胞以8 000个/孔接种于96孔细胞培养板,培养24 h后,加入无毒浓度的渣驯总提取物、渣驯水提取物、渣驯30%乙醇提取物、富里酸,同时设阳性对照组、溶剂对照组及模型组,药物预孵育12 h。随后除溶剂对照组外,其余各组均加入终浓度为400  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 继续作用细胞12 h。弃去培养液,采用MTT法检测细胞存活率。

**细胞培养上清生化指标检测** 细胞处理同“细胞存活率检测”,收集细胞培养上清,采用全自动生化分析仪(TBA-40FR,日本东芝株式会社)检测细胞培养上清中ALT、ALP、LDH含量。

**ROS检测** HepG2细胞以8 000个/孔接种于96孔细胞培养板,培养24 h后,加入渣驯总提取物、渣驯水提取物、渣驯30%乙醇提取物、富里酸,同时设阳性对照组、溶剂对照组及模型组,药物预孵育24 h。除溶剂对照组,其余各组均加入终浓度为100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 继续作用细胞1 h。弃去培养液,每孔加入10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ROS检测探针溶液100  $\mu\text{L}$ ,37  $^\circ\text{C}$ 孵育30 min,使用荧光酶标仪(Cytation 1,美国Biotek伯腾仪器公司)检测荧光强度。

**JC-1线粒体染色** 细胞处理方法同“ROS检测”。药物预孵育24 h。除溶剂对照组,其余各组均加入终浓度为100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 继续作用细胞1 h。随后每孔加入2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  JC-1染色液,放入培养箱中继续孵育30 min。弃去JC-1染色液,用PBS洗3次。随后采用荧光酶标仪检测荧光强度。

**Annexin V-FITC/PI凋亡检测** HepG2细胞以每毫升 $1.2\times 10^5$ 个接种于6孔细胞培养板中,每孔2 mL,培养24 h后,加入无毒浓度的渣驯总提取物、渣驯水提取物、渣驯30%乙醇提取物、富里酸,同时设溶剂对照

组及模型组,药物预孵育24 h。除溶剂对照组外,其余各组均加入终浓度为400  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 继续作用细胞12 h。1 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心3 min后收集细胞,加入500  $\mu\text{L}$ 结合缓冲液重悬细胞,随后加入Annexin V-FITC和PI染料进行染色,流式细胞仪(BD FACSverse,美国BD Bioscience公司)进行凋亡分析。

**Western blot检测** 细胞处理方法同“Annexin V-FITC/PI凋亡检测”。收集细胞,然后将细胞在补充有蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物的RIPA裂解缓冲液中裂解。通过BCA蛋白质定量试剂盒测量蛋白质浓度并用上样缓冲液煮沸变性。通过在十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳分离变性的蛋白质样品,然后将这些蛋白质转移到0.22  $\mu\text{m}$ 聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上并用5%脱脂奶粉封闭膜。随后,膜与特定的一抗和二抗反应,用Tanon ECL化学发光系统(Tanon 5200,上海天能科技有限公司)显现印迹。使用Gel-Pro Analyzer 4.0分析条带的密度。

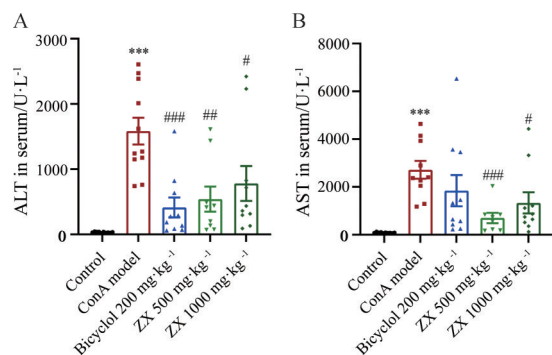
**统计学分析** 使用GraphPad Prism 8进行单因素方差分析(one way ANOVA)以确定组间差异显著性。数据显示为平均值 $\pm$ 平均值标准误差(SEM),并且在 $P < 0.05$ 时被认为具有统计学意义。

## 结果

### 1 渣驯总提取物可显著改善ConA诱导的小鼠急性免疫性肝损伤

**1.1 渣驯总提取物灌胃给药对小鼠一般状态无显著影响** 渣驯总提取物灌胃给药5天,各组小鼠状态正常,体重无显著变化,提示动物耐受性良好。

**1.2 渣驯总提取物可显著降低ConA诱导的肝损伤小鼠血清转氨酶水平** 转氨酶ALT与AST在肝细胞内分布位置不同,ALT主要分布于肝细胞浆内,肝细胞内ALT的浓度高于血清中1 000~3 000倍,1%的肝细胞被损伤破坏,血清中ALT含量即显著增加,血清ALT水平是目前公认的肝功能损害最敏感的检测指标。AST主要分布于肝细胞浆和肝细胞线粒体中,AST升高则提示肝细胞内线粒体存在损伤。血清ALT和AST升高程度与肝细胞受损程度呈正相关<sup>[19]</sup>。ConA是一种植物蛋白成分提取物,尾静脉注射ConA后能引起肝脏内T细胞活化,导致肝脏炎症及损伤<sup>[20]</sup>。在本研究中(图1),ConA 20  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 模型组小鼠血清ALT、AST水平较空白对照组显著升高( $P < 0.001$ ),提示肝损伤严重。与模型组相比,渣驯总提取物在500和1 000  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量下均可显著降低血清ALT、AST水平( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ;  $P < 0.001$ ,  $P < 0.05$ );并且渣驯总提取物在500和1 000  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量下降低AST活性方



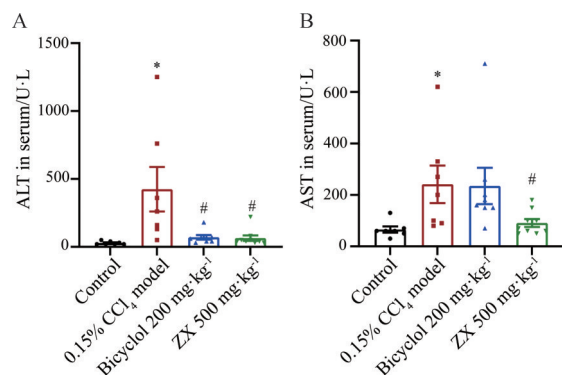
**Figure 1** Serum transaminase levels in concanavalin A (ConA) model. A: Alanine aminotransferase (ALT) in serum; B: Aspartate aminotransferase (AST) in serum.  $n = 8-11$ , mean  $\pm$  SEM. \*\*\* $P < 0.001$  vs control group; # $P < 0.05$ , ### $P < 0.01$ , #### $P < 0.001$  vs ConA model group. ZX: Zha Xun

