

刺梨发酵液通过激活 Nrf2/ARE 信号通路缓解对乙酰氨基酚诱导的小鼠肝损伤研究

朱亚南¹, 何李生¹, 胡天翠¹, 张硕², 张敏², 查忠俊¹, 王南¹, 陈林³, 张凯敏^{1*}, 高秀丽^{2*}

1. 盘州市人民医院 药学部, 贵州 六盘水 553537

2. 贵州医科大学药学院, 贵州 贵阳 550025

3. 贵州天刺力食品科技有限责任公司, 贵州 六盘水 553536

摘要: 目的 探究刺梨发酵液对乙酰氨基酚(acetaminophen, APAP)诱导的药物性肝损伤(drug-induced liver injury, DILI)小鼠模型的保护作用, 并基于核因子红细胞2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor, Nrf2)/抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)信号通路探讨其潜在机制。方法 以刺梨原汁为对照, 分析刺梨发酵液主要活性成分含量及体外抗氧化能力; 将60只昆明种小鼠随机分为对照组、模型组、N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC, 0.15 g/kg)组及刺梨发酵液低、中、高剂量(5、10、20 mL/kg)组, 每组10只。连续给药7 d, 末次给药1 h后, 除对照组外, 其余各组ip APAP(400 mg/kg)以建立急性肝损伤模型。造模12 h后, 麻醉并处死小鼠, 立即取出小鼠完整肝脏, 观察有无肉眼可见损伤及病变; 测定小鼠体质量及肝脏质量, 计算肝脏指数; 采用ELISA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)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 水平及肝组织超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性以及谷胱甘肽(glutathione, GSH)、丙二醛(malonaldehyde, MDA)水平; 苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色观察肝组织病理变化; qRT-PCR和Western blotting检测肝组织中Nrf2、血红素氧合酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)、SOD-1、过氧化氢酶(catalase, CAT)的mRNA及蛋白表达; Ly6G免疫荧光染色观察中性粒细胞浸润情况; TUNEL染色检测肝细胞凋亡情况。结果 与刺梨原汁相比, 刺梨发酵液中总酸、总酚及总黄酮含量显著升高($P<0.05$), 维生素C含量显著下降($P<0.05$), 主要抗氧化活性成分总量增加, 且其1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)自由基清除率与Fe³⁺还原能力均显著增强($P<0.01$)。与对照组比较, 模型组小鼠肝脏出现明显的出血性病理损伤, 肝脏指数、血清中ALT及AST活性、炎症因子水平和肝组织MDA水平平均显著升高($P<0.001$), 而肝组织GSH水平和SOD活性显著下降($P<0.001$); 肝组织炎性细胞浸润、肝索结构紊乱及坏死面积增加; 肝组织Nrf2、HO-1、SOD-1、CAT的mRNA及蛋白表达水平显著降低($P<0.001$); 肝组织中性粒细胞浸润及肝细胞凋亡显著增加($P<0.001$)。与模型组比较, NAC及刺梨发酵液各剂量组均可不同程度地改善上述病理及生化指标, 包括减轻肉眼可见的肝脏损伤及病变, 降低肝脏指数, 下调血清转氨酶活性及炎症因子水平, 降低肝组织MDA水平, 提升GSH水平和SOD活性, 并上调Nrf2/ARE通路相关基因及蛋白表达($P<0.05$ 、0.01、0.001), 同时显著抑制中性粒细胞浸润与肝细胞凋亡($P<0.05$ 、0.001)。结论 刺梨发酵液对APAP诱导的DILI小鼠具有潜在的肝保护作用, 其机制可能与激活Nrf2/ARE信号通路、增强机体抗氧化能力并抑制炎症反应有关。

关键词: 刺梨发酵液; 药物性肝损伤; 抗氧化; 抗炎; Nrf2/ARE信号通路; 维生素C; 多酚; 黄酮

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2026)02-0527-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.02.013

Rosa roxburghii fermentation broth alleviates acetaminophen-induced liver injury in mice via activating Nrf2/ARE signaling pathway

ZHU Yanan¹, HE Lisheng¹, HU Tiancui¹, ZHANG Shuo², ZHANG Min², ZHA Zhongjun¹, WANG Nan¹, CHEN Lin³, ZHANG Kaimin¹, GAO Xiuli²

收稿日期: 2025-09-22

基金项目: 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术课题(QZYY-2025-102); 贵州省科技重大专项项目(黔科合重大专项字[2024]015)

作者简介: 朱亚南, 男, 硕士研究生, 主要从事新药研发、体内药物分析及药物制剂质量研究与临床药学工作。

E-mail: 2726719792@qq.com

*通信作者: 张凯敏, 副主任药师, 主要从事临床药学及医院药事管理工作。E-mail: 332352884@qq.com

高秀丽, 博士生导师, 教授, 主要从事贵州特色资源和中药民族药的开发应用、药物质量分析及中药药效物质基础研究。

E-mail: gaoxl@gmc.edu.cn

1. Pharmacy Department, Panzhou People's Hospital, Liupanshui 553537, China
2. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China
3. Guizhou Tiancili Food Science and Technology Co., Ltd., Liupanshui 553536, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect of *Rosa roxburghii* fermentation broth against acetaminophen (APAP)-induced drug-induced liver injury (DILI) in mice and explore its potential mechanism based on nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/antioxidant response element (ARE) signaling pathway. **Methods** Taking the *R. roxburghii* juice as the control, the main active component contents and *in vitro* antioxidant capacity of *R. roxburghii* fermentation broth were analyzed. A total of 60 Kunming mice were randomly divided into control group, model group, *N*-acetylcysteine (NAC, 0.15 g/kg) group, and *R. roxburghii* fermentation broth low-, medium-, and high-dose (5, 10, 20 mL/kg) groups, with 10 mice in each group. All groups were consecutively administered for 7 d, 1 h after the last administration, except for the control group, all other groups received a single intraperitoneal injection of APAP (400 mg/kg) to establish the acute liver injury model. After 12 h of modeling, the mice were anesthetized and euthanized. The intact liver of mice was immediately removed and observed for any visible damage or lesions. The body weight and liver weight were measured and liver index was calculated. Activities of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), IL-1 β in serum, as well as activity of superoxide dismutase (SOD) and levels of glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) in liver tissue were detected by ELISA. Hepatic pathological changes were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The mRNA and protein expressions of Nrf2, heme oxygenase-1 (HO-1), SOD-1 and catalase (CAT) in liver tissue were detected by qRT-PCR and Western blotting. Neutrophil infiltration was observed by Ly6G immunofluorescence staining, and hepatocyte apoptosis was detected by TUNEL staining. **Results** Compared with *R. roxburghii* juice, the contents of total acids, total phenols and total flavonoids in *R. roxburghii* fermentation broth were significantly increased ($P < 0.05$), while the content of vitamin C was significantly decreased ($P < 0.05$), and the total amount of major antioxidant active ingredients were increased, and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging rate and Fe^{3+} reducing ability were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with control group, model group showed obvious pathological changes such as hemorrhagic injury in liver, liver index and activities of ALT, AST, levels of inflammatory factors in serum and MDA level in liver tissue were significantly increased ($P < 0.001$), while GSH level and SOD activity in liver tissue were significantly decreased ($P < 0.001$). Inflammatory cell infiltration in liver tissue, disruption of hepatic cord structure, and increased necrotic area were observed; The mRNA and protein expression levels of Nrf2, HO-1, SOD-1 and CAT in liver tissue were significantly reduced ($P < 0.001$); Neutrophil infiltration and hepatocyte apoptosis in liver tissue were significantly increased ($P < 0.001$). Compared with model group, NAC and *R. roxburghii* fermentation broth all dose groups could improve the above pathological and biochemical indicators to varying degrees, including reducing visible liver damage and lesions, lowering liver index, down-regulating transaminase activity and inflammatory factor levels in serum, reducing MDA level in liver tissue, increasing GSH level and SOD activity, and up-regulating Nrf2/ARE pathway related genes and protein expressions ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), while significantly inhibiting neutrophil infiltration and liver cell apoptosis ($P < 0.05, 0.001$). **Conclusion** *R. roxburghii* fermentation broth has a potential liver-protective effect against APAP-induced DILI in mice, and its mechanism may be related to the activation of Nrf2/ARE signaling pathway, enhancing antioxidant capacity and inhibiting inflammatory responses.

