

## 白雪茶水提物对乙醇诱导的小鼠急性酒精性肝损伤的干预作用

韩 兴<sup>1</sup>, 吕 静<sup>1</sup>, 王兴妮<sup>1</sup>, 秦 宇<sup>1</sup>, 李莉蓉<sup>1\*</sup>, 黄 锐<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>昆明理工大学食品科学与工程学院 昆明 650500

<sup>2</sup>中垦华山牧乳业有限公司 陕西渭南 714019)

**摘要** 目的:研究白雪茶水提物(TWA)对急性酒精性肝损伤(AALI)小鼠的保护作用。方法:以 12 mL/kg 剂量的 TWA 灌胃 56%乙醇诱导的 AALI 模型,评价小鼠体重、肝脏指数、肝功能、酒精代谢能力、氧化应激水平、炎症因子、关键蛋白表达的变化以及对肠道菌群的影响。结果:TWA 显著降低 AALI 小鼠谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)含量,提高乙醇脱氢酶(ADH)含量,改善肝功能,加快酒精代谢。TWA 通过提高血清和肝脏中超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)的活性,降低丙二醛(MDA)含量,降低小鼠机体氧化应激水平。此外,TWA 通过抑制肝脏和血清中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白介素-6(IL-6)水平来减轻机体炎症反应;通过增强 Nrf2 通路功能和抑制 NF- $\kappa$ B 通路活化来抑制 AALI 小鼠肝组织炎症及提高机体抗氧化应激作用;下调酒精代谢关键蛋白 CYP2E1 的表达来降低肝脏的酒精代谢损伤。同时,TWA 促进乳杆菌和双歧杆菌的增殖,减少肠球菌、大肠杆菌和消化球菌的数量,从而改善 AALI 小鼠肠道微生态环境。结论:TWA 能够提高小鼠肝功能和酒精代谢,增强机体抗氧化能力,降低体内炎症因子水平,抑制 Nrf2/NF- $\kappa$ B 通路关键蛋白表达并维持肠道稳态,改善小鼠 AALI。

**关键词** 白雪茶水提物;肝损伤;氧化应激;炎症;酒精

**文章编号** 1009-7848(2024)07-0172-10 **DOI**: 10.16429/j.1009-7848.2024.07.017

酒精主要在肝脏中代谢,肝脏在维持机体酒精代谢平衡中起着至关重要的作用<sup>[1]</sup>。短期内摄入大量酒精会导致急性酒精性肝损伤(Acute alcoholic liver injury, AALI)。研究表明,AALI 与过量摄入酒精所引起的酒精代谢异常<sup>[2]</sup>、氧化应激、炎症反应<sup>[3]</sup>、肠道稳态失衡<sup>[4]</sup>等多种因素有关。其中,氧化应激和炎症反应是导致酒精性肝损伤的重要原因<sup>[5]</sup>。AALI 早期主要是酒精性脂肪肝,随病情的加重会逐渐转变为酒精性肝炎、肝硬化、肝细胞癌<sup>[6]</sup>。目前,戒酒同时辅予药物治疗仍然是 AALI 的主要干预措施<sup>[7]</sup>。然而,药物有导致腹泻、头痛、呕吐等副作用,因此寻找安全有效地干预 AALI 的方法具有重要意义。

白雪茶(*Thamnia vermicularis* (Sw.) Ach)属地茶科(Thamniaceae)地茶属(*Thamnia*)植物,是雪域高原上天然的保健饮品<sup>[8]</sup>。从云南丽江民间

的食用历史来看,白雪茶具有清热解毒、生津止渴、清肝明目等有益作用<sup>[9]</sup>。目前,对于白雪茶的研究表明,其具有抗疲劳、抗炎、抗氧化、解热、抗辐射、增强免疫等作用<sup>[10-11]</sup>,且经药检显示安全、无毒副作用。目前未见关于白雪茶提取物对 AALI 干预的报道。本研究通过小鼠 AALI 模型,探究白雪茶水提物对 AALI 的影响及干预机制。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料与试剂

实验动物 C57BL/6 小鼠(5 周龄,体质量 18~20 g)购自昆明医科大学。小鼠饲养于昆明理工大学动物实验中心,温度(20 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,湿度 50%~70%,明暗循环 12 h。

白雪茶,中国云南省丽江市玉龙县。TNF- $\alpha$ 、IL-6 试剂盒,上海酶联生物科技有限公司;谷丙转氨酶(ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)、抗利尿激素(ADH)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、丙二醛(MDA)、总蛋白定量测定试剂盒,碧云天生物技术有限公司。

#### 1.2 仪器与设备

EPOCH 全波长酶标仪,美国 Bio Tek 公司;

收稿日期:2023-07-28

基金项目:云南省科技厅基础研究计划面上项目(202001AT070032);陕西省科技厅市联动渭南现代农业重点项目(2022GD-TSLD-58-1)

第一作者:韩兴,男,硕士生

通信作者:李莉蓉 E-mail: lilirong-lily@126.com

H3-18K 台式高速离心机,湖南可成仪器设备有限公司;RM2016 病理切片机,赛维尔生物;SCI-ENTZ-48L 高通量组织研磨器,宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 白雪茶水提取物的制备 白雪茶粉碎过 80 目筛,经超高压处理(600 MPa,15 min)后,加入蒸馏水,料液比为 1:15,在 60 ℃下超声提取(功率 200 W)1 h,然后冷冻离心(10 000 r/min)10 min,收集上清液。上清液在 60 ℃下旋转蒸发去除酒精后,置于 30 ℃鼓风干燥箱干燥,得到白雪茶水提取物(TWA),冷藏备用。

1.3.2 动物实验 适应 1 周后,将雄性 C57BL/6 小鼠随机分为 5 组( $n = 8$ ):空白对照组(CK)、模型组(ALD)、联苯双酯组(BP,200 mg/kg/d)、TWA 低剂量组(TWA-L,200 mg/kg/d)和 TWA 高剂量组(TWA-H,400 mg/kg/d)。第 1~20 天,CK 组和 ALD 组灌胃等剂量的生理盐水,药物组灌胃相应剂量的药物。第 21 天灌胃药物 2 h 之后,除 CK 组外,其余各组按 12 mL/kg 剂量灌胃 56%乙醇诱导小鼠 AALI。眼球采血后离心 (4 ℃,3 000 r/min)15 min,收集血清,保存于-80 ℃待用。

