

王不留行炭纳米类成分发现及其对小鼠酒精性肝损伤保护作用

赵亚芳¹, 李郁茹², 陈玉民¹, 赵玉升¹, 罗娟¹, 张一凡¹, 孔慧¹, 赵琰^{1*}, 屈会化^{3*}

1. 北京中医药大学中医学院, 北京 100029

2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100029

3. 北京中医药大学中医药研究院, 北京 100029

摘要: 目的 以王不留行 *Vaccariae Semen* 为碳源, 从中发现了王不留行炭纳米类成分 (*Vaccariae Semen Carbonisatum* nano-components, VSC-NCs), 并评价其对小鼠酒精性肝损伤的保护作用。方法 利用马弗炉高温煅烧出王不留行炭, 并从中提取分离出 VSC-NCs。利用透射电子显微镜、紫外-可见分光光谱、傅里叶变换红外光谱 (FT-IR)、荧光光谱、X 射线光电子能谱 (XPS) 分析对其进行表征鉴定。采用小鼠酒精性肝损伤模型, 对肝脏进行苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色, 同时检测谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)、总胆汁酸 (total bile acid, TBA) 的含量以及肝匀浆液中超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛的水平来评价 VSC-NCs 的保肝作用。结果 表征分析结果显示 VSC-NCs 为类球型, 粒径分布在 1.20~5.10 nm, 晶格间距为 0.23 nm, 其主要由 C、N、O 3 种元素组成, 表面含有羰基、羟基等基团。动物实验结果表明 VSC-NCs 可以显著降低酒精诱导的肝损伤小鼠 ALT、AST、TBA 和 ALP 含量, 同时显著提高 SOD 水平和降低丙二醛的水平, 表明 VSC-NCs 可以提高机体清除氧自由基的能力, 减少脂质过氧化物的产生, 从而达到保肝作用。结论 首次从王不留行炭中发现了 VSC-NCs, 并证实了其对酒精所造成的肝损伤有明显保护作用, 这不仅表明了 VSC-NCs 可以作为治疗酒精性肝损伤的一种潜在药物, 也为研究中药物质基础提供了一种全新思维方式。

关键词: 王不留行炭; 纳米类成分; 酒精性肝损伤; 保肝作用; 谷丙转氨酶; 谷草转氨酶; 碱性磷酸酶; 总胆汁酸; 超氧化物歧化酶; 丙二醛

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2021)22-6825-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.22.007

Discovery of *Vaccaria Semen Carbonisatum* nano-components and their hepatoprotective effect in mice with alcoholic liver injury

ZHAO Ya-fang¹, LI Yu-ru², CHEN Yu-min¹, ZHAO Yu-sheng¹, LUO Juan¹, ZHANG Yi-fan¹, KONG Hui¹, ZHAO Yan¹, QU Hui-hua³

1. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

3. Institute of Chinese Medicine Research, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: **Objective** Nano-components were discovered from *Vaccaria Semen Carbonisatum* (VSC) and explored their hepatoprotective effect on alcoholic liver injury in mice. **Methods** The VSC was calcinated by muffle furnace at a high temperature. By filtration, extraction and dialysis of the decoction, a new water-soluble substance was obtained and named as VSC nano-components (VSC-NCs). The VSC-NCs were characterized by using transmission electron microscopy (TEM), UV-Vis spectroscopy (UV-Vis), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), fluorescence spectroscopy, X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and other instruments and methods. According to the alcoholic liver injury model, performing hematoxylin-eosin (HE) staining on the liver and

收稿日期: 2021-06-04

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项基金资助项目 (2019-JYB-TD-001)

作者简介: 赵亚芳, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药炭药的物质基础研究。E-mail: zyf2640594023@163.com

*通信作者: 赵琰 (1973—), 女, 博士生导师, 教授, 研究方向为经典方剂的配伍与应用及中药炭药的物质基础研究。

Tel: (010)64286705 E-mail: zhaoyandr@bucm.edu.cn

屈会化 (1966—), 男, 博士生导师, 教授, 研究方向为中药炭药的物质基础研究。Tel: (010)64286705 E-mail: quhuihuadr@163.com

measuring alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), total bile acid (TBA) and the levels of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) in liver homogenate are to evaluate protective effect on liver injury of VSC-NCs. **Results** Characterization results showed that VSC-NCs were spherical, uniformly distributed in particle size between 1.20—5.10 nm, with a lattice spacing of 0.23 nm. The VSC-NCs were mainly composed by C, N, O and the surface contained carbonyl and hydroxyl groups. The animal experiment results showed that VSC-NCs significantly reduced the content of ALT, AST, TBA and ALP in mice with alcohol-induced liver injury, and significantly increased the level of SOD and reduced the level of MDA. The results indicated that VSC-NCs can improve the body's ability to scavenge oxygen free radicals and reduce the production of lipid peroxides, thereby protecting liver cells. **Conclusion** The VSC-NCs were discovered from *Vaccaria Semen Carbonisatum* for the first time and proved that they have a significant protective effect on liver damage caused by alcohol. This not only shows that VSC-NCs can be used as a potential drug for the treatment of alcoholic liver injury, but also provides a new way of thinking for the qualitative basis of traditional Chinese medicine in research.

