

苦荞麸皮总黄酮体外抗氧化活性 及体内解酒护肝作用

童钰琴¹, 李 姝^{2,3}, 牛曼思², 王松涛², 杨雪琴², 孙 琴^{4,1,*}, 冉茂芳²

(1.西南医科大学药学院,四川泸州 646000;

2.泸州品创科技有限公司,四川泸州 646000;

3.四川大学生命科学学院资源微生物学及生物技术教育部重点实验室,四川成都 610064;

4.西南医科大学附属中医医院中西医结合药物研究中心,四川泸州 646000)

摘要:目的:研究苦荞麸皮总黄酮(Total Flavonoids from Tartary Buckwheat Bran, TFTB)的体外抗氧化活性及体内解酒护肝作用。方法:在体外抗氧化活性实验中,观察TFTB对超氧阴离子自由基($O_2^- \cdot$)、DPPH \cdot 及 NO_2^- 离子的清除效果。在解酒护肝实验中,将50只小鼠随机分为模型组、阳性药对照组(150 mg/kg·bw)、TFTB低、中、高剂量组(100、200、300 mg/kg·bw)。各组小鼠一次性灌胃溶媒或药物30 min后,再一次性灌胃38% vol浓香型白酒(0.20 mL/10 g),测定小鼠醉酒率、醉酒耐受时间、醉睡时间,以及血清中谷草转氨酶(Aspartate Aminotransferase, AST)和肝脏中丙二醛(Malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)水平。结果:TFTB对超氧阴离子自由基($O_2^- \cdot$)、DPPH \cdot 及 NO_2^- 离子均有一定的清除作用,其半抑制浓度(IC₅₀)分别为1.36、0.02、1.79 mg/mL。与醉酒模型组对比,TFTB高剂量组醉酒耐受时间显著延长($P < 0.05$),TFTB各组醉睡时间极显著缩短($P < 0.01$);血清中AST含量显著降低($P < 0.05$),肝组织中SOD活性极显著提高($P < 0.01$),MDA含量显著降低($P < 0.05$)。结论:TFTB表现出较强的体外抗氧化活性,具有一定的防醉解酒作用,且在一定程度上能缓解小鼠的酒精性肝损伤。

关键词:黄酮,苦荞麸皮,抗氧化活性,醉酒,保肝作用

Antioxidant Activity of Total Flavonoids from Tartary Buckwheat Bran *in Vitro* and Its Effect on Antialcoholism and Liver Protection *in Vivo*

TONG Yu-qin¹, LI Shu^{2,3}, NIU Man-si², WANG Song-tao², YANG Xue-qin², SUN Qin^{4,1,*}, RAN Mao-fang²

(1.School of Pharmacy, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China;

2.Luzhou Pinchuang Technology Co., Ltd., Luzhou 646000, China;

3.Key Laboratory of Biological Resource and Ecological Environment of

Chinese Education Ministry, College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China;

4.Drug Research Center of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine,

Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China)

Abstract: Objective: To study the antioxidant activity *in vitro*, and relieving alcoholism and hepatoprotective effect in mice by total flavonoids from tartary buckwheat bran (TFTB). Method: *In vitro* antioxidant experiments, the scavenging effects of TFTB on superoxide anion radical ($O_2^- \cdot$), DPPH \cdot and NO_2^- were observed. In the alcohol-relieving and hepatoprotective experiments, fifty mice were randomly divided into drunkenness model group, positive control group (150 mg/kg·bw), TFTB low, medium and high dose group (100, 200 and 300 mg/kg·bw). After a one-time gavage of vehicle or drug for 30 min, the mice in each group were given a one-time gavage of Luzhou-flavor liquor of 38% vol (0.20 mL/10 g), and then the drunkenness rate, tolerance time of drunkenness, time of drunkenness and the levels of aspartate aminotransferase (AST) in serum, malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) in liver were determined. Results: TFTB had a certain scavenging effect on superoxide anion radical ($O_2^- \cdot$), DPPH \cdot and NO_2^- , and the inhibitory concentration 50% (IC₅₀) values were 1.36, 0.02 and 1.79 mg/mL. Compared with the model group of drunkenness, the tolerance time of drunkenness in the high dose group of TFTB was significantly prolonged ($P < 0.05$), the groups of TFTB also had a shortened drunkenness ($P < 0.01$), a significant

收稿日期:2019-12-12

作者简介:童钰琴(1991-),女,硕士研究生,研究方向:中药新药研究与质量评价,E-mail:tongyuqin.hi@163.com。

*通讯作者:孙琴(1976-),女,博士,教授,研究方向:中药新药研究与质量评价,E-mail:sdy-0502@126.com。

基金项目:四川省中医药管理局项目(2017C012);泸州市科技计划项目(2016CDLZ-S16、2017-S-49);泸州市科技局项目(2017LZXNYD-T01);西南医大科技项目[2018]6号-51。

decrease of AST level in serum ($P < 0.05$), and a significant increase SOD activity ($P < 0.01$) and a significant decrease of MDA level in liver ($P < 0.05$). Conclusion: TFTB shows strong antioxidant activity *in vitro*, and has a certain anti-alcoholic effect and can alleviate alcoholic liver injury in mice to a certain extent.

Key words: flavonoids; tartary buckwheat bran; antioxidant activity; drunkenness; hepatoprotective effect

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2020)17-0314-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020.17.053

引文格式: 童钰琴, 李姝, 牛曼思, 等. 苦荞麸皮总黄酮体外抗氧化活性及体内解酒护肝作用[J]. 食品工业科技, 2020, 41(17): 314-319, 326.