1.3.3 小鼠肝脏指数测定 收集小鼠肝脏计算肝脏指数<sup>[12]</sup>。

$$\text{肝脏指数}(\%) = \frac{\text{肝脏质量}(\text{g})}{\text{体质量}(\text{g})} \times 100 \quad (1)$$

1.3.4 生化指标检测 称取各组小鼠肝组织 0.5 g,按 1:9( $m/V$ )加入生理盐水,低温研磨至浆状,冷冻离心(3 000 r/min)10 min,收集上清液。试剂盒检测血清中 AST 和 ALT,肝组织中 ADH,血清和肝组织中 MDA、SOD 和 GSH-Px 的活性。用 ELISA 试剂盒检测肝组织和血清中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 含量。

1.3.5 病理组织学检查 取肝脏组织,以 4%的多聚甲醛固定,石蜡包埋后切片(厚 5  $\mu\text{m}$ )进行苏木精-伊红(H&E)染色,在光学显微镜下进行病理组织学检查。根据表 1 对肝脏组织病理损伤进行评分<sup>[13]</sup>。

1.3.6 蛋白印迹检测蛋白表达 用含有磷酸酶抑制剂的蛋白提取溶液,从肝脏组织中提取蛋白。然后以 10 000 r/min 的转速离心 2 min,收集上清液。

表 1 评分标准  
Table 1 Scoring criteria

评分	损伤情况(损伤细胞数目)
0	组织形态正常,细胞未见损伤
1	不超过 1/4 的细胞
2	不超过 1/2 的细胞
3	不超过 3/4 的细胞
4	几乎所有细胞出现损伤

用总蛋白测定试剂盒进行蛋白质浓度的测定与调整。用 SDS-PAGE 凝胶电泳分离肝脏匀浆(50  $\mu\text{g}$ )总蛋白后,转移到聚偏二氟乙烯膜。用 5%脱脂牛奶封闭 1 h 后,进行一抗(Keap1、Nrf2、NQO-1、I $\kappa$ B $\alpha$ 、P-I $\kappa$ B $\alpha$ 、NF- $\kappa$ BP65、P-NF- $\kappa$ BP65、CYP2E1)孵育,室温孵育 HRP 抗体 2 h,清洗后用 Image J Software 进行灰度测定。

1.3.7 肠道细菌检测 在无菌条件下,剪开结肠,取小鼠粪便 0.1 g 于 1.5 mL 无菌离心管中,用 PBS 溶液逐步稀释至 10<sup>-6</sup> g/mL。取 0.1 mL 稀释液涂布于 BS、LBS、BEA、PS 和 EMB 培养基。涂布完成后将肠球菌(*Enterococcus*)和大肠杆菌(*E. coli*)置于 37 ℃普通生化培养箱培养 24 h,乳酸菌(*Lactobacillus*)、双歧杆菌(*Bifidobacterium*)和胃球菌(*Peptococcus*)置于 37 ℃厌氧培养箱培养 24 h,计算培养基上菌落数量。

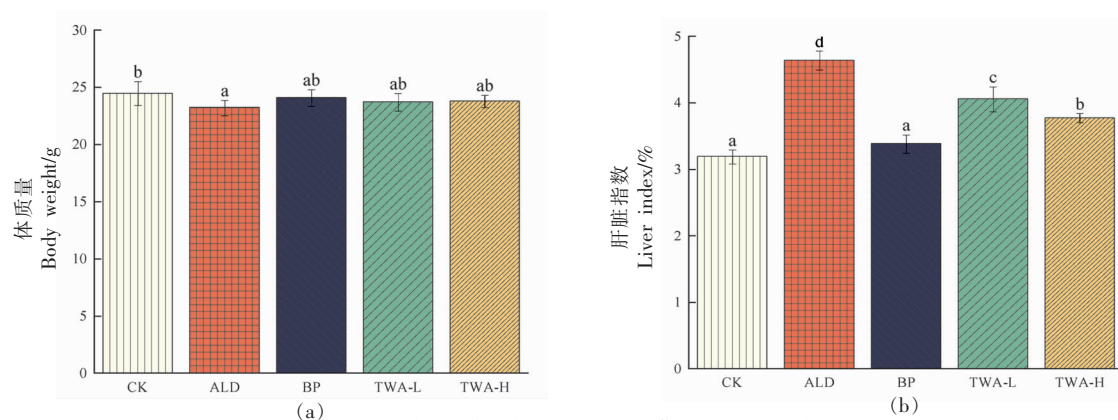
1.4 数据处理

用 SPSS 25.0 软件进行统计分析,所有数据表示为“平均值 $\pm$ 标准差”。采用单因素方差分析的 Duncan's 检验进行组间多重比较分析, $P < 0.05$  说明组间具有统计学上的显著差异。

2 结果与分析

2.1 TWA 对 AALI 小鼠体质量和肝脏指数的影响

如图 1a 所示,长期乙醇摄入导致小鼠体质量下降,由 24.49 g 下降至 23.24 g,而 TWA-L 和 TWA-H 干预后体质量分别增加了 2.19% 和 2.41%,然而与 BP 组和 ALD 组无显著性差异( $P > 0.05$ )。如图 1b 所示,与 CK 组相比,ALD 组小鼠肝脏指数显著升高,BP、TWA-L 和 TWA-H 干预使小鼠肝脏指数分别降低 26.94%、12.5%、18.53%。结果表示 TWA 干预可以有效抑制 AALI 导致的



注:不同小写字母表示组间差异显著( $P<0.05$ ),下同。

图1 小鼠体重(a)和肝脏指数(b)

Fig.1 Body weight (a) and liver index (b)

肝肿胀。

## 2.2 TWA对AALI小鼠肝功能的影响

如图2所示,与CK组相比,ALD组小鼠血清中ALT和AST水平分别升高至144.86 U/L和17.19 U/L,均显著升高,表明乙醇引起小鼠肝损伤。TWA干预后,血清ALT水平显著下降,TWA-L和TWA-H组较ALD组的AST含量分别下降8.90%和17.28%,而TWA-L和TWA-H组ALT、

