

## 牛膝炭纳米类成分对酒精性肝病小鼠的保护作用及机制研究

何晨昕<sup>1</sup>, 黄燕<sup>1#</sup>, 郭颖慧<sup>2</sup>, 马金玉<sup>1</sup>, 陆姿璇<sup>1</sup>, 金碧琳<sup>1</sup>, 王思琪<sup>1</sup>, 夏敏隆<sup>1</sup>, 孔慧<sup>3</sup>, 屈会化<sup>3\*</sup>, 赵琰<sup>1\*</sup>

1. 北京中医药大学中医学院, 北京 100029
2. 湖北省中医院, 湖北 武汉 430061
3. 北京中医药大学 北京中医药研究院, 北京 100029

**摘要:** 目的 探究牛膝炭纳米类成分 (*Achyranthis Bidentatae Radix Carbonisatum* nano-components, ABRC-NCs) 对酒精性肝病 (alcoholic liver disease, ALD) 的保护作用及潜在机制。方法 从牛膝炭中提取分离出 ABRC-NCs, 通过 CCK-8 实验评估其安全性, 利用纳米材料表征方法分析其形态结构、光学性质和官能团性质等。将 36 只雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组、模型组、联苯双酯 (450 mg/kg) 组及 ABRC-NCs 高、中、低剂量 (5.00、2.50、1.25 mg/kg) 组, 每组 6 只, 连续给药 6 d。末次给药 2 h 后 ig 50%乙醇溶液造模, 每 12 小时 ig 1 次, 连续 2 次, 构建急性 ALD 小鼠模型。造模结束后观察肝组织形态及病理变化; 检测血清中丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 活性及肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-1 $\beta$ 、IL-10 水平; 检测肝组织中超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性及丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、三酰甘油 (triglyceride, TG) 水平; 采用免疫组化法检测肝组织核因子 E2 相关因子 (nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2)、血红素氧合酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 蛋白表达。结果 3.91~1 000.00  $\mu\text{g/mL}$  的 ABRC-NCs 对 RAW264.7 细胞无毒性作用。ABRC-NCs 为近球形结构, 表面含有丰富的官能团。体内实验结果表明, ABRC-NCs 可减轻 ALD 小鼠肝组织损伤, 显著降低血清中 ALT、AST 活性及促炎因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  水平 ( $P < 0.01$ ), 升高抗炎因子 IL-10 水平 ( $P < 0.01$ ), 提高肝组织抗氧化酶 SOD 活性及 GSH 水平 ( $P < 0.01$ ), 下调肝组织 MDA 和 TG 水平 ( $P < 0.01$ ), 同时上调肝组织 Nrf2、HO-1 蛋白表达 ( $P < 0.05$ 、0.01)。结论 ABRC-NCs 可能通过抑制炎症反应、减轻氧化应激损伤, 对急性 ALD 发挥保护作用, 为牛膝炭的临床应用及 ALD 的临床治疗提供新思路。

**关键词:** 牛膝炭; 纳米类成分; 酒精性肝病; 炎症反应; 氧化应激

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)19-7079-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.19.019

## Protective effect and mechanism of *Achyranthis Bidentatae Radix Carbonisatum* nano-components on mice with alcoholic liver disease

HE Chenxin<sup>1</sup>, HUANG Yan<sup>1</sup>, GUO Yinghui<sup>2</sup>, MA Jinyu<sup>1</sup>, LU Zixuan<sup>1</sup>, JIN Bilin<sup>1</sup>, WANG Siqi<sup>1</sup>, XIA Minlong<sup>1</sup>, KONG Hui<sup>3</sup>, QU Huihua<sup>3</sup>, ZHAO Yan<sup>1</sup>

1. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China
2. Hubei Provincial Traditional Chinese Medicine Hospital, Wuhan 430061, China
3. Beijing Institute of Chinese Medicine Research, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

**Abstract: Objective** To explore the protective effect and potential mechanism of *Achyranthis Bidentatae Radix Carbonisatum* nano-components (ABRC-NCs) on alcoholic liver disease (ALD). **Methods** ABRC-NCs were extracted from *Achyranthis Bidentatae Radix Carbonisatum* and their safety was evaluated by CCK-8 test; The morphological structure, optical properties and functional group properties were analyzed by characterization method of nanomaterials. A total of 36 male C57BL/6J mice were randomly divided

收稿日期: 2025-06-11

基金项目: 中央高校基本科研业务费 (90011451310098, 2024-JYB-JBZD-040, 2024-JYB-JBZD-023, 2024-JYB-JBZD-045)

作者简介: 何晨昕, 硕士研究生, 研究方向为经典方药的现代应用的基础研究。E-mail: 20230931040@bucm.edu.cn

#共同第一作者: 黄燕, 硕士研究生, 研究方向为经典方药的现代应用的基础研究。E-mail: 13075914937@163.com

\*通信作者: 赵琰, 博士生导师, 教授, 从事经典方药现代应用的基础研究。E-mail: zhaoyandr@163.com

屈会化, 博士生导师, 研究员, 从事经典方药的现代应用的基础研究。E-mail: quhuihuadr@163.com

into control group, model group, bifendate (450 mg/kg) group, ABRC-NCs high-, medium- and low-dose (5.00, 2.50, 1.25 mg/kg) groups, with six mice in each group, mice were administered with drugs for 6 d. An acute ALD mouse model was established by gavage of 50% ethanol solution 2 h after the last administration, with gavage every 12 h for 2 consecutive times. The morphology and pathological changes of liver tissue were observed after modeling. The activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) as well as the levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), IL-1 $\beta$  and IL-10 in serum were detected; The activity of superoxide dismutase (SOD) and the levels of malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), triglycerides (TG) in liver tissue were detected; Immunohistochemistry was used to detect the protein expressions of nuclear factor E2 related factor 2 (Nrf2) and heme oxygenase-1 (HO-1) in liver tissue. **Results** ABRC-NCs at concentrations of 3.91—1 000.00  $\mu\text{g/mL}$  had no toxic effect on RAW264.7 cells. ABRC-NCs had a nearly spherical structure with abundant functional groups on their surface. The *in vivo* experimental results showed that ABRC-NCs could alleviate liver tissue damage in ALD mice, significantly reduce activities of ALT, AST and levels of pro-inflammatory factors TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  in serum ( $P < 0.01$ ), increase anti-inflammatory factor IL-10 level ( $P < 0.01$ ), increase antioxidant enzyme SOD activity and GSH level in liver tissue ( $P < 0.01$ ), down-regulate levels of MDA and TG in liver tissue ( $P < 0.01$ ), and up-regulate Nrf2 and HO-1 protein expressions in liver tissue ( $P < 0.05, 0.01$ ). **Conclusion** ABRC-NCs may exert a protective effect on acute ALD by inhibiting inflammatory response and reducing oxidative stress damage, providing new ideas for the clinical application of *Achyranthis Bidentatae Radix Carbonisatum* and the clinical treatment of ALD.