Key words: *Vaccaria Semen Carbonisatum*; nano-components; alcoholic liver injury; hepatoprotective effect; alanine aminotransferase; aspartate aminotransferase; alkaline phosphatase; total bile acid; superoxide dismutase; malondialdehyde

酒精是仅次于高血压和吸烟造成疾病的主要危险因素之一, 根据世界卫生组织 (WHO) 报道, 全球饮酒人群数量高达 20 亿, 其中滥用酒精超过 750 万人, 据统计, 临床中有 4%~25% 的疾病与饮酒有关^[1], 长期饮酒或者短期大量饮酒会导致酒精性肝损伤, 甚者会引发脂肪肝、肝炎、肝硬化甚至肝癌^[2], 严重威胁人们的健康。酒精性肝损伤主要是乙醇及其衍生物代谢过程中直接或间接诱导的氧化应激、炎性介质和营养失衡等多种因素相互作用的结果。其中一个重要原因是酒精会导致活性氧的增加, 诱导产生氧化应激, 进而导致细胞因子失衡和免疫紊乱, 诱发脂质过氧化物产生等一系列级联反应, 进一步损伤肝细胞^[3-4]。治疗酒精性肝损伤常规药物如糖皮质激素、美它多辛, 有助于改善酒精中毒症状和行为异常, 但长期使用这些药物会加重肝脏负担, 加快病情恶化^[5]。目前临床上尚无有效方法来阻止或者逆转由于酒精造成的肝损害, 因此开发一种安全、有效的治疗药物是很有必要的。

纳米材料中的碳点是直径为 1~10 nm 类球形纳米颗粒, 具有水溶性、低毒性、良好的生物相容性等优越的性质, 被广泛应用于生物医学领域, 如生物成像^[6]、药物递送^[7]、纳米探针^[8]等。前期研究发现, 不同前体 (或制备方法不同) 所制备出的碳点在尺寸和结构上存在一定差异^[9-11], 且同一种前体制备的碳点因其表面基团的丰度不同导致其有不同的生物活性, 包括抗癌^[12]、止血^[13]、抗惊厥^[14]、抗炎^[15]、抗菌^[16]、抗氧化^[17]、降糖^[18]等。中药炭药高温炭化过程与碳点制备工艺有很大的相似性, 不同的中药制备前体、炮制温度不同, 提取分离出的碳点粒径存在差异, 可能影响生物活性, 如荆芥穗

碳点因炮制温度的不同而止血活性强弱有差异^[19], 不同温度下制备的荷叶碳点粒径大小、表面基团不同对其止血作用有影响^[20]。前期本团队进行炭药物质基础研究时发现, 炭药中有一种尺寸和元素组成类似于碳点的新物质, 将其命名为纳米类成分 (nano-components)。根据已出版文献, 中药的碳点往往具有较好的活性, 如绵马贯众碳点具有止血作用^[21]、机油高温热解人发合成的碳点具有抗炎镇痛作用^[22]、黄柏碳点可以改善银屑病样炎症^[23]。因此, 猜测纳米类成分极可能是王不留行炭药中的起效物质基础。

王不留行 *Vaccariae Semen* (VS) 为石竹科麦蓝菜属植物麦蓝菜 *Vaccaria segetalis* (Neck.) Garcke 的干燥成熟种子, 始载于《神农本草经》, 具有活血通经、下乳消肿、利尿通淋的功效。古有“逢子必炒”的说法, 且炮制方法多为清炒法, 《金匱要略》记载王不留行炮制方法为“烧灰存性”, 用于金疮的治疗, 后世乃至现在却很少用王不留行烧炭治疗金疮, 而在临床实践以及治疗肝病的专利中有关于王不留行或炒王不留行的相关应用^[24-27], 同时之前的实验数据显示无论是生王不留行^[28]亦或是炒王不留行均具有抗氧化活性, 且炮制后活性更佳^[29], 而酒精性肝损伤能够引起机体出现氧化应激损伤, 这一点已经被大量的临床及药理实验所证实。

有研究认为“烧灰”是炭药最早的炮制标准, “存性”是炭药发挥药效的物质基础^[30], 为王不留行炭用提供了依据。基于前期研究基础, 本研究从王不留行炭水溶液中发现并分离出新物质, 将其命名为王不留行炭纳米类成分 (*Vaccariae Semen Carbonisatum* nano-components, VSC-NCs)。利用低

分辨透射电镜 (transmission electron microscopy, TEM) 获取其形态大小、粒径分布及晶格间距等特征; 利用紫外光谱 (ultraviolet-visible spectroscopic spectra, UV-vis)、傅里叶变换红外光谱 (fourier transform infrared, FT-IR) 与荧光光谱 (fluorescence spectroscopy, FL) 等光学方法来分析该量子点的光学特征、表面化学基团信息; 利用 X 射线光电子能谱 (X-ray photoelectron spectroscopy, XPS) 分析获得碳量子点的表面组成和元素分析。通过建立小鼠酒精性肝损伤模型观察肝损伤生化指标、测定肝脏抗氧化能力来评价其对酒精性肝损伤的保护作用。

1 仪器与材料

1.1 仪器

TecnaiG220 透射电子显微镜 (TEM), 美国 FEI 公司; JEN-1230 高分辨透射电子显微镜 (HR-TEM), 日本电子光学实验室; CECIL 紫外分光光度计, 英国 Cambridge 公司; ESCALAB 250X 射线光电子能谱分析仪 (XPS), 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; F-4500 荧光分光光度计, 日本 Hitachi 公司; JEN-1230 傅立叶变换红外光谱仪, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; AU-480 全自动生化分析仪, 美国贝克曼库尔特有限公司。

1.2 材料

王不留行饮片, 产地河北, 批号 200502005, 经北京中医药大学赵琰教授鉴定, 为石竹科麦蓝菜属植物麦蓝菜 *V. segetalis* (Neck.) Garcke 的干燥成熟种子, 购自北京仟草中药饮片有限公司; 透析膜, 截留相对分子质量 1000, 购自北京瑞达恒辉科技发展有限公司; 无水乙醇购自北京化学试剂公司; 联苯双酯滴丸, 批号 H11020980, 规格 1.5 mg, 北京协和药厂; 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 试剂盒 (批号 20210407)、丙二醛试剂盒 (批号 20210408) 购自南京建成生物工程研究所; 生理盐水购自石家庄四药有限公司; 本实验用水均为去离子水。