Key words: *Rosa roxburghii* fermentation broth; drug-induced liver injury; antioxidant; anti-inflammatory; Nrf2/ARE signaling pathway; vitamin C; polyphenols; flavonoids

药物性肝损伤 (drug-induced liver injury, DILI) 是临床最常见的肝脏损伤类型之一, 由各类化学药物、生物制品、传统中药及营养补充剂等诱发^[1]。其中, 过量摄入解热镇痛药对乙酰氨基酚 (acetaminophen, APAP) 是导致急性 DILI 的主要诱因, 其毒性代谢产物 *N*-乙酰-对苯醌亚胺 (*N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine, NAPQI) 可与肝脏生物大分子结合, 干扰线粒体功能并诱发氧化应激, 最终导致肝细胞坏死^[2-3]。*N*-乙酰半胱氨酸 (*N*-acetylcysteine, NAC) 是目前唯一获批的 APAP 解

毒剂, 但存在最佳用药窗口 (8 h 内) 狹窄及头痛、恶心、脂肪肝等不良反应^[4-5]。因此, 开发疗效相当或更优、不良反应更小的天然替代药物, 具有重要的临床意义。

药食同源中药因安全性高、功效多样, 成为 DILI 防护药物研发的核心资源^[6]。刺梨 *Rosa roxburghii* Tratt 作为我国云贵高原特有的药食同源民族药, 富含维生素 C、多酚、黄酮等多种活性成分, 已被证实具有抗氧化、抗炎及保肝潜力^[7]。但刺梨致密的细胞壁结构限制了其活性成分的溶出,

导致生物利用度偏低。微生物发酵可通过降解细胞壁提升活性成分含量与溶出率,甚至产生新活性物质,显著增强药效^[8]。已有研究证实,刺梨发酵后总酸、总多酚、总黄酮等活性成分含量及体外抗氧化活性均显著提高^[9-10]。核因子红细胞2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor, Nrf2)/抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)信号通路是细胞抵御氧化应激的核心机制。在肝脏中,该通路通过诱导一系列II相解毒酶和抗氧化蛋白的表达,有效清除活性氧(reactive oxygen species, ROS)等有害物质,维持肝细胞的氧化还原平衡,这一过程的激活对于对抗药物、酒精及病毒等多种因素引起的肝损伤至关重要,是内源性保肝作用的关键环节,多种中药活性成分可通过激活该通路,上调保护性基因表达以缓解肝损伤^[11-12]。

目前刺梨果汁、提取物的保肝研究已有较多报道^[13-15],但关于刺梨发酵液对DILI的保护作用及分子机制尚未明确。本研究首先在体外实验中,以等效生药量为基准,比较刺梨原汁与刺梨发酵液在活性成分含量及抗氧化能力上的差异;随后,通过构建APAP诱导的DILI小鼠模型,基于Nrf2/ARE信号通路,从抗氧化与抗炎角度^[16]系统探究刺梨发酵液的保肝效果及其作用机制,为刺梨等药食同源中药材及其天然发酵产品的研究与开发提供理论依据。

1 材料

1.1 动物

SPF级昆明种(KM)雄性小鼠60只,5周龄,体质量(28±2)g,由贵州医科大学实验动物中心提供,动物使用许可证号SYXK(贵)2023-0002。所有小鼠饲养在温度(25±2)℃、相对湿度(60±5)%和12 h光/12 h暗循环下,自由进食饮水,适应性喂养1周后用于实验。动物实验经贵州医科大学实验动物伦理委员会批准(批准号2403674)。

1.2 药品与试剂

刺梨原汁(批号20240501)、刺梨发酵液(批号20240615)均购自贵州天刺力食品科技有限责任公司;APAP(批号A105808,质量分数≥99%)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;L(+)-抗坏血酸对照品(货号50-81-7,质量分数≥99%)、D(-)-抗坏血酸对照品(货号89-65-6,质量分数≥99%)均购自国药集团化学试剂有限公司;芦丁对照品(货号SR8250,质量分数≥98%)、没食子酸对照品

(货号SG8040,质量分数≥98%)、NAC(批号C8460,质量分数≥98%)均购自北京索莱宝科技有限公司;丙二醛(malonaldehyde, MDA)试剂盒(批号A003-1)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)试剂盒(批号A006-2-1)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(批号A001-1)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)试剂盒(批号C010-2-1)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)试剂盒(批号C009-2-1)均购自南京建成生物工程研究所;牛血清白蛋白(批号4240GR250)购自上海碧云天生物技术公司;4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI,批号D8417-1MG)购自美国Sigma公司;抗荧光淬灭封片剂(批号T105635-50g)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)试剂盒(批号ELK1387)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)试剂盒(批号ELK1157)、IL-1β试剂盒(批号ELK1271)、总RNA提取试剂盒(批号EP013)、逆转录试剂盒(批号EQ001)、实时荧光定量聚合酶链式反应试剂盒(批号EQ003)均购自武汉科鹿生物科技有限责任公司;血红素氧化酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)抗体(批号66743-1-Ig)、Nrf2抗体(批号80593-1-RR)、过氧化氢酶(catalase, CAT)抗体(批号21260-1-AP)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;Ly6G一抗(批号MA5-51254)购自英杰生命技术有限公司;CY3标记山羊抗兔二抗(批号GB21303)购自武汉塞维尔生物科技有限公司;SOD-1抗体(批号ab51254)购自上海艾博抗贸易有限公司;TUNEL试剂盒(批号G1504)购自武汉赛维尔生物科技有限公司;β-actin抗体(批号TDY051)购自北京天德悦生物科技有限责任公司;BCA蛋白浓度试剂盒(批号AS1086)购自武汉阿斯本生物技术有限公司;其他化学分析试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.3 仪器

TB-215D型电子天平(美国DENVER INSTRUMENT公司);Agilent 1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司);UV-1600型紫外分光光度计(上海美谱达仪器有限公司);ND-100型超微量紫外可见分光光度计、HS-25型翘板摇床、DTH-100型干式恒温箱(杭州米欧仪器有限公司);DYY-6C型电泳仪(北京市六一仪器厂);9000F MarkII

型扫描仪(日本Canon公司);MIDI型组织切片数字扫描仪(匈牙利布达佩斯3DHISTECH公司);Cmax plus型酶标仪(瑞士Molecular公司);IX51型荧光倒置显微镜(日本奥林巴斯有限公司);QuantStudio 6 Flex型荧光定量PCR仪(美国生命技术公司);TC-XP-G型XP基因扩增仪(杭州博日科技有限公司);TGL-16c型台式离心机(上海安亭科学仪器厂);HSC-2015L型冷冻离心机(宁波新芝生物科技股份有限公司);IMS-20型制冰机(常熟市雪科电器有限公司);HH-W-600型水浴锅(金坛市江南仪器厂);GNP9160型恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司);SW-CJ-1FD型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司)。

2 方法

2.1 刺梨发酵液主要活性成分含量及体外抗氧化能力的测定

2.1.1 生药量校正 为准确比较刺梨原汁与刺梨发酵液的活性成分含量及抗氧化能力,所有体外测定均基于相同的生药量进行。根据合作方提供的特定批次生产工艺数据,获得发酵前刺梨原汁与发酵后刺梨发酵液的总质量,按公式($K=发酵后总质量/发酵前总质量$)计算质量校正因子(K)=0.83。该结果提示,发酵过程中总质量有所减少,使得单位体积发酵液所含生药量相对浓缩。为进一步将生药量基准统一至体积,本研究测定了刺梨原汁与刺梨发酵液的密度,分别为 $\rho_1=1.05\text{ g/cm}^3$ 及 $\rho_2=1.12\text{ g/cm}^3$,后根据公式 $[f=(K\times\rho_1)/\rho_2]$ 计算体积校正因子(f)=0.78,此校正因子被用于后续实验的体积校正,即在所有体外测定中,当刺梨原汁取用 V 体积时,刺梨发酵液则取用 $V\times0.78$ 体积,以确保两者基于相同的生药量进行比较。

2.1.2 刺梨发酵液主要活性成分含量的测定 分别测定刺梨原汁与刺梨发酵液中的主要活性成分:总酸含量参照国标GB 12456-2021^[17],通过酸碱滴定法测定;总酚含量参照团体标准T/GZCX 020-2022^[18],采用福林酚法测定;总黄酮含量参照团体标准T/GZCX 018-2022^[19],采用硝酸铝比色法测定。为精确测定维生素C含量,依据国标GB 5009.86-2016第一法^[20],使用高效液相色谱仪进行检测,在245 nm波长下直接测定样品中L(+)抗坏血酸与D(-)抗坏血酸的含量;同时,将样品中的L(+)脱氢抗坏血酸经L-半胱氨酸溶液还原为L(+)抗坏血酸,进而测定L(+)抗坏血酸总量。所有实验均设

置3个独立重复。

2.1.3 刺梨发酵液体外抗氧化能力的测定 根据相关文献报道的方法^[21]并稍作调整,测定1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl,DPPH)自由基清除率及Fe³⁺还原能力。准确称取19.8 mg DPPH试剂,用乙醇溶解并定容至50 mL,配制成储备液,临用前取10 mL DPPH储备液用乙醇稀释至100 mL,得到0.1 mmol/L的DPPH工作液;同时,准确称取5.0 mg L(+)抗坏血酸对照品,用1%偏磷酸溶液溶解并定容至100 mL棕色量瓶中,混匀,制得50 μg/mL L(+)抗坏血酸对照品溶液作为阳性对照,临用前配制并于4 °C避光保存。分别取2.0 mL刺梨原汁、1.56 mL刺梨发酵液或1.0 mL L(+)抗坏血酸对照品溶液于试管中,再向各试管中分别加入等体积的DPPH工作液,涡旋振荡混匀后,避光反应30 min,随即于517 nm波长下测定其吸光度(A)值,记为 A_1 。根据公式计算得到DPPH自由基清除率。

$$\text{DPPH自由基清除率} = 1 - (A_1 - A_2) / A_3$$

A_1 表示样品液与DPPH工作液混合后的 A 值; A_2 表示以等体积70%乙醇代替样品液(作为样品本底颜色对照)的 A 值; A_3 表示以等体积70%乙醇代替DPPH工作液(作为DPPH溶液初始浓度参比)的 A 值

