

牛樟叶总多糖对慢性酒精性肝损伤大鼠的保护作用及机制研究

张蓓, 曾榕榕, 万永艳, 徐宏, 梁学政*

柳州市中医医院 (柳州市壮医医院), 广西 柳州 545026

摘要: 目的 研究牛樟叶总多糖对大鼠慢性酒精性肝损伤的保护作用与机制。方法 60 只雄性大鼠按体质量随机分为对照组、模型组、多烯磷脂酰胆碱胶囊 (10.944 mg/kg) 组及牛樟叶总多糖高、中、低剂量 (50.0、37.5、25.0 mg/kg) 组。对照组和模型组给予蒸馏水, 其余各组给予不同剂量药物。给药 0.5 h 后, 除对照组外, 其余各组均 ig 体积分数为 56% 红星二锅头, 共给药 8 周。采用苏木精-伊红 (HE) 染色观察各组肝组织形态及结构的变化, 测定各组大鼠血清白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、丙氨酸转氨酶 (ALT)、谷氨酰转氨酶 (AST)、三酰甘油 (TG) 及肝组织匀浆液中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、谷胱甘肽 (GSH) 水平。免疫组织化学法测定大鼠肝脏沉默信息调节因子 1 (SIRT1)、磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶 α (p-AMPK α) 表达水平。蛋白质印迹法测定肝组织 SIRT1、AMPK α 、p-AMPK α 、甾醇调节元件结合蛋白 1c (SREBP1c) 水平。结果 病理切片结果表明, 牛樟叶总多糖能改善大鼠肝组织病理变化。与模型组相比, 牛樟叶总多糖各剂量组 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、TG、ALT、AST 水平均明显降低 ($P < 0.05$); GSH 水平明显升高 ($P < 0.05$)。牛樟叶总多糖可提高 SIRT1 表达及 AMPK α 的磷酸化水平。结论 牛樟叶总多糖对慢性酒精性肝损伤有一定的保护作用, 其机制可能与抗氧化应激、抑制炎症反应、调节 SIRT1/AMPK 信号通路有关。

关键词: 牛樟叶总多糖; 慢性酒精性肝损伤; 白细胞介素-1 β ; 肿瘤坏死因子- α ; 丙氨酸转氨酶; 谷胱甘肽; 沉默信息调节因子 1; 腺苷酸活化蛋白激酶 α ; 甾醇调节元件结合蛋白 1c

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2022)06-1182-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.06.003

Protective effect and mechanism of polysaccharide from *Cinnamomum camphora* leaves on chronic alcoholic liver injury in rats

ZHANG Bei, ZENG Rong-rong, WAN Yong-yan, XU Hong, LIANG Xue-zheng

Liuzhou Traditional Chinese Medical Hospital (Liujicouh Si Ywcuengh Yihyen), Liuzhou 545026, China

Abstract: **Objective** To study the protective effect and mechanism of polysaccharide from *Cinnamomum camphora* leaves on chronic alcoholic liver injury in rats. **Methods** Sixty male rats were randomly divided into control group, model group, Polyene Phosphatidylcholine Capsules (10.944 mg/kg), polysaccharide from *C. camphora* leaves high-, medium- and high-dose (50, 37.5 and 25mg/kg) groups according to body weight. Rats in the control group and model group was given distilled water, and rats in the other groups was given corresponding drugs regularly every day. In addition, rats in the treatment groups and model group were given 56% red star erguotou by intragastric administration 0.5 h later to establish chronic alcoholic liver injury model. They were treated for 8 weeks. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the changes of liver tissue morphology and structure in each administration group. The levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α , ALT, AST, and TG in serum and IL-1 β , IL-6, TNF- α , and GSH in liver tissue homogenate were determined. The protein levels of SIRT1, AMPK α , P-AMPK α and SREBP1c in liver tissue were determined by Western blotting. The expression levels of SIRT1 and P-AMPK α in rat liver were determined by immunohistochemistry. **Results** Pathological section results showed that polysaccharide from *C. camphora* leaves could improve the pathological changes of rat liver tissue. Compared with model group, the levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α , TG, ALT and AST in all dose groups were significantly decreased ($P < 0.05$), while the level of GSH was significantly increased ($P < 0.05$). Total polysaccharide from *C. camphora* leaves can increase the expression of SIRT1 and phosphorylation of AMPK α . **Conclusion** Total polysaccharide from *C. camphora* leaves

收稿日期: 2022-03-23

基金项目: 柳州市阳和工业新区应用技术研究开发与科技创新项目 (2019007)

作者简介: 张蓓, 女, 研究方向为中药学。E-mail: zhangbei8402@126.com

*通信作者: 梁学政

has a certain protective effect on chronic alcoholic liver injury, and its mechanism may be related to antioxidant stress, anti-inflammatory response and regulation of SIRT1-AMPK signaling pathway.