1.3 动物

SPF 级雄性昆明小鼠 36 只, 体质量为 (30.0 ± 2.0) g, 购于北京斯贝福生物技术有限公司, 质量合格证书编号 SYXK (京) 2020-0033。实验期间动物均饲养于同一环境下, 保持室温 (25 ± 1) °C 左右, 空气湿度 55% ~ 65%, 环境安静, 动物随意进食水。本实验相关动物实验遵循北京中医药大学有关实验动物管理和使用的规定, 均符合 3R 原则。

2 方法与结果

2.1 VSC-NCs 的制备

称取王不留行干燥药材 350 g, 放入坩埚中, 用锡箔纸密封, 加盖放入马弗炉中烧制, 马弗炉程序升温如下: 第 1 阶段 5 min 内升温到 70 °C, 保持 30 min, 第 2 阶段 25 min 升温到 350 °C, 保持 1 h。烧制完成后, 待冷却到室温后取出, 并放入粉碎机中打成粉末。取 60 g 粉末, 加入 1800 mL 去离子水, 煎煮 3 次, 每次 1 h, 放置室温后, 先用滤纸粗滤, 再用孔径为 0.22 μm 的微孔滤膜精滤, 合并 3 次滤液, 浓缩, 然后将浓缩液透析 72 h 以上, 直至透析膜内的溶液颜色无明显变化, 将获取的 VSC-NCs 透析液放于 4 °C 保存, 待用。

2.2 VSC-NCs 的表征

TEM 观察 VSC-NCs 的外貌形态和粒径分布, HR-TEM 观察其晶格间距和超微结构, 紫外分光光度计和荧光分光光度计分析 VSC-NCs 的光学特征; 红外分光光度计分析 VSC-NCs 表面的官能团信息; XPS 分析 VSC-NCs 中所含有元素及其配位信息。

结果表明 (图 1-a) VSC-NCs 形状为类球形, 在水中具有良好的分散度。(图 1-b) 显示, 粒径分布在 1.20 ~ 5.10 nm, 主要集中在 2.50 nm 左右, HR-TEM 的结果 (图 1-c) 显示, VSC-NCs 的晶格大小分布清晰可见, 晶格间距为 0.23 nm。

VSC-NCs 的紫外吸收光谱 (图 1-d) 所示, 该纳米类成分在 200 nm 左右有微弱的紫外吸收, 这可能是由于 $\pi-\pi^*$ 跃迁所导致。VSC-NCs 的红外光谱 (图 1-e) 显示, 吸收峰分别为 3439、2921、2360、1634、1033 cm^{-1} , 分析可知 3439 cm^{-1} 峰可能为 -O-H 键, 2921 cm^{-1} 可能为 -C-H 伸缩振动峰, 2360 cm^{-1} 吸收峰可能为 -C≡N 键。1634 cm^{-1} 吸收峰可能为 -C=O 键, 1384 cm^{-1} 的强吸收可能为 -C-N 键, 1033 cm^{-1} 的吸收可能为 -C-O-C 键伸缩振动引起的, 可以得出 VSC-NCs 含有羰基、羟基等官能团。从 VSC-NCs 的荧光光谱图 (图 1-f) 中可以看出, 该纳米类成分的最大激发波长在 371 nm 左右, 最大发射波长在 460 nm 左右。以硫酸奎宁作为参照物, 计算 VSC-NCs 的荧光量子产率为 2.08%。

利用 XPS 进一步研究 VSC-NCs 的元素组成及其配位情况。如图 2-a 所示, 284.94、399.67、531.8 eV 处有明显的峰, 表明 VSC-NCs 主要由 C (65.31%)、O (30.67%) 和少量 N (4.02%) 元素组成。Cl_{1s} 谱带 (图 2-b) 显示, 284.28、285.85、