**Key words:** *Achyranthis Bidentatae Radix Carbonisatum*; nano-components; alcoholic liver disease; inflammatory response; oxidative stress

酒精性肝病 (alcoholic liver disease, ALD) 是由长期过量饮酒引发的肝脏病变, 涵盖脂肪肝、酒精性肝炎及肝硬化等阶段<sup>[1]</sup>。ALD 在全球范围内发病率与致死率高, 尤其在青年人群中呈快速上升趋势, 已成为欧美地区肝移植的首要诱因<sup>[2]</sup>。在中国, 独特的饮酒文化导致 ALD 患病率持续升高<sup>[3]</sup>, 使其成为公共卫生领域的重大挑战。目前, ALD 的治疗策略集中于行为矫正、药物干预 (如调血脂药物、抗内毒素制剂、多烯磷脂酰胆碱等) 及营养支持<sup>[1]</sup>, 然而现有的药物治疗常伴随显著的不良反应, 因此开发安全高效的新型治疗药物是临床的迫切需求。

中医药以其药性温和、不良反应小且适合长期干预的特点, 在 ALD 的治疗中展现出独特潜力。研究表明, 中医药可通过调节肠道菌群<sup>[4]</sup>、调控炎症通路<sup>[5]</sup>及缓解氧化应激<sup>[6]</sup>等改善 ALD 病理进程。历代医籍虽无“酒精性肝病”之专名, 然其相关症状在“伤酒”“酒癖”“积聚”等范畴<sup>[7]</sup>已有系统论述, 为现代中医药防治 ALD 提供了深厚的理论基础。牛膝 *Achyranthis Bidentatae Radix* 首载于《神农本草经》, 其“逐血气伤”<sup>[8]</sup>的功效与 ALD 中瘀血阻滞所致的黄疸、蜘蛛痣高度契合。《本草纲目》言其能“益肝肾, 强筋骨”<sup>[9]</sup>, 可用于改善酒精所致的肝肾亏虚证, 如纳差、乏力、消瘦等症状, 且牛膝的引经特性可引导药物直达病所。现代药理学研究证实, 牛膝可通过抑制肝星状细胞活化改善四氯化碳诱导的小鼠肝损伤与肝纤维化<sup>[10]</sup>, 并可通过减轻氧化应激、调节肠道菌群及改善线粒体功能, 对急性

肝损伤发挥保护作用<sup>[11]</sup>。牛膝炭 *Achyranthis Bidentatae Radix Carbonisatum* 是牛膝经炮制而成的炭药, 《未刻本叶氏医案》记载其用于肝肾阴亏、虚热内扰之证 (症见气浮肤热、脉数腹胀等), 取其收敛止血、引热下行之效<sup>[12]</sup>。

炭药是经高温炭化处理的一类特色中药<sup>[13]</sup>。课题组前期研究发现, 中药炮制过程中会产生一种具有丰富生物活性的物质, 因其独特的纳米尺寸和表面丰富的官能团, 将其命名为炭药纳米类成分<sup>[14-15]</sup>, 该成分被认为是炭药发挥药效的关键物质基础, 已被证实具有止血<sup>[16]</sup>、抗炎<sup>[17]</sup>、抗溃疡<sup>[18]</sup>等多种生物活性, 在生物医学领域具有广阔的应用前景<sup>[19]</sup>。然而牛膝炭纳米类成分 (*Achyranthis Bidentatae Radix Carbonisatum* nano-components, ABRC-NCs) 对 ALD 的作用及物质基础尚未见报道。基于此, 本研究从牛膝炭中提取分离出纳米类成分, 建立 ALD 小鼠模型, 探究 ABRC-NCs 的肝保护作用及作用机制, 以期为 ALD 提供新的治疗手段。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 36 只, 体质量 (22.0 $\pm$ 2.0) g, 购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 动物生产许可证号 SCXK (京) 2019-0010。动物饲养于北京中医药大学良乡校区动物饲养中心, 室温 (24.0 $\pm$ 1.0)  $^{\circ}\text{C}$ , 相对湿度 55%~65%, 12 h 明暗交替, 通风良好, 饲养期间自由进食饮水。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,符合 3R 原则,动物伦理批准号为 BUCM-4-2021093001-3096。

## 1.2 细胞

小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 购自国家实验细胞资源共享平台(北京总部)。

## 1.3 药材

怀牛膝饮片(批号 24083102)购自北京仟草中药饮片有限公司,经北京中医药大学赵琰教授鉴定为苋科植物牛膝 *Achyranthes bidentata* Bl. 的干燥根,符合《中国药典》2020 年版规定。

## 1.4 药品与试剂

联苯双酯滴丸(批号 230301,国药准字 H11020980)购自北京协和药厂有限公司;无水乙醇(批号 10009218)购自国药集团化学试剂有限公司;透析膜(截留相对分子质量为  $1 \times 10^3$ ,批号 HF132640-1m)购自北京瑞达恒辉科技发展有限公司;DMEM 培养基(批号 11320033)购自赛默飞世尔生物化学制品有限公司;胎牛血清(批号 35-180-CV)购自美国 CORNING 公司;CCK-8 试剂盒(批号 BN15201)、BCA 蛋白定量检测试剂盒(批号 ZJ101L)购自北京拜尔迪生物技术有限公司;丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)试剂盒(批号 C009-1-1)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)试剂盒(批号 C010-2-1)、三酰甘油(triglyceride, TG)试剂盒(批号 F001-1-1)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒(批号 A003-1-2)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(批号 A001-3-2)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)试剂盒(批号 A006-2-1)购自南京建成生物工程研究所有限公司;肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) ELISA 试剂盒(批号 KT2132-A)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6) ELISA 试剂盒(批号 KT2163-A)、IL-1 $\beta$  ELISA 试剂盒(批号 KT2040-A)、IL-10 ELISA 试剂盒(批号 KT2176-A)购自江苏科特生物科技有限公司;核因子 E2 相关因子(nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2)抗体(批号 16396-1-AP)、血红素氧合酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)抗体(批号 10701-1-AP)、山羊抗兔二抗(批号 RGAR011)购自美国 Proteintech Group 公司。

## 1.5 仪器

PXR-9 型马弗炉(北京中科奥博科技有限公司);PFT-100A 型高速万能粉碎机(温岭市林大机

械有限公司);R-1001VN 小型旋转蒸发仪(郑州长城科工贸有限公司);Biotek 酶标仪(美国伯腾仪器有限公司);Tecnai G2 20 型低分辨率透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM, 美国 FEI 公司);JEN-1230 型高分辨率透射电子显微镜(high-resolution transmission electron microscope, HRTEM, 日本电子光学实验室);D8 型 X-射线衍射仪(X-ray diffractometer, XRD, 德国 Bruker AXS 公司);JEN-1230 型傅立叶转换红外光谱仪(Fourier transform infrared spectrometer, FTIR)、Escalab 250Xi 型 X 射线光电子能谱(X-ray photoelectron spectroscopy, XPS, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司);CECIL 紫外-可见分光光度计(ultraviolet-visible spectrophotometer, UV-Vis, 英国 Cambridge 公司);F-4500 型荧光分光光度计(fluorospectrophotometer, FL, 日本 Hitachi 公司);EOS90D 型佳能高清数码相机[佳能(中国)有限公司]。

## 2 方法

### 2.1 ABRC-NCs 的制备

称取适量怀牛膝饮片置于坩埚中,锡纸密封后加盖放置于马弗炉中进行程序性高温炭化。根据课题组前期对炭类中药的炭化条件优化<sup>[20]</sup>,马弗炉烧制条件设置为:第 1 阶段为于 5 min 内升温至 70 °C,恒温保持 30 min;第 2 阶段为 25 min 快速升温到 400 °C 烧制 1 h。马弗炉烧制后将牛膝炭粉碎,称取 60 g 炭粉置烧杯内,加入 1 800 mL 去离子水混合,于恒温水浴锅中 100 °C 提取 3 次,每次 1.5 h。药液经 0.22  $\mu$ m 滤膜滤过,滤液用旋转蒸发仪浓缩。将浓缩药液装入透析袋,在去离子水中透析 7 d,透析期间频繁更换去离子水,以确保完全去除低相对分子质量物质,直至透析袋外溶液无色透明。定容至 1 g/mL(以牛膝炭质量计),即得 ABRC-NCs 溶液,于 4 °C 冰箱保存。