Key words: total polysaccharide from *Cinnamomum camphora* leaves; chronic alcoholic liver injury; IL-1 β ; TNF- α ; ALT; GSH; SIRT1; AMPK α ; SREBP1c

酒精性肝病是由于长期大量饮酒而导致的肝脏疾病。随着人们饮食习惯及生活方式的改变,酒精性肝病已成为我国的常见病、多发病^[1-2]。世界卫生组织 2018 年报告全球范围内饮酒人群约占 45%,过量饮酒每年可造成 330 万人死亡,目前尚无全国范围内的酒精性肝病流行病学调查研究,但是据部分地区报道显示,我国酒精性肝病的患病率呈现上升及低龄化趋势^[3-4]。

牛樟 *Cinnamomum kanehirae* Hayata 为樟科植物,原产地台湾,在当地有“森林中的红宝石”的称号^[5-7]。牛樟叶的研究报道较少^[8],本课题组认为牛樟芝生长周期较长,价格较高,不利于大规模开发,首先提出来源于同种植物不同的部位具有相似的活性成分,前期以牛樟叶总多糖作为指标性成分考察了牛樟叶水提液的最佳提取工艺,并对水提液进行药效学研究,实验结果表明牛樟叶水提取物具有明确的急性酒精性肝损伤保护作用^[9]。

为了进一步明确发挥药效的活性成分,研究其对慢性酒精性肝损伤的保护作用,课题组对牛樟叶水提取物进行纯化工艺考察,进行脱蛋白、柱色谱法脱盐及小分子物质研究,以获得牛樟叶多糖成分,并利用牛樟叶多糖开展对慢性酒精性肝损伤的保护作用研究,以扩大其药效范围。同时通过研究其对血清指标丙氨酸氨基转移酶(ALT)、谷氨酸氨基转移酶(AST)、三酰甘油(TG)、谷胱甘肽(GSH)的影响,推断其发挥酒精性肝损伤保护作用机制在一定程度上与抗氧化应激反应有关;通过研究其对血清指标白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的影响,推断其发挥酒精性肝损伤保护作用机制在一定程度上与抑制炎症反应有关;通过研究沉默信息调节因子 1(SIRT1)/腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)通路相关蛋白表达,推断其发挥酒精性肝损伤保护作用机制是通过抑制肝脏脂质沉积,从而缓解酒精性肝病的进程。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

二甲苯(国药集团化学试剂有限公司,批号 10023418);碳酸锂(国药集团化学试剂有限公司,

批号 20022818);伊红(Solarbio,批号 E8090);蛋白质 Marker(Helix,批号 P12103);TEMED(Solarbio,批号 T8090);PVDF 转移膜(Millipore,IPVH00010);化学发光试剂(Millipore,WBKLS0500);聚山梨酯-20(Solarbio,批号 T220-100);RIPA(强)组织细胞快速裂解液(Solarbio,批号 R0010);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(Solarbio,批号 PC0020);SIRT1 一抗(Bioswamp,货号 PAB45132);AMPK α 一抗(bioswamp,货号 PAB30970);p-AMPK α 一抗(Abcam,货号 Ab133448);甾醇调节元件结合蛋白 1c 一抗(SREBP1c,Cbioswamp,货号 PAB39550);GAPDH 一抗(Bioswamp,货号 PAB36269);羊抗兔二抗 IgG(Bioswamp,货号 SAB43714)。

1.2 仪器和试剂

DM1000 正置显微镜(徕卡显微系统有限公司);移液器(吉尔森 P 型称器公司,P2、P10、P20、P100、P200、P1000);DHG-3023A 恒温烘箱(上海一恒科学有限公司);RM2235 石蜡切片机(徕卡显微系统有限公司);TKD-TK 摊片烤片机(湖北康强医疗器械有限公司);TB-718L 生物组织包埋机-冷冻机(泰维科技);TB-718D 生物组织包埋机(泰维科技);TKD-TSF 自动组织脱水机(湖北康强医疗器械有限公司);微量移液枪(各种型号,美国 Rainin PiPet-Life);Icen-24R 高速冷冻离心机(杭州奥盛仪器有限公司);GE48527 PCR 仪(杭州柏恒科技有限公司);mini protean 3 cell 电泳仪(BIO-RAD);MK3 酶标仪(芬兰雷勃);Tanon-5200 全自动化学发光分析仪(上海天能科技有限公司)。