AST含量无显著差异( $P>0.05$ )。

与CK组相比,ALD组小鼠肝小叶中ADH水平显著降低,表明肝脏酒精代谢能力降低(图2)。与ALD组相比,TWA-L组和TWA-H组的ADH含量分别上升1.26倍和2.90倍,而TWA-L与ALD组的ADH水平无显著差异( $P>0.05$ )。TWA-H组的ADH水平与BP组相当,说明TWA-H可以提升肝脏内ADH活性,减轻乙醇对肝脏的损害。

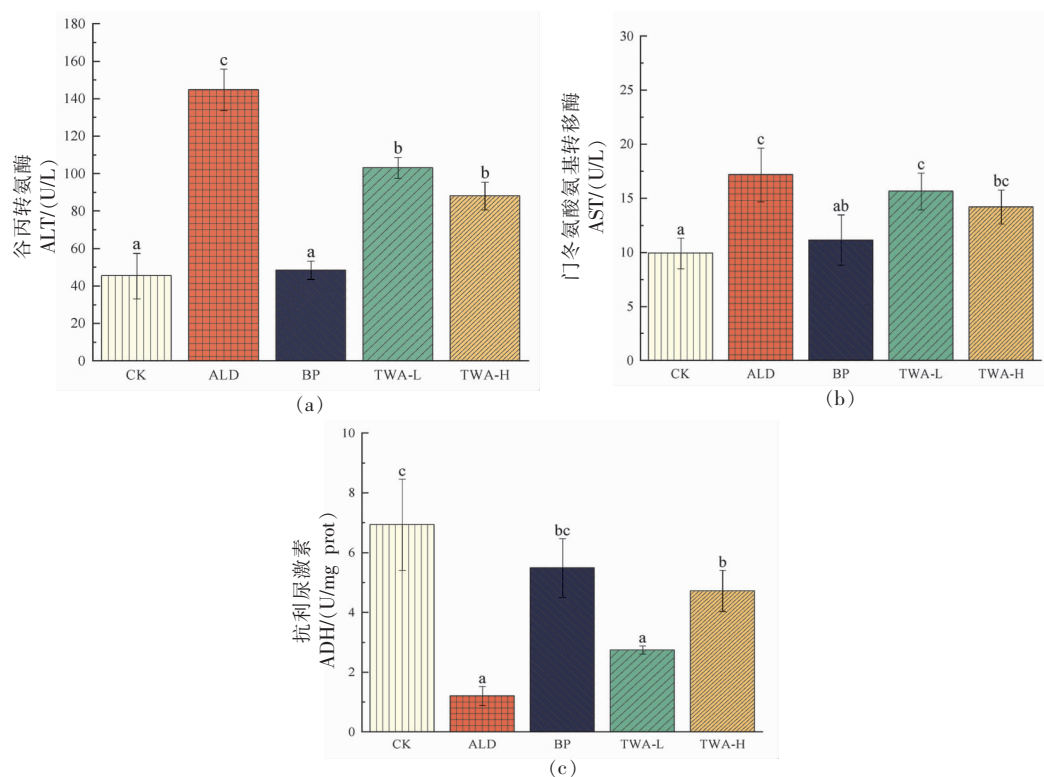


图2 小鼠血清ALT(a)和AST(b)以及肝脏组织中ADH(c)水平

Fig.2 Serum ALT (a) and AST (b) and liver ADH (c) levels in mice



2.3 TWA 对 AALI 小鼠肝脏组织病理的影响

如图 3 所示,CK 组肝细胞结构正常,无明显的炎症因子入侵,肝细胞核独立,且肝组织形态正常。ALD 组肝细胞聚集,肝细胞黏连,肝核聚集,肝组织受损且肝索紊乱。TWA 干预后,肝细胞结构恢复,肝索清晰,很少看到明显的凋亡区,肝窦也未见明显的扩张和挤压。TWA-H 组肝细胞形态同

BP 组,细胞形态正常,排列整齐,肝损伤程度明显减轻。如表 2 所示,与 CK 组相比,ALD 组肝脏组织病理学损伤评分显著升高( $P<0.05$ )。BP 和 TWA-H 干预显著降低肝脏组织病理损伤评分( $P<0.05$ ),表明 TWA-H 可以明显改善小鼠肝脏组织损伤。TWA-L 组的组织学评分有所下降,然而与 ALD 组差异不显著( $P>0.05$ )。

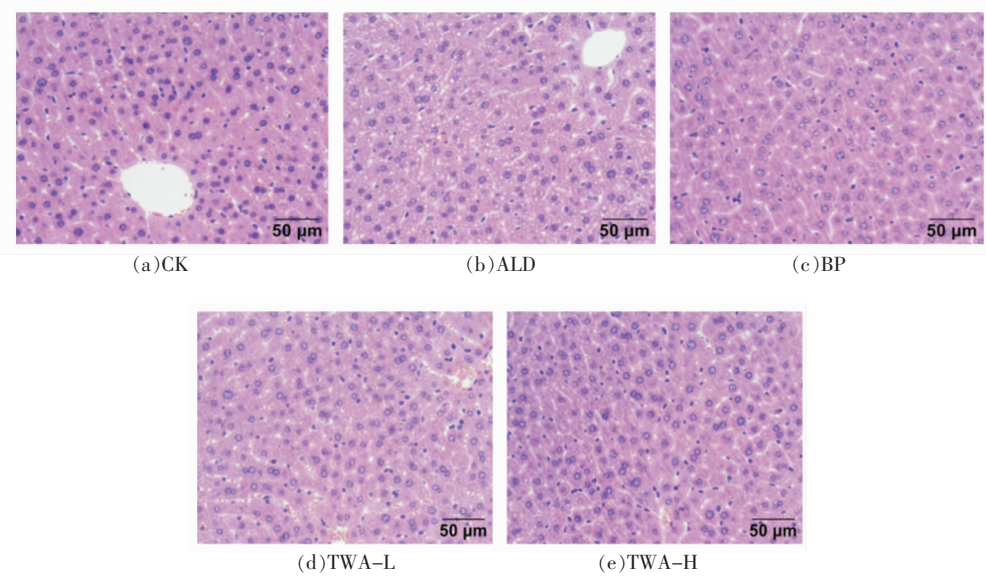


图 3 肝脏组织 H&E 染色切片图(400×)