分别精确移取2.5 mL刺梨原汁、1.95 mL刺梨发酵液或1.0 mL L(+)抗坏血酸对照品溶液于试管中,依次向各试管中加入等体积的10%铁氰化钾溶液与pH 6.6的磷酸盐缓冲液,混匀后于50 °C水浴中反应20 min。反应液经冰浴冷却至室温后,立即加入2.5 mL 10%三氯乙酸溶液,混匀,3 000 r/min离心10 min。取5 mL上清液,加入1 mL 0.1%三氯化铁溶液,混匀静置10 min后,于700 nm波长下测定 A 值。 A 值与样品的Fe³⁺还原能力呈正比, A 值越高,表明还原能力越强。上述所有实验均设置3个独立重复。

2.2 动物分组、造模与给药

将60只适应性喂养1周后的小鼠随机分为对照组、模型组、NAC(0.15 g/kg)组以及刺梨发酵液低、中、高剂量(5、10、20 mL/kg)组,每组10只。剂量的设置参考小鼠肝损伤研究中10 mL/kg刺梨醇化果醋的有效剂量^[22],并与7.83~10 mL/kg刺梨原汁的有效剂量范围相符^[14-15]。故本研究将10 mL/kg设为中剂量,同时设其0.5倍(5 mL/kg)和2.0倍(20 mL/kg)分别为低、高剂量以全面评估量

效关系, 该剂量范围经预实验证实可产生可量化的肝保护作用且未观察到明显毒性。各给药组 ig 相应药物, 对照组和模型组 ig 等体积生理盐水, 1 次/d, 连续给药 7 d。于末次给药 1 h 后, 除对照组 ip 等体积生理盐水外, 其余各组均 ip APAP 溶液 (400 mg/kg, 以生理盐水配制) 以诱导急性肝损伤模型。造模 12 h 后, 小鼠 ip 1% 戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 进行深度麻醉并处死, 眼球取血后立即分离出完整肝脏并进行拍照, 肝组织部分经 4% 多聚甲醛溶液固定用于组织学分析, 其余于-80 °C 冷冻保存。

2.3 肝脏指数的测定

取新鲜肝脏组织, 经生理盐水漂洗后称定质量, 计算肝脏指数。

$$\text{肝脏指数} = \text{肝质量}/\text{小鼠末次体质量}$$

2.4 血清生化指标检测

将血液样本于室温静置 1 h 后, 4 °C、3 500 r/min 离心 15 min, 分离血清, 按照试剂盒说明书测定 ALT 和 AST 活性。

2.5 氧化应激及炎症指标的测定

取存放于-80 °C 的小鼠肝脏组织, 加入生理盐水, 制成肝组织匀浆, 按照试剂盒说明书测定 SOD 活性及 MDA、GSH 水平; 取小鼠血清, 按照试剂盒说明书测定 TNF-α、IL-6、IL-1β 水平。

2.6 肝脏形态学及组织病理学观察

小鼠解剖后立即取其完整肝脏并拍照, 观察肝脏形态有无肉眼可见损伤及病变; 取存放于 4% 多聚甲醛溶液中的小鼠肝脏组织, 使用梯度乙醇进行脱水, 然后放入石蜡中包埋成块, 室温放置待石蜡凝固即可进行切片, 切片贴于载玻片上, 进行苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色, 在显微镜下观察肝脏病理组织变化, 并使用 MIDI 型组织切片数字扫描仪对组织切片进行扫描, 后使用 Image-Pro Plus 6.0 病理图像分析软件对切片总面积及坏死面积进行分析, 计算肝组织坏死面积分数, 对坏死面积进行量化, 从而更具体地描述肝组织病理学的变化。

2.7 Ly6G 免疫荧光染色分析

将小鼠肝组织石蜡切片置于二甲苯中浸泡 30 min, 经脱蜡和梯度乙醇脱水后, 进行水化复水。随后将切片浸入 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液 (pH 6.0) 中, 采用微波中高火加热进行抗原修复 5 min, 自然冷却至室温。用组化笔圈出组织区域以防液体溢散, PBS 清洗后, 用 5% 牛血清白蛋白按说明书推

荐比例稀释一抗, 滴加一抗 (1:200) 于切片上, 4 °C 孵育过夜。取出复温后, 以 PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min。随后滴加二抗 (1:100), 37 °C 避光孵育 40 min, 再用 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。最后滴加 DAPI 染液, 37 °C 染色 20 min, 抗荧光淬灭封片剂封片, 于荧光显微镜下观察并采集图像。采用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析 Ly6G 中性粒细胞蛋白阳性表达的累积 A 值, 以评估炎症浸润程度。

2.8 TUNEL 染色分析

将小鼠肝组织石蜡切片置于二甲苯中浸泡 30 min, 经脱蜡和梯度乙醇脱水后, 进行水化复水。取试剂盒中蛋白酶 K, 按 1:9 比例以 PBS 缓冲液稀释配制工作液, 37 °C 水浴孵育 20 min, 再用 PBS 清洗 3 次, 每次 5 min。随后配制破膜工作液, 室温孵育 10 min, PBS 同样清洗 3 次。按 2:5:50 的比例依次取试剂盒内 TdT 酶、CF488-dUTP 绿光标记反应液及 EB 平衡缓冲液, 混合配制成孵育液, 避光条件下反应 1 h。之后以 PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min, 滴加 DAPI 染液并于 37 °C 染色 20 min, 最后使用抗荧光淬灭封片剂封片, 在荧光显微镜下观察并采集图像。使用 Image-Pro Plus 6.0 病理图像分析软件对 TUNEL 染色阳性区域进行定量分析。

2.9 Western blotting 检测肝组织 Nrf2、HO-1、SOD-1 及 CAT 的蛋白表达

精确称取 50 mg 肝组织样本, 加入 1 mL 含 2% 十二烷基硫酸钠 (SDS) 的裂解缓冲液进行机械匀浆处理, 匀浆液于 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定总蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 分别加入 Nrf2 (1:2 000)、HO-1 (1:1 000)、SOD-1 (1:1 000)、CAT (1:1 000)、β-actin (1:10 000) 一抗, 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次后, 加入二抗 (1:10 000), 室温孵育 1 h, ECL 显影后通过 AlphaEaseFC 软件分析条带灰度值。

2.10 qRT-PCR 检测肝组织中 Nrf2、HO-1、SOD-1 及 CAT mRNA 的表达

取 20 mg 于-80 °C 冻存的肝组织样品, 经研磨后采用 TRIzol 法提取总 RNA, 测定其浓度并进行归一化处理。随后将 RNA 反转录为 cDNA, 反应程序: 25 °C、5 min, 42 °C、30 min, 85 °C、5 min。依据 SYBR Green 试剂盒操作指南, 将预混液与针对炎症基因的特异性引物混合进行扩增, 反应条

件: 95 °C 预变性 3 min, 之后进行 40 个循环, 包括 95 °C 变性 10 s、58 °C 退火 30 s 和 72 °C 延伸 30 s, 通过熔解曲线分析验证扩增产物的特异性。以 β -actin 作为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目标基因的相对表达水平, 所用引物由武汉科鹿生物科技有限责任公司合成, 序列信息见表 1。

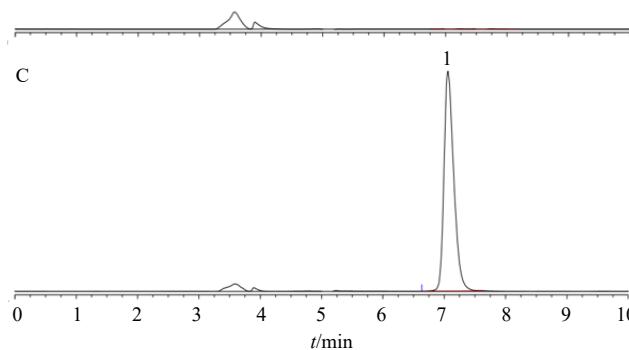
2.11 统计学分析

使用 SPSS 29.0 统计软件进行数据分析, 采用

表 1 引物序列
Table 1 Primers sequences

引物	序列 (5'-3')	长度/bp
β -actin	F: CTGAGAGGGAAATCGTGCCT R: CCACAGGATTCCATACCCAAGA	208
SOD-1	F: GAGACCTGGCAATGTGACTG R: CGCAATCCAATCACTCCACA	212
CAT	F: TACCTGTGAACTGTCCCTACCG R: GCGTTTCACATCTACAGCGC	176
Nrf2	F: GAGTCGCTTGCCTGGATATC R: GGGAACAGCGGTAGTATCAGC	219
HO-1	F: CACAGATGGCGTCACTTCGT R: TCCCTTACAGAGAGAAGGCCA	241

A



A-空白溶剂; B-混合对照品溶液; C-刺梨原汁; D-刺梨发酵液; 1-L(+)抗坏血酸; 2-D(+)抗坏血酸。
A-blank solvent; B-mixed reference solution; C-R. roxburghii juice; D-R. roxburghii fermentation broth; 1-L(+)ascorbic acid; 2-D(+)ascorbic acid.

图 1 刺梨原汁与刺梨发酵液 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of *R. roxburghii* juice and *R. roxburghii* fermentation broth

表 2 刺梨原汁与刺梨发酵液主要活性成分的含量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Contents of main active ingredients in *R. roxburghii* juice and *R. roxburghii* fermentation broth ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	总酸/(mg·mL ⁻¹)	总多酚/(mg·mL ⁻¹)	总黄酮/(mg·mL ⁻¹)	维生素C/(mg·mL ⁻¹)
刺梨原汁	11.21 \pm 1.32	3.38 \pm 1.21	1.91 \pm 0.42	13.44 \pm 2.85
刺梨发酵液	15.33 \pm 1.54*	6.50 \pm 1.46*	4.67 \pm 1.25*	8.42 \pm 1.14*

与刺梨原汁比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 表 3 同。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs *R. roxburghii* juice, same as table 3.