ALT 试剂盒(批号 20200615)、AST 试剂盒(批号 20200608)、TG 试剂盒(批号 20200521)、IL-1 β 试剂盒(批号 20200427)、IL-6 试剂盒(批号 20200408)、TNF- α 试剂盒(批号 20200518),以上试剂盒均购自南京建成生物研究所。

1.3 实验动物

雄性普通级大鼠 60 只,体质量(200 $\pm$ 50)g,8 周龄,购自广西医科大学动物实验中心,动物使用许可证号:SCXK(桂)2014-0005。饲养于动物房,动

物饲养条件: 温度(25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度(60 ± 10)%。

1.4 药物

牛樟叶总多糖(25 mg/mL, 质量分数为 89.31%, 批号 20201221, 柳州市中医医院中药壮瑶药制剂研发重点实验室); 多烯磷脂酰胆碱胶囊[阳性对照药, 228 mg/粒, 批号 20190919, 诺菲(北京)制药有限公司]; 体积分数为 56% 红星二锅头(北京红星股份有限公司)。

1.5 模型制备^[10]、分组和给药

60 只雄性大鼠适应性喂养 1 周后, 随机分为对照组、模型组、阳性药组及牛樟叶总多糖高、中、低剂量(50.0、37.5、25.0 mg/kg, 3 个剂量组 ALT、AST 指标差异有显著意义, 加大给药量指标差异无统计学意义, 因此设置剂量组比例为 2:1.5:1)组, 每组 10 只。阳性药组给予多烯磷脂酰胆碱胶囊(10.944 mg/kg), 对照组和模型组给予蒸馏水, 其余各组给予不同剂量药物。给药 0.5 h 后, 除对照组外, 其余各组均 ig 体积分数为 56% 红星二锅头, 剂量为 4 mL/kg, 共给药 8 周, 建立大鼠慢性酒精性肝损伤模型。以出现酒精性肝损伤的临床表现和病理改变为造模成功, 出现动物行为改变: 精神萎靡、食欲不振、大便稀溏, 被毛蓬松无光泽, 走路不稳、前爪挠嘴、动作呆板; 肝功能指标异常: 血清 AST、ALT 水平显著高于对照组; 病理切片: 肝脏组织炎性浸润或肝细胞中脂肪滴蓄积等。实验第 8 周末, 所有大鼠禁食不禁水 12 h, 股动脉取血后处死, 迅速解剖取肝脏, 用冷生理盐水清洗肝脏后称其质量。

1.6 组织病理形态学观察

末次给药后 1 h, 小鼠 ip 10% 水合氯醛以麻醉, 解剖小鼠肝组织放入 4% 甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 冠状切片, 苏木精-伊红(HE)染色, 光学显微镜观察肝组织形态以及结构变化。

1.7 血清指标检测

股动脉取血, 血液静置 30 min 后, 3 000 r/min, 离心 10 min, 取上层血清至 1.5 mL EP 管, 按照试剂盒说明书检测指标。生化分析法检测大鼠血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、ALT、AST、TG 水平, 按照试剂盒说明书来操作。

1.8 肝匀浆指标检测

末次给药后 12 h 内禁食不禁水, 12 h 后 10% 水合氯醛(0.35 mL/kg)麻醉大鼠, 股动脉取血后, 颈椎脱臼法处死大鼠, 迅速取大鼠肝脏, 每组取大鼠

肝脏相同部位置于 10% 的甲醛固定液中固定, 取其他肝脏置于离心管中于 -80°C 冰箱保存。取部分肝脏用冷生理盐水制成 10% 肝匀浆, 按试剂盒要求检测大鼠肝匀浆 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、GSH 水平。

1.9 免疫组织化学法检测 SIRT1/AMPK α 通路相关蛋白表达

取肝脏组织用常规免疫组化染色, 将脱蜡后的切片经 100% 酒精 I、100% 酒精 II、95% 酒精、85% 酒精、75% 酒精分别浸泡 5 min, 自来水冲洗 10 min。滴加一抗[SIRT1 (1:200)、p-AMPK α (1:100)], 湿盒孵育, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。PBS 溶液冲洗 3 min $\times$ 3 次, 将切片从 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出, 放置室温下复温 45 min, PBS 溶液冲洗 5 min $\times$ 3 次, 滴加 maxvision 二抗 (1:2 000), 湿盒孵育, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min。PBS 溶液冲洗 3 min $\times$ 3 次。DAB 染色, 观察到切片有颜色改变时, 立即用自来水洗去染色液。苏木素复染 3 min, 1% 盐酸酒精分化, 显微镜下观察, 控制染色程度, 自来水冲洗 10 min。400 倍光学显微镜下观察 SIRT1、p-AMPK α 表达情况。