Fig.3 H&E stained section of liver tissue (400×)

表 2 小鼠肝脏组织病理学评分

Table 2 Histopathological scoring of mouse liver

组别	剂量/ (mg/kg/d)	损伤等级(n=8)					分数
		0	1	2	3	4	
CK		8	0	0	0	0	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
ALD		0	3	4	1	0	1.75 ± 0.71 <sup>c</sup>
BP	200	2	6	0	0	0	0.75 ± 0.46 <sup>b</sup>
TWA-L	200	2	3	2	1	0	1.38 ± 0.92 <sup>bc</sup>
TWA-H	400	2	4	1	1	0	0.87 ± 0.64 <sup>b</sup>

注:不同肩标小写字母表示组间差异显著( $P<0.05$ )。

2.4 TWA 对 AALI 小鼠氧化应激水平的影响

如表 3 所示,与 CK 组相比,ALD 组小鼠肝脏中 GSH-PX 和 SOD 的活性显著降低,MDA 水平显著升高( $P<0.05$ ),表明小鼠肝脏存在明显的氧化损伤。TWA 干预后,SOD 活性显著上升,而 TWA-L 组 SOD 活性与 ALD 组差异不显著 ( $P>0.05$ )。TWA 干预使肝脏 GSH-PX 活性显著上升

( $P<0.05$ ),MDA 水平显著降低( $P<0.05$ ),剂量之间无显著差异( $P>0.05$ )。然而,TWA-H 组的 SOD 活性和 MDA 含量与 CK 组相当,即该剂量可以减轻 AALI 小鼠氧化应激至正常水平。TWA 干预增加 AALI 小鼠血清中 GSH-PX 和 SOD 活性,降低 MDA 水平,TWA-H 干预效果与 BP 无显著差异,优于 TWA-L。

表 3 小鼠肝脏和血清氧化酶活性及脂质过氧化水平  
Table 3 Liver and serum oxidase activity and lipid peroxidation levels in mice

组别	肝脏			血清		
	SOD/ (U/mg prot)	GSH-PX/ (U/mL)	MDA/ (nmol/mg prot)	SOD/ (U/mL)	GSH-PX/ (μmol/L)	MDA/ (nmol/mg prot)
CK	126.71 ± 3.19 <sup>c</sup>	343.95 ± 11.02 <sup>b</sup>	28.50 ± 1.57 <sup>a</sup>	376.22 ± 21.22 <sup>c</sup>	404.26 ± 35.73 <sup>d</sup>	15.66 ± 5.40 <sup>a</sup>
ALD	89.24 ± 1.66 <sup>a</sup>	272.93 ± 16.10 <sup>a</sup>	75.61 ± 6.66 <sup>c</sup>	223.01 ± 16.42 <sup>a</sup>	288.28 ± 5.43 <sup>a</sup>	57.76 ± 2.32 <sup>c</sup>
BP	112.89 ± 9.25 <sup>b</sup>	334.94 ± 17.06 <sup>b</sup>	31.94 ± 3.47 <sup>a</sup>	369.41 ± 24.13 <sup>c</sup>	367.02 ± 10.49 <sup>cd</sup>	17.84 ± 0.98 <sup>a</sup>
TWA-L	96.11 ± 4.15 <sup>a</sup>	315.70 ± 10.92 <sup>b</sup>	43.85 ± 8.10 <sup>b</sup>	247.08 ± 29.49 <sup>b</sup>	323.52 ± 16.34 <sup>ab</sup>	25.02 ± 2.47 <sup>b</sup>
TWA-H	108.61 ± 4.13 <sup>b</sup>	326.69 ± 24.48 <sup>b</sup>	34.89 ± 3.20 <sup>ab</sup>	335.36 ± 15.60 <sup>c</sup>	358.07 ± 25.19 <sup>bc</sup>	19.40 ± 3.65 <sup>ab</sup>

注:同一列不同肩标小写字母表示该指标组间差异显著( $P<0.05$ )。

2.5 TWA 对肝脏和血清炎症因子的影响

AALI 小鼠血清和肝脏中 TNF-α、IL-6 的水平均显著上升( $P<0.05$ ),即乙醇摄入诱发了小鼠炎症反应(表 4)。TWA-L 和 TWA-H 干预组小鼠肝脏 TNF-α 和 IL-6 水平显著降低( $P<0.05$ ),而仍

高于 BP 组 ( $P<0.05$ )。TWA 干预降低小鼠血清 TNF-α 和 IL-6 水平,TWA-L 组、TWA-H 组与 BP 组 IL-6 水平无显著差异 ( $P>0.05$ )。结果表明,TWA 抑制肝脏炎症因子释放,缓解肝脏炎症。

表 4 小鼠肝脏及血清炎症因子水平  
Table 4 Liver and serum inflammatory factor levels in mice

组别	肝脏/(pg/mL)		血清/(pg/mL)	
	TNF-α	IL-6	TNF-α	IL-6
CK	208 ± 79.47 <sup>a</sup>	55.15 ± 8.40 <sup>a</sup>	115 ± 10.82 <sup>a</sup>	35.21 ± 4.86 <sup>a</sup>
ALD	752.67 ± 52.30 <sup>c</sup>	186.30 ± 9.18 <sup>d</sup>	263.67 ± 11.06 <sup>c</sup>	147.62 ± 22.62 <sup>c</sup>
BP	301.33 ± 19.73 <sup>b</sup>	103.82 ± 4.21 <sup>b</sup>	150.67 ± 10.26 <sup>a</sup>	70.49 ± 3.37 <sup>b</sup>
TWA-L	579.00 ± 22.11 <sup>d</sup>	150.54 ± 12.42 <sup>c</sup>	238.33 ± 38.59 <sup>bc</sup>	98.95 ± 33.37 <sup>b</sup>
TWA-H	434.67 ± 6.35 <sup>c</sup>	138.86 ± 1.11 <sup>c</sup>	207.33 ± 28.38 <sup>b</sup>	78.27 ± 9.24 <sup>b</sup>