单因素方差分析方法 (One-way ANOVA) 比较组间差异, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 假定方差齐性时, 使用最小显著性差异法 (LSD) 进行检验, 方差不齐时使用 Dunnett's T3 进行检验, 图由 GraphPad Prism 10.0 制作。

3 结果

3.1 刺梨发酵液主要活性成分含量及体外抗氧化能力的测定结果

L(+)-抗坏血酸是自然界中具有完全生物活性的维生素 C 形式, 而 *D*(-)-抗坏血酸为其光学异构体, 在自然界中几乎不存在, 几乎不具备维生素 C 的生物活性, 若在测定中不加以区分, 将导致样品实际营养价值的误判。如图 1 所示, 刺梨原汁与刺梨发酵液的 HPLC 色谱图中均未检出 *D*(-)-抗坏血酸色谱峰, 表明两者中的维生素 C 几乎全部以生物活性最高的 *L*(+)-抗坏血酸形式存在。因此, 本研究以 *L*(+)-抗坏血酸总量表示样品中维生素 C 的含量。由表 2、3 可知, 与刺梨原汁相比, 刺梨发酵液中的总酸、总酚及总黄酮质量浓度均显著升高 ($P < 0.05$), 而维生素 C 质量浓度显著下降 ($P < 0.05$);

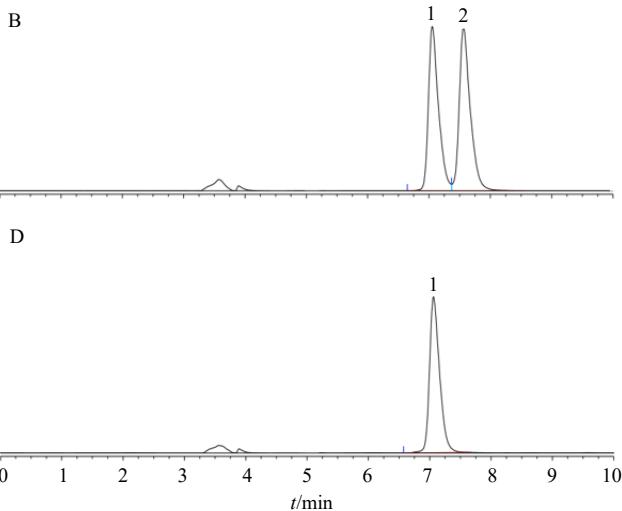


表3 刺梨原汁与刺梨发酵液体外抗氧化能力

 $(\bar{x} \pm s, n=3)$ Table 3 *In vitro* antioxidant capacity of *R. roxburghii* juice and *R. roxburghii* fermentation broth ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品	DPPH自由基清除率/%	Fe ³⁺ 还原能力
维生素C	95.2±1.57	1.02±0.02
刺梨原汁	65.3±2.15	0.52±0.02
刺梨发酵液	88.7±1.84**	0.85±0.03**

在体外抗氧化能力方面, 刺梨发酵液对DPPH自由基的清除能力及对Fe³⁺的还原能力均显著增强($P<0.01$)。以上结果提示, 尽管发酵导致维生素C含量下降, 但其他抗氧化活性成分(总酸、总酚与总黄酮)在发酵过程中得到进一步释放与富集。刺梨原汁中主要抗氧化活性成分总质量浓度为29.94 mg/mL, 发酵后提高至34.92 mg/mL, 活性成分总量的增加可能是其体外抗氧化能力提升的重要原因。

3.2 刺梨发酵液对DILI小鼠体质量、肝脏质量及肝脏指数的影响

如表4所示, 各组小鼠初始体质量无显著性差异, 表明分组均衡, 具有可比性。与对照组比较, 模型组小鼠末次体质量显著降低($P<0.001$), 肝脏

质量及肝脏指数均显著增加($P<0.001$), 表明APAP导致小鼠肝脏损伤, 显著抑制了小鼠的生长, 并导致肝脏的肿大, 提示DILI模型建立成功。干预治疗后发现, 与模型组比较, NAC与刺梨发酵液中、高剂量组均能显著提升小鼠末次体质量($P<0.01$ 、 0.001), 低剂量组具有降低体质量趋势, 但差异无统计学意义; NAC及刺梨发酵各剂量组均能显著降低小鼠肝脏质量及肝脏指数($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), 表明刺梨发酵液能改善肝脏肿大, 对DILI具有明确的保护效应。

3.3 刺梨发酵液对DILI小鼠血清中ALT和AST活性的影响

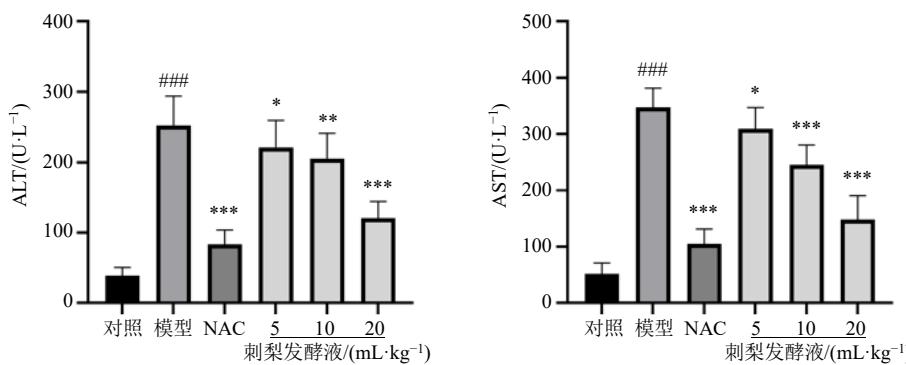
如图2所示, 与对照组比较, 模型组小鼠血清中ALT和AST活性明显升高($P<0.001$), 提示APAP在小鼠体内的暴露可导致肝细胞膜通透性增加, 从而使血清中转氨酶水平增加, 诱发肝脏损伤, 表示模型建立成功。与模型组比较, 各给药组均能显著降低血清中ALT和AST活性($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), 表明刺梨发酵液可有效抑制APAP引起的转氨酶升高, 减轻肝细胞损伤, 从而发挥保肝作用, 且其作用呈剂量相关性。

表4 刺梨发酵液对DILI小鼠体质量、肝脏质量及肝脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量	初始体质量/g	末次体质量/g	肝脏质量/g	肝脏指数/%
对照	—	28.01±1.34	36.96±1.35	1.65±0.11	4.46±0.19
模型	—	28.06±1.48	33.34±1.98###	1.85±0.17###	5.55±0.35###
NAC	0.15 g·kg ⁻¹	28.09±1.12	36.25±1.45***	1.67±0.13***	4.60±0.24***
刺梨发酵液	5 mL·kg ⁻¹	27.97±1.23	34.63±1.65	1.80±0.19*	5.14±0.31*
	10 mL·kg ⁻¹	28.13±1.34	35.82±1.58**	1.74±0.16**	4.88±0.27**
	20 mL·kg ⁻¹	28.53±1.49	36.49±0.72***	1.70±0.11***	4.64±0.21***

与对照组比较: ### $P<0.001$; 与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$, 下表同。

$P<0.001$ vs control group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs model group, same as below tables.



与对照组比较: ### $P<0.001$; 与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$, 下图同。

$P<0.001$ vs control group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs model group, same as below figures.

图2 刺梨发酵液对DILI小鼠血清中ALT和AST活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Fig. 2 Effect of *R. roxburghii* fermentation broth on activities of ALT and AST in serum of DILI mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

3.4 刺梨发酵液对 DILI 小鼠氧化应激及炎症指标的影响

如图 3 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肝脏组织中 MDA 水平显著升高 ($P<0.001$), 而 GSH 水平和 SOD 活性显著降低 ($P<0.001$), 表明 APAP 干预导致肝脏代谢功能紊乱, 诱发显著氧化应激反应, 加剧肝细胞损伤, 提示造模成功; 与模型组比较, 各给药组肝脏组织中 GSH 水平和 SOD 活性均显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), MDA 水平则显

著下降 ($P<0.05$ 、 0.001), 表明刺梨发酵液能够有效增强肝脏抗氧化能力, 减轻脂质过氧化损伤。与对照组比较, 模型组小鼠血清中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平显著升高 ($P<0.001$), 表明 APAP 在引发氧化应激的同时亦激活全身性炎症反应, 共同参与肝损伤进程; 与模型组比较, 各给药组均能显著降低上述炎症因子水平 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), 表明刺梨发酵液具有协同抗炎与抗氧化作用, 从而有效缓解 APAP 所致的肝损伤。

