

## 海参蒸煮液干粉对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的预防作用

蔡维震<sup>1</sup>, 张天骥<sup>1</sup>, 王庆慧<sup>1</sup>, 丁宁<sup>2</sup>, 胡炜<sup>3</sup>, 王静凤<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 中国海洋大学 山东青岛 266000

<sup>2</sup> 青岛墨尔文中学 山东青岛 266000

<sup>3</sup> 山东好当家海洋发展股份有限公司 山东威海 264200

**摘要** 目的:探究海参蒸煮液干粉(SCCL)对小鼠急性肝损伤的预防作用。方法:采用腹腔注射体积分数为 5%的 CCl<sub>4</sub> 玉米油溶液,建立急性肝损伤小鼠模型,检测 SCCL 对小鼠血清、肝脏中抗氧化酶、氧化产物的影响;H&E 和 8-OH dG 免疫组化染色观察小鼠肝脏组织病理学变化;qRT-PCR 法测定肝组织 *Nrf2*、*Keap-1*、*HO-1*、*NQO-1* mRNA 的表达情况。结果:相较于模型组,SCCL 组小鼠的血清、肝脏中抗氧化酶活力显著上升,蛋白质、脂质氧化产物含量显著减少;小鼠肝组织形态明显改善;*Nrf2*、*Keap-1*、*HO-1*、*NQO-1* mRNA 表达显著增加。结论:SCCL 通过增强肝损伤小鼠的抗氧化能力,抑制机体氧化应激,改善了 CCl<sub>4</sub> 诱导的急性肝损伤。

**关键词** 海参蒸煮液干粉;急性肝损伤;氧化应激

文章编号 1009-7848(2022)07-0115-08 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2022.07.012

肝脏是机体最重要的解毒代谢器官之一,在蛋白质、脂质、糖类等物质的代谢中起着重要作用,被称为“物质代谢的中枢”。数据估计,中国超过五分之一的人群受到肝脏疾病的困扰,使得肝病成为我国发病率和死亡率的主要影响因素之一<sup>[1]</sup>。急性肝损伤与多种肝脏疾病的发生密切相关;急性肝损伤引发的肝功能衰竭病死率占肝病患者的 60%~80%<sup>[2]</sup>,严重危害人类健康。临床药物甘草酸制剂、水飞蓟素等在治疗肝脏疾病的同时,伴有水肿、呕吐、腹泻等一定副作用。迫切需要寻找一种具有保肝、护肝且无毒副作用的活性物质。

海参蒸煮液 (Sea cucumber cooking liquid, SCCL) 是海参蒸煮灭酶过程中产生的大量墨绿色液体。前期研究发现,海参蒸煮液中含有大量的多糖、多肽、脂质和皂苷等多种活性物质,具有抗氧化、抗肿瘤、降血糖等功效。海参蒸煮液中多糖和可溶性蛋白含量分别为 0.546、0.535 g/L<sup>[3]</sup>。若直接将液体倒掉,则会造成环境污染和资源浪费。有研究指出每吨海参蒸煮液可提取海参活性成分 12 kg 左右,价值高达 20 多万元;全国每年排放的

海参蒸煮液的经济价值估计在 100 亿元以上<sup>[4]</sup>。翟二林等<sup>[5]</sup>发现海参蒸煮液中皂苷可以显著抑制 S180 皮下肿瘤的生长,表现出良好的免疫活性。李超峰<sup>[6]</sup>研究表明海参蒸煮液中酸性黏多糖能够显著抑制 HeLa 细胞增殖。然而,目前尚未见海参蒸煮液在保肝、护肝方面的研究报道。本研究为实现海参蒸煮液的高值化利用,通过经典的 CCl<sub>4</sub> 急性肝损伤小鼠模型,探究 SCCL 对肝损伤小鼠的预防保护作用,为保肝、护肝食品的开发提供理论基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物及原料 海参蒸煮液干粉,山东好当家海洋发展股份有限公司。4~5 周龄雄性 ICR 小鼠,SPF 级,体质量 18~22 g,济南朋悦实验动物繁育有限公司。动物合格证号:SCXK (鲁) 20190003。动物饲养环境温度为(23±1) °C,湿度为 40%~50%,12 h 光/12 h 暗节律交替。

1.1.2 试剂与药品 水飞蓟宾胶囊,天津天士力圣特制药有限公司;金龙鱼玉米油,益海嘉里食品营销有限公司;谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、谷胱甘肽 (GSH)、

收稿日期: 2021-07-12

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC0311203)

作者简介: 蔡维震(1997—),男,硕士生

通信作者: 王静凤 E-mail: jfwang@ouc.edu.cn

8-异前列腺素(8-iso-PG)、蛋白质羰基试剂盒(PCO),南京建成生物工程研究所;M-MLV逆转录酶,美国 Promega 公司;引物,上海生工生物工程有限公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒,北京索莱宝科技有限公司;其它试剂均为国产分析纯级。

1.1.3 仪器与设备 GL-20M 型高速冷冻离心机,上海卢湘仪离心机仪器公司;680 型酶标仪,美国 Bio-Rad 公司;Light Cycler480 实时荧光定量聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)仪,瑞士 Roche 公司;Mili-Q Synthesis 超纯水系统,美国 Milipore 公司;马弗炉,郑州仪器设备有限公司;凯氏定氮仪,德国福斯公司。