### 2.2 细胞毒性实验

RAW264.7 细胞用含 10%胎牛血清和 1%青链霉素混合液的 DMEM 完全培养基,于细胞培养箱中培养。取对数生长期的细胞,以  $1 \times 10^5$  个/mL 接种于 96 孔板中,100  $\mu$ L/孔,培养 24 h。弃去上清后,加入梯度质量浓度(1 000.00、500.00、250.00、125.00、62.50、31.25、15.63、7.81、3.91  $\mu$ g/mL)的 ABRC-NCs 溶液,孵育 24 h,对照组加入不含药物的培养基,另设置不接种细胞不加入药物的空白孔。弃去上清后,PBS 清洗 2 次,每孔加入 10  $\mu$ L

CCK-8 试剂, 孵育 2~4 h, 采用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度 ( $A$ ) 值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

### 2.3 ABRC-NCs 的表征

使用 TEM 及 HRTEM 观察 ABRC-NCs 颗粒尺寸及晶格间距; 使用 XRD 分析晶体结构; 使用 FTIR、FL、UV-Vis、XPS 对其进行官能团及光学性质分析。

### 2.4 ABRC-NCs 对 ALD 小鼠的作用

**2.4.1 分组、造模与给药** C57BL/6J 小鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为对照组、模型组、联苯双酯 (450 mg/kg) 组和 ABRC-NCs 高、中、低剂量 (5.00、2.50、1.25 mg/kg) 组, 每组 6 只。各给药组 ig 相应药物 (10 mL/kg), 对照组和模型组 ig 等体积的去离子水, 1 次/d, 连续给药 6 d。末次给药 2 h 后造模, 除对照组 ig 去离子水外, 其余小鼠 ig 50%乙醇溶液 (12 mL/kg), 每 12 小时 ig 1 次, 连续 2 次。

**2.4.2 血清中肝功能指标、炎症因子水平的检测** 末次造模后, 小鼠禁食不禁水 12 h, 麻醉后眼眶取血, 室温静置 4 h 后, 4 °C、3 500 r/min 离心 10 min, 取上清。按照试剂盒说明书测定血清中 ALT、AST 活性及 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、IL-10 水平。

**2.4.3 肝组织外观及病理学变化观察** 取血后, 迅速剖取小鼠肝脏, 观察其颜色和质地, 拍照并记录各组小鼠肝组织形态。取肝左叶相同部位月牙大小的肝脏, 在 4%多聚甲醛固定液中固定 48 h 后, 经梯度乙醇和二甲苯脱水处理, 石蜡包埋、切片, 进行苏木素-伊红 (HE) 染色, 于显微镜下观察肝组织病理损伤情况。

**2.4.4 肝组织 TG 及氧化应激水平的检测** 取各组小鼠肝组织, 制备肝组织匀浆液, 按照试剂盒说明书测定肝组织匀浆液中 TG、MDA、GSH 水平和 SOD 活性。

**2.4.5 免疫组化法检测肝组织 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达** 取各组小鼠肝组织切片, 经脱蜡、抗原修复、内源性酶灭活、血清封闭、一抗孵育、二抗孵育、DAB 显色、复染、脱水封片后, 于显微镜下观察并拍照, 采用 Image J 软件分析肝组织中 Nrf2 及 HO-1 的阳性表达量。

### 2.5 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析, 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。服从正态分布且方差齐的数据采用单因素方差分析, 组间差异分析比较运用 LSD 法进行

检验。

## 3 结果

### 3.1 牛膝炭的外观形态

经马弗炉烧制的牛膝炭外观形态见图 1, 内外均已达到明显的焦黑状, 且质地清脆, 基本没有发生灰化。

### 3.2 细胞毒性实验

如图 2 所示, 3.91~1 000.00  $\mu\text{g/mL}$  的 ABRC-NCs 对 RAW264.7 细胞存活率无明显影响。



图 1 马弗炉烧制后的牛膝炭外观图

Fig. 1 Appearance of *Achyranthis Bidentatae Radix Carbonisatum* fired in muffle furnace

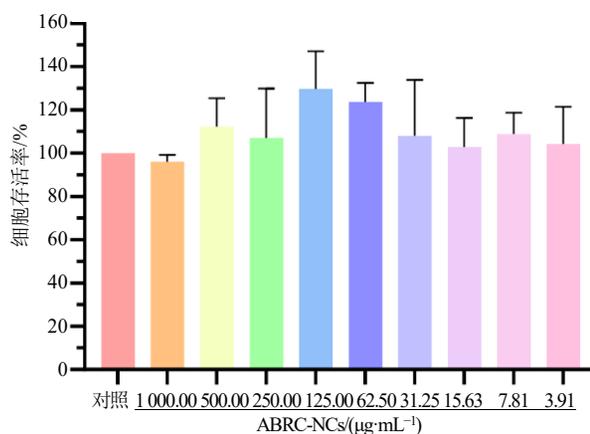


图 2 ABRC-NCs 对 RAW264.7 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Fig. 2 Effect of ABRC-NCs on survival rate of RAW264.7 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

### 3.3 ABRC-NCs 的表征

TEM (图 3-A) 结果显示, ABRC-NCs 呈现规则的近球形纳米结构, 粒径分布均匀且分散性良好, 粒径为 0.5~2.5 nm (图 3-D), 峰值集中于 1.5 nm 附近。HRTEM (图 3-B) 结果显示, 纳米颗粒表面可见清晰的晶格条纹, 其晶格间距为 0.190 nm (图 3-C)。XRD 图谱 (图 4-A) 显示, ABRC-NCs