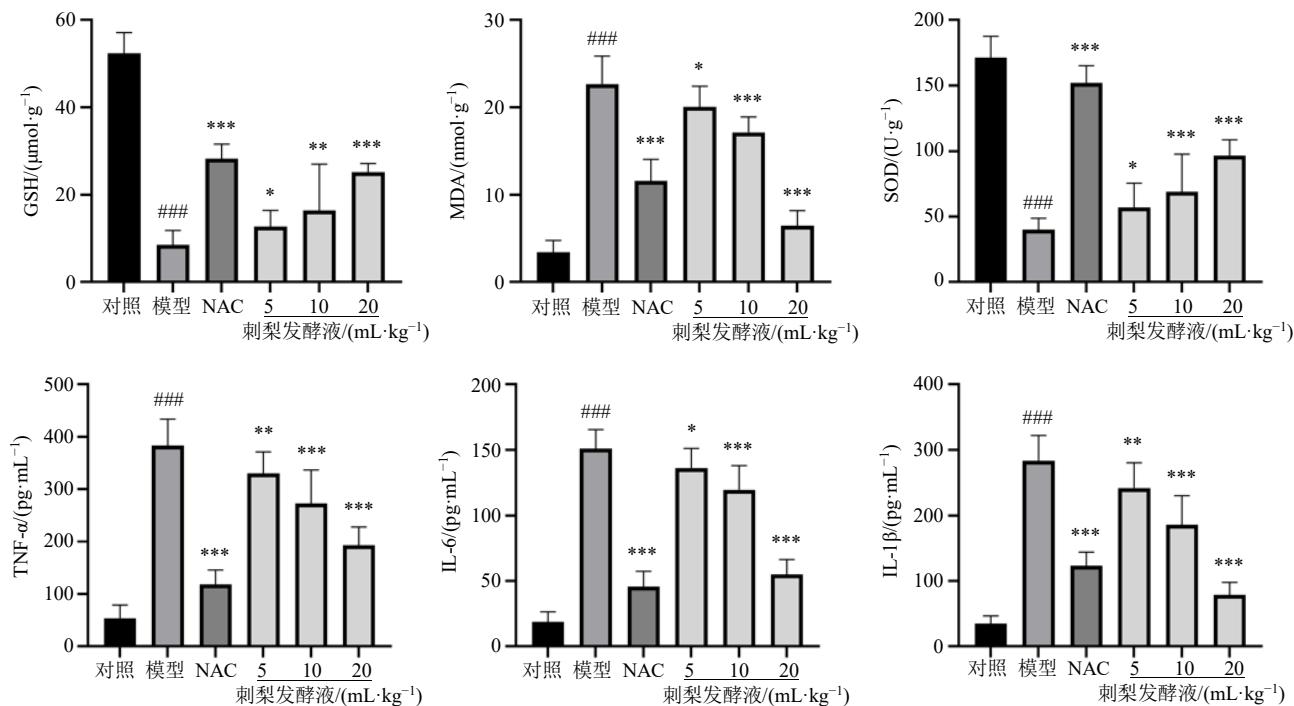


图 3 刺梨发酵液对 DILI 小鼠氧化应激及炎症指标的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 3 Effect of *R. roxburghii* fermentation broth on oxidative stress and inflammatory indicators of DILI mice
($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

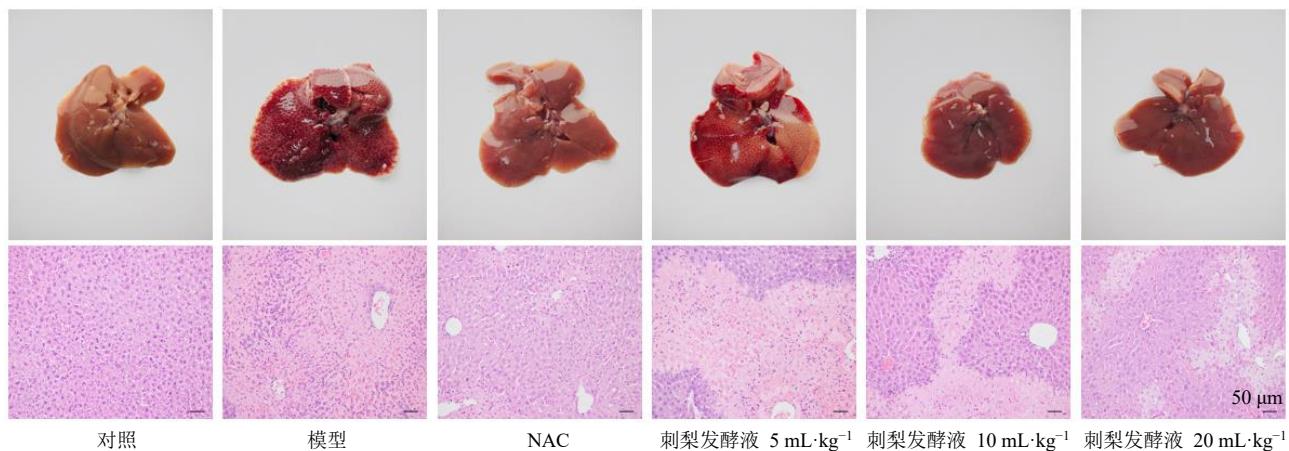
3.5 刺梨发酵液对 DILI 小鼠肝脏形态及组织病理学的影响

如图 4 所示, 对照组小鼠肝脏呈淡粉红色, 被膜完整, 质地柔软, 形态结构正常; 模型组肝脏外观发生显著改变, 颜色异常, 质地变硬, 表面可见明显暗红色出血灶, 提示急性肝损伤模型建立成功。刺梨发酵液干预后, 肝脏外观呈剂量相关性地改善, 具体表现: 低剂量组肝脏颜色略深, 表面可见少量斑点, 但整体形态趋于正常, 出血灶面积较模型组明显减少; 中剂量组肝脏色泽略暗, 表面斑点基本消失, 出血现象显著改善; 高剂量组与 NAC 组的肝脏颜色、形态与对照组相近, 质地柔软, 未见明显病理学改变。肝组织 HE 染色结果显示, 对

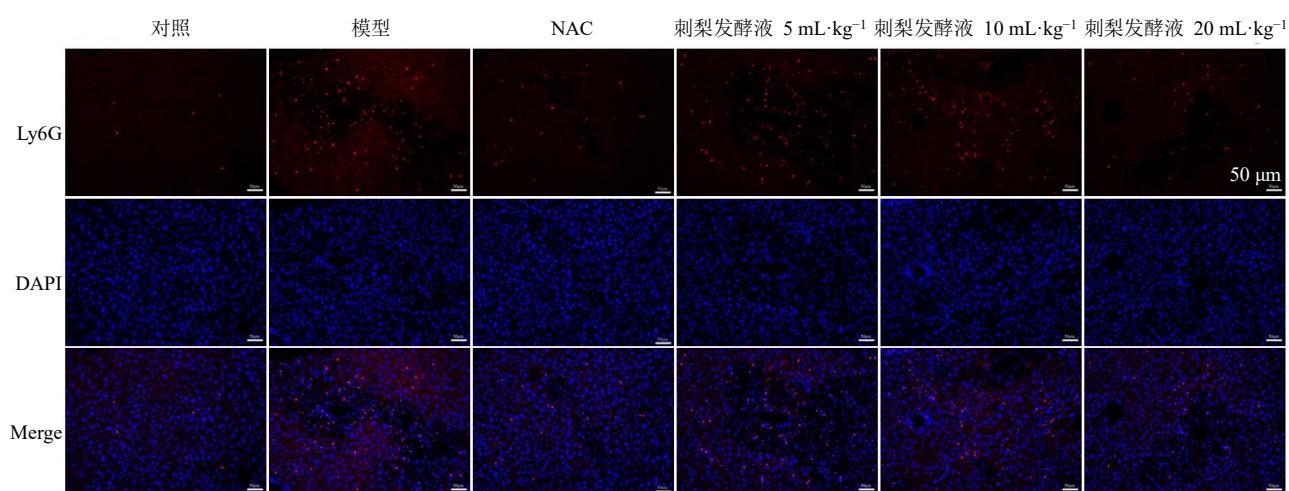
照组肝小叶结构完整, 肝细胞呈放射状规则排列, 无炎性浸润及坏死区域; 模型组呈现典型肝损伤特征, 包括肝索排列紊乱、大量炎性细胞浸润及广泛肝组织坏死; 与模型组相比, 各给药组均能显著减轻上述病理损伤。如表 5 所示, 定量分析结果显示, 与模型组比较, NAC 及刺梨发酵液各剂量组均能减少肝组织坏死面积 ($P<0.01$ 、 0.001), 从形态计量学层面证明刺梨发酵液可有效缓解 APAP 诱导的肝组织病理损伤。

3.6 刺梨发酵液对 DILI 小鼠肝组织 Ly6G 中性粒细胞浸润的影响

如图 5 和表 6 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肝组织中 Ly6G 阳性信号 (红色荧光) 的染色面

图4 刺梨发酵液对 DILI 小鼠肝脏形态及组织病理学的影响 (HE, $\times 200$)Fig. 4 Effect of *R. roxburghii* fermentation broth on liver morphology and histopathology in DILI mice (HE, $\times 200$)表5 刺梨发酵液对 DILI 小鼠肝组织坏死面积的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)Table 5 Effect of *R. roxburghii* fermentation broth on necrotic area of liver tissue in DILI mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	剂量	坏死面积/mm ²	总面积/mm ²	坏死面积分数/%
对照	—	0.00±0.00	33.34±2.45	0.00±0.00
模型	—	37.98±2.51	45.66±2.75	83.60±10.44
NAC	0.15 g·kg ⁻¹	7.41±2.67***	35.56±1.19***	20.97±8.18***
刺梨发酵液	5 mL·kg ⁻¹	18.38±3.38**	41.44±2.39*	44.28±7.25***
	10 mL·kg ⁻¹	16.57±2.67***	38.52±1.18***	42.98±6.28***
	20 mL·kg ⁻¹	11.15±1.62***	36.61±1.09***	30.43±4.12***