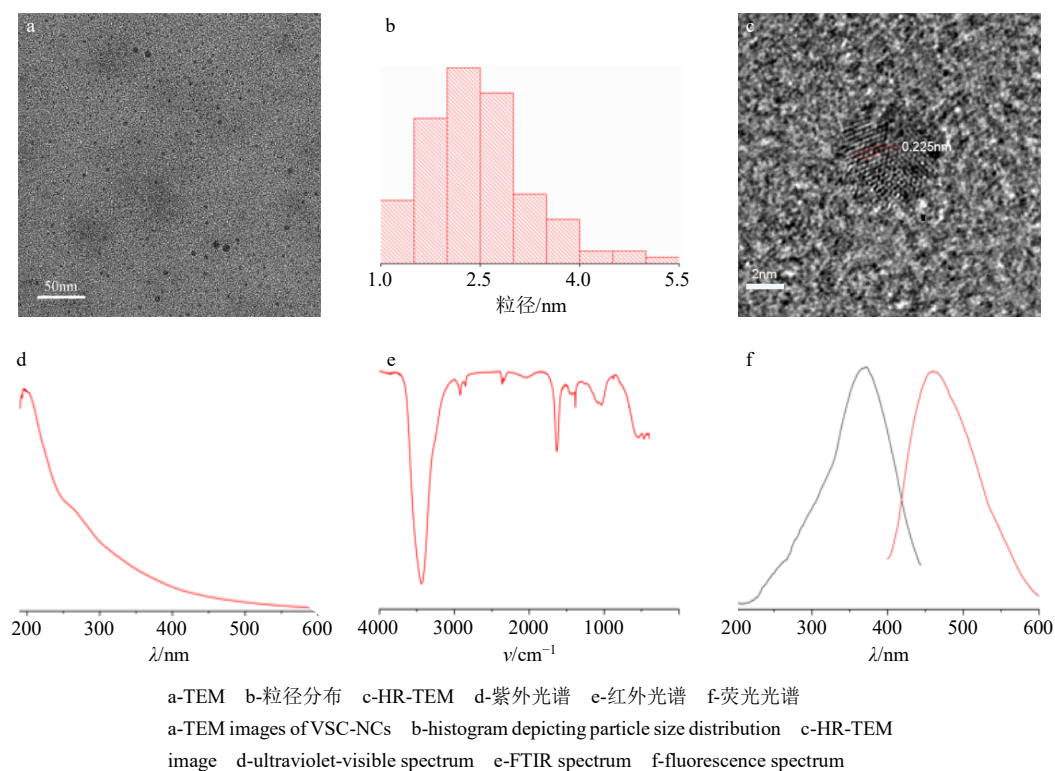


图 1 VSC-NCs 表征结果

Fig. 1 Characterization of VSC-NCs

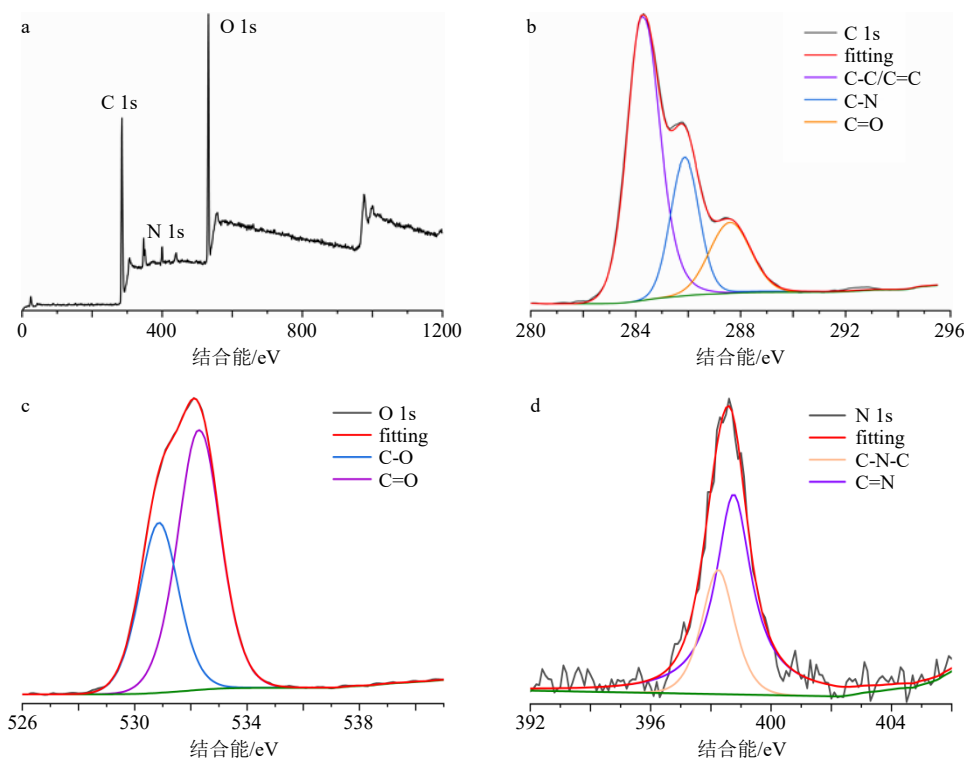


图 2 VSC-NCs 的表面基团和元素组成分析

Fig. 2 Surface composition and elemental analysis of VSC-NCs

287.61 eV 3 个峰, 分别对应于 C-C/C=C、C-N、C=O 键^[14-15,31]。O1s 谱带(图 2-c)所示, 530.83、532.28 eV 2 个峰分别对应于 C-O、C=O 键^[14-15]。N1s 谱带(图 2-d)显示, 399.24、399.75 eV 2 个峰分别对应于 C-N-C、C=N 键^[21-22]。

2.3 荧光量子产率 (fluorescence quantum yield, FQY)

以硫酸奎宁^[32]为参比物质, 计算 VSC-NCs 的 FQY^[33], 本实验测定的 FQY 为 VSC-NCs 的相对量子产率。荧光光谱扫描时激发波长 (EX) 与发射波长 (EM) 狭缝宽度均为 10 nm, 利用公式 $FQY_{NCs} = FQY_{R_{NCs}} A_R \eta_{NCs}^2 / (I_R A_{NCs} \eta_R^2)$ 进行计算, 其中 I 表示发射光谱下的峰下面积, A 表示 371 nm 时的吸光度值, η 表示溶剂的折射率, NCs 和 R 表示 VSC-NCs 和对照品。为了使重吸收效应最小化, A_R 和 A_{NCs} 应该保证在 0.05 以下。

2.4 VSC-NCs 对酒精性肝损伤保护作用研究

2.4.1 造模及给药 雄性昆明小鼠 36 只, 随机分成 6 组, 每组 6 只, 分别为对照组、模型组、阳性药 (联苯双酯滴丸, 用时将滴丸研成细粉后配制成质量浓度为 15 mg/mL 的水溶液) 组和 VSC-NCs 高、中、低剂量 (5.00、2.50、1.25 mg/kg) 组。高、中、低剂量组分别给予相对应质量浓度的 VSC-NCs, 阳性药组给予联苯双酯, 剂量为 150 mg/kg, 给药体积均为 0.01 mL/g, 给药 1 h 后, 除对照组给予去离子水外, 其余各组按体质量 0.01 mL/g 剂量 ig 50% 酒精溶液, 以上所有操作每天进行 1 次, 连续给药 21