苦荞麦 (Tartary buckwheat), 学名鞑靼荞麦 (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaerth), 是蓼科 (Polygonaceae) 荞麦属 (*Fagopyrum*) 的一种营养价值丰富的药食两用粮食作物^[1]。苦荞在中国有着悠久的食用历史,《本草纲目》中记载其有益气力、续精神、利耳目、降气宽肠、健胃的作用。苦荞麦中除了含有蛋白质、碳水化合物、矿物质及维生素等丰富的营养成分外,还含有黄酮类、酚酸、单宁、植物甾醇等生物活性物质^[2]。

中国有悠久的酿酒历史和内涵丰富的酒文化,酒作为人们日常生活中的一种重要饮品,正逐渐成为各种社交及情感沟通的媒介^[3]。近年来虽然欧洲国家的酒精性饮料消费量略有下降,但包括中国在内的其他国家销量仍呈现上涨趋势,因过度饮酒所带来的个人健康及全球公共卫生问题也受到广泛的关注^[4-5]。正常情况下,自由基及活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 都是机体的正常代谢物,机体也处于氧化还原的动态平衡中,因而理性适量的饮酒不会对身体造成严重损害;但是长期大量的饮酒则会破坏机体的氧化还原平衡,引起机体的氧化损伤,造成机体生理功能的紊乱^[6-7]。过度饮酒严重时还会造成酒精性肝损伤,进而引发酒精性肝炎、肝脏脂肪变性、肝硬化、肝癌等病理性疾病,对机体健康造成威胁^[8-9]。因此,解酒护肝产品的研究与开发也逐渐受到了社会各界的重视。

目前市面上的解酒产品多以古方中的中草药结合现代化的手段来进行开发,这些产品以其低毒副作用等优势成为市场上的主流产品,但同时也存在活性成分不明确等问题^[10]。近年来的研究表明,膳食中含有的活性物质如黄酮、白藜芦醇、皂苷、多糖和 β -胡萝卜素等,可通过抗氧化、抗炎、促凋亡等多种机制对酒精造成的肝损伤产生保护作用^[11-12]。作为植物中普遍存在的一类天然化合物,黄酮类物质具有广泛的生理活性,相关研究也显示黄酮类物质如葛根总黄酮、荷叶总黄酮等具有良好的解酒护肝功效^[13-14]。苦荞黄酮是苦荞中主要的功能活性物质,具有降低血糖、调节血脂、抗氧化、抗炎、抗肿瘤等生物活性,也具有抗动脉粥样硬化、预防老年痴呆等疾病的作用^[15]。然而,目前国内外关于 TFTB 解酒护肝的研究报道内容较少。

本文就 TFTB 的体外抗氧化活性、解酒功能及对醉酒小鼠肝损伤的保护作用开展研究,以期 TFTB 作为解酒功能性食品及解酒药物的开发研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

清洁级 KM 小鼠 4~5 周龄,体重 18~22 g,雄性,由西南医科大学实验动物中心提供,生产许可证号: SCXK(川)2018-17,小鼠于实验前 7 d 购进,并进行适应性喂养。动物房内光线充足,通风良好,室内温度 (26 ± 1) °C,相对湿度为 45%~50%,小鼠饲养维持饲料,饮用一级动物饮水,在饲养期间小鼠自由进食、饮水;苦荞麸皮总黄酮 (Total Flavonoids from Tartary Buckwheat Bran, TFTB) 总黄酮含量 70.83%,实验室自制;儿茶素、表儿茶素、牡荆素、芦丁、杨梅素、山奈酚-3-O 芸香糖苷、槲皮素、山奈酚标准品 (纯度均 $\geq 98\%$) 成都普思生物科技股份有限公司;甲醇、磷酸 (色谱纯) Knowles; 净品级 ADS-7 型大孔吸附树脂 天津浩聚树脂科技有限公司;磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、无水乙醇、冰乙酸、盐酸、 α -萘乙二胺盐、羧甲基纤维素钠 (Carboxymethylcellulose sodium, CMC-Na) 分析纯,成都市科隆化学品有限公司;维生素 C (L-ascorbic acid, V_c)、对氨基苯磺酸 上海阿拉丁试剂公司;邻苯三酚、亚硝酸钠 分析纯,国药化学试剂公司;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical 2, DPPH) Sigma 公司;38% vol 浓香型白酒 泸州老窖股份有限公司;联苯双酯 北京协和制药厂;谷草转氨酶 (Aspartate aminotransferase, AST) 试剂盒、总超氧化物歧化酶 (Total superoxide dismutase, T-SOD) 试剂盒、丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 试剂盒、蛋白定量试剂盒 南京建成生物工程有限公司。

ME20A 型万分之一天平 梅特勒-托利多仪器有限公司;LC-16 型高效液相色谱仪 日本岛津公司;DHG-9245A 型电热鼓风干燥箱 上海一恒科技有限公司;SP-756P 型紫外可见分光光度计 上海光谱仪器有限公司;5804R 型台式高速离心机 艾本德中国有限公司;Flex Station 3 型酶标仪 美谷分子仪器有限公司;DZKW-D-4 恒温水浴锅 北京市永光明医疗仪器有限公司;MT-30K 型自动匀浆器 北京中兴伟业仪器有限公司;WH-861 型涡旋混合器 太仓市华利达实验设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 TFTB 的制备方法 取苦荞麸皮适量,加入 10 倍量的 70% 食品级乙醇在 60 °C 下热回流提取 3 次,每次 3 h,合并 3 次提取液,减压浓缩至干,得苦荞麸皮黄酮粗品。以苦荞麸皮黄酮粗品加适量水样品作