图5 刺梨发酵液对 DILI 小鼠肝组织 Ly6G 中性粒细胞浸润的影响 (免疫荧光, $\times 200$)Fig. 5 Effect of *R. roxburghii* fermentation broth on Ly6G neutrophil infiltration in liver tissue of DILI mice (immunofluorescence, $\times 200$)

积及累积 A 值显著增加 ($P < 0.001$), 表明在 APAP 诱导的肝损伤过程中有大量中性粒细胞向肝组织内浸润。与模型组比较, 各给药组小鼠肝组织中 Ly6G 阳性荧光信号面积及累积 A 值均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.001), 且刺梨发酵液高剂量组的抑制效果尤为明显。表明刺梨发酵液能够有效抑制中性粒细胞向肝

脏炎症部位的趋化与浸润, 这可能是其缓解 APAP 所致肝损伤的重要免疫调节机制之一。

3.7 刺梨发酵液对 DILI 小鼠肝细胞凋亡的影响

如图 6 和表 7 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肝组织中 TUNEL 染色阳性细胞数显著增加 ($P < 0.001$), 表明 APAP 诱导后出现大量肝细胞凋亡,

表6 刺梨发酵液对 DILI 小鼠肝组织 LyG6 中性粒细胞蛋白阳性表达的累积 A 值的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Effect of *R. roxburghii* fermentation broth on cumulative optical density values of LyG6 neutrophil protein positive expression in liver tissue of DILI mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量	累积 A 值
对照	—	108.32 \pm 12.47
模型	—	1 638.40 \pm 57.28 ^{###}
NAC	0.15 g·kg ⁻¹	375.57 \pm 56.37 ^{***}
刺梨发酵液	5 mL·kg ⁻¹	1 377.23 \pm 196.19 [*]
	10 mL·kg ⁻¹	921.85 \pm 60.54 ^{***}
	20 mL·kg ⁻¹	652.31 \pm 76.34 ^{***}

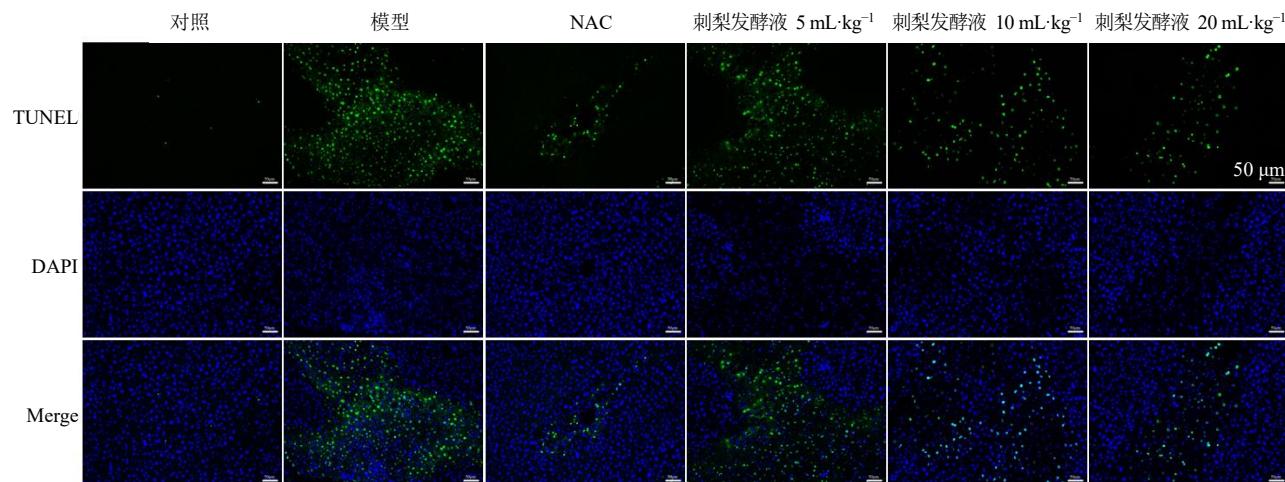


图6 刺梨发酵液对 DILI 小鼠肝细胞凋亡的影响 (TUNEL, $\times 200$)

Fig. 6 Effect of *R. roxburghii* fermentation broth on hepatocyte apoptosis in DILI mice (TUNEL, $\times 200$)

表7 刺梨发酵液对 DILI 小鼠肝细胞凋亡阳性率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Effect of *R. roxburghii* fermentation broth on positive rate of liver cell apoptosis in DILI mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量	凋亡阳性率/%
对照	—	1.02 \pm 0.13
模型	—	45.95 \pm 2.87 ^{###}
NAC	0.15 g·kg ⁻¹	6.77 \pm 0.56 ^{***}
刺梨发酵液	5 mL·kg ⁻¹	39.21 \pm 2.43 [*]
	10 mL·kg ⁻¹	24.80 \pm 3.32 ^{***}
	20 mL·kg ⁻¹	12.48 \pm 2.11 ^{***}

ARE 信号通路的活化, 从而导致下游抗氧化酶表达下调, 削弱肝脏的抗氧化防御能力。与模型组比较, NAC 及刺梨发酵液各剂量组小鼠肝组织中 Nrf2、HO-1、SOD-1 及 CAT 的蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.001), 且呈剂量相关性。表明刺梨发酵液能够有效激活 Nrf2/ARE 信号通路, 促进下游抗

提示凋亡过程在肝损伤进展中起重要作用。与模型组比较, 各给药组小鼠肝组织 TUNEL 阳性细胞率均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.001), 且高剂量刺梨发酵液组的凋亡抑制效果尤为明显。表明刺梨发酵液能够有效抑制 APAP 引发的肝细胞过度凋亡, 这可能是其发挥肝保护作用的重要细胞学机制。

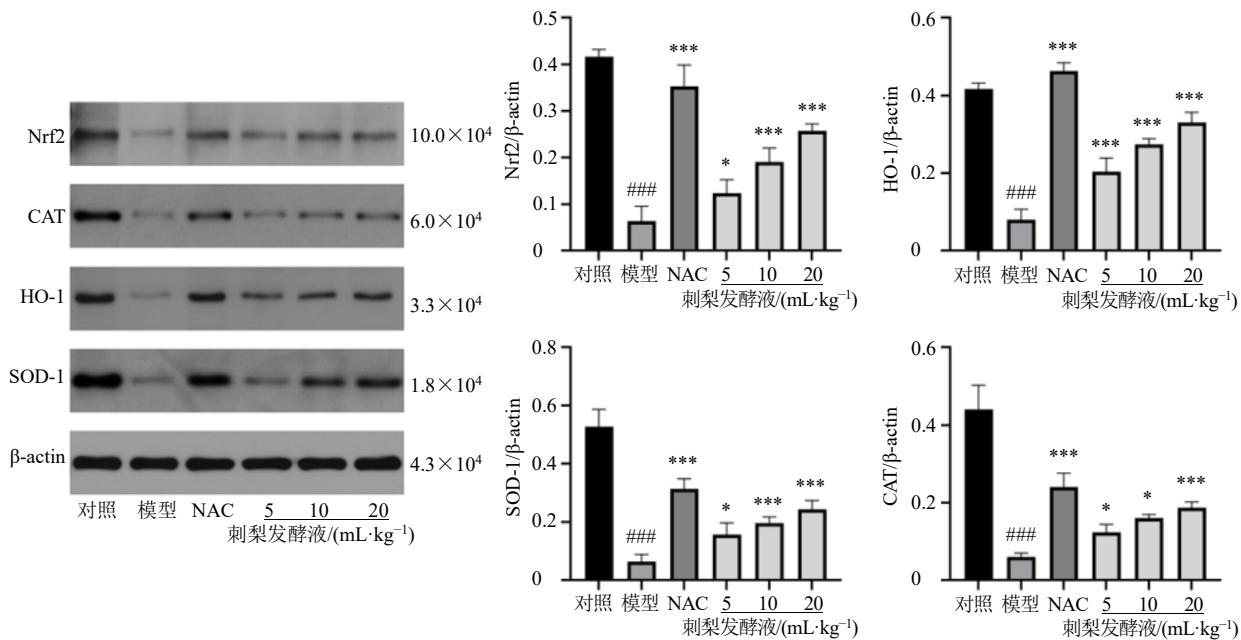
3.8 刺梨发酵液对 DILI 小鼠肝组织 Nrf2、HO-1、SOD-1 及 CAT 蛋白表达的影响

如图 7 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肝组织中 Nrf2、HO-1、SOD-1 及 CAT 的蛋白表达水平均显著下降 ($P < 0.001$), 提示 APAP 可抑制 Nrf2/

氧化蛋白的表达, 增强机体内源性抗氧化防御能力, 从而缓解 APAP 引起的氧化应激性肝损伤。

3.9 刺梨发酵液对 DILI 小鼠肝组织 Nrf2、HO-1、SOD-1 及 CAT mRNA 表达的影响

如表 8 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肝组织中 Nrf2、HO-1、SOD-1 及 CAT 的 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.001$), 表明 APAP 不仅影响抗氧化蛋白的合成, 更在转录水平上抑制了 Nrf2/ARE 信号通路及其下游基因的表达。与模型组比较, NAC 及刺梨发酵液各剂量组均能显著上调小鼠肝组织中 Nrf2、HO-1、SOD-1 和 CAT 的 mRNA 表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 且呈剂量相关性。该结果从转录层面进一步证实, 刺梨发酵液可通过激活 Nrf2/ARE 信号通路, 上调关键抗氧化基因的表达, 进而增强肝脏的抗氧化能力, 缓解 APAP 所致的肝损伤。