注:同一列不同肩标小写字母表示该指标组间差异显著( $P<0.05$ )。

2.6 TWA 对 AALI 小鼠相关信号通路关键蛋白的影响

与 CK 组相比,ALD 组的小鼠肝组织 Keap1-Nrf2 通路中 Keap1 蛋白表达显著上调,Nrf2 和 NQO-1 蛋白表达显著下调( $P<0.05$ ),提示短期高剂量、高浓度乙醇摄入能够造成肝脏抗氧化防御系统急性损伤。BP、TWA-L 和 TWA-H 干预组 Keap1 蛋白表达显著下调,TWA-H 组 Keap1 蛋白表达显著低于 TWA-L 组 ( $P<0.05$ )。AALI 小鼠 Nrf2 蛋白表达显著降低( $P<0.05$ ),TWA 干预抑制 Nrf2 蛋白表达的降低,然而 TWA 组 Nrf2 蛋白表达水平与 ALD 组无显著性差异( $P>0.05$ )。TWA 干预还能缓解 AALI 小鼠肝脏 NQO-1 蛋白表达的显著降低 ( $P<0.05$ )。结果表明,TWA 通过增强

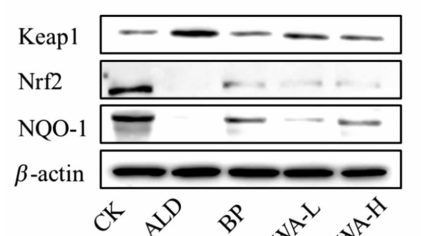
Keap1-Nrf2 通路功能来减轻 AALI 小鼠肝脏氧化损伤。

与 CK 组比较,ALD 组小鼠肝组织中 p-IκBα/IκBα、p-NF-κBp65/NF-κBp65 值显著升高 ( $P<0.05$ ),提示机体发生炎症反应。经 TWA 干预后,小鼠肝组织中 p-IκBα/IκBα、p-NF-κBp65/NF-κBp65 值显著降低 ( $P<0.05$ ),BP 组和 TWA-H 组中 p-NF-κBp65/NF-κBp65 值与 CK 组相比无显著性差异( $P>0.05$ ),这表明经 TWA 干预后,AALI 小鼠 p-NF-κBp65 水平恢复到正常水平。结果表明,TWA 能够抑制 NF-κBp65 的磷酸化,从而抑制小鼠体内炎症因子水平。

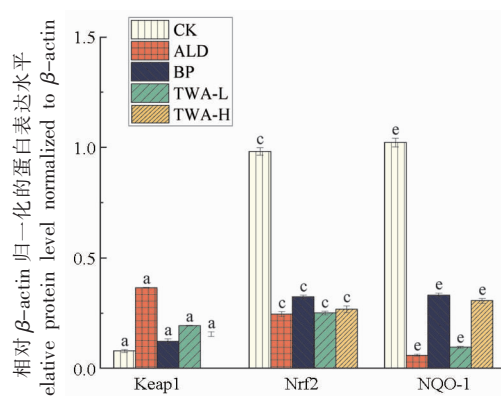
对酒精代谢相关酶 CYP2E1 表达水平分析显示,与 CK 组比较,ALD 组小鼠肝组织中 CYP2E1

蛋白表达水平显著上调 ( $P<0.05$ );BP 和 TWA 干预显著下调 AALI 小鼠肝脏 CYP2E1 蛋白表达

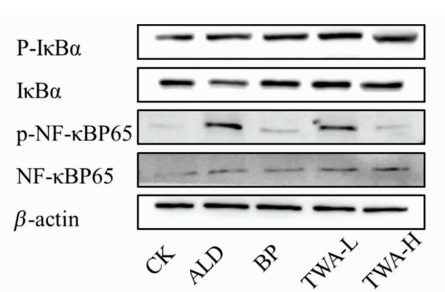
( $P<0.05$ )。结果表明 TWA 可以加快肝脏酒精代谢,减轻乙醇对小鼠肝脏组织的损害。



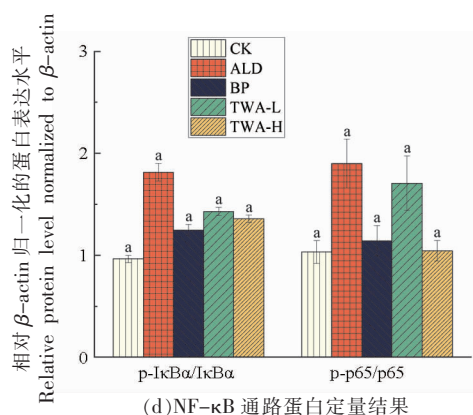
(a)Keap1-Nrf2 通路氧化应激通路蛋白印迹图



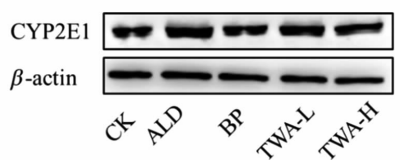
(b)Keap1-Nrf2 通路蛋白定量结果



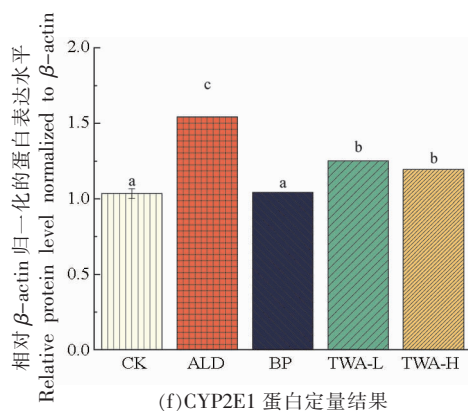
(c)NF-κB 炎症通路蛋白印迹图



(d)NF-κB 通路蛋白定量结果



(e)酒精代谢 CYP2E1 蛋白印迹图



(f)CYP2E1 蛋白定量结果

图 4 小鼠 AALI 相关信号通路关键蛋白表达

Fig.4 Expression of key proteins in signaling pathways associated with acute alcoholic liver injury in mice