## 1.2 方法

1.2.1 动物分组及模型建立 雄性 ICR 小鼠适应性饲养 3~5 d,随机分 5 组,分别为:正常组、模型组、阳性药组(水飞蓟素 30 mg/kg)、SCCL 低剂量组(50 mg/kg)、SCCL 高剂量组(200 mg/kg),每组 6 只。预灌胃 15 d,末次灌胃 2 h 后,正常组腹腔注射花生油,其余各组腹腔注射体积分数 5%的 CCl<sub>4</sub> 玉米油溶液建立急性肝损伤模型,注射剂量为 10 mL/kg·bw;禁食不禁水 20 h 后,麻醉摘眼球取血、脱颈椎处死小鼠。血清分离后-20 °C 冰箱保存,用于生化指标测定;肝脏摘取后拍照,部分肝脏固定,部分肝脏保存于-80 °C 冰箱备用。

1.2.2 血清 AST、ALT 等生化指标测定 血清

ALT、AST 等使用普通试剂盒按相应试剂盒说明书测定。

1.2.3 肝脏 SOD、MDA、GSH-Px、GSH 等生化指标测定 使用生理盐水制备质量浓度为 0.1 g/mL 的肝脏匀浆液,6 000 r/min,4 °C 离心 20 min,收集上清液。用普通商品试剂盒测定 SOD、GSH-Px 等活性和 MDA 含量,Elisa 试剂盒检测 8-iso-PG 含量。以牛血清白蛋白(BSA)为标准品,肝脏蛋白浓度 BCA 试剂盒测定肝脏蛋白浓度。

1.2.4 肝脏组织形态学观察 肝脏组织使用 4% 多聚甲醛固定 24 h,酒精脱水,石蜡包埋,制备 5 μm 切片,苏木精-伊红(Hematoxylin-Eosin, H & E)染色,BH-2 型光学显微镜观察组织形态。

1.2.5 qRT-PCR 法检测 Keap1、Nrf2 等 mRNA 的表达 使用 TRIzol 试剂提取肝脏总 RNA, NanoDrop-2000 微量分光光度计测定 RNA 浓度和纯度。采用 M-MLV 将 1 μg RNA 逆转录成 cDNA,并以此为模版进行 qRT-PCR 反应。反应总体积 25 μL:cDNA 样品 5 μL,各基因对应引物 0.15 μL,DEPC 水 7.2 μL,SYBR 荧光染料 12.5 μL。反应参数:95 °C 预变性 10 min,95 °C 变性 15 s,60 °C 退火 20 s,72 °C 沿伸 30 s,35 个循环。以 β-actin 为内参,采用目的基因与内参基因比值来表征目的基因相对表达量,引物序列见表 1。

表 1 目的基因引物序列

Table 1 The primer sequence of target genes

目的基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
<i>Nrf2</i>	5'-CACATCCAGACAGACACCAGT-3'	5'-CTTGTTGGGAATGTGGGCA-3'
<i>Keap-1</i>	5'-CGCTGTGCTTAGTCACCGT-3'	5'-GCATGGGGTTCTCTGATGACA-3'
<i>CYP2E1</i>	5'-CCGACCTGTTCTTTGCAGGA-3'	5'-GGCTTGGCCCAATAACCCTG-3'
<i>HO-1</i>	5'-ACAGAAGAGGCTAAGACCCG-3'	5'-GACGAAGTGACCCATCTGT-3'
<i>NQO-1</i>	5'-ACGACAACGGTCTTTCCAG-3'	5'-ATGACGTTTCATGTCCTCCG-3'
<i>β-actin</i>	5'-GGCTGTATTCCCTCCATCG-3'	5'-GTTGGGGTTTGTCTCTCCC-3'

1.2.6 数据分析 实验数据采用 SPSS 23.0 软件进行单因素方差分析,并同时用 LSD 法进行组间差异比较,以  $P < 0.05$  为显著性差异, $P < 0.01$  为极显著差异;实验数据表示为“平均值±标准差”( $\bar{x} \pm s$ )。