1.10 蛋白质印迹法检测 SIRT1/AMPK α 通路相关蛋白表达

在电子天平上称 50 mg 肝脏组织, 提取肝组织蛋白, 进行蛋白定量, 依次进行电泳、转膜、牛奶封闭, 加入 1:1 000 的一抗后, 放置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱的摇床上过夜, 次日加入 1:10 000 的二抗后放置摇床上约 1 h, 最后进行 ECL 化学发光检测。

1.11 统计学方法

用 SPSS 18.0 软件处理数据, 多组间比较采用单因素方差分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 牛樟叶总多糖对慢性酒精性肝损伤大鼠肝脏形态的影响

HE 染色结果显示, 模型组胞质疏松呈网状、内质网呈不同程度扩张, 脂质内分布有脂肪空泡, 呈现片状坏死及炎性细胞浸润。阳性药组及牛樟叶总多糖各剂量组细胞水肿程度有所减轻, 炎性细胞浸润部分减少, 说明肝组织病变程度有所减轻, 见图 1。

2.2 牛樟叶总多糖对慢性酒精性肝损伤大鼠 ALT、AST、TG 水平的影响

与对照组相比, 模型组血清 ALT、AST、TG 显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 牛樟叶总多糖各剂量组和阳性药组 ALT、AST、TG 均显著降低 ($P < 0.01$), 见表 1。

2.3 牛樟叶总多糖对慢性酒精性肝损伤大鼠炎症因子水平的影响

2.3.1 牛樟叶总多糖对慢性酒精性肝损伤大鼠血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平的影响 与对照组相比, 模型组血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 显著升高($P<0.05$), 表明造模成功; 与模型组相比, 牛樟叶总多糖各剂量组和阳性药组 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 均显著降低($P<0.01$), 见表 2。

2.3.2 牛樟叶总多糖对慢性酒精性肝损伤大鼠肝脏

组织 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平的影响 与对照组相比, 模型组 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平明显升高($P<0.05$), 与模型组相比, 牛樟叶总多糖各剂量组和阳性药组 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 明显降低($P<0.01$), 见表 3。

2.4 牛樟叶总多糖对慢性酒精性肝损伤大鼠肝脏组织匀浆 GSH 水平的影响

与对照组相比, 模型组肝脏组织匀浆 GSH 水平降低($P<0.05$); 与模型组相比, 牛樟叶总多糖各剂量组和阳性药组 GSH 升高($P<0.01$), 见表 4。

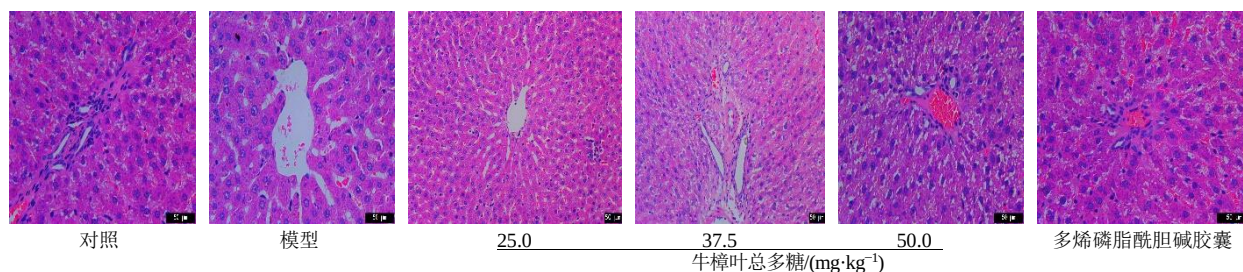


图 1 牛樟叶总多糖对慢性酒精性肝损伤大鼠肝组织病理学的影响 (HE, $\times 400$)

Fig. 1 Effects of polysaccharides from *C. camphora* leaves on liver histopathology in rats with chronic alcoholic liver injury (HE, $\times 400$)

表 1 牛樟叶总多糖对慢性酒精性肝损伤大鼠血清 ALT、AST、TG 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 1 Effects of total polysaccharides from *C. camphora* leaves on serum ALT, AST and TG of rats with chronic alcoholic liver injury ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	ALT/(IU·L ⁻¹)	AST/(IU·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	130.5 $\pm$ 2.85	93.10 $\pm$ 2.32	1.28 $\pm$ 2.89
模型	—	199.3 $\pm$ 1.32 [#]	195.6 $\pm$ 2.39 [#]	2.48 $\pm$ 1.58 [#]
牛樟叶总多糖	25.0	162.1 $\pm$ 2.14 ^{**}	149.7 $\pm$ 1.68 ^{**}	2.07 $\pm$ 3.68 ^{**}
	37.5	158.6 $\pm$ 3.54 ^{**}	133.6 $\pm$ 1.88 ^{**}	1.48 $\pm$ 2.56 ^{**}
	50.0	150.1 $\pm$ 2.44 ^{**}	113.2 $\pm$ 2.60 ^{**}	1.36 $\pm$ 2.62 ^{**}
多烯磷脂酰胆碱胶囊	10.944	148.0 $\pm$ 1.56 ^{**}	116.5 $\pm$ 1.38 ^{**}	1.46 $\pm$ 2.08 ^{**}