## 2.7 TWA 对 AALI 小鼠肠道细菌菌落结构的影响

如图 5 所示,ALD 组小鼠肠道乳杆菌和双歧杆菌的数量显著降低( $P<0.05$ ),而肠球菌、大肠杆菌和消化球菌的数量显著升高( $P<0.05$ ),这说明

酒精使小鼠肠道肠球菌、大肠杆菌和消化球菌增加,乳杆菌和双歧杆菌减少,肠道细菌结构改变。经过 TWA 干预后,发现小鼠肠道中乳杆菌和双歧杆菌的数量显著上升( $P<0.05$ ),而肠球菌、大肠杆

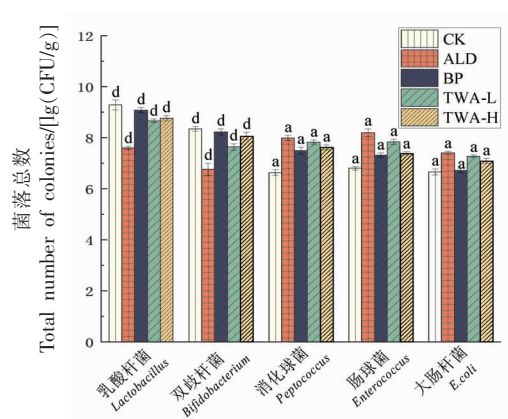


图5 小鼠肠道细菌计数

Fig.5 Mouse intestinal bacteria count

菌和消化球菌的数量显著降低( $P<0.05$ )。这说明TWA能够通过增加有益菌的数量,减少有害菌的数量来维持AALI小鼠肠道稳态。

### 3 讨论

短期内摄入大量酒精会破坏肝细胞线粒体功能,酒精代谢减缓并促进机体炎症反应,加速细胞凋亡<sup>[14]</sup>。本研究采用灌胃给药法建立AALI模型,探讨TWA对小鼠AALI的改善作用,并对其干预机制进行研究。

肝脏肿大是酒精性肝损伤的常见症状之一<sup>[15]</sup>。本研究中,AALI小鼠肝脏肿大的程度用肝脏指数表示。酒精能够破坏肝细胞,导致AST、ALT因肝细胞损坏而释放,促使血清中AST和ALT含量增加<sup>[16]</sup>。临床上以AST和ALT水平来评价肝功能<sup>[17]</sup>。研究结果显示,ALD组小鼠肝脏指数及血清中AST、ALT水平显著升高,表明AALI模型成功建立。TWA干预后,肝脏指数、血清AST和ALT水平下降,说明TWA能够减轻酒精对肝细胞的破坏,从而保护肝脏。肝脏中的酒精代谢主要取决于ADH途径<sup>[18]</sup>。本研究结果显示,ALD组小鼠肝脏组织ADH水平显著下降,主要是因为急性酒精诱导,导致肝脏负荷加重,造成酒精代谢紊乱,使ADH的表达下降。TWA能够显著增加ADH水平,说明TWA能够改善小鼠急性肝损伤。H&E染色结果表明,TWA能保护肝细胞形态和大小,可以显著改善肝组织损伤。

氧化应激是酒精导致AALI的重要因素之

一<sup>[19]</sup>。大量摄入酒精会使肝脏产生过量ROS,造成氧化应激,最终导致脂质过氧化<sup>[20]</sup>。MDA作为脂质过氧化的主要终产物,通常被用来评价肝脏氧化损伤<sup>[21]</sup>。在本研究中,ALD组肝脏MDA含量增加,TWA干预后,小鼠血清和肝脏中MDA水平均显著降低,说明酒精诱导导致了小鼠肝脏氧化损伤,同时TWA能够缓解小鼠氧化应激。

Keap1-Nrf2是一条抗氧化通路,对防御氧化应激具有重要作用<sup>[22]</sup>。正常情况下,Nrf2与Keap1偶联,并在各种组织和细胞中普遍表达。当机体发生氧化应激,Nrf2与Keap1解离,并易位到细胞核,进一步调控NQO-1,控制氧化还原反应<sup>[23]</sup>。本研究结果显示,TWA可以降低肝损伤小鼠肝脏Keap1蛋白表达,提高Nrf2和NQO-1蛋白表达水平,提示TWA可通过激活Keap1-Nrf2信号通路,提高下游SOD、GSH-Px的活性,减轻肝脏的过氧化损伤。

炎症因子异常增多是AALI的另一个主要特征<sup>[24]</sup>。正常情况下,NF- $\kappa$ B p65与抑制蛋白IKB以复合物的形式存在于细胞质中,当受到外界病理性刺激时,NF- $\kappa$ Bp65入核引发炎症反应,促炎细胞因子(如TNF- $\alpha$ 、IL-6)的大量释放,造成肝损伤<sup>[25]</sup>。本研究ALD组小鼠肝脏组织p-I $\kappa$ B $\alpha$ /I $\kappa$ B $\alpha$ 比值、p-NF- $\kappa$ Bp65/NF- $\kappa$ Bp65比值显著上升,肝脏和血清中TNF- $\alpha$ 、IL-6水平显著升高。经TWA干预后,小鼠肝脏p-I $\kappa$ B $\alpha$ /I $\kappa$ B $\alpha$ 比值、p-NF- $\kappa$ Bp65/NF- $\kappa$ Bp65比值显著下降,TNF- $\alpha$ 、IL-6水平显著降低,表明TWA能够抑制NF- $\kappa$ Bp65的磷酸化和I $\kappa$ B $\alpha$ 的磷酸化,进一步减少炎症因子的释放。

CYP2E1在肝脏中表达,酒精摄入会增加这种酶的表达,抑制CYP2E1可有效改善AALI小鼠氧化应激和脂质积累<sup>[26]</sup>。本研究结果显示,ALD组小鼠肝脏CYP2E1蛋白表达水平明显上调,TWA能够明显下调CYP2E1蛋白表达,提示TWA可以通过抑制酒精介导的CYP2E1异常活化而减少肝脏损伤。