为上样液,通过 ADS-7 型大孔吸附树脂进行动态吸附,再用 90% 乙醇洗脱,收集洗脱液减压浓缩至干,即得 TFTB 样品。

1.2.2 TFTB 黄酮组分及含量测定 参照高效液相色谱法 (High performance liquid chromatography, HPLC) [16] 测定,取 TFTB 样品适量,甲醇充分溶解后,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,HPLC 进行检测,检测条件为:色谱柱为 Intersustain C₁₈ (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm),流速 1.0 mL/min,柱温 35 $^{\circ}\text{C}$,检测波长 280 nm;梯度洗脱的流动相 A 为 0.2% 磷酸溶液,流动相 B 为甲醇。洗脱程序:0~25 min,20%~35% B;25~40 min,35%~50% B;40~50 min,50%~90% B;50~60 min,90%~90% B。检测完毕后与混合标准品进行对比。

1.2.3 体外抗氧化活性测定

1.2.3.1 超氧阴离子自由基 ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 清除作用的测定

使用邻苯三酚自氧化法 [17] 进行测定。配制不同质量浓度 TFTB (0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mg/mL) 及阳性对照品 V_c (0.02、0.05、0.1、0.2、0.4 mg/mL) 和芦丁 (0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mg/mL) 溶液作为清除剂。在 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温条件下,在具塞试管中加入 pH = 8.34 的 66.7 mmol/L 的 PBS 5.00 mL,2 mmol/L 邻苯三酚 0.2 mL,加入 TFTB、V_c 和芦丁样品溶液 1.0 mL,然后再加一定量缓冲溶液至体系总体积为 9.00 mL,并以二次蒸馏水作参比,邻苯三酚最后加入,然后立即迅速混匀,在 6 min 内每 30 s 测定一次吸光度值,并以反应时间为横坐标,吸光度值为纵坐标进行线性回归,最后得到的直线斜率为反应速率 V₂;其他条件不变,用 1 mL 蒸馏水替代样品溶液,得到反应速率为 V₁,按下式计算清除率:

$$\text{清除率}(\%) = \frac{V_1 - V_2}{V_1} \times 100$$

其中:V₁:未加清除剂时的反应速率;V₂:加入清除剂时的反应速率。

1.2.3.2 DPPH·清除作用的测定 参照文献 [18-19] 方法进行测定。分别配制质量浓度为 0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/mL 的 TFTB 和芦丁溶液及 V_c (0.01、0.02、0.04、0.08、0.12、0.16、0.20 mg/mL) 溶液作为清除剂。分别吸取 2 mL 浓度为 0.2 mg/mL 的 DPPH 50% 乙醇溶液及不同浓度清除剂置于具塞试管中,摇匀,避光反应 30 min 后,以无水乙醇作为参比于 517 nm 测定其吸光度 A_i;方法同 A₁ 操作,测定 2 mL DPPH 50% 乙醇溶液与无水乙醇混合反应后吸光度 A_c;方法同 A₁ 操作,测定 2 mL 不同浓度清除剂及 50% 乙醇溶液混合后吸光度 A_j。按照公式计算清除率。用清除率表示清除剂的清除能力,清除率越大表示 TFTB 的抗氧化性越强。按以下公式计算:

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_c}\right) \times 100$$

其中:A_i:加清除剂时 DPPH·体系的吸光度;A_j:清除剂的吸光度值;A_c:未加清除剂时 DPPH·体系吸光度值。

1.2.3.3 NO₂⁻ 离子清除作用的测定 参考文献 [20] 方法进行实验。配制质量浓度为 0.4、0.8、1.2、1.6、

2.0 mg/mL 的 TFTB 和 V_c 溶液及芦丁 (0.4、0.8、1.2、1.6、2.0、2.4 mg/mL) 溶液作为清除剂。在 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,分别吸取不同清除剂 2 mL 置于具塞试管中,加入 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 NaNO₂ 溶液 2 mL 反应 30 min,然后加入 4 g/L 对氨基苯磺酸 2 mL 反应 5 min,再加入 2 g/L 盐酸萘乙二胺盐溶液 1 mL 显色,蒸馏水定容至 25 mL 混匀反应 15 min,在 538 nm 处测定吸光度值。清除剂对 NO₂⁻ 离子的清除能力以清除率计算。

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_c}\right) \times 100$$

其中:A_c:未加清除剂时吸光度值;A_i:加入清除剂时吸光度值;A_j:未加 NaNO₂ 时吸光度值。

1.2.4 解酒护肝作用评价

1.2.4.1 小鼠醉酒模型的建立 通过参考文献 [21] 制备小鼠醉酒模型,分别以 0.15、0.20、0.23、0.25 mL/10 g 剂量给各组小鼠一次性经口灌胃 38% vol 浓香型白酒,每组 10 只,确定能使小鼠出现翻正反射消失数量最大而不出现死亡的剂量为最佳致醉剂量。实验结果显示,在能够保证全部小鼠醒来的情况下,使小鼠醉酒只数达到最大的最佳致醉剂量为 0.20 mL/10 g。

1.2.4.2 动物分组及给药 取 50 只雄性 KM 小鼠,按体重随机分为 5 组,每组 10 只。分别是醉酒模型组 (0.5% 的 CMC-Na 溶液)、阳性对照组 (联苯双酯,150 mg/kg·bw)、TFTB 低、中、高剂量组 (100、200、300 mg/kg·bw)。在实验前先对小鼠禁食不禁水 12 h,使用 0.5% 的 CMC-Na 溶解阳性药物及 TFTB,各组小鼠以 0.1 mL/10 g 剂量分别灌胃对应剂量的溶媒、阳性药物及 TFTB。各组小鼠在一次性灌胃溶媒或相应药物后 30 min 按照 0.20 mL/10 g 剂量一次性灌胃 38% vol 白酒。

1.2.4.3 小鼠醉酒情况观察 参考文献 [22] 中方法及标准对小鼠醉酒情况进行判定,实验各组小鼠灌胃白酒后,观察小鼠的醉酒现象。观察并记录小鼠醉酒耐受时间 (从灌胃白酒后到醉酒的时间)、醉睡时间 (翻正反射消失持续时间),并计算小鼠的醉酒率。以翻正反射消失作为判断小鼠醉酒的标准,即当小鼠保持背向下的姿势 30 s 以上时,则认为其翻正反射消失,判定为醉酒。