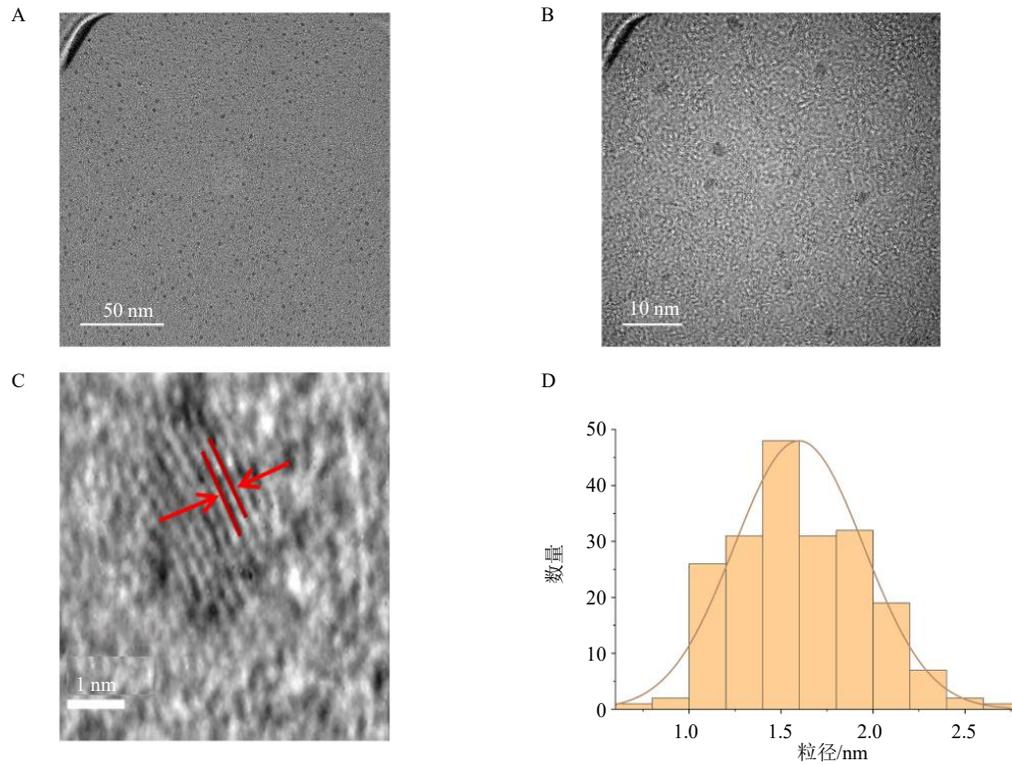
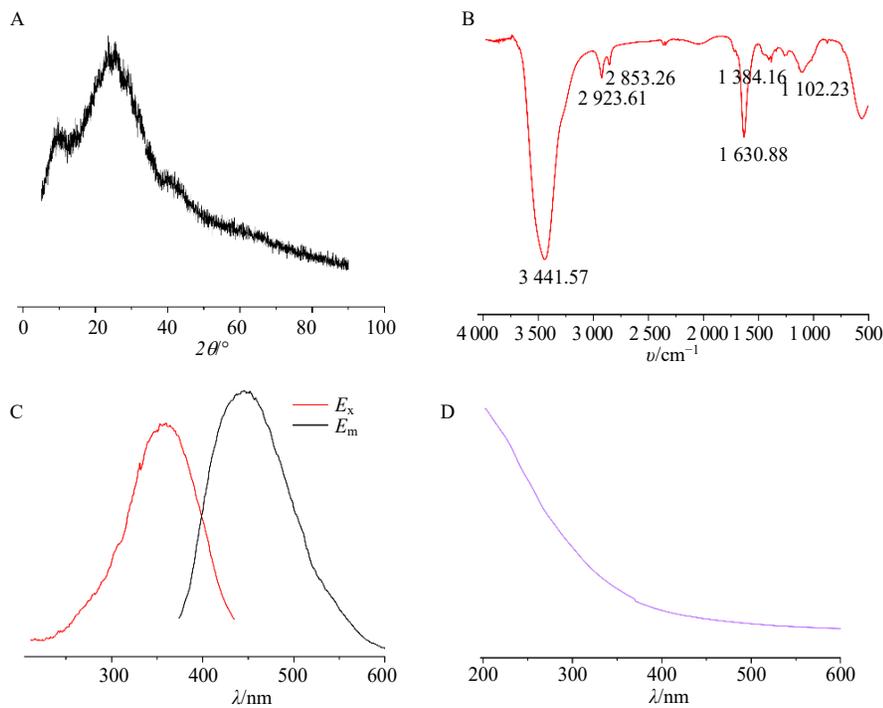


图3 ABRC-NCs的TEM图(A)、HRTEM图(B)、晶格放大图(C)和粒径分布图(D)

Fig. 3 TEM image (A), HRTEM image (B), enlarged lattice image (C) and particle size distribution (D) of ABRC-NCs



A-XRD 图谱; B-FTIR 光谱; C-FL 光谱; D-UV-Vis 光谱。  
A-XRD spectrum; B-FTIR spectra; C-FL spectra; D-UV-Vis spectra.

图4 ABRC-NCs的光谱表征图

Fig. 4 Spectral characterization of ABRC-NCs

在  $26.603^\circ$  的  $2\theta$  处有 1 个衍射峰, 计算出的晶格间距约为  $0.334\text{ nm}$ , 可能与 ABRC-NCs 无定型的碳结构有关<sup>[21]</sup>。

利用 FTIR 对 ABRC-NCs 的表面官能团进行表征, 结果见图 4-B, 在  $3\ 441.57\text{ cm}^{-1}$  处观察到宽而强的吸收峰, 该特征峰可归因于羟基 (-OH) 的伸缩振动;  $2\ 923.61$ 、 $2\ 853.26\text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰分别对应亚甲基 (-CH<sub>2</sub>-) 的不对称和对称伸缩振动, 表明样品中存在脂肪烃类结构单元;  $1\ 630.88\text{ cm}^{-1}$  附近的吸收峰归属于羰基 (-C=O) 的伸缩振动;  $1\ 384.16\text{ cm}^{-1}$  处的特征峰与碳氮双键 (C=N) 的伸缩振动相关; 而  $1\ 102.23\text{ cm}^{-1}$  附近的吸收峰则提示分子中存在醚键 (-C-O-C-) 结构<sup>[20,22-23]</sup>。表明 ABRC-NCs 表面富集羟基、羰基等极性官能团, 上述官能团可能通过氢键作用、静电相互作用或共轭效应参与药物-靶点的特异性结合, 从而对 ABRC-NCs 的药效发挥起到关键作用。

FL 光谱 (图 4-C) 显示, ABRC-NCs 最大激发波长为  $360\text{ nm}$ , 最大发射波长为  $446\text{ nm}$ 。UV-Vis

光谱 (图 4-D) 显示, ABRC-NCs 无明显的特征吸收峰, 仅在  $200\sim 300\text{ nm}$  有紫外吸收, 提示可能与芳香族 C=C 键的  $\pi\text{-}\pi^*$  跃迁有关<sup>[24]</sup>。

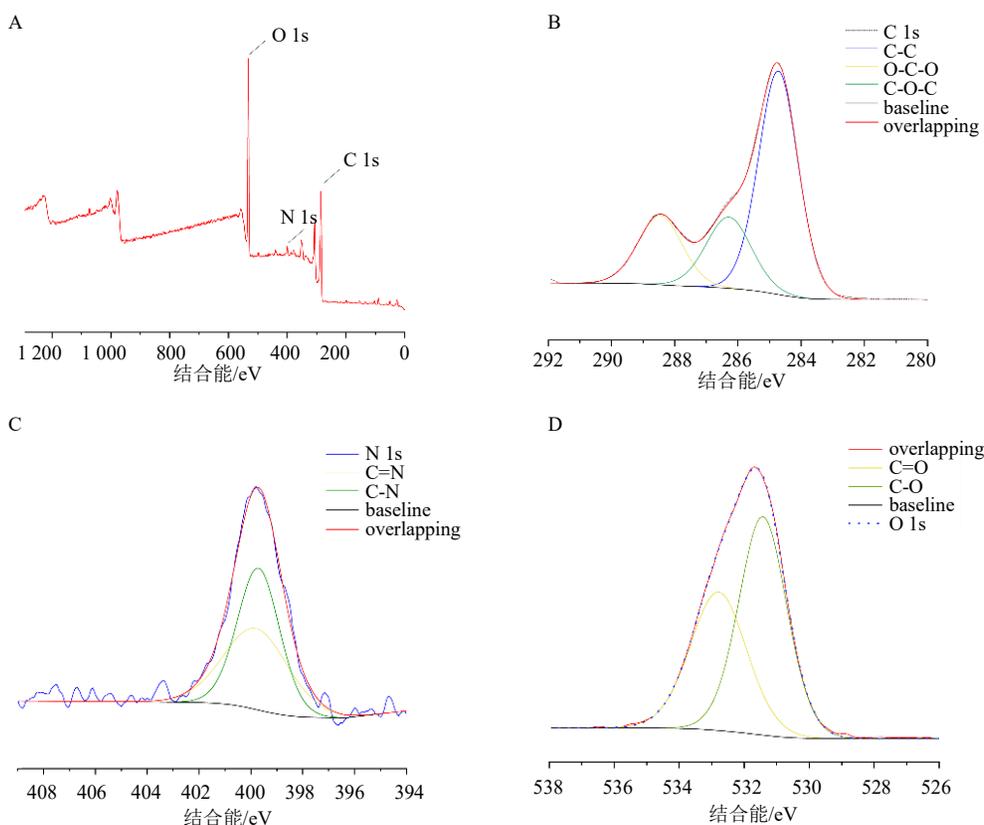
利用 XPS 进一步测定 ABRC-NCs 的元素组成、分子结构及其配位情况, 全扫描图谱 (图 5-A) 显示, ABRC-NCs 主要含 C (37.04%)、O (59.75%) 和 N (3.21%) 3 种元素。C 1s 能谱 (图 5-B) 显示在  $284.72$ 、 $286.29$ 、 $288.46\text{ eV}$  处有 3 个峰, 对应的化学键分别为 C-C、C-O-C 及 O-C=O<sup>[25]</sup>。O 1s 能谱峰 (图 5-C) 为  $531.42$ 、 $532.77\text{ eV}$ , 对应 C-O 和 C=O<sup>[26]</sup>。N 1s 能谱 (图 5-D) 在  $399.8\text{ eV}$  处有峰值, 对应 C-N 或 C=N<sup>[27]</sup>。