d 后取材, 实验前 12 h 禁食不禁水, 小鼠眼眶取血后, 立即摘取肝组织, 放入 -80 °C 冰箱备用。

2.4.2 肝脏组织病理切片观察 小鼠处死后, 取肝左叶同一部位组织块, 立即置入 4% 多聚甲醛中固定留待病理检测, 乙醇梯度脱水后进行石蜡包埋与 HE 染色, 于光学显微镜下观察肝脏组织学特点。各组肝脏组织病理形态的结果如图 3 所示, 对照组小鼠肝小叶结构完整, 肝索排列规则, 肝组织结构正常, 肝细胞排列整齐、结构清晰, 无炎性细胞, 未出现变形和坏死; 酒精模型组小鼠肝小叶结构模糊, 排列紊乱, 肝组织结构、肝细胞排列紊乱, 中心区域周围有明显大小不一的脂肪变性和炎细胞浸润; VSC-NCs 中剂量组小鼠肝组织结构、肝细胞排列较整齐, 肝组织内炎性细胞、脂肪滴空泡较模型组有很大减轻; VSC-NCs 高、低剂量组小鼠肝组织结构相对清晰, 肝细胞排列相对整齐, 炎性细胞、脂肪滴空泡较模型组显著减轻。病理切片结果表明, VSC-NCs 高、中、低剂量组均可以一定程度上减轻酒精造成的肝损伤。

2.4.3 血清中生化指标检测 眼眶取血后, 全血在室温下静置 2 h, 离心 (3000 r/min、15 min), 取血清, 测定血清中谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)、总胆汁酸 (total bile acid, TBA) 的含量。VSC-NCs 对酒精性肝损伤小鼠血清肝功指标的影响如表 1 所示, 与对照组小鼠相比, 酒精干

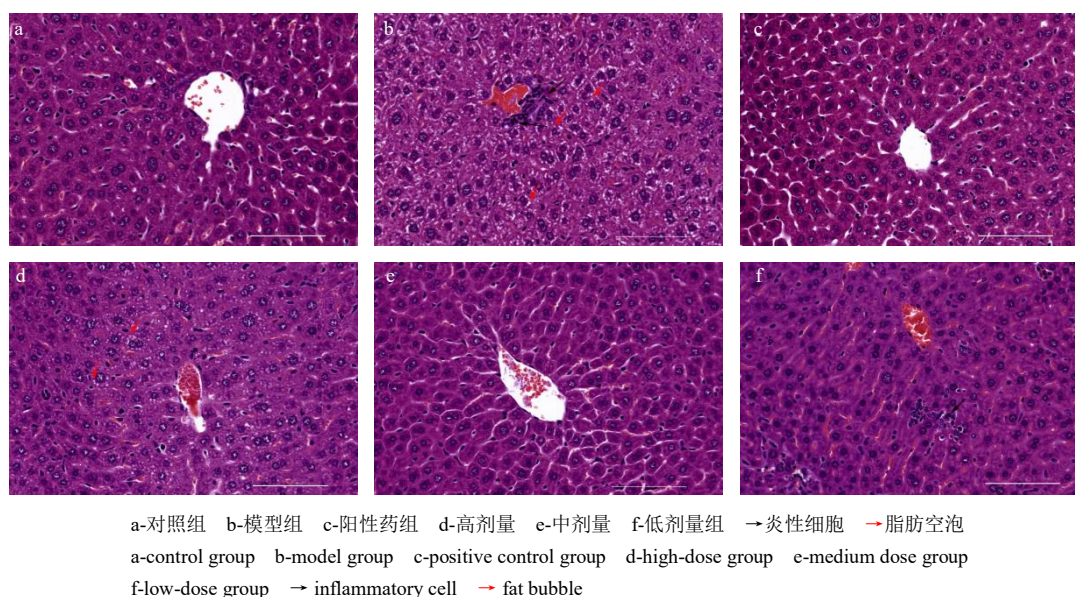


图 3 VSC-NCs 各组小鼠肝组织染色结果 (×400)

Fig. 3 Staining results of liver tissue of mice in each group of VSC-NCs (×400)

表 1 VSC-NCs 对酒精性肝损伤小鼠血清 ALT、AST、ALP、TBA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 1 Effects on ALT, AST, ALP and TBA levels in serum of mice with ethanol-induced liver injury ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	ALP/(U·L ⁻¹)	TBA/(U·L ⁻¹)
对照	—	21.67±2.8	104.68±6.83	170.70±12.28	2.15±0.29
模型	—	49.00±3.9 ^{##}	123.52±6.83 ^{##}	212.07±28.97 ^{##}	4.92±0.66 ^{##}
阳性药	150	36.83±4.92 ^{**}	108.82±5.71 ^{**}	183.45±26.86 [*]	2.38±0.45 ^{**}
VSC-NCs	5.00	35.50±5.68 ^{**}	105.73±13.23 ^{**}	179.77±25.12 [*]	3.23±0.74 ^{**}
	2.50	35.40±2.07 ^{**}	104.02±9.85 ^{**}	145.67±20.37 ^{**}	2.22±0.36 ^{**}
	1.25	40.33±3.56 ^{**}	107.15±9.47 ^{**}	165.13±18.18 ^{**}	2.38±0.23 ^{**}

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$, 表 2 同^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group, same as table 2

预 21 d 后模型组小鼠血清 ALT、AST、ALP、TBA 含量均极显著性升高 ($P < 0.01$), 表明酒精性肝损伤小鼠模型构建成功。与模型组小鼠相比, 阳性药组和 VSC-NCs 高、中、低剂量组能极显著性的降低模型小鼠血清中 ALT、AST、TBA 水平 ($P < 0.01$); 阳性药组和 VSC-NCs 高、中、低剂量组对 ALP 水平的降低也有一定的作用, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05, 0.01$)。结果表明, VSC-NCs 能够减轻酒精诱导的肝损伤, 有较好的肝保护作用, 其中中剂量效果最好。