## 2 结果与分析

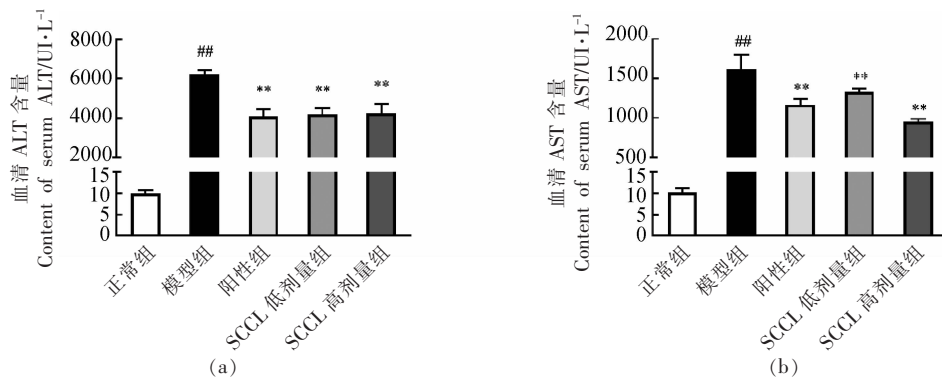
### 2.1 SCCL 基本成分分析

经过实验测得 SCCL 中含有较多的脂质和蛋白质,质量分数分别为 38.01%,35.34%;其次为糖类和灰分,分别为 11.36%,10.17%。

### 2.2 SCCL 对急性肝损伤小鼠血清 AST、ALT 酶活力的改善作用

血清 AST、ALT 活性反映了肝脏损伤程度,为临床上判断肝脏损伤的重要手段<sup>[7]</sup>。如图 1 所示,相较于正常组,模型组小鼠血清 AST、ALT 酶活力

极显著升高 ( $P<0.01$ ),SCCL-H 组血清 ALT、AST 活力相较于模型组分别降低了 40.96% 和 41.09% ( $P<0.01$ ),并呈现剂量依赖关系(ALT 酶活力)。上述结果说明,SCCL 可以在一定程度上减小肝细胞损伤,降低转氨酶的释放。



注: #. 与正常组比较,  $P<0.05$ ; ##. 与正常组比较,  $P<0.01$ ; \*. 与模型组比较,  $P<0.05$ ; \*\*. 与模型组比较,  $P<0.01$ ;下同。

图 1 SCCL 对血清 ALT、AST 酶活性的影响

Fig.1 Effect of SCCL on serum ALT, AST levels in acute liver injury mice

### 2.3 SCCL 对急性肝损伤小鼠肝脏组织形态学的改善作用

由图 2 肝组织 HE 染色(200 倍)可知,正常组肝细胞排列致密,肝索以肝门静脉为中心,呈放射状排列,细胞核正常无固缩现象。模型组肝细胞以肝门静脉为中心出现大面积坏死现象,肝细胞边界丧失,肝索断裂,核固缩严重,细胞质大量流失;SCCL-H 组肝细胞损伤明显减轻,无大面积坏死

现象( $P<0.01$ ),肝索排列整齐,SCCL-L 组肝组织形态与模型组相比有一定程度改善,而与 SCCL-H 组相比效果稍差。氧化应激与肝脏疾病的发生密切相关,DNA 的氧化损伤可能为肝病的共同发病机制<sup>[8]</sup>。8-羟基脱氧鸟苷(8-OH dG)为 DNA 氧化损伤的标志产物,在肝脏的积累量可反映出肝细胞 DNA 氧化损伤的程度。由图 3 肝组织 8-OH dG 免疫组化染色(200 倍)可知,模型组较正常组