### 3.4 ABRC-NCs 对 ALD 小鼠一般情况的影响

与对照组比较, 模型组小鼠精神萎靡, 活动减少, 皮肤毛发失去光泽感, 体质量降低; 与模型组比较, 各给药组小鼠精神情况明显改善, 但活动、毛发光泽、体质量较造模前均有所下降。

### 3.5 ABRC-NCs 对 ALD 小鼠肝组织病理变化的影响

对照组小鼠肝脏被膜光滑, 色泽红润, 边缘锐



A-全扫描图谱; B-C 1s 图谱; C-N 1s 图谱; D-O 1s 图谱。

A-full scan spectrum; B-C 1s spectrum; C-N 1s spectrum; D-O 1s spectrum.

图 5 ABRC-NCs 的 XPS 扫描图谱

Fig. 5 XPS scan spectra of ABRC-NCs

利，质地柔软，与周围组织无黏连，易于剥离。模型组小鼠肝脏体积轻度增大，被膜紧张，色泽泛黄，与周围组织黏连，表面可见散在颗粒状突起，部分肝叶边缘质地较韧硬。与模型组比较，联苯双酯组肝脏病变特征明显减轻；ABRC-NCs 各给药组肝脏病变呈不同程度的改善，以低剂量组效果最佳，可见肝脏被膜光滑、色泽红润，肝叶边缘锐利柔软，外观接近对照组。

肝组织 HE 染色结果如图 6 所示，对照组肝小叶结构完整，肝索呈放射状排列，未见炎性浸润及脂肪空泡。模型组肝组织大部分区域脂肪变性严重，可见大量脂肪空泡，肝小叶结构紊乱，出现肝

细胞坏死和出血性病变。联苯双酯组肝小叶结构部分修复，肝细胞变性程度减轻，炎细胞浸润范围缩小，虽仍存在轻微结构紊乱，但较模型组显著改善。ABRC-NCs 各给药组小鼠肝组织损伤情况均显著缓解，肝小叶结构趋于清晰，肝索排列相对规则，脂肪变性明显减轻，尤以低剂量组肝组织损伤缓解最为明显。

### 3.6 ABRC-NCs 对 ALD 小鼠肝功能的影响

如图 7 所示，与对照组比较，模型组小鼠血清中 AST 和 ALT 活性显著升高 ( $P < 0.01$ )；与模型组比较，各给药组血清中 AST 和 ALT 活性均显著降低 ( $P < 0.01$ )。

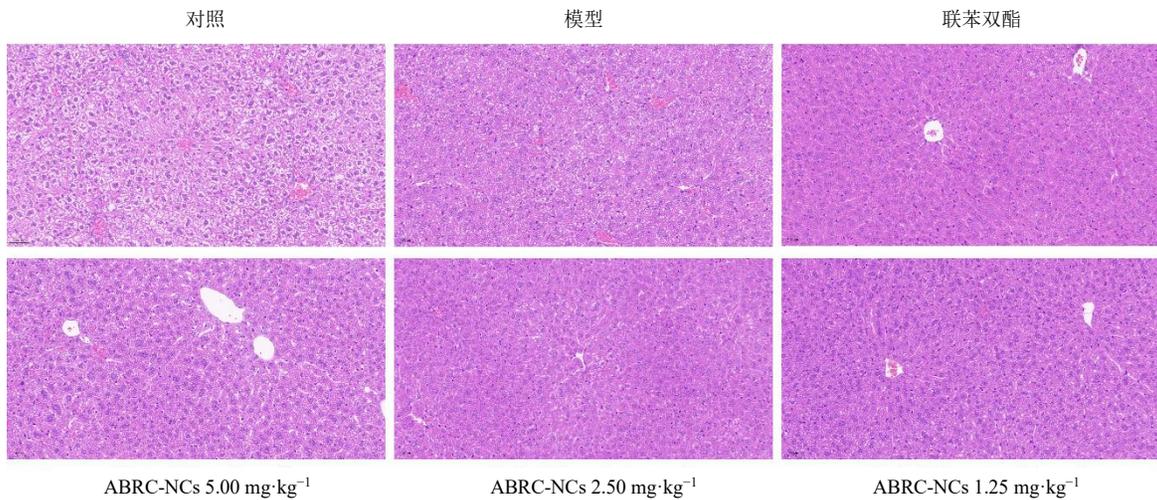
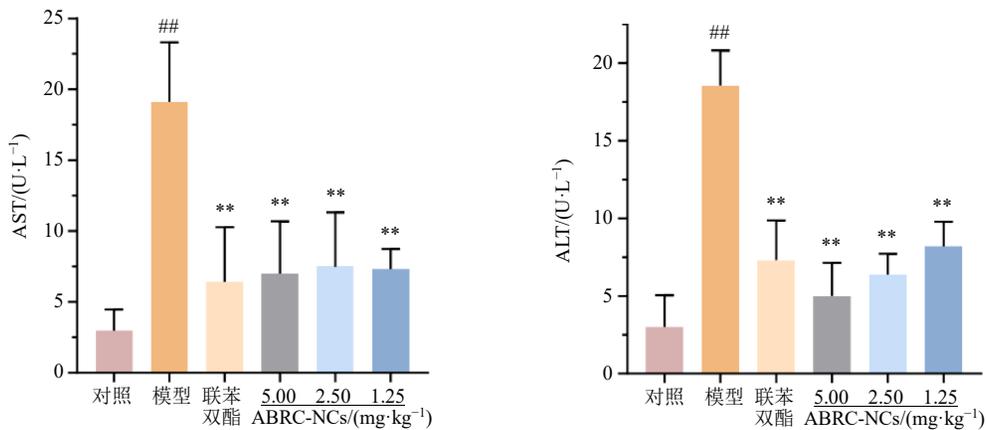


图 6 ABRC-NCs 对 ALD 小鼠肝组织病理变化的影响 (HE, ×200)

Fig. 6 Effect of ABRC-NCs on pathological changes of liver tissue in ALD mice (HE, × 200)



与对照组比较：## $P < 0.01$ ；与模型组比较：\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ ，下图同。

## $P < 0.01$  vs control group; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs model group, same as below figures.