2.4.4 抗氧化水平的研究 剪取肝组织, 用 0.9%氯化钠溶液漂洗, 滤纸吸干表面水分, 置于 10 mL 的离心管中, 加入 9 倍 0.9%氯化钠溶液 (肝组织质量与 0.9%生理盐水溶液体积比为 1:9), 用匀浆机打碎, 离心 (3000 r/min, 15 min), 取上清液, 按照试剂盒说明测定肝匀浆中 SOD 和丙二醛的含量, 统计实验数据并分析实验结果。

氧化应激是酒精性肝损伤发生发展的重要机制之一, 通过进一步测定 SOD 和丙二醛的水平来评价 VSC-NCs 抗氧化能力。各组肝组织中 SOD 和丙二醛水平的比较如表 2 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠肝组织中 SOD 的水平极显著性降低 ($P < 0.01$), 丙二醛含量极显著性升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, VSC-NCs 高、中、低剂量组、阳性药组肝组织中 SOD 水平极显著性升高 ($P < 0.01$), 丙二醛含量极显著性降低 ($P < 0.01$), 结果表明, VSC-NCs 能显著性地提高酒精性肝损伤小鼠肝脏中 SOD 水平, 降低丙二醛的含量, 具有很好的抗氧化能力。

2.4.5 统计方法 采用 SPSS 20.0 统计软件分析, 所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计学处理采用方差分析。单因素 ANOVA 分析方法用于实验数据服从

表 2 VSC-NCs 对酒精性肝损伤小鼠肝脏中 SOD 和丙二醛水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 2 Effects on SOD and malonic dialdehyde levels in liver tissue of mice with ethanol-induced liver injury ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)	丙二醛/(nmol·mg ⁻¹)
对照	—	407.39±30.46	1.27±0.33
模型	—	172.17±15.09 ^{##}	11.24±0.60 ^{##}
阳性药	150	335.61±14.61 ^{**}	2.30±0.35 ^{**}
DSC-NCs	5.00	249.24±31.15 ^{**}	9.57±0.21 ^{**}
	2.50	312.91±34.79 ^{**}	4.12±0.24 ^{**}
	1.25	300.24±30.78 ^{**}	7.09±0.48 ^{**}

正态分布, 同时方差齐, 组间差异则运用 LSD 方法统计。

3 讨论

王不留行作为一种传统中药, 有着悠久的历史, 现代研究主要从原始植物中所含刺桐碱、黄酮苷等小分子来解释它的抗炎^[34]、保肝^[35]的生物活性。科研人员发现银纳米粒子尺寸对抗菌活性有一定影响^[36], 同时关于纳米粒子尺寸、结构对生物活性的影响也引起了业内深入探讨^[37-38], 而中药炭药因其制备方法不同, 其粒径尺寸和官能团的不同, 也会导致其生物活性的多样性, 如黄柏炭制备的纳米颗粒不仅可以改善银屑病样炎症^[23], 也可以保护尖吻蝮蛇毒导致的急性肾损伤^[39]。

本实验从纳米材料角度出发, 首次从王不留行炭中发现纳米类成分, 通过建立酒精性肝损伤的模型来评价 VSC-NCs 对酒精性肝损伤的保护作用, 通过 TEM 鉴定为 VSC-NCs。紫外光谱和荧光光谱结果显示 VSC-NCs 有荧光现象, QY 为 2.08%, FT-IR 和 XPS 显示 VSC-NCs 发现其主要由 C、O、N 3

种元素组成, 含有 $-C\equiv N$ 键、 $-C=O$ 键、 $-C-N$ 键和 $-C-O-C$ 键, 同时表面官能团丰富, 如羰基、羟基等官能团, 本研究中 VSC-NCs 丰富的官能团可能有利于增加生物活性。

实验结果^[40]表明酒精性肝损伤模型中动物血清 ALT、AST、ALP 活性升高及 TBA 含量增加, 病理组织分析显示肝组织结构破坏明显, 甚至有肝细胞坏死。血清 ALT、AST 活性高低可以间接反映肝损伤程度, 是目前最常用的肝功能生化指标。ALT 主要存在于肝细胞浆内, AST 主要存在于肝细胞线粒体内, 当肝细胞破坏、细胞膜通透性增强时, 血清 ALT 活性升高, AST 活性增强^[41-42]。实验结果表明, 不同浓度的 VSC-NCs 干预能够显著降低小鼠血清 ALT 和 AST 的水平 ($P<0.05$), 推测 VSC-NCs 能够减少肝细胞以及肝细胞线粒体的破坏, 恢复细胞膜的通透性使血清 ALT 和 AST 含量减少, 从而保护肝细胞。ALP 是胆汁淤积的重要指标, 当胆汁的生成或排出障碍时会损伤肝细胞^[43], 可评估肝损伤的严重程度。胆汁酸浓度的升高可促进 ALP 合成, 无论肝内或者肝外胆道阻滞时, 都会导致 ALP 含量升高^[44]。TBA 也是反应肝损伤的重要指标, 且对肝损伤比较敏感。健康人 TBA 的含量极微, 当肝细胞发生病变或患胆管疾病时可引起胆汁的代谢障碍, 使进入血中的胆汁酸含量显著升高^[45], 在胆汁淤积的情况下, 肝脏的抗氧化能力下降, 有研究表明胆汁酸可通过破坏线粒体的呼吸功能产生过量的活性氧直接造成肝细胞的氧化损伤^[46], 而肝脏氧化应激损伤在胆汁淤积的状态下加重, 氧化应激损伤是肝内胆汁淤积的重要病理损伤环节^[47]。本研究结果发现, 在酒精诱导后血清中 ALP 和 TBA 的含量显著增加, 而在给药后发现 ALP 和 TBA 的含量显著降低, 推测在酒精诱导下肝细胞受损造成肝内胆汁淤积以致肝损伤, VSC-NCs 可能通过抗氧化应激保护肝细胞从而减轻胆汁淤积所造成的肝损伤。