面优于阳性对照药双环醇 200 mg·kg<sup>-1</sup>。

## 2 渣驯总提取物可显著改善 0.15% CCl<sub>4</sub> 诱导的小鼠急性氧化性肝损伤

**2.1 渣驯总提取物灌胃给药对小鼠一般状态无显著影响** 渣驯总提取物 500 mg·kg<sup>-1</sup> 灌胃给药 5 天, 各组小鼠状态正常, 体重无显著变化, 提示动物耐受性良好。

**2.2 渣驯总提取物可显著降低 CCl<sub>4</sub> 诱导的肝损伤小鼠血清转氨酶水平** CCl<sub>4</sub> 所致急性肝损伤模型为研究保肝药物药效的经典模型, 该模型的肝组织病理学特征与人类病毒性肝炎极为相似。肝脏 CYP450 酶系可将 CCl<sub>4</sub> 代谢为 ·CCl<sub>3</sub>, 引起生物膜脂质过氧化, 及细胞内 ROS 积聚, DNA 突变、断裂, 从而导致肝细胞严重损伤<sup>[21]</sup>。在本研究中, CCl<sub>4</sub> 所致急性肝损伤模型组小鼠血清 ALT、AST 水平较空白对照组显著升高 ( $P < 0.05$ )。与模型组相比, 渣驯总提取物 500 mg·kg<sup>-1</sup> 剂量下均可显著降低血清 ALT、AST 水平 ( $P < 0.05$ ); 且渣驯总提取物 500 mg·kg<sup>-1</sup> 剂量化降低 AST 活性方面优于阳性对照药双环醇 200 mg·kg<sup>-1</sup> (图 2)。



**Figure 2** Serum transaminase levels in 0.15% CCl<sub>4</sub> model. A: ALT in serum; B: AST in serum.  $n = 7-9$ , mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs 0.15% CCl<sub>4</sub> model group

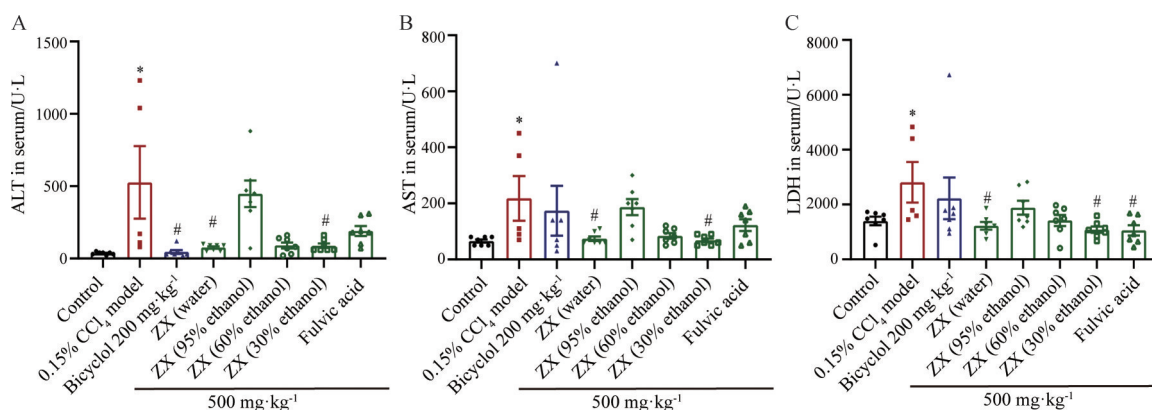
## 3 渣驯不同溶剂提取物及富里酸可改善 0.15% CCl<sub>4</sub> 诱导的小鼠急性氧化性肝损伤

**3.1 渣驯不同溶剂提取物及富里酸灌胃给药对小鼠一般状态无显著影响** 在明确渣驯于小鼠体内具有明确的肝保护活性的基础上, 进一步考察了渣驯不同溶剂提取物, 包括渣驯水提取物 500 mg·kg<sup>-1</sup>、渣驯 95% 乙醇提取物 500 mg·kg<sup>-1</sup>、渣驯 60% 乙醇提取物 500 mg·kg<sup>-1</sup>、渣驯 30% 乙醇提取物 500 mg·kg<sup>-1</sup>, 以及渣驯中大量含有的富里酸成分<sup>[18]</sup>, 对 0.15% CCl<sub>4</sub> 诱导急性氧化性肝损伤的保护作用。结果显示, 渣驯各溶剂提取物及富里酸灌胃给药 5 天, 各组小鼠状态正常, 体重无显著变化, 提示各组小鼠耐受性良好。

**3.2 渣驯不同溶剂提取物可降低 CCl<sub>4</sub> 诱导的肝损伤小鼠血清转氨酶、乳酸脱氢酶水平** 实验结果表明, 与空白对照组相比, 模型组小鼠血清 ALT、AST 水平较空白对照组显著升高 ( $P < 0.05$ )。与模型组相比, 渣驯不同溶剂提取物在 0.15% CCl<sub>4</sub> 诱导的氧化性肝损伤中均表现出一定的保护活性, 其中, 渣驯水提取物 500 mg·kg<sup>-1</sup>、渣驯 30% 乙醇提取物 500 mg·kg<sup>-1</sup> 均可显著降低小鼠血清中 ALT、AST 含量 ( $P < 0.05$ ) (图 3A、B), 对 AST 的降低作用优于阳性药双环醇。渣驯 60% 乙醇提取物、渣驯 95% 乙醇提取物、富里酸 500 mg·kg<sup>-1</sup> 对小鼠血清 ALT、AST 亦有降低的趋势, 在不同乙醇浓度提取物中, 提取溶剂乙醇含量越低, 其相应提取物对 ALT、AST 降低作用越强。LDH 主要存在于心肌、肝、肾等组织中, 是糖酵解过程中一种重要的酶, 肝细胞损伤可导致 LDH 逸出, 引起血清 LDH 活力增加<sup>[22]</sup>。与空白对照组相比, 模型组小鼠血清 LDH 含量显著增加 ( $P < 0.05$ ); 与模型组相比, 渣驯水提取物 500 mg·kg<sup>-1</sup>、渣驯 30% 乙醇提取物 500 mg·kg<sup>-1</sup>、富里酸 500 mg·kg<sup>-1</sup> 可显著降低小鼠血清中 LDH 含量 ( $P < 0.05$ ), 且效果优于阳性药双环醇 (图 3C)。渣驯 60% 乙醇提取物、渣驯 95% 乙醇提取物亦有降低小鼠血清中 LDH 含量的趋势, 与 ALT、AST 结果相似, 渣驯 30% 乙醇提取物对 LDH 的降低作用最强。综上结果表明, 在本动物模型中, 各洗脱组分活性强弱对比: 渣驯水提取物  $\approx$  渣驯 30% 乙醇提取物 > 渣驯 60% 乙醇提取物 > 渣驯 95% 乙醇提取物。