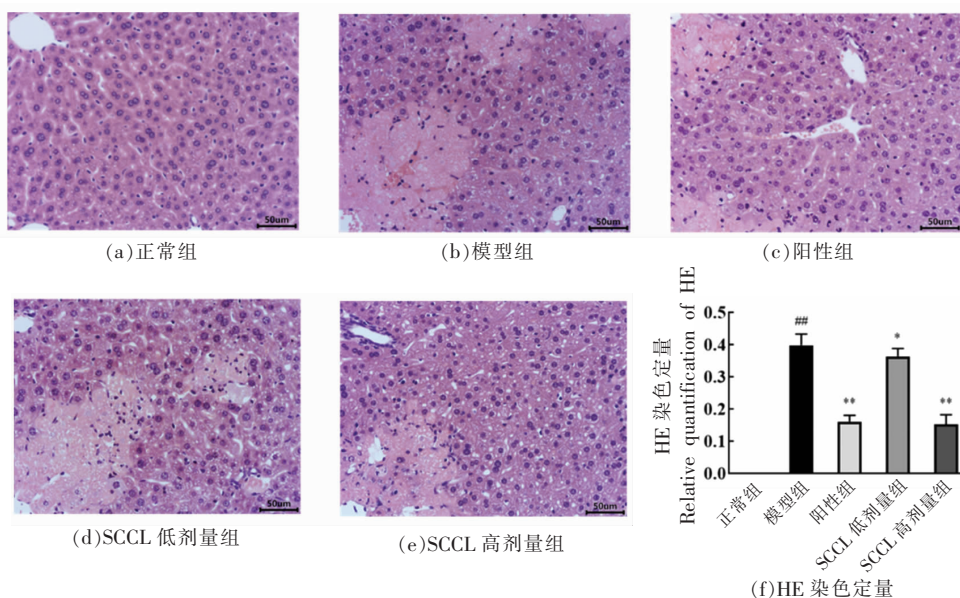


图 2 SCCL 对肝细胞组织形态学的影响

Fig.2 Effect of SCCL on hepatocyte histomorphology in acute liver injury mice



阳性表达显著增加( $P<0.01$ ),SCCL 干预组较模型组阳性表达面积显著减少( $P<0.01$ );提示 SCCL 可显著减少 DNA 的氧化损伤。

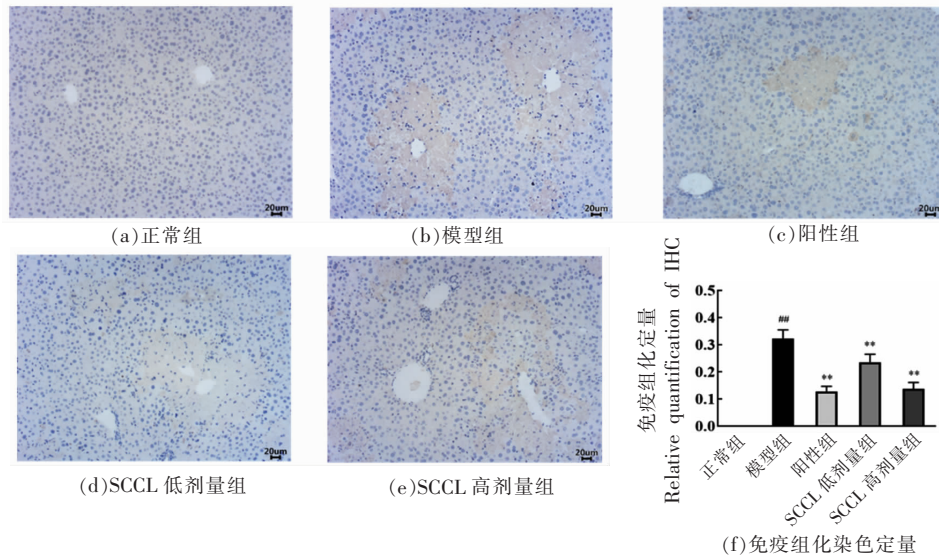


图 3 SCCL 对 DNA 氧化产物 8-OH dG 表达的影响

Fig.3 Effect of SCCL on the expression of 8-OH dG, the product of DNA oxidative in acute liver injury mice

2.4 SCCL 对急性肝损伤小鼠血清、肝脏氧化应激相关指标的改善作用

MDA、8-异前列腺素, 蛋白质羰基分别为脂

质和蛋白质的过氧化产物,肝脏、血清中过氧化产物的积累量可以反映机体抗氧化的能力<sup>[9]</sup>。如图 4 所示,模型组的 MDA、8-iso-PG、PCO 含量较正常

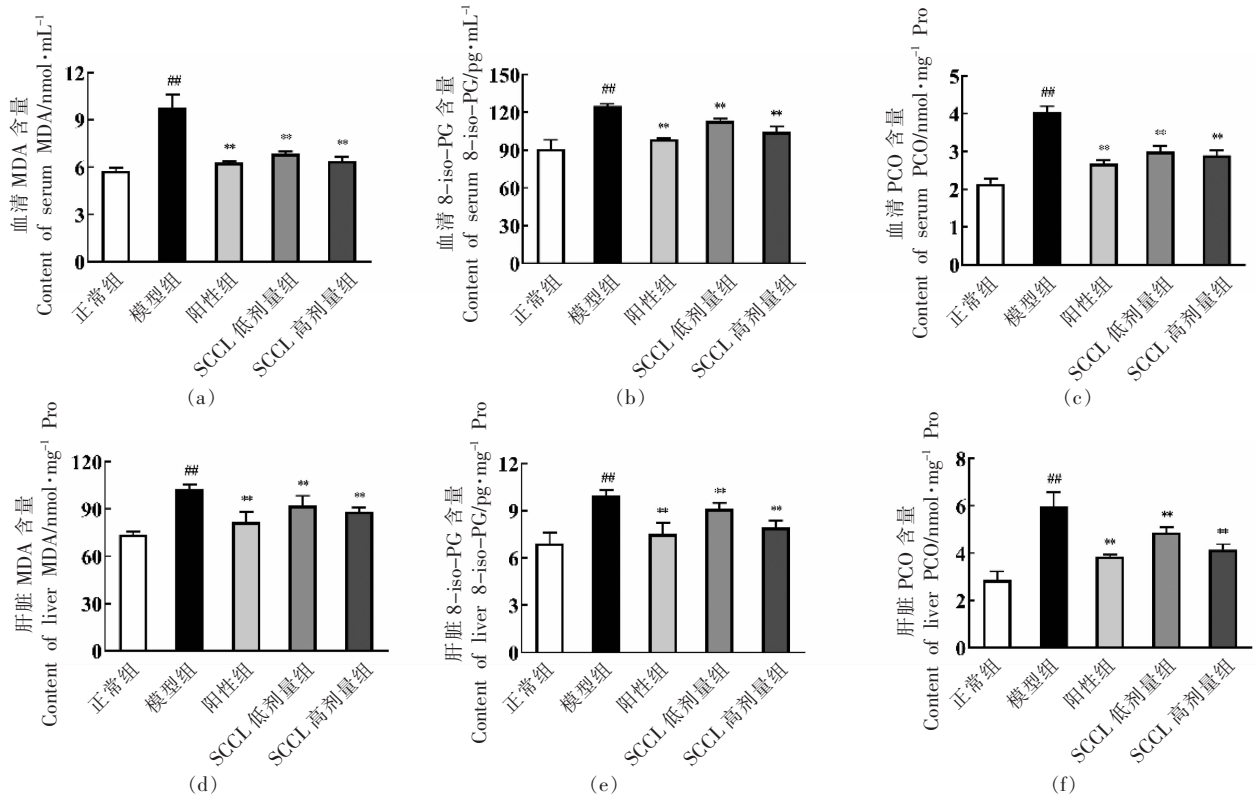


图 4 SCCL 对血清、肝脏氧化产物含量的影响

Fig.4 Effect of SCCL on serum and liver oxidation products in mice with liver injury induced by CCl<sub>4</sub>