1.2.4.4 血清指标测定 实验各组小鼠分别于灌胃白酒后 5 h,用 1% 戊巴比妥钠腹腔注射 (40 mg/kg) 麻醉,摘眼球取血,置 EP 管中,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 30 min 后,3500 r/min 离心 10 min,取上层血清置另一 EP 管中,照谷草转氨酶 (AST/GOT) 试剂盒说明书中方法测定小鼠血清中 AST 活性。

1.2.4.5 肝脏指标测定 各组实验小鼠分别于灌胃白酒 5 h 后处死,取出肝脏,使用预冷的生理盐水反复冲洗,用滤纸吸干水分后,使用天平称重。称重后的肝脏加入预冷的生理盐水匀浆制备 10% 的肝组织匀浆液,组织匀浆液离心 10 min (3000 r/min,4 $^{\circ}\text{C}$),取上清液分别按照相关试剂盒说明书操作,进行 SOD、MDA 和蛋白含量的测定。

1.3 数据处理

实验数据采用单因素方差分析 (one-way

ANOVA) 比较组间差异,以 $P < 0.05$ 作为差异具有统计学意义的判断标准。方差齐时,采用 LSD 法进行两两比较,若方差不齐,则采用 Tamhane's 法进行两两比较。醉酒率比较使用卡方检验,以上数据由 SPSS 19.0 for Windows 进行统计分析处理。

2 结果与分析

2.1 TFTB 样品组分的初步分析

从图 1A 可以看出,在此色谱条件下,8 种黄酮类化合物的标准品得到较好分离,TFTB 样品溶液色谱图中 4 个目标峰的保留时间分别与标准品溶液芦丁、山奈酚-3-O 芸香糖苷、槲皮素、山奈酚的色谱峰保留时间一致,其中以芦丁相对含量最高,可达总黄酮含量的 87.8% (图 1B)。

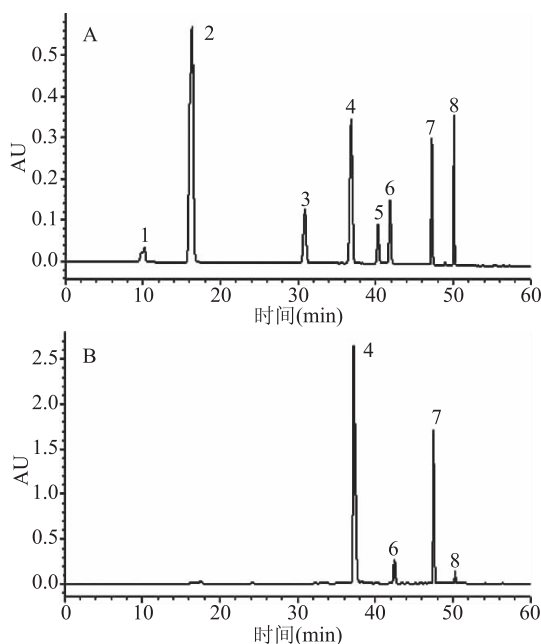


图 1 黄酮标准品(A)与 TFTB(B)HPLC 图

Fig.1 HPLC chromatograms of flavonoids(A) and TFTB(B)

注:1:儿茶素;2:表儿茶素;3:牡荆素;4:芦丁;

5:杨梅素;6:山奈酚-3-O 芸香糖苷;7:槲皮素;8:山奈酚。

2.2 体外抗氧化活性

2.2.1 对超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)清除效果 由图 2 可知,TFTB 对超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)具有一定的清除作用,在试验浓度范围内,随着添加量的增加,对超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)清除率不断增大。TFTB 的半数抑制浓度(IC_{50})为 1.36 mg/mL, V_c 及芦丁的 IC_{50} 分别为 0.02、1.02 mg/mL。TFTB 中芦丁等黄酮类化合物的含量为 70.83%,不及芦丁的纯品浓度,因此 TFTB 清除能力稍弱于芦丁。于志峰等^[17]研究表明,苦荞黄酮精提物对邻苯三酚自氧化体系产生的超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)有清除作用,且在试验浓度范围内随着加入量的增加,清除率逐渐增大。

2.2.2 对 DPPH·清除效果 由图 3 可知,TFTB 对 DPPH·具有一定的清除能力,在试验浓度范围内,TFTB 对 DPPH·的清除能力随着浓度的增大而增加,呈现出量效关系。TFTB 对 DPPH·清除的 IC_{50} 为 0.02 mg/mL,即质量浓度为 0.02 mg/mL 时,体系中

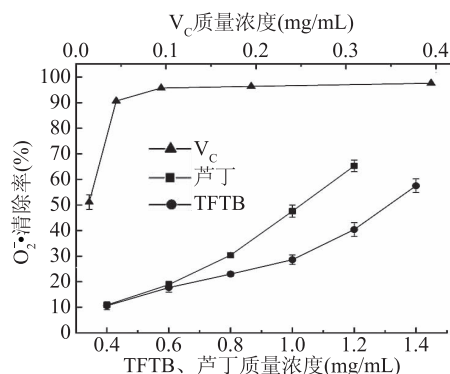


图 2 不同添加量不同清除剂对超氧阴离子自由基的清除作用

Fig.2 Scavenging effects of different amount of varied scavenger on superoxide anion radicals

50% 的 DPPH·可被清除,但 TFTB 清除能力弱于同质量浓度的芦丁。在质量浓度为 2.0 mg/mL 时,TFTB 对 DPPH·的清除率能够达到 90%,与芦丁的清除作用相当,但清除能力低于 V_c 。郭刚军等^[23]研究表明,苦荞黄酮对 DPPH·具有较好的清除能力,清除 DPPH·能力随着苦荞黄酮质量浓度的增大而升高,与本研究结果一致。