图 7 ABRC-NCs 对 ALD 小鼠肝功能的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 7 Effect of ABRC-NCs on liver function of ALD mice ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

### 3.7 ABRC-NCs 对 ALD 小鼠血清中炎症因子水平的影响

如图 8 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠血清中 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平显著升高 ( $P < 0.01$ ), 抗炎因子 IL-10 水平显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 各给药组 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平显著降低 ( $P < 0.05, 0.01$ ), IL-10 水平显著升高 ( $P < 0.01$ )。

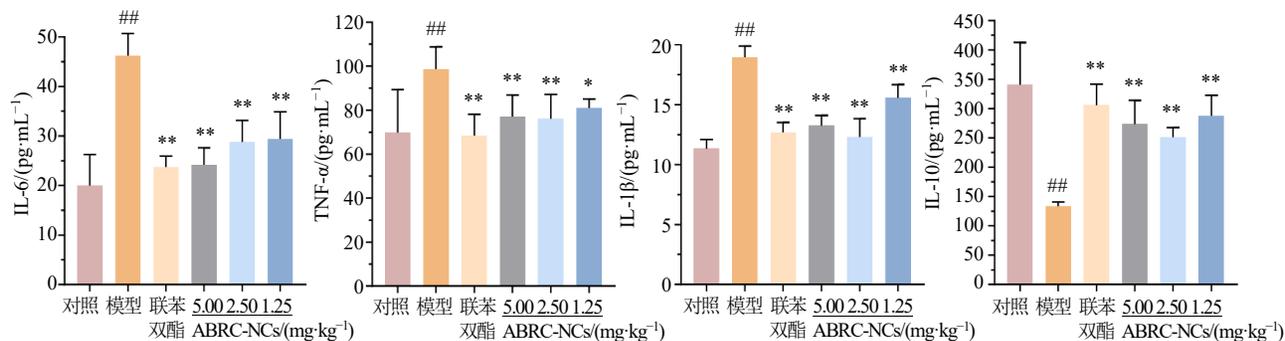


图 8 ABRC-NCs 对 ALD 小鼠血清中炎症因子水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 8 Effect of ABRC-NCs on levels of inflammatory factors in serum of ALD mice ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

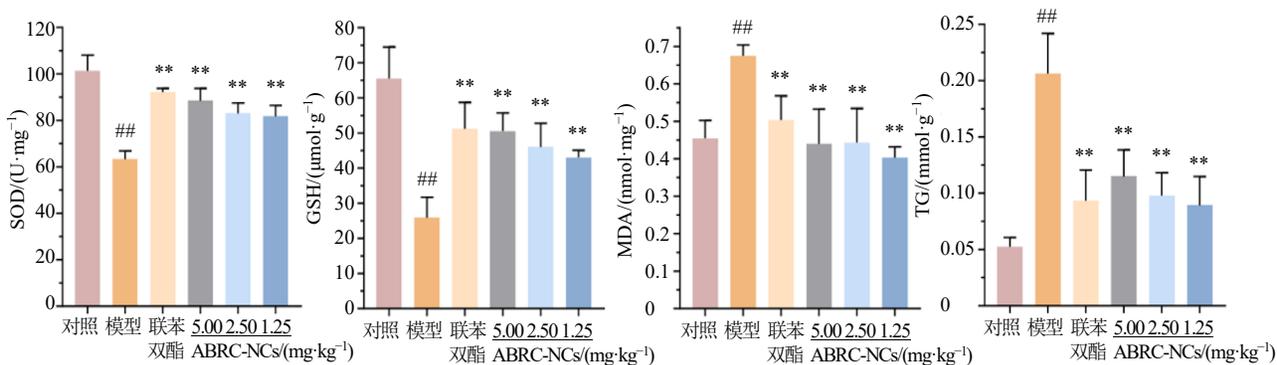


图 9 ABRC-NCs 对 ALD 小鼠肝组织氧化应激和 TG 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 9 Effect of ABRC-NCs on levels of oxidative stress and TG in liver tissue of ALD mice ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

### 3.9 ABRC-NCs 对 ALD 小鼠肝组织 HO-1 和 Nrf2 蛋白表达的影响

如图 10 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肝组织 HO-1、Nrf2 阳性表达显著减少 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 各给药组小鼠肝组织 HO-1 和 Nrf2 阳性表达均显著增加 ( $P < 0.05, 0.01$ )。

## 4 讨论

ALD 是肝硬化的常见病因之一<sup>[28]</sup>, 显著增加了肝病相关死亡风险<sup>[29]</sup>。在 ALD 成为全球常见病的当下, 开发安全高效的治疗药物是当前亟待解决的关键科学问题。在中医理论体系中, ALD 归属于“伤酒”“酒癖”“积聚”等范畴<sup>[7]</sup>, 核心病机为热毒、痰

### 3.8 ABRC-NCs 对 ALD 小鼠肝组织氧化应激和 TG 水平的影响

如图 9 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肝组织 SOD 活性及 GSH 水平显著降低 ( $P < 0.01$ ), MDA 和 TG 水平显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 各给药组小鼠肝组织 SOD 活性及 GSH 水平显著升高 ( $P < 0.01$ ), MDA 和 TG 水平显著降低 ( $P < 0.01$ )。

湿、瘀血互结及正气亏虚<sup>[30-31]</sup>。而牛膝作为“足厥阴、少阴之药”<sup>[9]</sup>, 其“逐血气伤, 热, 火烂”<sup>[8]</sup>及其引药下行的特性, 与 ALD 病位、病机高度契合。虽然清代以前的古籍中并未有明确的牛膝治疗肝脏疾病的记载, 但牛膝以其出色的临床表现被近现代医家广泛应用于肝脏疾病, 并且有现代研究充分证实了可行性。如王旭高以柔肝法治疗肝病时, 牛膝既助当归养血活血以柔肝体, 又协同枸杞子滋补肝肾以固根本, 更引诸药下行, 直达病所<sup>[32]</sup>; 牛膝的提取物菊粉样果聚糖 ABWW 亦被证实可通过减轻肝脏炎症和氧化应激等机制发挥保肝作用<sup>[10]</sup>。