## 4 渣驯通过抗氧化和抑制凋亡改善 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HepG2 细胞损伤

**4.1 渣驯总提取物及其水溶性洗脱部位改善 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的肝细胞损伤** 利用体外实验进一步考察渣驯总提取物及其体内研究中表现显著活性的水溶性洗脱部位 (渣驯 30% 乙醇提取物、渣驯水提取物、富里酸) 体外肝细胞保护活性及可能的作用机制。细胞毒性实验



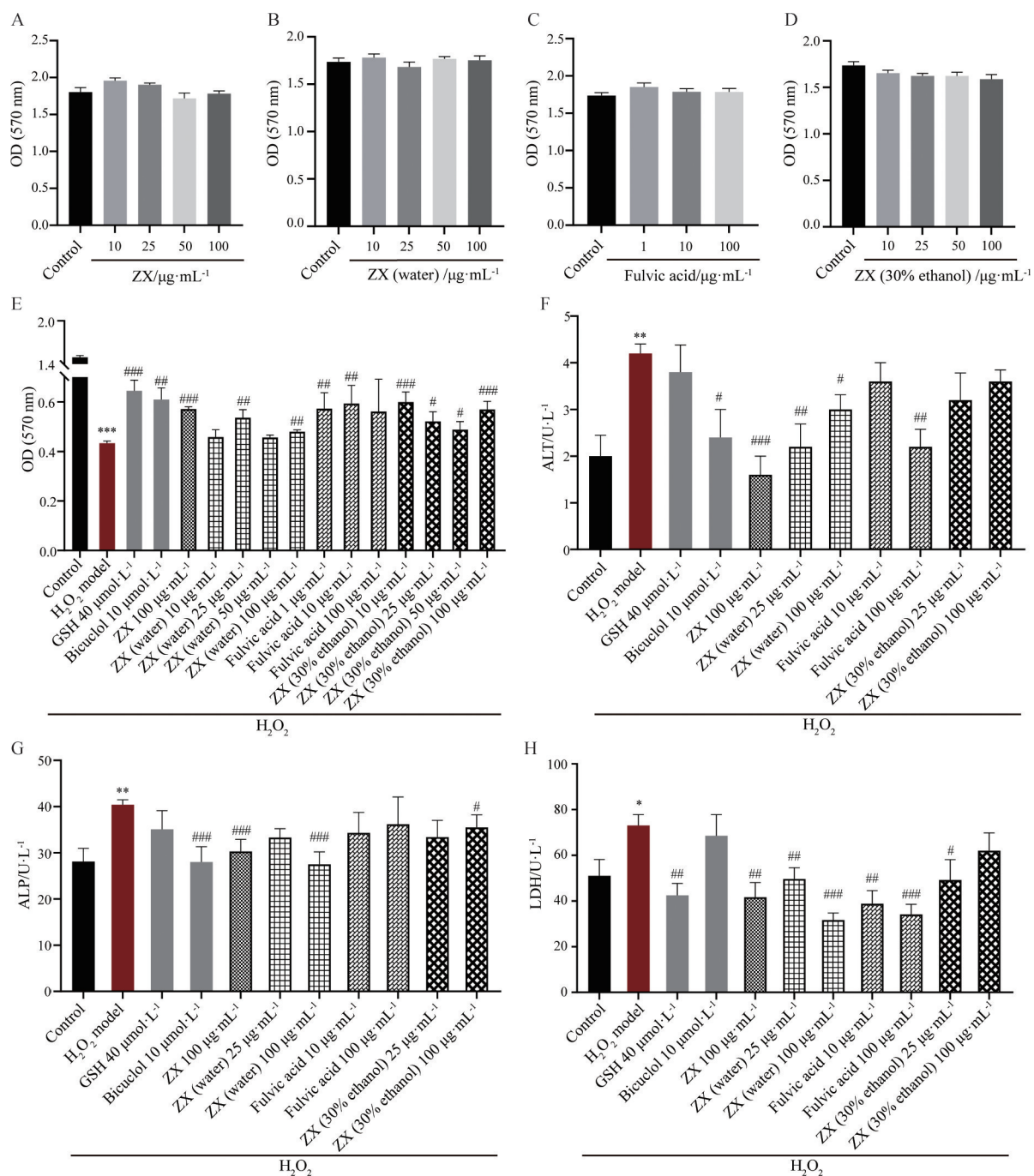
**Figure 3** Serum transaminase and lactic dehydrogenase (LDH) levels in 0.15%  $\text{CCl}_4$  model. A: ALT in serum; B: AST in serum. C: LDH in serum.  $n = 5-7$ , mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs 0.15%  $\text{CCl}_4$  model group