与对照组比较: [#] $P<0.05$; 与模型组比较: ^{**} $P<0.01$

[#] $P<0.05$ vs control group; ^{**} $P<0.01$ vs model group

表 2 牛樟叶总多糖对慢性酒精性肝损伤大鼠血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 2 Effects of total polysaccharides from *C. camphora* leaves on serum IL-1 β , IL-6 and TNF- α in rats with chronic alcoholic liver injury ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)
对照	—	45.574 $\pm$ 2.45	63.204 $\pm$ 1.42	287.078 $\pm$ 2.89
模型	—	137.982 $\pm$ 1.27 [#]	167.198 $\pm$ 1.37 [#]	702.621 $\pm$ 2.37 [#]
牛樟叶总多糖	25.0	94.231 $\pm$ 1.04 ^{**}	140.034 $\pm$ 2.31 ^{**}	599.247 $\pm$ 1.28 ^{**}
	37.5	83.546 $\pm$ 3.04 ^{**}	123.046 $\pm$ 1.84 ^{**}	526.214 $\pm$ 2.40 ^{**}
	50.0	75.160 $\pm$ 2.64 ^{**}	113.972 $\pm$ 2.34 ^{**}	478.339 $\pm$ 3.22 ^{**}
多烯磷脂酰胆碱胶囊	10.944	67.042 $\pm$ 2.28 ^{**}	96.147 $\pm$ 2.08 ^{**}	392.42 $\pm$ 1.68 ^{**}

与对照组比较: [#] $P<0.05$; 与模型组比较: ^{**} $P<0.01$

[#] $P<0.05$ vs control group; ^{**} $P<0.01$ vs model group

表 3 牛樟叶总多糖对慢性酒精性肝损伤大鼠肝匀浆 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 3 Effects of total polysaccharides from *C. camphora* leaves on IL-1 β , IL-6, and TNF- α in liver homogenates of rats with chronic alcoholic liver injury ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)
对照	—	38.504 ± 2.48	48.137 ± 2.47	185.080 ± 1.56
模型	—	75.176 ± 1.02 [#]	90.492 ± 1.09 [#]	380.396 ± 2.42 [#]
牛樟叶总多糖	25.0	69.548 ± 1.88 ^{**}	73.457 ± 1.64 ^{**}	264.148 ± 1.29 ^{**}
	37.5	52.647 ± 3.14 ^{**}	66.214 ± 1.37 ^{**}	240.244 ± 1.45 ^{**}
	50.0	42.654 ± 2.03 ^{**}	54.486 ± 3.35 ^{**}	223.230 ± 2.34 ^{**}
多烯磷脂酰胆碱胶囊	10.944	42.111 ± 2.18 ^{**}	52.602 ± 3.65 ^{**}	201.009 ± 2.04 ^{**}

与对照组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$

[#] $P < 0.05$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs model group

表 4 牛樟叶总多糖对慢性酒精性肝损伤大鼠肝脏组织匀浆 GSH 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 4 Effects of polysaccharides from *C. camphora* leaves on GSH in liver homogenates of rats with chronic alcoholic liver injury ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	GSH/(μ mol·L ⁻¹)
对照	—	380.457 ± 2.77
模型	—	217.932 ± 2.60 [#]
牛樟叶总多糖	25.0	300.248 ± 1.05 ^{**}
	37.5	340.578 ± 3.47 ^{**}
	50.0	364.214 ± 2.24 ^{**}
多烯磷脂酰胆碱胶囊	10.944	350.214 ± 3.56 ^{**}

与对照组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$

[#] $P < 0.05$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs model group

2.5 牛樟叶总多糖对慢性酒精性肝损伤大鼠 SIRT1/AMPK α 信号通路的影响

2.5.1 牛樟叶总多糖对大鼠肝脏中 SIRT1、p-AMPK α 表达的影响 与模型组相比,牛樟叶总多糖各剂量组和阳性药组大鼠肝脏 SIRT1、p-AMPK α 蛋白表达明显增加,见图 2、3。