组极显著升高( $P<0.01$ ),说明  $CCL_4$  进入机体后会  
引起多种生物大分子物质发生氧化反应,导致机  
体组织、器官损伤。SCCL 预防后,血清、肝脏  
MDA、8-iso-PG、PCO 含量相较于模型组均极显著  
下降( $P<0.01$ );结果提示 SCCL 干预可改善氧化产  
物在体内的累积。

抗氧化酶是清除机体自由基的重要物质,它

能对自由基诱发的氧化反应起保护作用<sup>[10]</sup>。由图 5  
可以得出,模型组血清、肝脏中 SOD、GSH-Px、  
GSH 含量较正常组极显著降低( $P<0.01$ ),SCCL 组  
血清、肝脏中其含量相较于模型组都有不同程  
度的升高( $P<0.01$ );提示 SCCL 可提高机体抗氧化  
物的酶活力,增强机体清除自由基的能力,减小  $CCL_4$   
对机体造成的氧化损伤。

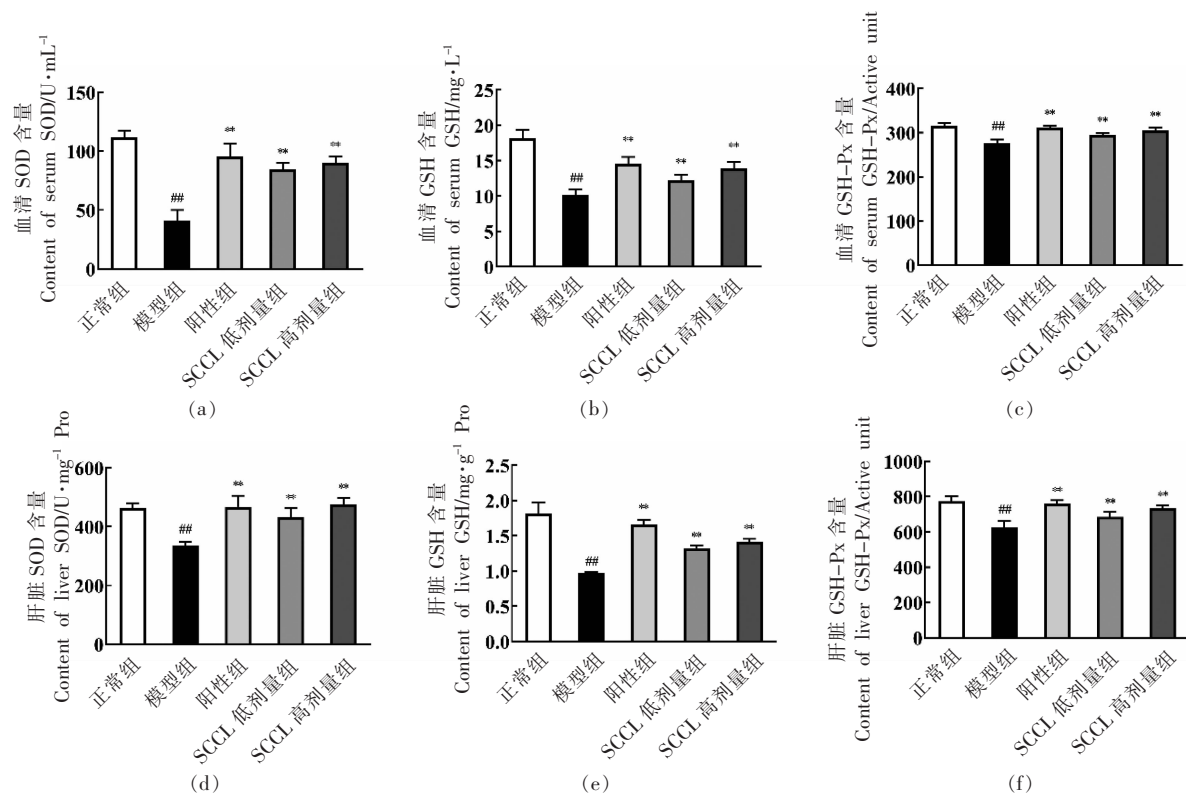


图 5 SCCL 对血清、肝脏抗氧化酶、底物含量的影响

Fig.5 Effect of SCCL on the content of serum, liver antioxidant enzymes and substrates in acute liver injury mice