结果显示, 渣驯总提取物及渣驯水提取物、富里酸、渣驯 30% 乙醇提取物在  $10 \sim 100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  浓度下均对 HepG2 细胞的存活率无显著影响 (图 4A~D)。在本研究中, 使用  $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  刺激 HepG2 细胞 12 h 建立肝细胞氧化应激损伤模型。与溶剂对照组比较,  $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  显著降低 HepG2 细胞存活率 ( $P < 0.001$ )。渣驯总提取物 ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) ( $P < 0.001$ )、渣驯水提取物 ( $25$ 、 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) ( $P < 0.01$ )、富里酸 ( $1$ 、 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) ( $P < 0.01$ )、渣驯 30% 乙醇提取物 ( $10$ 、 $25$ 、 $50$ 、 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ ) 均能显著提高  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的人肝细胞的存活率 (图 4E)。随后每组选择对体外肝细胞损伤药效较优的两个浓度进行后续实验。检测细胞培养上清中肝细胞损伤生物标记物 ALT 水平, 结果表明, 渣驯总提取物  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $P < 0.001$ )、渣驯水提取物 ( $25$ 、 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )、富里酸  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $P < 0.01$ ) 可以显著降低细胞培养上清的 ALT 水平 (图 4F), 渣驯 30% 乙醇提取物 ( $25$ 、 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 亦有降低细胞培养上清 ALT 水平的趋势。ALP 是广泛分布于人体肝脏、骨骼、肠、肾和胎盘等组织并经肝脏向胆外排出的一种酶, 循环中 ALP 活动升高被普遍认为是骨骼或肝胆疾病的标志物<sup>[23]</sup>。检测细胞培养上清中肝细胞损伤生物标记物 ALP 水平, 结果表明, 渣驯总提取物  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $P < 0.001$ )、渣驯水提取物  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $P < 0.001$ )、渣驯 30% 乙醇提取物  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $P < 0.05$ ) 可以显著降低细胞培养上清的 ALP 水平 (图 4G), 富里酸 ( $10$ 、 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 亦存在降低趋势。检测细胞培养上清中肝细胞损伤生物标记物 LDH 水平, 结果表明, 渣驯总提取物  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $P < 0.01$ )、渣驯水提取物 ( $25$ 、 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )、富里酸 ( $10$ 、 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )、渣驯 30% 乙醇提取物  $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $P < 0.05$ ) 可显著降低细胞培养上清中肝细胞损伤生

物标记物 LDH 水平 (图 4H)。以上结果表明, 渣驯总提取物及其水溶性洗脱部位具有改善  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的 HepG2 细胞损伤的活性。

**4.2 渣驯总提取物及其水溶性洗脱部位改善  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的 HepG2 细胞氧化应激** HepG2 细胞在受到  $\text{H}_2\text{O}_2$  的刺激后会发生显著的氧化应激, 从而导致肝细胞发生损伤。在本研究中使用活性氧荧光探针 (DCFH-DA) 检测了 HepG2 细胞内 ROS 水平。DCFH-DA 其本身无荧光, 可以自由穿过细胞膜, 进入细胞内后, 可以被细胞内的酯酶水解生成 DCFH。而 DCFH 不能透过细胞膜, 从而使探针被装载到细胞内。细胞内的活性氧可以氧化无荧光的 DCFH 生成荧光产物 2',7'-二氯荧光素 (DCF)。因此检测 DCF 的荧光强度可以反映细胞内 ROS 的水平。与空白对照组相比, 模型组细胞内 ROS 水平显著升高 ( $P < 0.001$ ); 与模型组相比, 渣驯总提取物  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $P < 0.001$ )、渣驯水提取物 ( $25$ 、 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )、富里酸  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $P < 0.05$ )、渣驯 30% 乙醇提取物 ( $25$ 、 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) ( $P < 0.05$ ) 可显著降低肝细胞内 ROS 水平 (图 5)。

**4.3 渣驯总提取物及其水溶性洗脱部位通过调控线粒体介导的内源性凋亡通路抑制  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的 HepG2 细胞凋亡** 细胞凋亡是机体为维持内环境稳态, 在生理或病理情况下, 特定基因调控与一系列酶的参与下, 使生物体内无用或受损细胞程序性死亡的过程<sup>[24]</sup>。细胞凋亡是正常的细胞生理应答反应, 凋亡的细胞最终将被体内吞噬细胞处理, 然而过度的细胞凋亡将直接导致组织器官功能的下降。Annexin V-FITC/PI 双染是检测细胞凋亡的经典方法之一, Annexin V 选择性结合磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS)。PS 主要分布在细胞膜内侧, 在细胞凋亡早期, PS 外翻到细胞膜外侧, 有绿色荧光的荧光探针 FITC 标记的 Annexin V, 即 Annexin V-FITC, 可与细胞膜外侧的 PS 结合, 产生

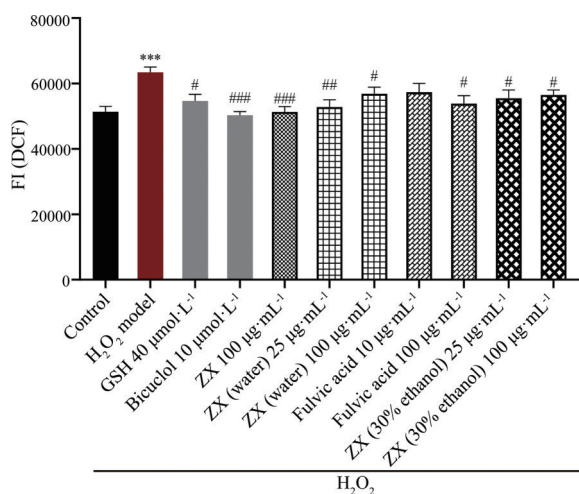


**Figure 4** ZX and its different solvent eluting salleviated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced hepatotoxicity. A–D: Effect of ZX and its different solvent eluting on the viability of HepG2 cells; E: Effect of ZX and its different solvent eluting on the viability of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced damage in HepG2 cells; F–H: Levels of ALT, alkaline phosphatase (ALP) and LDH in cell culture medium. *n* = 5, mean ± SEM. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001 vs control group; #*P* < 0.05, ##*P* < 0.01, ###*P* < 0.001 vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> model

绿色荧光。碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 可以染色坏死细胞或凋亡晚期丧失细胞膜完整性的细胞, 呈现红色荧光。与空白对照组比较, 400 μmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用细胞 12 h 可致显著的肝细胞凋亡 (*P* < 0.01)。与模型组比较, 渣驯总提取物 100 μg·mL<sup>-1</sup> (*P* < 0.01)、渣驯水提取物 100 μg·mL<sup>-1</sup> (*P* < 0.001)、富里酸 (10、100 μg·mL<sup>-1</sup>) (*P* < 0.05, *P* < 0.01)、渣驯 30% 乙醇提取