图7 刺梨发酵液对DILI小鼠肝组织Nrf2、HO-1、SOD-1及CAT蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 7 Effect of *R. roxburghii* fermentation broth on protein expressions of Nrf2, HO-1, SOD-1 and CAT in liver tissues of DILI mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)表8 刺梨发酵液对DILI小鼠肝组织Nrf2、HO-1、SOD-1及CAT mRNA表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 8 Effect of *R. roxburghii* fermentation broth on Nrf2, HO-1, SOD-1 and CAT mRNA expressions in liver tissue of DILI mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量	mRNA相对表达量			
		Nrf2	HO-1	SOD-1	CAT
对照	—	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型	—	0.37±0.03###	0.21±0.03###	0.26±0.07###	0.30±0.04###
NAC	0.15 g·kg⁻¹	0.81±0.06***	0.69±0.04***	0.71±0.05***	0.75±0.06***
刺梨发酵液	5 mL·kg⁻¹	0.47±0.05*	0.37±0.06***	0.39±0.03*	0.43±0.05*
	10 mL·kg⁻¹	0.62±0.04***	0.54±0.05***	0.46±0.06**	0.55±0.06***
	20 mL·kg⁻¹	0.72±0.07***	0.63±0.04***	0.61±0.03***	0.70±0.04***

4 讨论

中药的多组分特性常导致其活性成分溶出度不足、生物利用度受限,部分药材还可能伴随潜在的毒性风险。为优化其药学性能,现代加工技术被用于增强功效组分的释放、促进肠道吸收并降低毒副成分含量^[23-24]。与传统溶剂提取法相比,微生物发酵技术能够定向转化药材基质,显著提高多酚、黄酮、皂苷等活性成分的产率,扩大治疗窗口,并通过转化或分解有毒成分以减少不良反应,从而在提高有效成分提取率的同时降低药材用量^[25-26]。现代研究进一步表明,作为生物体内高效的特异性催化剂,酶系统驱动着代谢途径的精确调控。在药食同源基质的微生物发酵过程中,所产生的复合酶系不仅具有营养强化作用,还具备氧化还原调节功能。此

类发酵产物中的多酚类衍生物可通过电子转移机制淬灭ROS,有效清除自由基,减轻氧化损伤^[27]。以刺梨原汁的自然发酵为例,乳酸菌等微生物以糖类为底物代谢产生大量乳酸及少量其他有机酸,导致发酵液pH下降和总酸度上升。同时,微生物代谢产生的酯酶、β-葡萄糖苷酶等关键酶活性增强,能够将结合态的多酚和黄酮糖苷水解为游离态,从而使总酚和总黄酮的检测含量显著增加。然而,维生素C在水相发酵环境中稳定性较差,易因氧化降解、作为抗氧化剂被消耗或被微生物利用而导致含量明显降低^[28-29]。本研究结果显示,刺梨原汁经自然发酵后,总酸、总酚及总黄酮含量均显著升高,而维生素C含量显著降低,与文献报道一致。尽管维生素C有所损失,但其他抗氧化活性成分的释放与

富集总量显著增加,这可能是刺梨发酵液在体外实验中表现出较高DPPH自由基清除能力与 Fe^{3+} 还原能力的重要原因,并为其体内保肝作用提供了物质基础。

APAP过量可诱发肝细胞损伤,其机制涉及线粒体功能障碍、氧化应激及继发性炎症反应,炎症反应伴随的肝细胞水肿和炎性细胞浸润会导致肝脏重量增加和肝脏指数升高^[30]。本研究中,刺梨发酵液能显著降低APAP模型小鼠的肝脏质量及肝脏指数,提示其可有效缓解肝脏病理水肿和炎性浸润。血清转氨酶ALT与AST是评估肝功能的重要指标,这2种酶主要存在于肝细胞内,当肝细胞受损导致膜通透性改变时,会大量释放入血,使其血清转氨酶活性显著升高,因此可作为肝损伤的敏感生物标志物^[31]。本研究显示刺梨发酵液能显著降低APAP诱导的ALT、AST活性的升高,与张娟等^[32]报道的黄芩苷保肝作用类似,表明刺梨发酵液可能通过调控转氨酶活性发挥肝保护作用。研究报道,APAP肝损伤模型能有效模拟临床DILI的氧化应激和脂质过氧化等特征,被广泛用于肝保护药物机制研究^[33]。目前临床常用解毒剂NAC存在治疗时间窗短、不良反应多等局限^[5]。同时,当肝细胞受损时,体内抗氧化酶如SOD、CAT活性和GSH水平降低,无法有效清除药物代谢过程中产生的ROS,造成ROS积累并诱发氧化应激^[34]。作为脂质过氧化产物,MDA可将ROS转化为活性物质,进一步加剧ROS的效应^[35]。本研究证明,刺梨发酵液可显著恢复肝组织中GSH水平,提高SOD活性并降低MDA水平,提示其通过调节氧化应激通路发挥保肝作用,且因其食源性特点而具备高安全性,有望成为NAC的潜在替代药物。

DILI常伴随无菌性炎症反应,已有研究证实其机制与高迁移率族蛋白B1(high mobility group box-1 protein, HMGB-1)/Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)信号通路激活有关,该通路可促进核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)核转位,上调TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等促炎因子表达,引发炎症级联反应,加剧肝细胞损伤^[36-37]。本研究结果表明,刺梨发酵液能显著降低DILI小鼠血清中上述炎症因子水平,显示其具有抗炎作用。氧化应激是机体在有害刺激下产生的自由基超过清除能力时出现的氧化-抗氧化失衡状态,与炎症反应相互促进,构成肝损伤的重要病理基础^[38]。Nrf2/ARE通路是细胞抗

氧化防御的核心机制,在氧化应激状态下,Nrf2与Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1(Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)解离后入核,与ARE结合激活下游抗氧化基因(如HO-1、SOD-1、CAT)的表达,从而维持氧化平衡^[39-40]。先天免疫系统在APAP诱发的急性肝损伤进程中发挥关键的促进作用,APAP可引起肝细胞损伤、凋亡及坏死,并在此过程中释放多种损伤相关分子模式(damage-associated molecular patterns, DAMPs),这些分子可被炎症小体及各类免疫细胞识别,肝脏常驻库普弗细胞(Kupffer cell)通过其表面TLR感知DAMPs后,不仅自身激活,还会招募更多巨噬细胞向肝组织浸润^[41]。活化的巨噬细胞进一步释放大量促炎细胞因子与趋化因子,募集中性粒细胞等免疫细胞至肝脏局部,从而加剧炎症反应并扩大肝组织损伤范围^[42]。陶芸等^[43]和郑静^[44]分别报道了刺梨多糖和纳米药物通过调节Nrf2通路及炎症细胞浸润发挥保肝作用。本研究通过Western blotting和qRT-PCR实验证实,刺梨发酵液能显著上调肝组织中Nrf2及其下游靶基因HO-1、SOD-1和CAT的表达。这些结果提示,激活Nrf2/ARE信号通路是刺梨发酵液发挥保肝作用的关键机制之一。然而,需要指出的是,目前的证据仍属于相关性范畴。为了确立Nrf2通路激活与肝保护之间的因果关系,最理想的实验是在未来研究中引入Nrf2基因敲除小鼠或使用Nrf2特异性抑制剂进行干预。若能证明在Nrf2功能被特异性抑制后,刺梨发酵液的保护效应被显著削弱或完全取消,则可最终确认其依赖性。尽管如此,本研究的结果与大量已有文献的结论高度吻合,这些研究已确证了Nrf2通路在对抗APAP肝毒性中的核心地位^[11,40]。此外,刺梨相关成分通过此通路发挥保护作用亦有报道支持^[43]。本研究中,刺梨发酵液在激活Nrf2通路的同时,伴随着氧化应激标志物(MDA)的下降和抗氧化物质(GSH、SOD)的回升,以及下游效应分子(HO-1、SOD-1、CAT)的同步上调,这一完整的逻辑链条为刺梨发酵液通过激活Nrf2通路缓解氧化应激的假说提供了强有力的支持性证据,后续研究将围绕通路的因果性验证深入开展。本研究表明,刺梨发酵液可显著上调Nrf2及其下游HO-1、SOD-1、CAT的mRNA及蛋白表达水平,同时减少肝组织中性粒细胞浸润及肝细胞凋亡。这些发现与相关文献报道结果类似,共同阐明了其保护DILI小鼠肝损伤的作用。

本研究采用了一种预防性给药模型来评估刺梨发酵液对 APAP 所致肝损伤的保护作用。尽管临幊上对 APAP 中毒的处理属于治疗性干预, 但预防性模型在学术研究中被广泛采用, 其首要目的在于深入阐明药物的潜在保护机制, 而非直接模拟临幊急救场景^[3,13,32]。通过提前给药, 可以更清晰地评估药物在体内蓄积后, 其对 Nrf2/ARE 抗氧化通路的基础激活能力、以及对后续急性肝毒性的最大耐受和抵抗潜力。本研究结果证实, 刺梨发酵液能显著增强肝脏的抗氧化储备并减轻氧化应激与炎症损伤, 为其开发为一种具有预防潜力的肝保护剂或保健食品提供了重要的临幊前依据。未来的研究将采用治疗性干预模型, 如在 APAP 造模后给药, 以进一步验证刺梨发酵液作为治疗药物的转化价值。