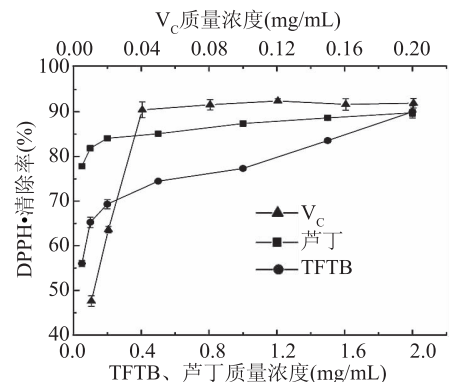


图 3 不同添加量不同清除剂对 DPPH·的清除作用

Fig.3 Scavenging effects of different amount of varied scavenger on DPPH·

2.2.3 对 NO_2^- 离子清除效果 由图 4 可知,TFTB 对 NO_2^- 离子具有一定的清除能力,在试验浓度范围内,对 NO_2^- 离子的清除能力随添加量的增加而不断提高。TFTB、 V_c 和芦丁的 IC_{50} 分别为 1.79、0.29、2.64 mg/mL,说明 TFTB 对 NO_2^- 离子清除能力略高于芦丁而弱于 V_c 。尤玲玲等^[24]通过研究表明,芦丁是苦荞黄酮含有的主要抗氧化物质,除芦丁外,TFTB 中含有的槲皮素、山奈酚-3-O 芸香糖苷等其他黄酮类化合物可能具有更高的抗氧化活性,因此使得 TFTB 对 NO_2^- 离子的清除能力略高于芦丁。

2.3 解酒护肝作用

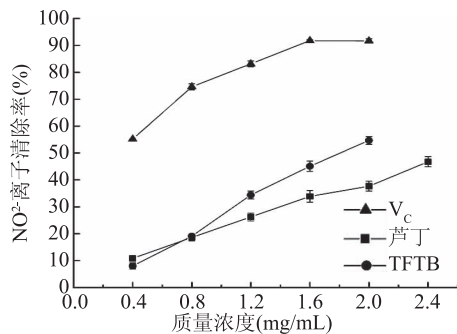
2.3.1 防醉解酒作用 当按照实验确定剂量灌胃白酒后,各组小鼠均表现出不同程度的醉酒现象。具体表现为出现醉酒后的兴奋状态,爬行不稳,频繁用前肢搔头、闭眼不动等行为。由表 1 可知,在醉酒率方面,醉酒模型组有 9 只小鼠醉酒,醉酒率为 90%,结合醉酒模型建立实验结果及文献报道,表明醉酒

表1 TFTB 对小鼠耐受时间及醉酒时间的影响

Table 1 Effects of TFTB on tolerance time and drunkenness time in mice

组别	动物数(只)	耐受时间(min)	醉睡时间(min)	醉酒率(只/%)
醉酒模型组	10	60.38 ± 25.28	179.40 ± 33.150	9(90%)
联苯双酯组	10	37.50 ± 15.02	43.67 ± 22.94**	3(30%)*
低剂量组	10	43.25 ± 12.98	94.00 ± 22.73**	7(70%)
中剂量组	10	47.67 ± 14.50	96.25 ± 31.72**	5(50%)
高剂量组	10	83.20 ± 9.65*	49.75 ± 11.90**	7(70%)

注:与醉酒模型组相比,*表示具有显著差异, $P < 0.05$; **表示具有极显著差异性, $P < 0.01$ 。表2、表3同。

图4 不同添加量不同清除剂对 NO₂⁻ 的清除作用Fig.4 Scavenging effects of different amount of varied scavenger on NO₂⁻

模型造模成功^[22];TFTB 各组醉酒率较之醉酒模型组略有降低但无显著性差异($P > 0.05$)。在耐受时间方面,与醉酒模型组相比,除 TFTB 高剂量组外,其他组耐受时间均有不同程度的缩短,一方面可能是酒精的摄入抑制了 TFTB 在体内的进一步吸收和利用,另一方面可能是 TFTB 对耐受时间的延长作用存在剂量依赖性。在醉睡时间方面,与醉酒模型组对比,TFTB 组及联苯双酯组的醉睡时间均极显著缩短($P < 0.01$)。

2.3.2 TFTB 对血清指标的影响 由表 2 可知,与醉酒模型组对比,TFTB 组与联苯双酯组的 AST 水平均显著降低($P < 0.05$)。其中 TFTB 低剂量组降低转氨酶的效果与目前公认的降酶保肝药物联苯双酯的作用相当,与醉酒模型组对比具有极显著性差异($P < 0.01$)。

表2 TFTB 对小鼠 AST 的影响

Table 2 Effects of TFTB on AST in mice

组别	AST(卡门氏单位)
醉酒模型组	42.78 ± 8.37
联苯双酯组	29.90 ± 4.76**
低剂量组	30.65 ± 6.71**
中剂量组	34.67 ± 3.91*
高剂量组	33.87 ± 7.67*

2.3.3 TFTB 对肝脏指标的影响 由表 3 知,与醉酒模型组相比,TFTB 组和联苯双酯组肝脏中 SOD 活性均极显著提升($P < 0.01$),但不同剂量组 TFTB 间无显著的量效关系。在肝组织 MDA 指标方面,与醉酒模型组对比,TFTB 各组肝脏中 MDA 的含量均显著降低($P < 0.05$)。