肝脏是乙醇主要的代谢场所之一, 肝细胞代谢乙醇时产生大量活性氧, 氧化应激水平增高, SOD 的消耗增加, 造成脂质过氧化, 引起肝损伤^[48]。SOD 活力的高低反映了机体清除氧自由基的能力, 丙二醛是生物体脂质过氧化的标志物, 也是终级脂质过氧化物, 能间接反映机体细胞受氧自由基攻击的严重程度, 华宝玉等^[5]和魏芳等^[49]发现经过药物治疗后, 肝组织中 SOD 水平升高、丙二醛水平降低, 氧化应激反应降低, 肝损伤程度减轻。本研究给药组

小鼠 SOD 的活力显著提高, 而丙二醛的水平则显著下降, 说明 VSC-NCs 通过抗氧化应激的作用改善肝损伤。

综上, 本研究利用高温热解法成功制备并分离出了 VSC-NCs, 而且发现 VSC-NCs 能够通过抗氧化发挥对酒精性肝损伤保护作用, 未来可能成为一种绿色、安全的治疗酒精性肝损伤的潜在药物。本研究为中药治疗酒精性肝损伤的临床应用提供了实验依据, 为中药, 尤其是炭药的相关研究提供了一种全新的思维方式。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Rehm J, Mathers C, Popova S, *et al.* Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders [J]. *Lancet*, 2009, 373(9682): 2223-2233.
- [2] 张红阳, 李雪激, 姚雪莲, 等. 肝损伤的分子机制及其中药药理研究进展 [J]. *中药新药与临床药理*, 2016, 27(3): 448-455.
- [3] 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.
- [4] Albano E. Free radical mechanisms in immune reactions associated with alcoholic liver disease [J]. *Free Radic Biol Med*, 2002, 32(2): 110-114.
- [5] 华宝玉, 陈津, 汪永夫, 等. 凤柜斗草醇提取物对小鼠酒精性肝损伤的保护作用 [J]. *龙岩学院学报*, 2021, 39(2): 61-65.
- [6] Zhao S, Lan M, Zhu X, *et al.* Green synthesis of bifunctional fluorescent carbon dots from garlic for cellular imaging and free radical scavenging [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7(31): 17054-17060.
- [7] Feng T, Ai X, An G, *et al.* Charge-convertible carbon dots for imaging-guided drug delivery with enhanced *in vivo* cancer therapeutic efficiency [J]. *ACS Nano*, 2016, 10(4): 4410-4420.
- [8] Zhang J L, Zhao X W, Xian M, *et al.* Folic acid-conjugated green luminescent carbon dots as a nanoprobe for identifying folate receptor-positive cancer cells [J]. *Talanta*, 2018, 183: 39-47.
- [9] Li Y, Bi J R, Liu S, *et al.* Presence and formation of fluorescence carbon dots in a grilled hamburger [J]. *Food Funct*, 2017, 8(7): 2558-2565.
- [10] Veltri F, Alessandro F, Scarcello A, *et al.* Porous carbon materials obtained by the hydrothermal carbonization of orange juice [J]. *Nanomaterials*, 2020, 10(4): E655.
- [11] Sahu S, Behera B, Maiti T K, *et al.* Simple one-step