综上, 刺梨发酵液通过自然发酵富集了总酸、总酚与总黄酮等活性成分, 在体外表现出强抗氧化活性; 在体内通过激活 Nrf2/ARE 信号通路, 剂量相关性地减轻 APAP 诱导的氧化应激、炎症反应及肝细胞损伤。刺梨发酵液是一种具有潜力用于预防药物性肝损伤的天然发酵型产品。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- Hassan A, Fontana R J. The diagnosis and management of idiosyncratic drug-induced liver injury [J]. *Liver Int*, 2019, 39(1): 31-41.
- McGill M R, Staggs V S, Sharpe M R, et al. Serum mitochondrial biomarkers and damage-associated molecular patterns are higher in acetaminophen overdose patients with poor outcome [J]. *Hepatology*, 2014, 60(4): 1336-1345.
- 杨宇莎, 时京珍, 雷钟, 等. 血人參乙酸乙酯部位对 APAP 诱导小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. 时珍国医国药, 2018, 29(4): 786-789.
- Rhodes K, Braakhuis A. Performance and side effects of supplementation with *N*-acetylcysteine: A systematic review and Meta-analysis [J]. *Sports Med*, 2017, 47(8): 1619-1636.
- Yan M Z, Huo Y Z, Yin S T, et al. Mechanisms of acetaminophen-induced liver injury and its implications for therapeutic interventions [J]. *Redox Biol*, 2018, 17: 274-283.
- 孙武燕, 张娟, 张炫, 等. 基于 JNK 信号通路和线粒体氧化应激研究儿茶素拮抗对乙酰氨基酚诱导肝损伤的作用机制 [J]. 中草药, 2024, 55(8): 2589-2600.
- 季嘉城, 袁敏艳, 张硕, 等. 基于网络药理学方法和分子对接技术探讨刺梨治疗高血脂症的作用机制 [J]. 中国药理学通报, 2022, 38(10): 1572-1578.
- 屈青松, 李智勋, 周晴, 等. 发酵中药的研究进展及其“发酵配伍”理论探索 [J]. 中草药, 2023, 54(7): 2262-2273.
- Yi X X, Zhang S, Meng D, et al. Optimization of *Rosa roxburghii* Tratt pomace fermentation process and the effects of mono- and mixed culture fermentation on its chemical composition [J]. *Front Nutr*, 2024, 11: 1494678.
- 彭欢, 黄子健, 吴涛, 等. 刺梨自然发酵制酒过程中化学成分、抗氧化活性及优势菌的变化 [J]. 现代食品科技, 2023, 39(2): 205-213.
- Zhang D D. The Nrf2-Keap1-ARE signaling pathway: The regulation and dual function of Nrf2 in cancer [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 13(11): 1623-1626.
- Tonelli C, Chio I I C, Tuveson D A. Transcriptional regulation by Nrf2 [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2018, 29(17): 1727-1745.
- 马璐, 吕佳鑫, 杨璐铭, 等. 刺梨汁对砷诱导的大鼠肝脏 S-腺苷甲硫氨酸消耗及肝损伤的改善作用 [J]. 环境与职业医学, 2023, 40(12): 1387-1394.
- 于丽伟, 王聪智, 何蓉蓉. 刺梨果汁对拘束负荷诱发小鼠肝损伤的保护作用 [J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29(5): 730-734.
- Xu Y Y, Yu C, Zeng Q B, et al. Assessing the potential value of *Rosa roxburghii* Tratt in arsenic-induced liver damage based on elemental imbalance and oxidative damage [J]. *Environ Geochem Health*, 2021, 43(3): 1165-1175.
- Tian W S, Zhao J, Kim M K, et al. *Veronica persica* ameliorates acetaminophen-induced murine hepatotoxicity via attenuating oxidative stress and inflammation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 169: 115898.
- 食品中总酸的测定 [S]. GB 12456-2021. 2021: 1-3.
- 刺梨及其制品中总酚含量的测定 [S]. T/GZCX 020-2022. 2022: 1-6.
- 刺梨及其制品中总黄酮含量的测定 [S]. T/GZCX 018-2022. 2022: 1-7.
- 食品中抗坏血酸的测定 [S]. GB 5009.86-2016. 2016: 1-4.
- 刘晓燕, 谢丹, 马立志, 等. 刺梨果渣发酵前后活性成分及抗氧化能力的比较研究 [J]. 食品科技, 2021, 46(2): 16-24.
- 文永岚, 王瑜, 万科, 等. 刺梨酵素化果醋对小鼠急性酒精性肝损伤的改善作用 [J]. 现代食品科技, 2023, 39(4): 26-32.
- Ren J L, Yang L, Qiu S, et al. Efficacy evaluation, active ingredients, and multitarget exploration of herbal medicine

- [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2023, 34(3): 146-157.
- [24] Yuan D, Guo Y J, Pu F Y, et al. Opportunities and challenges in enhancing the bioavailability and bioactivity of dietary flavonoids: A novel delivery system perspective [J]. *Food Chem*, 2024, 430: 137115.
- [25] Xue H K, Li P C, Bian J Y, et al. Extraction, purification, structure, modification, and biological activity of traditional Chinese medicine polysaccharides: A review [J]. *Front Nutr*, 2022, 9: 1005181.
- [26] Yang H Y, Han L, Lin Y Q, et al. Probiotic fermentation of herbal medicine: Progress, challenges, and opportunities [J]. *Am J Chin Med*, 2023, 51(5): 1105-1126.
- [27] Randazzo W, Corona O, Guarcello R, et al. Development of new non-dairy beverages from Mediterranean fruit juices fermented with water kefir microorganisms [J]. *Food Microbiol*, 2016, 54: 40-51.
- [28] Uriho A, Omedi J O, Chen C, et al. Screening of LAB strains and their co-culture fermentation with *Bacillus subtilis* of Cili fruit substrate: Impact on γ -aminobutyric acid enrichment, key enzyme activities, bioactive and functional properties [J]. *Front Nutr*, 2025, 12: 1622745.
- [29] 罗婧文, 龙明秀, 王辉, 等. 刺梨发酵优势菌种分离鉴定及其营养品质分析 [J]. 粮食与油脂, 2025, 38(2): 133-138.
- [30] 王帆, 朱哿瑞, 刘成海, 等. 对乙酰氨基酚致药物性肝损伤的分子机制 [J]. 肝脏, 2021, 26(8): 939-942.
- [31] Louvet A, Mathurin P. Alcoholic liver disease: Mechanisms of injury and targeted treatment [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2015, 12(4): 231-242.
- [32] 张娟, 孙武燕, 王春宝, 等. 基于 mTOR 信号通路研究黄芩苷对乙酰氨基酚诱导肝损伤后肝修复作用 [J]. 中草药, 2024, 55(13): 4399-4410.
- [33] McGill M R, Jaeschke H. Animal models of drug-induced liver injury [J]. *Biochim Biophys Acta BBA Mol Basis Dis*, 2019, 1865(5): 1031-1039.
- [34] Liu H, Guo H R, Jian Z J, et al. Copper induces oxidative stress and apoptosis in the mouse liver [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 1359164.
- [35] 郭瑶雪, 邓晔, 李春, 等. 异烟肼致线粒体损伤引起药物性肝损伤研究进展 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2015, 20(3): 356-360.
- [36] Petrović A, Bogojević D, Korać A, et al. Oxidative stress-dependent contribution of HMGB1 to the interplay between apoptosis and autophagy in diabetic rat liver [J]. *J Physiol Biochem*, 2017, 73(4): 511-521.
- [37] Khedr L H, Rahmo R M, Farag D B, et al. Crocin attenuates cisplatin-induced hepatotoxicity via TLR4/NF- κ B p50 signaling and BAMBI modulation of TGF- β activity: Involvement of miRNA-9 and miRNA-29 [J]. *Food Chem Toxicol*, 2020, 140: 111307.
- [38] 丁美灵, 高铭, 包懿文, 等. 基于 p62-Keap1-Nrf2 信号通路探讨荆防颗粒对酒精性肝损伤小鼠的保护作用 [J]. 中草药, 2024, 55(19): 6588-6598.
- [39] 石学汇, 宁守斌, 杨全龙, 等. Nrf2 转录因子在炎症性肠病及其并发症中的研究进展 [J]. 空军军医大学学报, 2023, 14(5): 476-480.
- [40] Zhao N, Guo F F, Xie K Q, et al. Targeting Nrf-2 is a promising intervention approach for the prevention of ethanol-induced liver disease [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(17): 3143-3157.
- [41] Gong L H, Liao L, Dai X Y, et al. The dual role of immune response in acetaminophen hepatotoxicity: Implication for immune pharmacological targets [J]. *Toxicol Lett*, 2021, 351: 37-52.
- [42] Monti-Rocha R, Cramer A, Gaio Leite P, et al. SOCS₂ is critical for the balancing of immune response and oxidative stress protecting against acetaminophen-induced acute liver injury [J]. *Front Immunol*, 2019, 9: 3134.
- [43] 陶芸, 谭书明, 谢国芳, 等. 基于 Nrf2/CYP2E1 通路探讨刺梨多糖对酒精性肝损伤小鼠的保护机制 [J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(20): 78-85.
- [44] 郑静. 负载雷公藤红素的仿生纳米药物改善 APAP 诱导的肝损伤效应及机制研究 [D]. 宜昌: 三峡大学, 2022.

[责任编辑 李亚楠]