### 2.5 SCCL 对急性肝损伤小鼠肝脏 Nrf2 通路相关基因表达的影响

Nrf2 是细胞抵御氧化应激的转录因子,在活  
性氧的刺激下进入细胞核,与抗氧化反应元件相  
互作用,并诱导下游 II 相解毒酶和抗氧化酶的表  
达,起到保护细胞的作用<sup>[11]</sup>。SCCL 对肝脏 *Nrf2*、  
*HO-1* mRNA 表达影响如图 6 所示。与正常组相  
比,模型组 *Nrf2*、*Keap-1* mRNA 表达极显著降低  
( $P<0.01$ )。SCCL-H 组 *Nrf2*、*Keap-1* mRNA 表达较  
模型组分别上升了 255%和 222%( $P<0.01$ )。*HO-1*、  
*NQO-1* 为重要的 II 相解毒酶,模型组其 mRNA  
表达较正常组极显著下降 ( $P<0.01$ );SCCL 干预

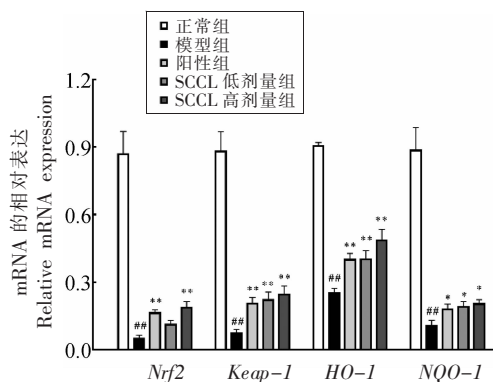


图 6 SCCL 对肝脏 Nrf2 通路相关基因表达的影响

Fig.6 Effect of SCCL on the expression of genes related to liver Nrf2 pathway in acute liver injury mice

后,*HO-1*、*NQO-1* mRNA 表达较模型组显著增加了 90% 和 85% ( $P < 0.01$ )。说明 SCCL 能通过激活 Nrf-2/HO-1 通路改善  $\text{CCl}_4$  诱导的肝脏氧化应激。

### 3 讨论

急性肝损伤是大量肝细胞在较短时间内受到外界因素影响而引起的肝脏急性炎症性疾病,包括各种急性病毒性肝炎、急性缺血性肝损伤及急性毒性肝损伤。 $\text{CCl}_4$  诱导的肝脏急性损伤是经典的急性肝损伤模型,经常被用来模拟急性病毒性肝炎、急性毒性肝损伤等疾病<sup>[12]</sup>。 $\text{CCl}_4$  诱导肝脏损伤的机制目前公认为:在细胞色素 P450 作用下, $\text{CCl}_4$  会被代谢产生  $\text{CCl}_3\cdot$  和  $\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$  引发链式过氧化反应,导致细胞膜和细胞器膜的脂质过氧化,造成膜结构和功能失常;并且氧自由基还与肝脏蛋白、DNA 等结合造成后者功能丧失,最终导致肝细胞损伤、坏死<sup>[13]</sup>。

AST 和 ALT 主要分布在心肌、肝脏、肾脏等组织中,正常血清中含量较低;然而当肝细胞受到损伤时,细胞膜通透性增加,导致细胞浆中的 AST、ALT 释放进入血液,其含量会在血液中显著增加;血清中 AST 和 ALT 的浓度可直接反映肝脏功能状态和肝损伤程度<sup>[14-15]</sup>。在本研究中,SCCL 干预后明显降低了血清中 AST、ALT 的活性,这可能与 SCCL 中含有部分多糖有关。滕来宾<sup>[16]</sup>研究发现,海参岩藻聚糖硫酸酯可以减轻酒精性肝损伤小鼠模型中血清 AST、ALT 水平,改善小鼠肝脏损伤,与本研究结果一致。

研究证明,氧自由基对生物膜脂质的过氧化作用是引起肝细胞病理损伤的原因之一。 $\text{CCl}_4$  公认的致肝损伤机制是由于其生成的自由基以及诱导产生的过氧化反应导致。 $\text{CCl}_4$  经酶代谢产生的自由基可以与细胞膜、细胞器膜的磷脂分子结合,导致脂质过氧化反应,生成脂质过氧化产物 MDA、8-iso-PG 等<sup>[17-18]</sup>。本研究发现,SCCL 显著降低了血清和肝脏中两者的累积;与此同时,研究发现蛋白质的过氧化产物 PCO 含量在 SCCL 组显著降低,PCO 形成是多种氨基酸在蛋白质的氧化修饰过程中的早期标志,其含量反应了蛋白质损伤程度<sup>[9]</sup>。SOD、GSH-Px 在机体抗氧化防御体系中起着重要作用,SOD 可以清除体内超氧阴离子,使细

胞内氧自由基处于低水平状态,维持细胞内的氧化还原反应平衡;GSH-Px 可以特异性的催化 GSH 对过氧化物的还原反应,减轻脂质过氧化物对细胞膜造成的破坏<sup>[19-20]</sup>。综上,SCCL 可显著提高血清和肝脏中 SOD、GSH-Px、GSH 水平,降低 MDA、8-iso-PG、PCO 等氧化产物的累积;提示 SCCL 对肝脏的预防作用可能是通过调节机体的氧化应激,来减轻  $\text{CCl}_4$  对肝脏造成的损伤。