2.5.2 牛樟叶总多糖对大鼠肝脏组织中 SIRT1、AMPK α 、p-AMPK α 、SREBP1c 蛋白水平的影响 与对照组相比,模型组 SIRT1、AMPK α 、p-AMPK α 蛋白表达显著降低, SREBP1c 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比,牛樟叶总多糖各剂量组和阳性药组 SIRT1、AMPK α 、p-AMPK α 表达显著升高, SREBP1c 显著降低 ($P < 0.01$), 见图 4。

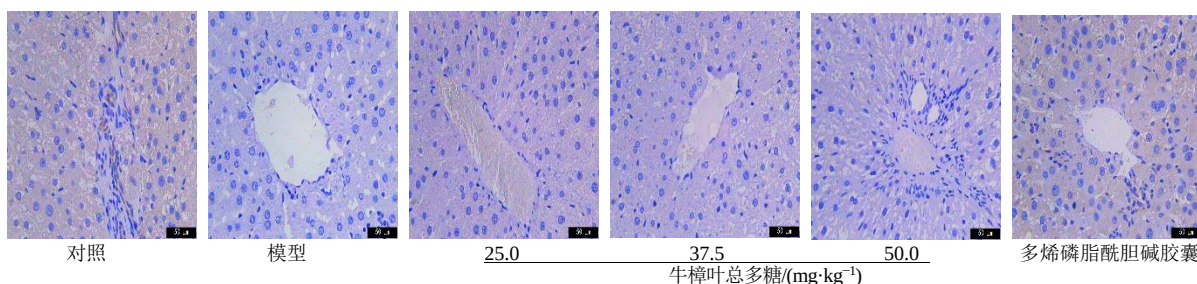


图 2 牛樟叶总多糖对大鼠肝脏 SIRT1 表达的影响

Fig. 2 Effect of total polysaccharides from *C. camphora* leaves on expression of SIRT1 in liver of rats

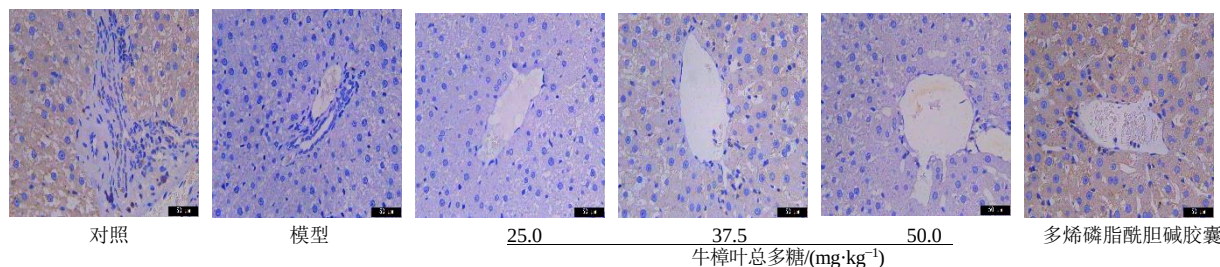


图 3 牛樟叶总多糖对大鼠肝脏 p-AMPK α 表达的影响

Fig. 3 Effect of total polysaccharides from *C. camphora* leaves on the expression of P-AMPK α in liver of rats