物 25 μg·mL<sup>-1</sup> (*P* < 0.01) 可显著降低 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的肝细胞凋亡细胞的占比 (图 6A、B)。

之后使用 JC-1 荧光探针检测 HepG2 细胞线粒体膜电位, 在线粒体膜电位较高时, JC-1 聚集在线粒体的基质中, 形成聚合物 (J-aggregates) 产生红色荧光; 线粒体膜电位的下降是细胞凋亡早期的一个标志性事件, 在线粒体膜电位较低时, 此时 JC-1 为单体, 可以产生

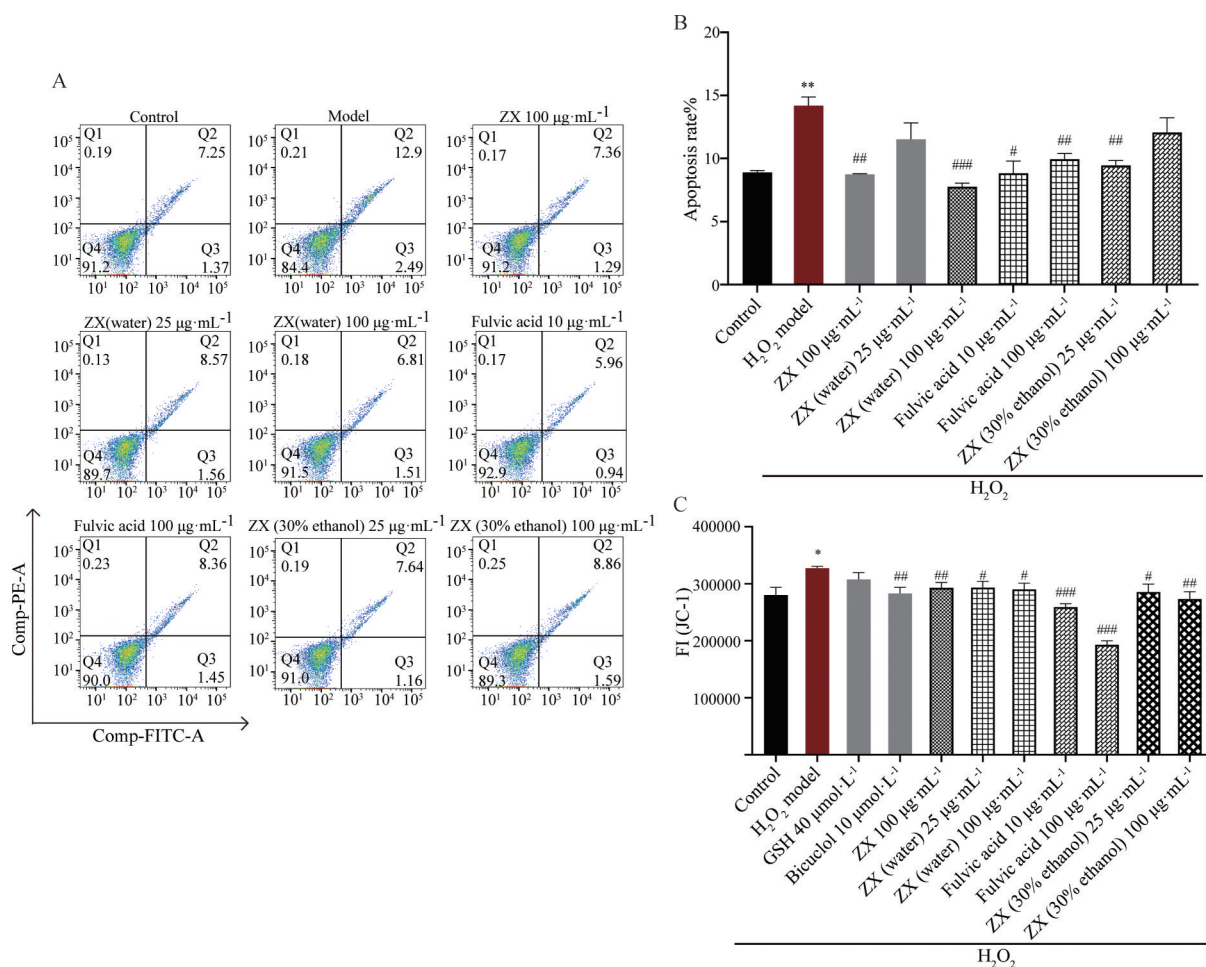


**Figure 5** ZX and its different solvent eluting alleviated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress. 2',7-Dichlorofluorescein (DCF) fluorescence intensity.  $n = 5$ , mean  $\pm$  SEM. \*\*\* $P < 0.001$  vs control group; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> model