表3 TFTB 对小鼠 SOD、MDA 的影响

Table 3 Effects of TFTB on SOD and MDA in mice

组别	SOD(U/mg prot)	MDA(nmol/mg prot)
醉酒模型组	88.51 ± 7.58	12.97 ± 1.34
联苯双酯组	106.34 ± 8.56**	11.11 ± 2.21*
低剂量组	118.77 ± 11.46**	11.15 ± 1.38*
中剂量组	115.98 ± 11.64**	10.62 ± 1.94**
高剂量组	110.73 ± 8.56**	10.72 ± 1.75**

3 讨论与结论

本研究采用三种目前常用的自由基体系:超氧阴离子自由基(O₂⁻·)、DPPH·及 NO₂⁻ 离子对 TFTB 的体外抗氧化活性进行研究。TFTB 对小鼠解酒护肝作用的研究采用的是目前醉酒实验中常用的动物醉酒模型。实验以小鼠醉酒率、醉酒耐受时间、醉睡时间为观察指标考察 TFTB 对小鼠的防醉解酒作用;并以血清转氨酶 AST 含量、肝脏中抗氧化酶 SOD 活性及肝脏脂质过氧化损伤标志物 MDA 含量为检测指标探究 TFTB 对醉酒小鼠肝损伤的保护作用。

相关研究表明,苦荞麸皮所含有的黄酮类物质具有良好的体外抗氧化活性^[24-25],这与本实验中 TFTB 对超氧阴离子自由基(O₂⁻·)、DPPH·及 NO₂⁻ 离子表现出的清除作用结果一致。酒精进入体内经消化道吸收入血后,90% 均需通过肝脏进行氧化代谢^[26]。酒精氧化代谢将会产生过量的 ROS 及自由基,这会导致机体出现一系列氧化应激反应并破坏脂质、蛋白质和 DNA 等生物分子而造成氧化损伤;另一方面,机体的氧化应激也会使受氧化还原调节的细胞信号传导通路被破坏而导致细胞功能丧失,进而对肝脏造成损伤,引发不同的肝脏疾病^[7,27]。因此,TFTB 的体外抗氧化活性可能是其在机体内发挥解酒护肝作用的基础。

醉酒主要是指因大量饮酒而造成急性酒精中毒,使得机体中枢神经呈现出一种兴奋或抑制状态^[28]。目前开发出的解酒产品主要是通过抑制胃肠等消化系统对酒精的吸收或直接作用于肝代谢酶系而加速酒精在体内的代谢而起到解酒效果^[29]。朱振元等^[30]研究葛根素的防醉解酒效果,结果显示,葛根素能够降低小鼠血清中的酒精浓度从而延长小鼠的醉酒耐受时间,缩短醉睡时间,具有良好的防醉解酒药效。本实验的研究结果表明,同醉酒模型组对比,给药 300 mg/kg·bw TFTB 能够延长醉酒耐受时间($P < 0.05$),同时 TFTB 各组小鼠醉睡时间均显著缩短($P < 0.01$)。结果表明,TFTB 具有较好的防醉解

酒作用。

AST 主要存在于肝脏细胞的线粒体中,而酒精在肝脏代谢时产生的大量 ROS 将会损伤肝细胞线粒体膜及细胞膜,使得肝脏细胞中的 AST 大量释放至血液中引起指标的升高,因此血清中 AST 指标的含量是判断肝损伤的重要指标^[31]。与醉酒模型组相比,TFTB 各组及联苯双酯组血清中 AST 含量均显著降低($P < 0.05$),表明 TFTB 对小鼠酒精所致肝脏损伤具有一定的保护作用。Sun 等^[32]通过研究表明一种膳食类黄酮醇非瑟酮可以抑制酒精造成的氧化应激、肝细胞凋亡,脂质蓄积进而实现对肝脏的保护作用,因此 TFTB 对肝脏的保护作用可能与其体内抗氧化活性有关。

SOD 在机体中的主要功能是清除体内的自由基,其在一定程度上反映了氧化应激反应的程度。酒精的刺激会造成肝脏中的 SOD 活性水平下降,导致机体内的氧化还原平衡的破坏^[33]。MDA 作为脂质过氧化终产物,可使核酸、蛋白质等大分子出现交联或断裂而影响细胞的正常生理活性,因此,MDA 水平是脂质过氧化损伤的标志产物,反映了活性氧对肝脏的损伤程度;酒精的摄入导致机体内的脂质过氧化反应增加,从而会引起肝脏中 MDA 含量的升高^[33-34]。肝组织指标测定结果显示,与醉酒模型组对比,TFTB 各组小鼠肝脏中 SOD 活力均极显著提升($P < 0.01$),且肝脏中 MDA 的含量均显著降低($P < 0.05$)。相关研究结果显示,黄酮类化合物可通过抑制氧化应激,改善脂质代谢,减轻线粒体损伤,诱导细胞凋亡等方式改善肝脏损伤^[35]。也有研究表明芦丁可以减轻 t-BHP 诱导的小鼠肝脏的氧化应激损伤,有助于由氧化应激引起的相关疾病的预防和治疗^[36]。而芦丁作为 TFTB 中主要的黄酮化合物,其作为一种膳食因子可能有助于改善机体细胞内氧化还原平衡。这提示 TFTB 对酒精造成肝损伤的保护作用可能是通过提高小鼠体内 SOD 酶活力加速细胞对自由基的清除并抑制细胞内脂质过氧化反应进而改善了氧化应激反应实现。

综上所述,TFTB 对超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)、DPPH \cdot 及 NO_2^{\cdot} 离子均有一定的清除作用,表现出较强的体外抗氧化活性。TFTB 可以延长醉酒耐受时间(给药 300 mg/kg·bw TFTB),缩短小鼠的醉睡时间,具有较好的防醉解酒功能;同时,TFTB 还能够提高醉酒小鼠肝脏 SOD 酶的活力而提高机体抗氧化的能力,从而减少醉酒小鼠肝脏中过氧化脂质反应,缓解酒精对肝脏的损伤,起到保护肝脏的作用。本研究为 TFTB 的进一步开发利用提供了新的思路和参考,但研究也存在着许多问题,需要对 TFTB 解酒护肝的机制开展更深入的研究,以阐明其产生解酒及护肝作用的机理。同时,也需进一步观察 TFTB 长期给药对动物的干预及保护作用,进一步验证其解酒护肝的作用。

参考文献

- [1] 赵钢. 中国荞麦[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 49-51.
- [2] 聂薇, 李再贵. 苦荞麦营养成分和保健功能[J]. 粮油食品

科技, 2016, 24(1): 40-45.