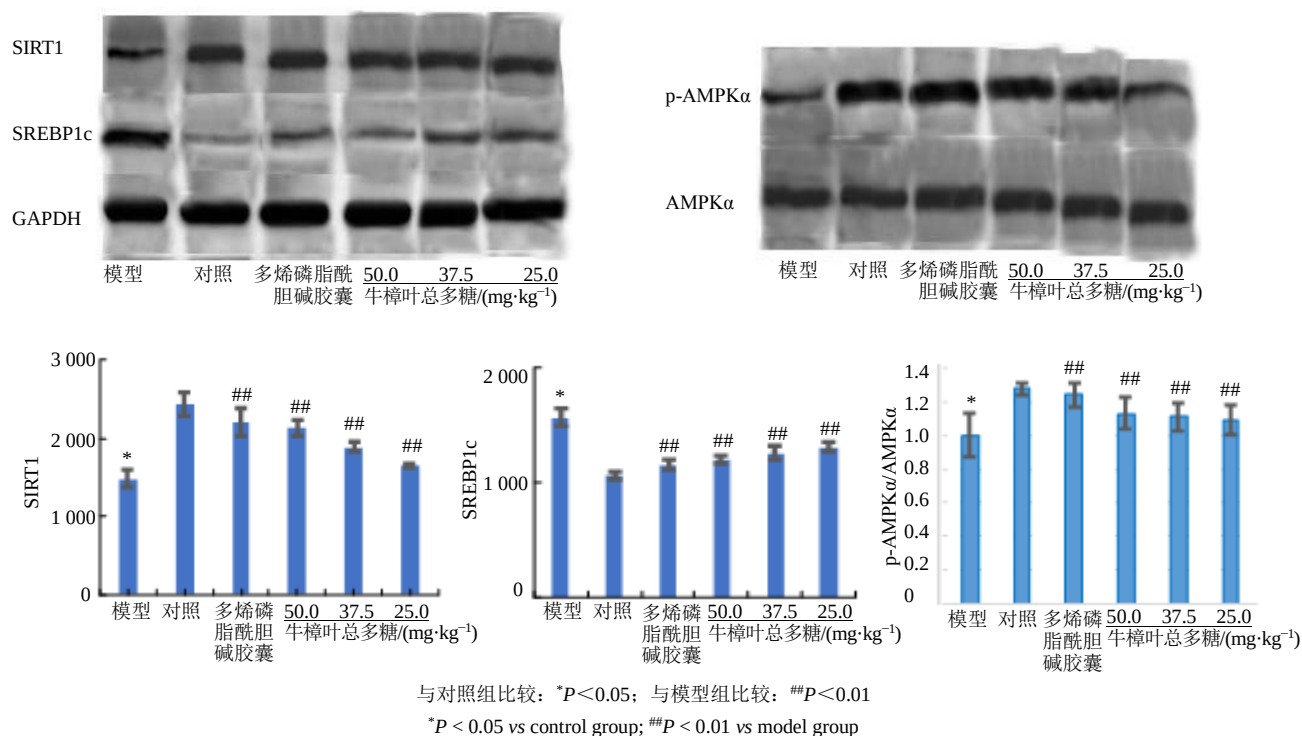


图 4 SIRT1、AMPKα、p-AMPKα、SREBP1c 在各组大鼠肝组织中的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Fig. 4 Expression of SIRT1, AMPKα, p-AMPKα and SREBP1c in rats liver tissue ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

3 讨论

酒精在机体内代谢过程中会产生大量活性氧自由基, 当其超过机体清除能力时, 引起肝脏的氧化应激损伤, 进一步导致酒精性脂肪肝、肝炎、肝硬化, 甚至肝癌。本研究结果显示, 酒精可损害小鼠肝脏组织形态及功能, 肝脏出现肝细胞坏死、炎性细胞浸润; 反映肝功能的血清 ALT、AST、TG 水平明显升高, 说明肝细胞受损; 肝脏内源性抗氧化物质 GSH 活性水平降低, 提示酒精使肝脏清除自由基能力下降, 氧化和抗氧化平衡被打破, 产生氧化应激反应^[11]。给予牛樟叶多糖提取物后, ALT、AST、TG 水平明显降低, 表明其可在一定程度上修复肝脏受损的程度, 而 GSH 活性水平明显得到提高, 表明其发挥作用的机制可能是通过提高机体抗氧化的能力, 延缓氧化应激反应而实现^[12-13]。

氧化应激是炎症过程中的伴随现象, 通过氧化加重炎症反应, 炎症通过炎症介质促进氧化。本实验采用酶联免疫吸附法测定大鼠肝脏和血清中炎症关键因子给药前后的变化, 结果显示模型组大鼠肝脏和血清中 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平高于对照组, 模型组大鼠肝脏出现明显的炎症反应, 给予牛樟叶多糖后, 上述炎症因子水平明显下降, 肝脏的炎症反应

得到明显改善。文献资料显示, 除了氧化应激引起炎症反应, 饮酒导致肠道菌群失调, 从而使肠道通透性增加, 肠道衍生的内毒素脂多糖易位至门静脉在循环中释放, 进而引发一系列炎症反应, 以触发信号级联反应, 从而趋化因子并释放炎性细胞因子, 包括 TNF-α、IL-1β 等^[14-15]。本实验结果提示牛樟叶总多糖可缓解酒精性肝脏炎症反应^[16-18], 至于是通过何种机制抑制炎症反应的发生, 有待进一步研究。

肝脏是 SIRT1 主要表达的器官之一, SIRT1 过表达可以激活腺苷酸活化蛋白酶 (AMPK), 进而增加脂肪酸的氧化, 减少葡萄糖的输出^[19-20]。研究表明, 提高 SIRT1/AMPK 通路活性有助于减少脂质堆积, 改善肝脏脂肪变性^[4], 从而起到保护肝脏的作用。在酒精性肝损伤的发生发展起着重要的作用。本研究结果表明, 酒精性大鼠肝脏 SIRT1 表达量下降, 给予牛樟叶多糖后, 其表达量明显升高, 提示 SIRT1 发挥对酒精性肝损伤的调控作用; AMPKα 通过磷酸化可以调节脂质代谢, 其下游 SREBP1c 蛋白是调控脂质合成及代谢的关键调控分子, 本研究发