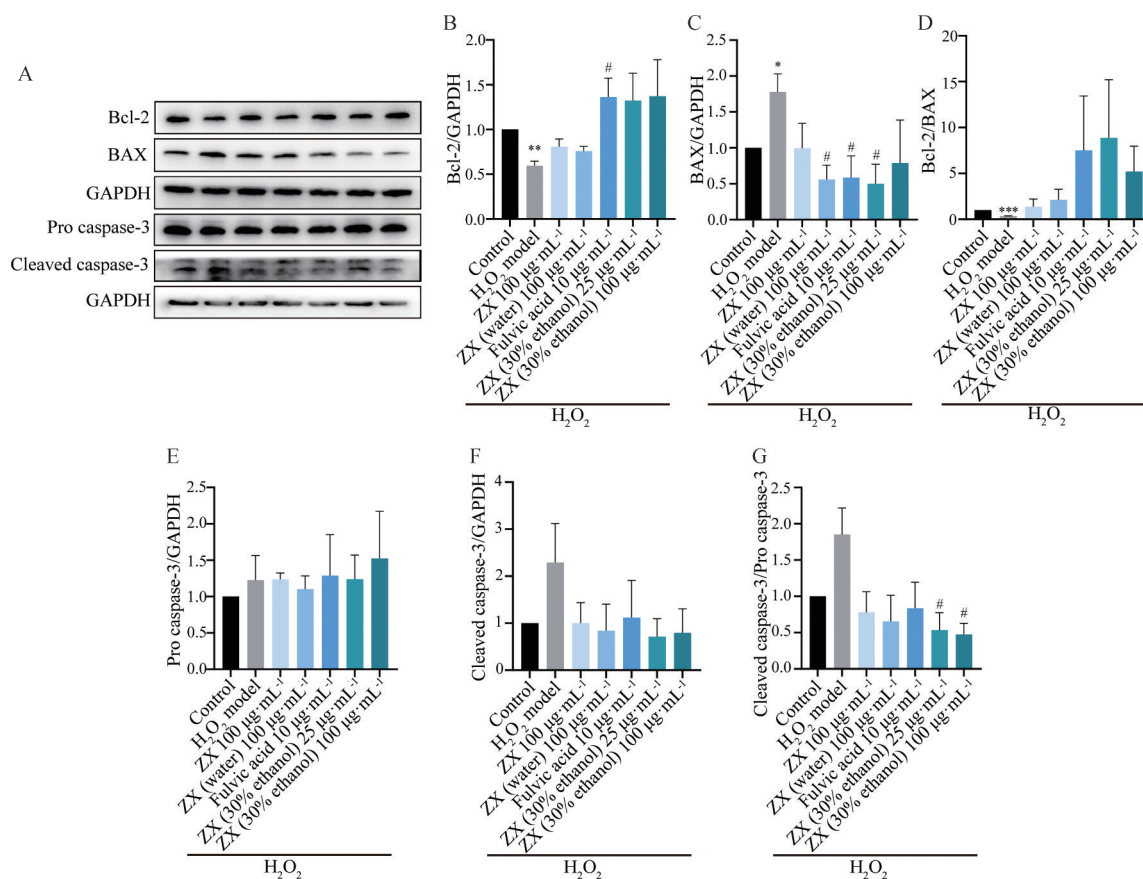
绿色荧光。与模型组相比, 渣驯总提取物 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $P < 0.01$ )、渣驯水提取物 (25、100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) ( $P < 0.05$ )、

富里酸 (10、100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) ( $P < 0.001$ )、渣驯 30% 乙醇提取物 (25、100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) 可显著降低 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的细胞线粒体膜电位改变 (图 6C)。

Western blot 研究结果 (7A) 显示, 与模型组比较, 富里酸 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  可显著升高 Bcl-2 蛋白表达水平 (图 7B), 其余各部位亦有升高趋势。渣驯水提取物 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $P < 0.05$ )、富里酸 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $P < 0.05$ )、渣驯 30% 乙醇提取物 25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $P < 0.05$ ) 可显著降低 BAX 蛋白表达水平 (图 7C), 其余各部位亦有降低趋势。渣驯总提取物及其水溶性部位均有升高 Bcl-2/BAX 蛋白表达比例的趋势 (图 7D); 与模型组比较, 渣驯 30% 乙醇提取物 (25、100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 均可显著降低 cleaved caspase-3/pro caspase-3 的比例 ( $P < 0.05$ ), 其余各组亦有降低的趋势 (图 7E~G)。该结果进一步提示, 渣驯总提取物及其水溶性洗脱部位可能通过调控线粒体介导的内源性凋亡通路对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的肝细胞凋亡具有抑制活性。



**Figure 6** ZX and its different solvent eluting alleviated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis. A: Representative images of flow cytometry Annexin V-FITC/PI apoptosis assay; B: Proportion of apoptotic cells detected by flow cytometry; C: Fluorescence intensity (FI) of JC-1.  $n = 3$ , mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> model



**Figure 7** The effect of ZX and its different solvent eluting on cellular protein expression. A: Representative Western blot brands of Bcl-2, BAX, pro caspase-3 and cleaved caspase-3; B–G: The density analysis of Bcl-2 (B), BAX (C), Bcl-2/BAX (D); pro caspase-3 (E), cleaved caspase-3 (F), pro caspase-3/cleaved caspase-3 (G). *n* = 3, mean ± SEM. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001 vs control group; #*P* < 0.05 vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> model

### 讨论

ConA 和 CCl<sub>4</sub> 是急性肝损伤动物模型的常用造模剂。ConA 是一种植物蛋白成分提取物, T 淋巴细胞表面存在其受体, ConA 可以激活 T 淋巴细胞导致干扰素-γ (interferon-γ, IFN-γ) 和肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor α, TNF-α) 释放, 从而引起动物自身免疫性肝炎<sup>[25]</sup>。CCl<sub>4</sub> 可经过肝脏 CYP450 酶系代谢产生三氯甲基自由基 (CCl<sub>3</sub>·), 该自由基可以与蛋白质、脂质、核酸等结合, 导致线粒体损伤和氧化应激, CCl<sub>3</sub>· 还可以与 O<sub>2</sub> 反应形成 CCl<sub>3</sub>OO·, 从而引发脂质过氧化链式反应, 破坏细胞膜, 最终导致肝脏损伤<sup>[26]</sup>。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 是诱导细胞产生氧化应激和凋亡的常见刺激剂<sup>[27]</sup>。本研究使用 ConA 与 CCl<sub>4</sub> 作为造模剂评价了渣驯总提取物体内肝保护活性, 利用 CCl<sub>4</sub> 作为造模剂评价了渣驯不同溶剂洗脱部位, 包括渣驯水提取物、渣驯 95% 乙醇提取物、渣驯 60% 乙醇提取物、渣驯 30% 乙醇提取物的体内肝保护活性, 同时对目前研究显示的渣驯主要水溶性成分富里酸亦进行了体内肝保护活性考察。另外,

利用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作为造模剂在体外细胞水平进一步评价了在体内研究中显示显著活性的渣驯总提取物、渣驯水提取物、渣驯 30% 乙醇提取物及富里酸的肝保护活性和可能的作用机制。