酒精滥用会导致肠道通透性增加,造成肠道稳态失衡<sup>[27]</sup>。多项研究已证实,酒精性肝病患者存在体内肠球菌、大肠杆菌和消化球菌等有害菌数量增加,而乳杆菌和双歧杆菌等有益菌数量减少



的现象<sup>[28]</sup>。本研究中ALD组也出现了同样的结果,说明AALI小鼠出现了肠道菌群的失调。而经过TWA干预后,小鼠乳杆菌和双歧杆菌的数量较ALD组显著增多,而肠球菌、大肠杆菌和消化球菌的数量显著减少,干预组之间呈现一定的剂量效应关系。本实验结果与前人研究结果相一致<sup>[29-30]</sup>,说明TWA对AALI小鼠的肠道菌群失衡有改善作用。

#### 4 结论

综上所述,白雪茶水提物低、高剂量均能改善AALI小鼠的肝功能,加快小鼠体内酒精代谢,保护肝细胞完整性。白雪茶水提物显著下调小鼠肝脏中Keap1表达,上调小鼠肝脏中Nrf2、NQO-1的表达,降低机体氧化应激水平,通过抑制NF- $\kappa$ Bp65和I $\kappa$ B $\alpha$ 的磷酸化,减轻炎症反应。其中,400 mg/kg/d的TWA可将p-NF- $\kappa$ Bp65下调至正常水平。此外,白雪茶水提物通过增加肠道内乳杆菌和双歧杆菌有益菌的数量,减少有害菌肠球菌、大肠杆菌和消化球菌的数量,维持肠道稳态。本研究可为白雪茶改善酒精性肝损伤的研究与开发提供依据。

#### 参 考 文 献

- [1] XUE Y H, LI X J, TIAN Y Y, et al. Salmon sperm DNA prevents acute liver injury by regulating alcohol-induced steatosis and restores chronic hepatitis via alleviating inflammation and apoptosis[J]. Journal of Food Biochemistry, 2022, 46(10): e14346.
- [2] TESCHKE R. Alcoholic liver disease: Alcohol metabolism, cascade of molecular mechanisms, cellular targets, and clinical aspects[J]. Biomedicines, 2018, 6(4): 106.
- [3] DONG M J, LI L S, LI G W, et al. Mangiferin protects against alcoholic liver injury via suppression of inflammation-induced adipose hyperlipolysis[J]. Food & Function, 2020, 11(10): 8837-8851.
- [4] SHARMA S P, SUK K T, KIM D J. Significance of gut microbiota in alcoholic and non-alcoholic fatty liver diseases[J]. World Journal of Gastroenterology, 2021, 27(37): 6161-6179.
- [5] YE S, REN L L, CHEN X, et al. Protective effect and mechanism of Wangshi Baochi Pills against acute alcoholic liver/stomach injury in mice[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2021, 46(15): 3900-3906.
- [6] ZHOU Y N, XU P J, DENG C F, et al. Chrysin alleviated ethanol-induced alcoholic liver injury via SIRT1/AMPK signaling pathway[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2022, 38(1): 159-160.
- [7] OU Y X, CHENG H Y, HU W Q, et al. Research progress on anti-alcoholic liver injury effects and mechanism of flavonoids[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2020, 36(9): 1200-1205.
- [8] 程攀. 云南白雪茶研究现状及开发利用[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(11): 289-290, 294.  
CHENG Z. Research status and exploitation of *Thamnia vermicularis* Ach in Yunnan[J]. Anhui Agricultural Science, 2015, 43(11): 289-290, 294.
- [9] 林春榕, 罗永会, 张翠香, 等. 云南丽江产白雪茶多糖提取工艺及抗氧化作用[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(8): 16-19.  
LIN C R, LUO Y H, ZHANG C X, et al. Extraction process and antioxidant effect of polysaccharides from *Thamnia vermicularis* Ach produced in Lijiang, Yunnan[J]. Food Research and Development, 2013, 34(8): 16-19.
- [10] GUO J, LI Z L, WANG A L, et al. Three new phenolic compounds from the lichen *Thamnia vermicularis* and their antiproliferative effects in prostate cancer cells[J]. Planta Medica, 2011, 77(18): 2042-2046.
- [11] YU H, SHEN X, LIU D, et al. The protective effects of beta-sitosterol and vermicularin from *Thamnia vermicularis* (Sw.) Ach. against skin aging *in vitro*[J]. Anais Da Academia Brasileira De Ciencias, 2019, 91(4): e20181088.
- [12] CAI T, WANG R, WEI J, et al. Protective effects of betulinic acid and total triterpenic acids from red jujubes on alcoholic liver injury in mice[J]. Food Science, 2018, 39(11): 191-195.
- [13] 饶智, 陈光宇, 谢梦洲, 等. 芦根提取物对大鼠急性酒精性肝损伤的保护作用研究[J]. 时珍国医国药, 2022, 33(1): 95-98.  
RAO Z, CHEN G Y, XIE M Z, et al. Study on the protective effect of Rutaceae extract on acute alcoholic liver injury in rats[J]. Shi Zhen Chinese Medicine, 2022, 33(1): 95-98.