在 ALD 进展中, 乙醇及其代谢物乙醛的持续

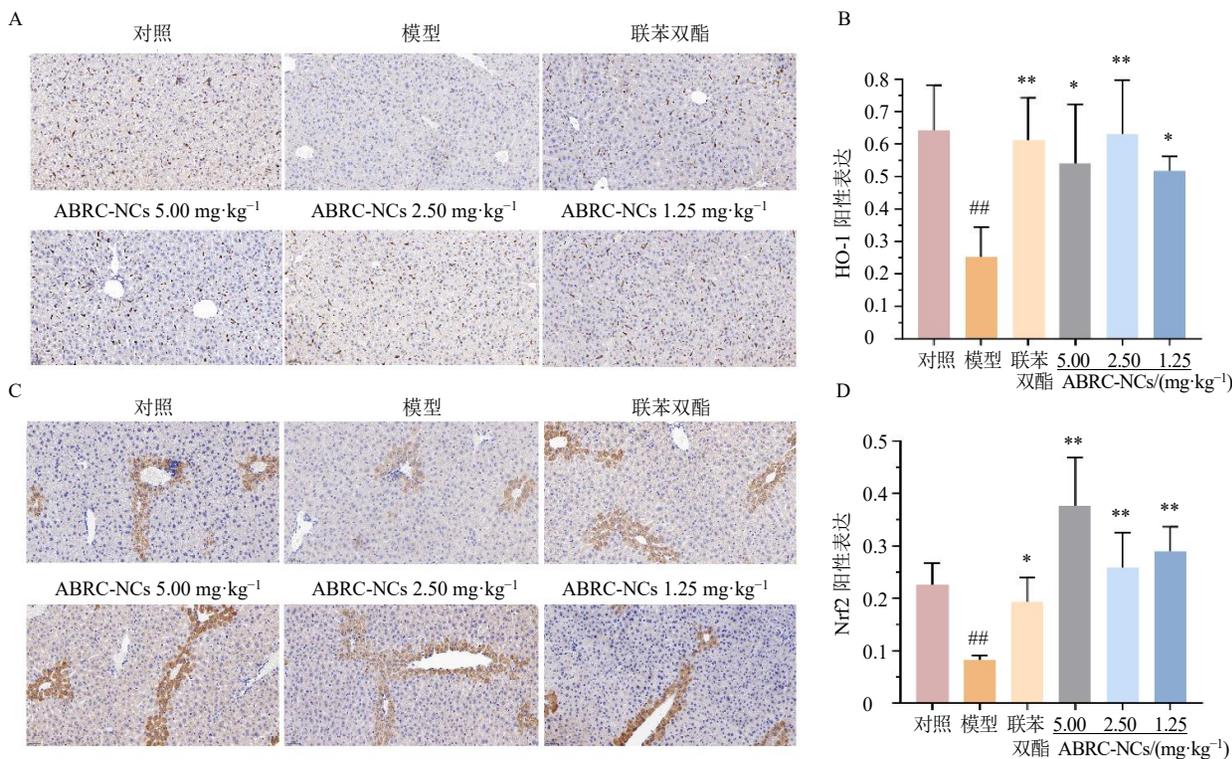


图 10 ABRC-NCs 对 ALD 小鼠肝组织 HO-1 (A, B) 和 Nrf2 (C, D) 蛋白表达的影响 (×200;  $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 10 Effect of ABRC-NCs on protein expressions of HO-1 (A, B) and Nrf2 (C, D) in liver tissue of ALD mice

(× 200;  $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

毒性可致肝细胞坏死、纤维化、门脉高压，进而导致出血相关并发症。因此，在 ALD 的针对性治疗中，必须考虑药物的止血特性。而炭药作为特色炮制品，以其优良的止血功效被广泛应用于各类出血性疾病的治疗<sup>[13,33]</sup>。课题组前期研究发现，炭药中的纳米类成分具有高比表面积与丰富表面活性位点<sup>[34]</sup>，凭借其独特的理化性质与生物活性在生物医药领域展现出广泛的应用前景，因此本研究探究 ABRC-NCs 在 ALD 中的作用及可能的机制。

CCK-8 实验结果显示，3.91~1 000.00 μg/mL 的 ABRC-NCs 对 RAW264.7 细胞无明显毒性作用。现代表征技术显示，ABRC-NCs 具有近球形结构和丰富的官能团，这些结构特征可能是反应中吸附和催化的结构基础进而产生治疗作用。本研究构建了乙醇诱导的急性 ALD 小鼠模型，结果显示，模型组小鼠肝组织外观及病理切片出现明显改变，可见肝细胞水肿、肝索排列紊乱、炎性细胞浸润及脂肪空泡形成。生化指标检测显示，模型组血清 ALT、AST 活性及肝组织 TG 水平显著升高，与病理改变一致，提示模型建立成功。而给予 ABRC-NCs 干预后，肝脏病理损伤明显改善，肝功能相关指标显著降低，

证实了 ABRC-NCs 具有一定的肝保护作用。

乙醇及其代谢产物乙醛引发的氧化应激与炎症级联是 ALD 的核心病理环节<sup>[35]</sup>。其中 TNF-α 作为一种多功能细胞因子，介导下游炎症相关信号分子的表达<sup>[36]</sup>，刺激肝细胞分泌促炎介质放大炎症级联，导致肝细胞坏死、炎症细胞浸润和肝窦内皮损伤。IL-10 作为关键抗炎因子，能抑制炎症损伤拮抗 ALD 的发展<sup>[37]</sup>。结果显示，ABRC-NCs 显著降低促炎因子 TNF-α、IL-6 及 IL-1β 水平，升高抗炎因子 IL-10 水平，涵盖了免疫触发因子-促炎级联介质-抗炎平衡因子的完整炎症调控轴，表明 ABRC-NCs 具有抗炎活性，可能通过多靶点协同作用实现多层次的干预，为 ALD 的精准治疗提供了新的思路。

长期大量饮酒造成体内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 激增，大量消耗 SOD、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidases, GSH-Px)<sup>[37]</sup> 等内源性抗氧化剂，过量自由基通过脂质过氧化反应与细胞膜脂质结合生成 MDA，破坏细胞膜的结构与功能，诱发肝细胞坏死和凋亡<sup>[38]</sup>。本研究结果显示，ABRC-NCs 可显著上调肝组织中 SOD 活性及 GSH 水平，同时抑制 MDA 生成，从而有效减轻酒

精诱导的氧化损伤。免疫组化结果显示, ABRC-NCs 能够促进肝组织 Nrf2 及下游关键抗氧化酶 HO-1 蛋白的表达。Nrf2 是调控多种抗氧化酶表达的关键转录因子, 可启动下游抗氧化基因的转录<sup>[39]</sup>, 其下游的 HO-1 是血红素分解的限速酶, 可清除 ROS<sup>[40]</sup>, 二者共同构成细胞内重要的抗氧化防御网络。不同于外源性抗氧化剂补充(如维生素 E<sup>[41]</sup>)或侧重于单一通路(如 Nrf2 激动剂<sup>[42]</sup>)的肝脏疾病潜在治疗策略, ABRC-NCs 不仅激活了核心的 Nrf2/HO-1 抗氧化通路, 同时显著提高了包括 SOD、GSH 在内的内源性抗氧化酶的整体活性, 从而提供了更为全面的抗氧化保护屏障。