有文献研究显示, 渣驯对骨肉瘤大鼠模型中病灶转移引起的肝脏和肾脏损害具有保护作用, 可以显著降低骨肉瘤大鼠 ALT、AST、ALP 水平<sup>[28]</sup>。另外, 在高脂饮食诱导的大鼠 NAFLD 模型中, 渣驯也具有降低肝损伤标志物, 改善肝组织病理的作用<sup>[17]</sup>。富里酸作为渣驯中已知的主要组分, 已有研究显示其能够刺激大鼠肝细胞线粒体呼吸<sup>[29]</sup>, 喂食小鼠富里酸饲料 19 周可显著增强小鼠肝细胞内山梨醇脱氢酶、单胺氧化酶的活性, 且可增强肝巨噬细胞内酸性磷酸酶的活性, 调节肝细胞的物质代谢、增强肝生物转化<sup>[30]</sup>。在 CCl<sub>4</sub> 诱导的大鼠肝纤维化模型及 CCl<sub>4</sub> 联合肝脏缺血再灌注损伤大鼠模型中, 富里酸都表现出显著的肝保护活性<sup>[31,32]</sup>。本研究进一步确证了渣驯总提取物及富里酸的体内外肝保护活性, 为渣驯用于肝病治疗进一步提供了科学依据。另外, 本研究的重要发现在于获得渣

驯不同溶剂的洗脱组分,并对这些洗脱组分进行了药效学比较研究,结果表明,渣驯不同溶剂洗脱组分对 $\text{CCl}_4$ 诱导的氧化性肝损伤模型均表现一定的活性,其中水提取物和30%乙醇提取物表现的肝保护活性更佳,各洗脱组分活性强弱对比:水提取物 $\approx$ 30%乙醇提取物 $>$ 60%乙醇提取物 $>$ 95%乙醇提取物,结合各洗脱溶剂的水溶性,提示渣驯保肝活性组分多存在于水溶性洗脱部位中。且研究中发现,渣驯水提取物和30%乙醇提取物对血清AST和LDH的降低作用明显优于阳性对照药双环醇。目前,对渣驯药效物质基础的研究多集中在渣驯正丁醇提取物,有文献报道显示,渣驯正丁醇提取物在对乙酰氨基酚及ConA诱导的小鼠急性肝损伤模型中表现肝保护活性,但其效果略逊于阳性药联苯双酯<sup>[15,33]</sup>。综合分析正丁醇的溶剂特点,其水溶性弱于60%乙醇,更弱于30%乙醇,该文献为本研究结果也提供了佐证,进一步提示渣驯治疗肝脏病的有效成分具有水溶性。

富里酸作为目前多数研究中认为的渣驯中主要组分,在水、酸、碱、乙醇中均具有良好的溶解性。本研究亦发现,在0.15%  $\text{CCl}_4$ 诱导的小鼠氧化性肝损伤模型中,渣驯水提取物、渣驯30%乙醇提取物对小鼠血清ALT、AST水平的降低作用优于富里酸;在体外 $\text{H}_2\text{O}_2$ 诱导的人肝细胞损伤模型中,渣驯水提取物、渣驯30%乙醇提取物 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对细胞培养上清中ALP的降低作用优于富里酸 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,渣驯水提取物 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对细胞培养上清中LDH的降低作用亦优于富里酸 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,提示渣驯水溶性组分中除了富里酸为活性成分,尚存在其他具有肝保护活性的组分,深入的研究有待进一步开展。

氧化应激是体内氧化与抗氧化作用失衡的一种状态,过量的ROS生成与脂质、蛋白质和DNA几种重要生物分子的氧化损伤有关,这些大分子的损伤与肝脏疾病息息相关<sup>[34]</sup>。本研究结果显示在体外细胞水平,渣驯、其水溶性活性洗脱部位及富里酸均具有降低细胞内ROS的作用。

细胞死亡受体介导的信号通路和线粒体介导的信号通路是控制细胞凋亡的两种主要信号通路。在线粒体诱导的细胞凋亡途径中,Bcl-2家族具有核心作用。Bcl-2家族蛋白通过调节线粒体膜通透性参与细胞凋亡,该家族主要包括Bcl-2抗凋亡蛋白和BAX促凋亡蛋白。Bcl-2可以与线粒体结合并阻止细胞色素c(线粒体凋亡因子)从线粒体移动到细胞质中。另一方面,促凋亡成员BAX可以插入线粒体外膜并扩大线粒体通透性,从而促进线粒体膜电位降低和细胞色素c释放。此外,已经证实Bcl-2/BAX的比例是细胞凋亡易

感性的关键决定因素<sup>[35]</sup>。Caspase-3是细胞程序性死亡(细胞凋亡)的重要介质,在细胞发生凋亡时,前体caspase-3分解为剪切体caspase-3,降解多聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)导致细胞程序性死亡<sup>[36]</sup>。本研究表明,渣驯总提取物、其水溶性活性洗脱部位及富里酸可显著改善 $\text{H}_2\text{O}_2$ 诱导的肝细胞线粒体膜电位改变,并可能通过提高Bcl-2/BAX比值、降低cleaved caspase-3/caspase-3比值抑制肝细胞凋亡。

综上所述,本研究进一步确证了渣驯和富里酸对肝损伤的保护作用,且发现渣驯治疗肝病的有效成分多集中在水溶性洗脱部位,渣驯保肝活性的主要机制与抗氧化及降低线粒体膜电位、抑制肝细胞凋亡有关。渣驯进一步的药效物质基础和质量标准的研究尚在开展中。

**作者贡献:** 林莫迪负责细胞实验操作、数据处理及文章撰写;陈智伟负责动物实验操作;孙华负责文章修改;吉腾飞、边巴坚参、米玛、次仁负责提取工作。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. The liver [J]. *Curr Biol*, 2017, 27: R1147-R1151.
- [2] Wang FS, Fan JG, Zhang Z, et al. The global burden of liver disease: the major impact of China [J]. *Hepatology*, 2014, 60: 2099-2108.
- [3] Liu XA, Pan L, Yang CH, et al. Understanding and treatment of hepatobiliary diseases [J]. *Clin Chin Mater Clin Med (中药与临床)*, 2022, 13: 58-64.
- [4] Zhuo MC, Dun Z. Research on the origin, solution and clinical application of Jiu wei za xun Pills [J]. *Asia-Pacific Trad Med (亚太传统医药)*, 2022, 18: 30-33.
- [5] Zhong GY, Zhou FC, Shi SM, et al. Actuality investigation on general crude drugs and its quality standard of Tibetan medicine [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2012, 37: 2349-2355.
- [6] Zhao MM, Gu R, Fan JY, et al. Research progress of Tibetan medicine "Zha-xun" [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2018, 43: 1554-1562.
- [7] Hu TT, Dai LP, Peng C, et al. Research progress of Tibetan medicine on treatment of peptic ulcer [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志)*, 2016, 22: 204-208.
- [8] Mi MZG. Tibetan enemas for ulcerative colitis [J]. *J Med Pharm Chin Minorities (中国民族医药杂志)*, 2002, (02): 21.
- [9] Alshubaily FA, Jambi EJ. Correlation between antioxidant and anti-osteoporotic activities of Shilajit loaded into chitosan nanoparticles and their effects on osteoporosis in rats [J]. *Polymers*, 2022, 14: 3972.
- [10] Durg S, Veerapur VP, Thippeswamy BS, et al. Antiepileptic and