- [14] YANG Y M, CHO Y E, HWANG S. Crosstalk between oxidative stress and inflammatory liver injury in the pathogenesis of alcoholic liver disease[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(2): 774.
- [15] LI W D, WANG Y X, SUN M, et al. The saggy ink cap medicinal mushroom, *Coprinus comatus* (Agaricomycetes), protein attenuates acute alcoholic liver injury in association with changes in the gut microbiota of mice[J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2021, 23(5): 91–100.
- [16] LIU H X, KANG X, YANG X D, et al. Compound probiotic ameliorates acute alcoholic liver disease in mice by modulating gut microbiota and maintaining intestinal barrier[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2022, 15(1): 185–201.
- [17] SUN S F, ZHONG H J, ZHAO Y L, et al. Indole alkaloids of *Alstonia scholaris* (L.) R. Br. alleviated nonalcoholic fatty liver disease in mice fed with high-fat diet[J]. Natural Products and Bioprospecting, 2022, 12(1): 14.
- [18] LU J, LYU Y B, LI M T, et al. Alleviating acute alcoholic liver injury in mice with *Bacillus subtilis* co-expressing alcohol dehydrogenase and acetaldehyde dehydrogenase[J]. Journal of Functional Foods, 2018, 49: 342–350.
- [19] XIAO J, ZHANG R F, WU Y J, et al. Rice bran phenolic extract protects against alcoholic liver injury in mice by alleviating intestinal microbiota dysbiosis, barrier dysfunction, and liver inflammation mediated by the endotoxin-TLR4-NF-kappa B pathway[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(5): 1237–1247.
- [20] BIAO Y N, CHEN J, LIU C X, et al. Protective effect of Danshen Zexie Decoction against non-alcoholic fatty liver disease through inhibition of ROS/NLRP3/IL-1 beta pathway by Nrf2 signaling activation[J]. Frontiers in Pharmacology, 2022, 13: 877924.
- [21] DING Q C, CAO F W, LAI S L, et al. *Lactobacillus plantarum* ZY08 relieves chronic alcohol-induced hepatic steatosis and liver injury in mice via restoring intestinal flora homeostasis [J]. Food Research International, 2022, 157: 111259.
- [22] ZHOU J M, ZHENG Q X, CHEN Z. The Nrf2 pathway in liver diseases[J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2022, 10: 826204.
- [23] SHI J, ZHOU X, ZHAO Y, et al. The three-spot seahorse -derived peptide PAGPRGPA attenuates ethanol -induced oxidative stress in LO2 cells through MAPKs, the Keap1/Nrf2 signalling pathway and amino acid metabolism[J]. Food & Function, 2021, 12(4): 1672–1687.
- [24] ILYAS G, CINGOLANI F, ZHAO E, et al. Decreased macrophage autophagy promotes liver injury and inflammation from alcohol[J]. Alcoholism-Clinical and Experimental Research, 2019, 43(7): 1403–1413.
- [25] SONG Y, WU X Q, YANG D, et al. Protective effect of andrographolide on alleviating chronic alcoholic liver disease in mice by inhibiting nuclear factor kappa B and tumor necrosis factor alpha activation[J]. Journal of Medicinal Food, 2020, 23(4): 409–415.
- [26] SHI Y Y, LIU Y, WANG S J, et al. Endoplasmic reticulum-targeted inhibition of CYP2E1 with vitamin E nanoemulsions alleviates hepatocyte oxidative stress and reverses alcoholic liver disease[J]. Biomaterials, 2022, 288: 121720.
- [27] DU Y, YANG C C, REN D Y, et al. Fu brick tea alleviates alcoholic liver injury by modulating the gut microbiota-liver axis and inhibiting the hepatic TLR4/NF-kappa B signaling pathway [J]. Food & Function, 2022, 13(18): 9391–9406.
- [28] VASSALLO G, MIRIJELLO A, FERRULLI A, et al. Review article: Alcohol and gut microbiota – the possible role of gut microbiota modulation in the treatment of alcoholic liver disease [J]. Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 2015, 41(10): 917–927.
- [29] TIAN X Z, LI R, JIANG Y M, et al. *Bifidobacterium breve* ATCC15700 pretreatment prevents alcoholic liver disease through modulating gut microbiota in mice exposed to chronic alcohol intake[J]. Journal of Functional Foods, 2020, 72: 104045.
- [30] 匡逸静, 谢安琪, 田鹏, 等. 维生素C对酒精性肝损伤大鼠肠道菌群的影响[J]. 现代食品, 2021(10): 192–195, 202.
- KUANG Y J, XIE A Q, TIAN P, et al. Effect of vitamin C on the intestinal flora of rats with alcoholic liver injury[J]. Modern Food, 2021(10): 192–195, 202.

## Protective Effect and Mechanism of Aqueous Extract of *Thamnia vermicularis* Ach on Ethanol-Induced Acute Alcoholic Liver Injury in Mice

Han Xing<sup>1</sup>, Lü Jing<sup>1</sup>, Wang Xingni<sup>1</sup>, Qin Yu<sup>1</sup>, Li Lirong<sup>1\*</sup>, Huang Rui<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Faculty of Food Science and Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500

<sup>2</sup>Zhongken Huashan Mu Dairy Co., Ltd., Weinan 714000, Shaanxi)

**Abstract** Objective: The purpose of the present study was to investigate the protective effect of aqueous extract of *Thamnia vermicularis* Ach (TWA) on acute alcoholic liver injury (AALI) and its mechanism. Methods: The AALI model was induced by gavage of 56% alcohol at a dose of 12 mL/kg of the experiment. Its mechanisms were evaluated by weight loss, liver index, liver function, ability to metabolize alcohol, oxidative stress levels, inflammatory factors, changes in key protein expression and the effects on intestinal flora. Results: TWA significantly reduced the levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), increased the level of ethanol dehydrogenase (ADH), improved liver function and accelerated ethanol metabolism in mice. TWA also increased the activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-PX) in serum and liver, decreased malondialdehyde (MDA) content, and reduced level of oxidative stress in the mouse caused by ethanol. In addition, TWA reduced the inflammatory response of the body by suppressing tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) levels in the liver and serum. TWA enhanced Nrf2 pathway function and inhibited NF- $\kappa$ B pathway activation, thereby inhibiting liver inflammation and improving the antioxidant stress effect in mice with acute alcoholic liver injury. Meanwhile, the expression of CYP2E1, a key protein of alcohol metabolism, was down-regulated to accelerate hepatic alcohol metabolism and reduce hepatic alcohol metabolic injury. TWA promoted the proliferation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, and reduced the colony numbers of *Enterococcus*, *E. coli* and *Peptococcus*, so improved the intestinal environment. Conclusion: TWA could improve liver function and alcohol metabolism, enhance antioxidant capacity, reduce the level of inflammatory factors, inhibit the expression of key proteins of Nrf2/NF- $\kappa$ B pathway and maintain intestinal homeostasis, so improve AALI in mice.

**Keywords** aqueous extract of *Thamnia vermicularis* Ach; liver injury; oxidative stress; inflammation; alcohol