- [3] 方芳, 王凤忠. 醉酒与解酒的研究[J]. 农产品加工·学刊, 2013, 22: 59-61.
- [4] Mathurin P, Bataller R. Trends in the management and burden of alcoholic liver disease [J]. Journal of Hepatology, 2015, 62: 38-46.
- [5] Stickel F, Datz C, Hampe J, et al. Pathophysiology and management of alcoholic liver disease: Update 2016 [J]. Gut and Liver, 2017, 11(2): 173-188.
- [6] Liochev S I. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2013, 60: 1-4.
- [7] Jung H A, Abdul Q A, Byun J S, et al. Protective effects of flavonoids isolated from Korean milk thistle *Cirsium japonicum* var. *maackii* (Maxim.) Matsum on tert-butyl hydroperoxide-induced hepatotoxicity in HepG2 cells [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2017: 62-72.
- [8] 酒精性肝病防治指南(2018年新版)[J]. 临床肝胆病杂志, 2018, 34(5): 939-946.
- [9] Hosseini N, Shor J, Szabo G. Alcoholic hepatitis: A Review [J]. Alcohol and Alcoholism, 2019, 54(4): 408-416.
- [10] 吕文平, 汪超, 李良, 等. 解酒制品的研究进展[J]. 海峡药学, 2009, 21(6): 8-11.
- [11] Tu Y, Zhu S, Wang J, et al. Natural compounds in the chemoprevention of alcoholic liver disease [J]. Phytotherapy Research, 2019: 2192-2212.
- [12] 刘畅, 成玉梁, 郭亚辉, 等. 芦荟多糖联合茶多酚对小鼠酒精性肝损伤的预防作用[J]. 食品工业科技, 2019, 40(22): 300-305.
- [13] 刘建兴, 何进勇, 李耿, 等. 葛根总黄酮对醉酒小鼠自主活动及血清中乙醇浓度的影响[J]. 中医药导报, 2015, 21(5): 42-44.
- [14] 梁树才, 宗自卫, 于海英, 等. 荷叶总黄酮对小鼠酒精肝损伤的保护作用[J]. 食品工业科技, 2014, 35(9): 347-350.
- [15] 谭平艳, 郭皖北. 苦荞黄酮的生理功能及其作用机制的研究进展[J]. 医学综述, 2018, 24(8): 1627-1632.
- [16] 濮生财. 苦荞黄酮含量研究与千金子抗癌因子 L3 提取和结构修饰[D]. 成都: 成都理工大学, 2015.
- [17] 于智峰, 付英娟, 王敏, 等. 苦荞黄酮提取物体外清除自由基活性的研究[J]. 食品科技, 2007(3): 126-129.
- [18] Wang X, Xie K, Zhuang H, et al. Volatile flavor compounds, total polyphenolic contents and antioxidant activities of a China ginkgo wine [J]. Food Chemistry, 2015, 182: 41-46.
- [19] 牛改改, 游刚, 李京丽. 还原糖对牡蛎蛋白肽糖基化反应产物功能特性与抗氧化性的影响[J]. 食品工业科技, 2018, 39(8): 44-49.
- [20] 田成. 桂花果实多酚的超声波提取及抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2011, 32(24): 106-110.
- [21] 杨柱, 田维毅, 王文佳, 等. 5 首解酒方对小鼠醉酒模型解酒效应的比较研究[J]. 中成药, 2010, 32(11): 1969-1972.
- [22] 郑立发, 邓瑾, 张振海, 等. 解酒护肝口服液对醉酒模型小鼠解酒作用的研究[J]. 山东中医杂志, 2014, 33(6): 478-480.

(下转第 326 页)