- antipsychotic activities of standardized Śilājatu (Shilajit) in experimental animals [J]. *Anc Sci Life*, 2015, 35: 110-117.
- [11] Goel RK, Banerjee RS, Acharya SB. Antiulcerogenic and antiinflammatory studies with Shilajit [J]. *J Ethnopharmacol*, 1990, 29: 95-103.
- [12] Jafari M, Forootanfar H, Ameri A, et al. Antioxidant, cytotoxic and hyperalgesia-suppressing activity of a native Shilajit obtained from Bahr Aseman mountains [J]. *Pak J Pharm Sci*, 2019, 32: 2167-2173.
- [13] Kloskowski T, Szeliski K, Krzeszowiak K, et al. Mumio (Shilajit) as a potential chemotherapeutic for the urinary bladder cancer treatment [J]. *Sci Rep*, 2021, 11: 22614.
- [14] Stohs SJ. Safety and efficacy of Shilajit (mumie, moomiyo) [J]. *Phytother Res*, 2014, 28: 475-479.
- [15] Wang WQ, Ye CP, Zeng Y, et al. Protective effect of *n*-butanol fraction from Tibetan medicine Brag-zhun on liver injury in mice induced by concanavalin A [J]. *J Chin Med Mater (中药材)*, 2016, 39: 2846-2849.
- [16] Ye CP. Protective Effect and Mechanism of Tibetan Medicine Zhaxun on Experimental Liver Injury in Mice (藏药渣驯对小鼠实验性肝损伤的保护作用及机制研究) [D]. Chengdu: Chengdu University of Chinese Medicine, 2017.
- [17] Ghezelbash B, Shahrokhi N, Khaksari M, et al. Hepatoprotective effects of Shilajit on high fat-diet induced non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in rats [J]. *Horm Mol Biol Clin Investig*, 2020. DOI: 10.1515/hmbci-2019-0040.
- [18] Cao B, Gu R, Ma YY, et al. Material composition research on Tibetan medicine "Brag-zhun" [J]. *J Chin Med Mater (中药材)*, 2015, 38: 279-283.
- [19] McGill MR. The past and present of serum aminotransferases and the future of liver injury biomarkers [J]. *EXCLI J*, 2016, 15: 817-828.
- [20] Heymann F, Hamesch K, Weiskirchen R, et al. The concanavalin A model of acute hepatitis in mice [J]. *Lab Anim*, 2015, 49: 12-20.
- [21] Faccioli AP, Dias ML, Paranhos BA, et al. Liver cirrhosis: an overview of experimental models in rodents [J]. *Life Sci*, 2022, 301: 120615.
- [22] Chaudhary A, Chauhan V. Lactate dehydrogenase as an indicator of liver diseases [J]. *J Adv Med Dental Sci Res*, 2015, 3: S20.
- [23] Siller AF, Whyte MP. Alkaline phosphatase: discovery and naming of our favorite enzyme [J]. *J Bone Miner Res*, 2018, 33: 362-364.
- [24] Zhang W, Liang ZH. Comparison between annexin V-FITC/PI and Hoechst33342/PI double stainings in the detection of apoptosis by flow cytometry [J]. *Chin J Cell Mol Immunol (细胞与分子免疫学杂志)*, 2014, 30: 1209-1212.
- [25] Wang H, Feng X, Yan W, et al. Regulatory T cells in autoimmune hepatitis: unveiling their roles in mouse models and patients [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 575572.
- [26] Weber LW, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model [J]. *Crit Rev Toxicol*, 2003, 33: 105-136.
- [27] Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21: 363-383.
- [28] Jambi EJ, Abdulaziz F. Shilajit potentiates the effect of chemotherapeutic drugs and mitigates metastasis induced liver and kidney damages in osteosarcoma rats [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2022, 29: 103393.
- [29] Visser SA. Effect of humic substances on mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation [J]. *Sci Total Environ*, 1987, 62: 347-354.
- [30] Gao JG, Wang RP, Yang Y, et al. Effects of fulvic acid on enzyme activity of mice liver [J]. *Humic Acid (腐植酸)*, 2007, (03): 22-25.
- [31] Yu JH, Mao Y. Protective effects of sodium fulvit on hepatic ischemia/reperfusion injury after liver cirrhosis in rats [J]. *Chin J Hepatobiliary Surg (中华肝胆外科杂志)*, 2004, 10: 613-615.
- [32] Yu JH, Mao Y. Effects of sodium fulvit on the development of liver fibrosis in rats [J]. *J Pract Med (实用医学杂志)*, 2008, 24: 4018-4020.
- [33] Ye CP, Wang WQ, Cao B, et al. Protective effect of Tibetan medicine residue and *n*-butanol on acute liver injury induced by acetaminophen in mice [J]. *J Med Pharm Chin Minorities (中国民族医药杂志)*, 2017, 23: 60-62.
- [34] Farzaei MH, Zobeiri M, Parvizi F, et al. Curcumin in liver diseases: a systematic review of the cellular mechanisms of oxidative stress and clinical perspective [J]. *Nutrients*, 2018, 10: 855.
- [35] Ma ZJ, Lu L, Yang JJ, et al. Lariciresinol induces apoptosis in HepG2 cells *via* mitochondrial-mediated apoptosis pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 821: 1-10.
- [36] Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis [J]. *Cell Death Differ*, 1999, 6: 99-104.