- synthesis of highly luminescent carbon dots from orange juice: Application as excellent bio-imaging agents [J]. *Chem Commun*, 2012, 48(70): 8835-8837.
- [12] Vasanth K, Ilango K, MohanKumar R, *et al*. Anticancer activity of *Moringa oleifera* mediated silver nanoparticles on human cervical carcinoma cells by apoptosis induction [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2014, 117: 354-359.
- [13] Yan X, Zhao Y, Luo J, *et al*. Hemostatic bioactivity of novel *Pollen Typhae Carbonisata*-derived carbon quantum dots [J]. *J Nanobiotechnology*, 2017, 15(1): 60.
- [14] Zhang M L, Cheng J J, Zhang Y, *et al*. Green synthesis of *Zingiberis Rhizoma*-based carbon dots attenuates chemical and thermal stimulus pain in mice [J]. *Nanomed Lond Engl*, 2020, 15(9): 851-869.
- [15] Wang X K, Zhang Y, Kong H, *et al*. Novel mulberry silkworm cocoon-derived carbon dots and their anti-inflammatory properties [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2020, 48(1): 68-76.
- [16] Yang J J, Zhang X D, Ma Y H, *et al*. Carbon dot-based platform for simultaneous bacterial distinguishment and antibacterial applications [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8(47): 32170-32181.
- [17] Wei X J, Li L, Liu J L, *et al*. Green synthesis of fluorescent carbon dots from *Gynostemma* for bioimaging and antioxidant in zebrafish [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11(10): 9832-9840.
- [18] Sun Z W, Lu F, Cheng J J, *et al*. Hypoglycemic bioactivity of novel eco-friendly carbon dots derived from traditional Chinese medicine [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2018, 14(12): 2146-2155.
- [19] 张美龄. 荆芥炭止血物质基础及其作用机制的研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- [20] 罗娟, 赵琰, 成金俊, 等. 荷叶炭纳米颗粒的发现及其止血作用的研究 [J]. *西北药学杂志*, 2019, 34(4): 499-504.
- [21] 熊威, 赵琰, 成金俊, 等. 绵马贯众炭中新型碳点的发现及其止血作用研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(6): 1388-1394.
- [22] 赵玉升, 侯婷婷, 赵金莉, 等. 以机油为分散剂高温热解人发合成新型碳点及其生物效应研究 [J]. *中草药*, 2020, 51(14): 3663-3669.
- [23] Zhang M L, Cheng J J, Hu J, *et al*. Green *Phellodendri Chinensis Cortex*-based carbon dots for ameliorating imiquimod-induced psoriasis-like inflammation in mice [J]. *J Nanobiotechnology*, 2021, 19(1): 105.
- [24] 肖利平. 治疗肝炎、肝硬化、肝坏死中药冲剂: 中国, CN1043458C [P]. 1999-05-26.
- [25] 耿全好. 一种可以修复损伤的肝细胞的药物: 中国, CN108371702A [P]. 2018-08-07.
- [26] 李绍华. 一种治疗肝炎和肝硬化的药物组合物: 中国, CN103736022A [P]. 2014-04-23.
- [27] 黎俊民, 李敏峰. 加味荣肝汤治疗慢性乙型肝炎肝纤维化 50 例 [J]. *中医杂志*, 2009, 50(9): 815-816.
- [28] Yuan X H, Fu L N, Gu C B, *et al*. Microwave-assisted extraction and antioxidant activity of vaccarin from the seeds of *Vaccaria segetalis* [J]. *Sep Purif Technol*, 2014, 133: 91-98.
- [29] 李翠芹, 王喆之, 张丽燕. 生、炒王不留行抗氧化活性的比较研究 [J]. *中药材*, 2008, 31(6): 820-822.
- [30] 刘晓曼. 从黄柏炭止血作用及其机制研究探讨“炒炭止血”与“烧灰存性” [D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- [31] Han Y W, Chen Y, Wang N, *et al*. Magnesium doped carbon quantum dots synthesized by mechanical ball milling and displayed Fe³⁺ sensing [J]. *Mater Technol*, 2019, 34(6): 336-342.
- [32] Yang L, Jiang W H, Qiu L P, *et al*. One pot synthesis of highly luminescent polyethylene glycol anchored carbon dots functionalized with a nuclear localization signal peptide for cell nucleus imaging [J]. *Nanoscale*, 2015, 7(14): 6104-6113.
- [33] Ding C P, Cao X, Zhang C L, *et al*. Rare earth ions enhanced near infrared fluorescence of Ag₂S quantum dots for the detection of fluoride ions in living cells [J]. *Nanoscale*, 2017, 9(37): 14031-14038.
- [34] 蔡维维, 侯豹, 陈旭红, 等. 王不留行中刺桐碱的分离鉴定及抗炎活性研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2018, 30(4): 616-620.
- [35] 雷月月. 王不留行黄酮苷改善肝脏糖脂代谢紊乱的作用及其机制研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2019.
- [36] Bruna T, Maldonado-Bravo F, Jara P, *et al*. Silver nanoparticles and their antibacterial applications [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(13).
- [37] Yaqoob A A, Umar K, Ibrahim M N M. Silver nanoparticles: Various methods of synthesis, size affecting factors and their potential applications-a review [J]. *Appl Nanosci*, 2020, 10(5): 1369-1378.
- [38] Jo D H, Kim J H, Lee T G, *et al*. Size, surface charge, and shape determine therapeutic effects of nanoparticles on brain and retinal diseases [J]. *Nanomed: Nanotechnol Biol Med*, 2015, 11(7): 1603-1611.
- [39] Zhang M L, Cheng J J, Sun Z W, *et al*. Protective effects of carbon dots derived from *Phellodendri Chinensis Cortex Carbonisata* against deinagkistrodon acutus venom-induced acute kidney injury [J]. *Nanoscale Res Lett*, 2019, 14(1): 377.
- [40] 叶木荣, 长尾由纪子, 李楚源, 等. 消炎利胆片防治大

- 鼠急性肝损伤的实验研究 [J]. 中成药, 2006, 28(11): 1616-1619.
- [41] 谷大为, 陈志敏, 周明, 等. 果蔬发酵液对小鼠酒精性肝损伤的保护作用及氧化应激机制 [J]. 营养学报, 2015, 37(4): 366-371.
- [42] 牛佳卉, 袁静, 张慧芳, 等. 王浆酸对小鼠酒精性肝损伤的保护作用 [J]. 食品工业科技, 2020, 41(3): 291-296.
- [43] Kusters A, Karpen S J. The role of inflammation in cholestasis: Clinical and basic aspects [J]. *Semin Liver Dis*, 2010, 30(2): 186-194.
- [44] 朱维平, 张民, 李玮. 现代肝脏病诊疗学 [M]. 天津: 天津科学技术出版社, 2010.
- [45] 张成顺. 总胆汁酸与血清酶联合检测在肝损害诊断中的临床应用 [J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(8): 1376-1377.
- [46] Yerushalmi B, Dahl R, Devereaux M W, *et al.* Bile acid-induced rat hepatocyte apoptosis is inhibited by antioxidants and blockers of the mitochondrial permeability transition [J]. *Hepatology*, 2001, 33(3): 616-626.
- [47] 曾惠芬, 戴卫波, 欧焕娇. 素馨护肝方对 ANIT 诱导的大鼠胆汁淤积肝损伤的保护作用 [J]. 海南医学, 2019, 30(13): 1633-1638.
- [48] Louvet A, Mathurin P. Alcoholic liver disease: Mechanisms of injury and targeted treatment [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2015, 12(4): 231-242.
- [49] 魏芳, 许瑞杰, 蔡诗怡, 等. 石榴多酚对小鼠急性酒精性肝损伤的保护作用 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(14): 2721-2725.

[责任编辑 郑礼胜]