进一步,检测了 SCCL 对肝脏 Nrf2/HO-1 通路的影响,Nrf2/HO-1 通路是机体保护正常细胞抵抗氧化应激,以及外源性损伤的抗氧化信号通路<sup>[21]</sup>。当肝细胞受到  $\text{CCl}_4$  刺激后,Nrf2 磷酸化入核,与核内的抗氧化元件 ARE 的 DNA 序列结合,启动 ARE 调控的下游 II 相解毒酶及抗氧化酶基因的表达,从而抵抗氧化应激引起的损伤。周金鑫等<sup>[22]</sup>研究发现高浓度的  $\text{CCl}_4$  处理会导致大量肝细胞坏死及毒物的侵袭,导致 Nrf2 及其下游抗氧化酶基因的表达能力明显减弱。本研究结果显示在 5% 的  $\text{CCl}_4$  染毒下,小鼠肝脏中 Nrf2、Keap1、HO-1、NQO-1 等基因表达显著下调,SCCL 干预组 Nrf2、Keap1、HO-1、NQO-1 等基因表达显著上调,机体 SOD、GSH-Px 等抗氧化酶活力显著提高,提示 SCCL 可促进 Nrf2 解偶联入核,显著提高机体解毒能力,增强机体的抗氧化能力,这与左玮等<sup>[23]</sup>的结果基本一致。总之,本研究提示 SCCL 保护肝脏的机制可能是其所含有的多糖<sup>[24]</sup>、EPA<sup>[25]</sup> 等物质协同作用促进 Nrf2 入核,增强肝组织中 HO-1、NQO-1 表达,从而抵抗氧化应激引起的损伤。

### 4 结论

本研究表明 SCCL 能够增强机体抗氧化能力,减少肝细胞氧化损伤,从而预防  $\text{CCl}_4$  导致的急性肝损伤;进一步证实了 SCCL 是通过 Nrf2-Keap1-ARE 信号通路来发挥保肝护肝的作用。

### 参 考 文 献

- [1] XIAO J, WANG F, WONG N K, et al. Global liver disease burdens and research trends: Analysis from a Chinese perspective[J]. J Hepatol, 2019, 71 (1): 212-221.

- [2] 胡凤霞. 乙肝相关慢加亚急性肝衰竭患者外周血 Th17、Treg 及 CTL 细胞的变化及临床意义的初步探讨[D]. 苏州: 苏州大学, 2012.  
HU F X. Changes and clinical significance of Th17, Treg and CTL cells in peripheral blood of patients with chronic and subacute liver failure associated with hepatitis B[D]. Suzhou: Soochow University, 2012.
- [3] 高芮. 海参加工液中蛋白及多糖的提取工艺[D]. 大连: 大连理工大学, 2019.  
GAO R. Extraction process of polysaccharide and protein from waste liquor of processing sea cucumber [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2019.
- [4] 孙明河. 信息集萃[J]. 渔业现代化, 2010, 37(3): 74.  
SUN M H. Information collection [J]. Fishery Modernization, 2010, 37(3): 74.
- [5] 翟二林, 迟翠翠, 韩伟, 等. 海参加工废液中皂苷的提取及其抗肿瘤作用的研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(23): 128–132.  
ZHAI E L, CHI C C, HAN W, et al. Extraction and *in vivo* anti-tumor activity of saponins from sea cucumber waste [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(23): 128–132.
- [6] 李超峰. 海参加工工艺评价及其加工废弃液活性物质研究[D]. 青岛: 中国科学院研究生院 (海洋研究所), 2013.  
LI C F. Evaluation of the processing techniques and studies on active substances from offal of sea cucumber[D]. Qingdao: The Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2013.
- [7] WANG H, ZHOU H, ZHANG Q R, et al. Inhibition of IRAK4 kinase activity improves ethanol-induced liver injury in mice[J]. J Hepatol, 2020, 73(6): 1470–1481.
- [8] QU H, GAO X, CHENG C L, et al. Hepatoprotection mechanism against alcohol-induced liver injury *in vivo* and structural characterization of *Pinus koraiensis* pine nut polysaccharide[J]. Int J Biol Macromol, 2020, 154(1): 1007–1021.
- [9] ZHANG X M, FENG J, SU S F, et al. *Camellia nitidissima* hepatoprotective effects of aqueous ethanol extract against CCl<sub>4</sub>-induced acute liver injury in SD rats related to Nrf2 and NF- $\kappa$ B signaling[J]. Pharm Biol, 2020, 58(1): 239–246.
- [10] XU Q, XI H, CHEN X, et al. Milk-derived hexapeptide PGPIP<sub>N</sub> prevents and attenuates acute alcoholic liver injury in mice by reducing endoplasmic reticulum stress [J]. Int J Mol Med, 2020, 46(3): 1107–1117.
- [11] HYBERTSON B M, GAO B, BOSE S K, et al. Oxidative stress in health and disease: The therapeutic potential of Nrf2 activation[J]. Mol Aspects Med, 2011, 32(4/5/6): 234–246.
- [12] KOSINSKA A D, LIU J, LU M J, et al. Therapeutic vaccination and immunomodulation in the treatment of chronic hepatitis B: Preclinical studies in the woodchuck[J]. Med Microbiol Immunol, 2015, 204(1): 103–114.
- [13] WEBER L W D, BOLL M, STAMPFL A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: Carbon tetrachloride as a toxicological model[J]. Crit Rev Toxicol, 2003, 33(2): 105–136.
- [14] CHUNG R T, STRAVITZ R T, FONTANA R J, et al. Pathogenesis of liver injury in acute liver failure[J]. Gastroenterology, 2012, 143(3): 1–7.
- [15] YANG B Y, ZHANG X Y, GUAN S W, et al. Protective effect of procyanidin B2 against CCl<sub>4</sub>-induced acute liver injury in mice [J]. Molecules, 2015, 20(7): 12250–12265.
- [16] 滕来宾. 海参岩藻聚糖硫酸酯对小鼠酒精性肝损伤防治作用的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.  
TENG L B. Preventive and therapeutic effects of fucoidan isolated from sea cucumber on alcoholic liver injury in mice[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2011.
- [17] HERMENEAN A, MARIASIU T, NAVARRO G, et al. Hepatoprotective activity of chrysin is mediated through TNF- $\alpha$  in chemically-induced acute liver damage: An *in vivo* study and molecular modeling [J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2017, 13(5): 1671–1680.
- [18] COCATE P G, NATALI A J, OLIVEIRA A D, et al. Fruit and vegetable intake and related nutrients are associated with oxidative stress markers in middle-aged men[J]. Nutrition, 2014, 30(6): 660–665.
- [19] CHEN W, SU H, XU Y, et al. Protective effect of wild raspberry (*Rubus hirsutus* Thunb.) extract against acrylamide-induced oxidative damage is potentiated after simulated gastrointestinal digestion [J]. Food Chem, 2016, 1(196): 943–952.