- [5] Cho M S, Kim S Y, Suk K T, et al. Modulation of gut microbiome in nonalcoholic fatty liver disease: Pro-, pre-, syn-, and antibiotics [J]. *Journal of Microbiology*, 2018, 56(12): 855-867.
- [6] 唐京, 陈明, 柯文灿, 等. 乳酸菌在疾病防治和人体保健中的应用研究进展 [J]. *微生物学杂志*, 2017, 37(4): 98-107.
- [7] 杜瑞. 益生菌调控胃肠道菌群改善肉品质的研究进展 [J]. *微生物学通报*, 2019, 46(9): 2378-2385.
- [8] 杨光, 窦琳, 唐蔚青, 等. 高脂饮食和西方饮食诱导的非酒精性脂肪肝小鼠模型的特征比较 [J]. *医学分子生物学杂志*, 2018, 15(1): 17-24.
- [9] 孙海丽, 刘鹏飞. 非酒精性脂肪肝及肥胖与肠道菌群的研究进展 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2018, 18(80): 94-95.
- [10] 刘嘉琪, 周少明. 非酒精性脂肪性肝病肠道菌群的研究进展 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2017, 33(12): 2453-2456.
- [11] 刘小青, 张冰, 胡京红, 等. 菊苣提取物对高脂模型小鼠肝脂水平和 NO 的影响 [J]. *中药新药与临床药理*, 2000, 11(6): 340-342.
- [12] Han K, Bose S, Wang J H, et al. Contrasting effects of fresh and fermented kimchi consumption on gut microbiota composition and gene expression related to metabolic syndrome in obese Korean women [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2015, 59(5): 1004-1008.
- [13] 陈文翰, 孙光裕, 陈伟忠, 等. 复合乳酸菌胶囊对非酒精性脂肪性肝病患者肠道菌群及血脂影响的临床研究 [J]. *中国医学创新*, 2018, 15(25): 1-5.
- [14] 唐外姣, 周本杰. 肠道菌群失调-非酒精性脂肪肝病治疗新靶点 [J]. *世界华人消化杂志*, 2017, 25(22): 23-29.
- [15] 王丽, 李显辉. 益生菌对大鼠非酒精性脂肪肝的治疗作用及机制 [J]. *世界华人消化杂志*, 2013, 21(36): 4127-4132.
- [16] He J, Yang X F. Gut microbiota and non-alcoholic fatty liver disease [J]. *World Chinese Journal of Digestology*, 2017, 25(27): 2480-2485.
- [17] Bandsma R, Mouzaki M. Targeting the gut microbiota for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Current Drug Targets*, 2015, 16(12): 1324-1331.
- [18] Kelishadi R, Farajian S, Mirlohi M. Probiotics as a novel treatment for non-alcoholic fatty liver disease; A systematic review on the current evidences [J]. *Hepatitis Monthly*, 2013, 13(4): 7233.
- [19] 黄强, 阮梦成, 王华林, 等. 鲟鱼油对高脂诱导的非酒精性脂肪肝小鼠肠道菌群平衡的影响 [J]. *武汉轻工大学学报*, 2017, 36(4): 16-21.
- [20] Wang B G, Xu H B, Xu F, et al. Efficacy of oral *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521 on microflora and antioxidant in mice [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2016, 62: 249-262.
- [21] 李金龙, 陈婷婷, 王高飞, 等. 基于常规 HE 染色的组织最佳核染时间探索 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2018, 34(6): 697-699.
- [22] 陈龙, 徐畅, 马京升, 等. 动物双歧杆菌 A6 对减轻小鼠慢性酒精肝损伤的作用 [J]. *中国奶牛*, 2016, 00(11): 51-56.
- [23] 白利梅, 郑鹏远, 张军, 等. 降脂益生菌对非酒精性脂肪肝大鼠胆汁酸代谢的影响及机制 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2016, 36(2): 110-116.
- [24] 邹堂斌, 黄明元, 洗叶明, 等. 虾青素抑制 MCD 饮食诱导的小鼠非酒精性脂肪肝纤维化 [J]. *现代预防医学*, 2016, 43(4): 130-133.
- [25] 卢双, 沈天白, 陈阳, 等. 调节肠道菌群治疗非酒精性脂肪肝的研究进展 [J]. *肝脏*, 2019, 24(5): 585-587.
- [26] Sohn W, Jun D W, Lee K N, et al. *Lactobacillus paracasei* induces M2-dominant kupffer cell polarization in a mouse model of nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Digestive Diseases & Sciences*, 2015, 60(11): 3340-3350.
- [27] 郑贤干, 王教常, 王益训, 等. 双歧杆菌三联活菌肠溶胶囊对非酒精性脂肪肝患者肝功能及炎症因子的影响 [J]. *中国药师*, 2015(6): 975-977.
- [28] 郭刚军, 何美莹, 邹建云, 等. 苦荞黄酮的提取分离及抗氧化活性研究 [J]. *食品科学*, 2008, 29(12): 373-376.
- [29] 尤玲玲, 刘幻幻, 李晓雁, 等. 苦荞黄酮的纯化及抗氧化活性的研究 [J]. *中国粮油学报*, 2014, 29(8): 23-27.
- [30] 李富华, 刘冬, 明建. 苦荞麸皮黄酮抗氧化及抗肿瘤活性 [J]. *食品科学*, 2014, 35(7): 58-63.
- [31] 李秀敏, 李慧莉. 乙醇诱导肝损伤作用机制概述 [J]. *中国药师*, 2008(9): 1114-1116.
- [32] Zhang L, Wang X, Cueto R, et al. Biochemical basis and metabolic interplay of redox regulation [J]. *Redox Biology*, 2019: 26.
- [33] 傅宏义. 新编药物大全 [M]. 3 版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 956.
- [34] 潘敏, 谢少龙, 丘慧秋, 等. 枳椇子、葛花的最佳配比解酒方影响人体乙醇吸收代谢过程研究 [J]. *中国执业药师*, 2016, 13(3): 23-26.
- [35] 朱振元, 薛婧, 刘晓翠, 等. 葛根素及葛根异黄酮对小鼠急性醉酒预防和解酒效果的研究 [J]. *食品科学*, 2014, 35(15): 247-250.
- [36] 侯善欣. L-茶氨酸对降低白酒酒度及其缓解肝损伤的效果研究 [D]. 杭州: 浙江工商大学, 2015.
- [37] Sun Q, Zhang W, Zhong W, et al. Dietary fisetin supplementation protects against alcohol-induced liver injury in mice [J]. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 2016, 40(10): 2076-2084.
- [38] 苗彦妮. 葛花预防酒精性肝损伤的实验研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2008.
- [39] 曹婉鑫, 陈洋, 唐瑶. 苦荞中黄酮类化合物的生物活性研究进展 [J]. *饮料工业*, 2015, 18(3): 64-67.
- [40] 何国鑫, 陈华国, 邓青芳, 等. 黄酮类化合物抗肝损伤的作用机制研究进展 [J]. *中国现代应用药学*, 2019, 36(12): 1583-1591.
- [41] Shilpi S, Singh D K, Meena A, et al. Rutin protects t-butyl hydroperoxide-induced oxidative impairment via modulating the Nrf2 and iNOS activity [J]. *Phytomedicine International Journal of Phytotherapy and Phytomedicine*, 2019, 55: 92-104.

(上接第 319 页)