在 ALD 进展中, 肝细胞损伤、炎症级联反应、氧化应激及潜在的出血风险构成了复杂的病理网络。而在本研究构建的小鼠急性 ALD 模型中, ABRC-NCs 通过多途径发挥保护作用, 缓解 ALD 的病理进程, 从而减轻肝损伤。本研究揭示了 ABRC-NCs 对 ALD 的保护作用及其潜在机制, 推动了传统中药牛膝炭的临床转化, 不仅为中医药干预 ALD 提供了新思路, 也为构建 ALD 多靶点疗法提供了新的候选药物, 同时, 通过阐明炭药纳米成分的现代药理机制, 揭示了经典炮制工艺的科学内涵。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Singal A K, Bataller R, Ahn J, *et al.* ACG clinical guideline: Alcoholic liver disease [J]. *Am J Gastroenterol*, 2018, 113(2): 175-194.
- [2] Åberg F, Gordon Jiang Z, Cortez-Pinto H, *et al.* Alcohol-associated liver disease — Global epidemiology [J]. *Hepatology*, 2024, 80(6): 1307-1322.
- [3] Feng X F, Huang N F, Wu Y Q, *et al.* Alcoholic liver disease in China: A disease influenced by complex social factors that should not be neglected [J]. *J Clin Transl Hepatol*, 2024, 12(7): 677-684.
- [4] 刘佳华. 乌药叶提取物改善结肠炎和酒精性肝病的作用机制及其发酵饮料的开发 [D]. 南昌: 南昌大学, 2024.
- [5] 王文萱, 付向磊, 戚曼, 等. 红花提取物通过调控 Nrf2/STAT3/NF-κB 信号通路对酒精性肝病的作用机制研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2024, 35(8): 1132-1141.
- [6] 左晓利, 娄静, 闫悦. 基于“肝病实脾”理论探讨白术多糖对酒精性肝损伤大鼠的保护作用 [J]. *中药新药与临床药理*, 2025, 36(4): 534-541.
- [7] 叶永安, 田德录. 酒精性肝病中医认识初探 [J]. *中国医药学报*, 1997, 12(5): 8-10.
- [8] 魏·吴普等述, 清·孙星衍, 清·孙冯翼辑. 神农本草经 [M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2018: 6.
- [9] 李时珍. 本草纲目 [M]. 南昌: 二十一世纪出版社, 2017: 111.
- [10] Dai X L, Du Z Y, Jin C, *et al.* Inulin-like polysaccharide ABWW may impede CCl<sub>4</sub> induced hepatic stellate cell activation through mediating the FAK/PI3K/Akt signaling pathway *in vitro* & *in vivo* [J]. *Carbohydr Polym*, 2024, 326: 121637.
- [11] Guo P L, Zeng M N, Liu M, *et al.* Isolation of calendulose E from *Achyranthes bidentata* Blume and its effects on LPS/D-GalN-induced acute liver injury in mice by regulating the AMPK-SIRT3 signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2024, 125: 155353.
- [12] 清·叶天士著, 程门雪校. 未刻本叶氏医案 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1963: 120.
- [13] 孙紫薇, 张越, 孔慧, 等. 炭类中药临床应用的历史沿革 [J]. *北京中医药大学学报*, 2020, 43(9): 729-734.
- [14] Zhang J W, Zou L J, Li Q L, *et al.* Carbon dots derived from traditional Chinese medicines with bioactivities: A rising star in clinical treatment [J]. *ACS Appl Bio Mater*, 2023, 6(10): 3984-4001.
- [15] 赵玉升, 屈会化, 赵琰. 炭药纳米类成分的药理作用研究进展 [J]. *中草药*, 2022, 53(3): 921-929.
- [16] Zhang M L, Zhao Y, Cheng J J, *et al.* Novel carbon dots derived from *Schizonepetae Herba Carbonisata* and investigation of their haemostatic efficacy [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 46(8): 1562-1571.
- [17] Zhang M L, Liu Y H, Qu H H. Protective effect of nanoparticles from *Platycladi Cacumen Carbonisata* on 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis in rats [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2022, 18(2): 422-434.
- [18] Zhang Y F, Zhao J, Zhao Y S, *et al.* The *Rhei Radix Rhizoma*-based carbon dots ameliorates dextran sodium sulphate-induced ulcerative colitis in mice [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2023, 51(1): 180-191.
- [19] Xu J, Huang B B, Lai C M, *et al.* Advancements in the synthesis of carbon dots and their application in biomedicine [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2024, 255: 112920.
- [20] Zhao Y S, Zhang Y, Kong H, *et al.* Carbon dots from *Paeoniae Radix Alba Carbonisata*: Hepatoprotective effect [J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15: 9049-9059.
- [21] Ngamjumrus N, Silakaew K, Thompho S, *et al.* Two steps for improving reduced graphene oxide/activated durian shell carbon composite by hydrothermal and 3-D ball

- milling process for symmetry supercapacitor device [J]. *Energies*, 2023, 16(19): 6962.
- [22] Baranitharan M, Sawicka B, Gokulakrishnan J. Phytochemical profiling and larval control of *Erythrina variegata* methanol fraction against malarial and filarial vector [J]. *Adv Prev Med*, 2019, 2019: 2641959.
- [23] Bora A, Sarmah D, Rather M A, et al. Nanocomposite of starch, gelatin and itaconic acid-based biodegradable hydrogel and ZnO/cellulose nanofiber: A pH-sensitive sustained drug delivery vehicle [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 256(Pt 1): 128253.
- [24] 倪国华, 宋焕禄. 凝胶过滤分离鸡肉蛋白酶解物时紫外检测波长的选择 [J]. *食品研究与开发*, 2002, 23(5): 73-75.
- [25] Monyake K, Han T H, Ali D, et al. Experimental and machine learning studies on chitosan-polyacrylamide copolymers for selective separation of metal sulfides in the froth flotation process [J]. *Colloids Interfaces*, 2023, 7(2): 41.
- [26] Gupta S K, Mitra R K, Yadav M, et al. Electrochemical, surface morphological and computational evaluation on carbohydrazide Schiff bases as corrosion inhibitor for mild steel in acidic medium [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 15108.
- [27] 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.
- [28] Melis M, Tang X H, Trasino S E, et al. Retinoids in the pathogenesis and treatment of liver diseases [J]. *Nutrients*, 2022, 14(7): 1456.
- [29] Hagström H, Thiele M, Roelstraete B, et al. Mortality in biopsy-proven alcohol-related liver disease: A population-based nationwide cohort study of 3453 patients [J]. *Gut*, 2021, 70(1): 170-179.
- [30] 隋·巢元方等著, 丁光迪等点校, 杨柳, 陈永萍整理. 诸病源候论 [M]. 海口: 海南国际新闻出版中心, 1995: 183.
- [31] 陈亚男, 卢秉久. 卢秉久疏肝理脾辨治酒精性肝病经验 [J]. *湖南中医杂志*, 2018, 34(1): 27-29.
- [32] 秦伯未著, 吴大真, 王凤岐编, 王雷, 李顺整理. 名医秦伯未医文精华 [M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2023: 82.
- [33] 张贺, 徐园园, 王明慧, 等. 中药炮制“炭药止血”理论的现代研究进展 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2023, 25(4): 1502-1510.
- [34] Nnadozie E C, Ogunwa K I, Chukwuike V I, et al. Synthesis and characterization of carbonaceous materials for medical applications: A comprehensive review [J]. *BioMed*, 2024, 4(4): 464-492.
- [35] Teschke R. Alcoholic liver disease: Alcohol metabolism, cascade of molecular mechanisms, cellular targets, and clinical aspects [J]. *Biomedicines*, 2018, 6(4): 106.
- [36] Zhang J X, Yang Y, Huang H, et al. TNF- $\alpha$ /TNFR1 regulates the polarization of Kupffer cells to mediate trichloroethylene-induced liver injury [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2022, 230: 113141.
- [37] 卜义凡, 朴圣爱, 李紫薇, 等. 尖叶假龙胆不同组分对酒精性肝损伤模型大鼠的保护作用研究 [J]. *环球中医药*, 2022, 15(8): 1329-1336.
- [38] Yan C Y, Hu W T, Tu J Q, et al. Pathogenic mechanisms and regulatory factors involved in alcoholic liver disease [J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 300.
- [39] Xu D W, Xu M, Jeong S, et al. The role of Nrf2 in liver disease: Novel molecular mechanisms and therapeutic approaches [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 9: 1428.
- [40] 杨宇婷, 陈亮亮, 杨娟娟, 等. 补骨脂反成配伍何首乌、熟地黄及五味子调控 Nrf2/HO-1 信号通路缓解肝毒性 [J/OL]. *中药药理与临床*, (2025-05-08) [2025-06-11]. <https://doi.org/10.13412/j.cnki.zyyj.20250508.001>.
- [41] Sanyal A J, Chalasani N, Kowdley K V, et al. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis [J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(18): 1675-1685.
- [42] Sun J, Fu J Q, Li L, et al. Nrf2 in alcoholic liver disease [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2018, 357: 62-69.

[责任编辑 李亚楠]