- [20] 郭永月, 陶明焯, 程光宇, 等. 黑牛肝菌多糖对急性酒精肝损伤小鼠的保护作用[J]. 中国食品学报, 2016, 16(1): 35-41.  
GUO Y Y, TAO M X, CHENG G Y, et al. Protective effect of polysaccharides from *Boletus aereus* on alcoholic liver injury in mice[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016, 16(1): 35-41.
- [21] MA Q. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2013, 53 (1): 401-426.
- [22] 周金鑫, 李世月, 张娅, 等. 四氯化碳诱导小鼠急性肝损伤中 Nrf2 信号通路的变化[J]. 毒理学杂志, 2020, 34(5): 380-384.  
ZHOU J X, LI S Y, ZHANG Y, et al. Changes of Nrf2 pathway in acute liver injury induced by CCl<sub>4</sub> in mice [J]. Journal of Toxicology, 2020, 34 (5): 380-384.
- [23] 左玮, 张波, 梅丹. 红景天苷对乙酰氨基酚诱导肝损伤模型小鼠 Keap1-Nrf2 信号通路的影响[J]. 中国药房, 2018, 29(11): 1487-1490.  
ZUO W, ZHANG B, MEI D, et al. Effects of salidroside on Keap1 -Nrf2 signal pathway in acetaminophen -induced liver injury model mice [J]. China Pharmacy, 2018, 29(11): 1487-1490.
- [24] WANG Y Q, WEI J G, TU M J, et al. Fucoidan alleviates acetaminophen-induced hepatotoxicity via oxidative stress inhibition and Nrf2 translocation[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(12): 4050-4066.
- [25] LUO C, URGARD E, VOODER T, et al. The role of COX-2 and Nrf2/ARE in anti-inflammation and antioxidative stress: Aging and anti-aging[J]. Med Hypotheses, 2011, 77(2): 174-178.

### Preventive Effect of Dry Powder of Sea Cucumber Cooking Liquid on Acute Liver Injury Induced by CCl<sub>4</sub> in Mice

Cai Weizhen<sup>1</sup>, Zhang Tianqi<sup>1</sup>, Wang Qinghui<sup>1</sup>, Ding Ning<sup>2</sup>, Hu Wei<sup>3</sup>, Wang Jingfeng<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Ocean University of China, Qingdao 266000, Shandong

<sup>2</sup>Qingdao Malvern College, Qingdao 266000, Shandong

<sup>3</sup>Shandong Haodangjia Ocean Development Co., Ltd., Weihai 264200, Shandong

**Abstract** Objective: To investigate the protective mechanism of dry powder of sea cucumber cooking liquid on acute liver injury mice, which will provide evidences in developing function food for liver protection. Methods: Acute liver injury models established by intraperitoneal injection of CCl<sub>4</sub> corn oil solution with a volume fraction of 5% in mice. The activities of antioxidant enzyme and the contents of oxidation product were determined in serum and liver. Liver tissue was stained with H & E and immunohistochemistry for observing the of SCCL on mice liver histopathology. Expression of *Nrf2*, *Keap-1*, *HO-1*, *NQO-1* mRNA were measured by qRT-PCR. Results: Compared with model group, the groups of SCCL, antioxidant enzyme activities significantly increased and oxidation product contents were declined significantly in serum and liver; the liver histomorphology was improved; expression levels of *Nrf2*, *Keap-1*, *HO-1*, *NQO-1* were improved in the SCCL groups. Conclusion: The SCCL enhanced the antioxidant activity, ameliorate organism damage by oxidative stress, effectively protect the acute liver injury by CCl<sub>4</sub> in mice.

**Keywords** sea cucumber cooking liquid; acute liver injury; oxidative stress