增加, SREBP1c 表达量降低, 提示牛樟叶总多糖可以激活 SIRT1/AMPK 通路, 调节脂质合成与代谢, 抑制脂肪酸合成, 对酒精性肝损伤起到保护作用。

综上所述, 本研究表明牛樟叶总多糖能减轻酒精对肝脏损伤, 有助于肝细胞抵御酒精侵害, 增强肝脏的抗氧化能力, 提高肝脏抗炎及脂肪代谢能力, 为牛樟叶保健功能的开发提供了实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突
参考文献

- [1] 孙韬华, 刘振胜, 辛永宁. 酒精性肝病治疗研究进展 [J]. 实用肝病杂志, 2019, 22(2): 156-159.
- [2] 邱萍, 李相, 孔德松, 等. 酒精性肝病发病机制研究的新进展 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(2): 160-163.
- [3] Ma L N, Li Y. SIRT1: Role in cardiovascular biology [J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 440: 8-15.
- [4] You M, Jogasuria A, Taylor C, *et al.* Sirtuin 1 signaling and alcoholic fatty liver disease [J]. *Hepat Surg Nutr*, 2015, 4(2): 88-100.
- [5] 李冈荣. 汉方中草药对症图典 [M]. 乌鲁木齐: 新疆人民出版社, 2015: 206.
- [6] 邢文婷, 许奕, 陈培, 等. 台湾牛樟在海南引种栽培及生长特性研究 [J]. 热带作物学报, 2018, 39(4): 630-634.
- [7] 林雪玲, 郑蓉, 何天友, 等. 台湾牛樟总 DNA 提取方法研究及其 PCR 验证 [J]. 安徽农学通报, 2019, 25(S1): 7-9.
- [8] 杨海宽, 章挺, 汪信东, 等. 牛樟叶精油化学成分分析及类型划分研究 [J]. 江西农业大学学报, 2016, 38(4): 668-673.
- [9] 张蓓, 余潇苓, 万永艳, 等. 牛樟叶水提物对急性酒精性肝损伤的保护作用及其机制研究 [J]. 亚太传统医药, 2021, 17(7): 31-33.
- [10] 黄思远, 顾健, 谭睿, 等. 藏药波棱瓜子总木脂素对大

鼠慢性酒精性肝损伤的保护作用及机制探讨 [J]. 中药材, 2018, 41(2): 432-436.

- [11] 向进乐, 李晨露, 郭帅, 等. 红枣醋对慢性酒精肝损伤的保护作用 [J]. 现代食品科技, 2015, 31(10): 40-44.
- [12] Cederbaum A I, Wu D, Mari M, *et al.* CYP2E1-dependent toxicity and oxidative stress in HepG2 cells [J]. *Free Radic Biol Med*, 2001, 31(12): 1539-1543.
- [13] 王东风, 梁惠, 王文成. D-柠檬烯对大鼠酒精性肝损伤脂质代谢紊乱的影响 [J]. 食品科学, 2015, 36(5): 163-167.
- [14] Inokuchi S, Tsukamoto H, Park E, *et al.* Toll-like receptor 4 mediates alcohol-induced steatohepatitis through bone marrow-derived and endogenous liver cells in mice [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2011, 35(8): 1509-1518.
- [15] Szabo G, Lippai D. Converging actions of alcohol on liver and brain immune signaling [J]. *Int Rev Neurobiol*, 2014, 118: 359-380.
- [16] 王瑞婕, 杨勇, 白婷. 大黄素甲醚对酒精性肝损伤中 SIRT1-AMPK 通路的影响 [J]. 中国药理学通报, 2020, 36(11): 1557-1562.
- [17] Lee G, Choi T W, Kin C, *et al.* Anti-inflammatory activities of *Reydoutria celiptica* through suppression of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- κ B activation pathways [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2012, 34(3): 454-64.
- [18] 邱萍, 刘平平, 孔德松, 等. 复方银杏制剂对急性酒精性肝损伤小鼠的防护作用及其机制 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2014, 28(3): 373-379.
- [19] Wan D, Zhou Y H, Wang K, *et al.* Resveratrol provides neuroprotection by inhibiting phosphodiesterases and regulating the cAMP/AMPK/SIRT1 pathway after stroke in rats [J]. *Brain Res Bull*, 2016, 121: 255-262.
- [20] Yin H Q, Hu M, Liang X M, *et al.* Deletion of SIRT1 from hepatocytes in mice disrupts lipin-1 signaling and aggravates alcoholic fatty liver [J]. *Gastroenterology*, 2014, 146(3): 801-811.

[责任编辑 金玉洁]