

三叶青地上部分总黄酮的分离纯化、组分分析及其对急性肝损伤小鼠的保护作用

陈雨薇, 毕欣, 孙永*

(南昌大学食品科学与资源挖掘全国重点实验室, 江西南昌 330047)

摘要: 为了优化三叶青地上部分总黄酮 (Total Flavonoids from Aerial Parts of *Tetrastigma hemsleyanum*, TFATH) 的大孔树脂纯化工艺, 并探讨其对四氯化碳 (Carbon Tetrachloride, CCl₄) 诱导急性肝损伤小鼠的保护作用, 采用单因素实验考察不同上样条件和洗脱条件对纯化效果的影响, 测定三叶青地上部分样品纯化前后的抗氧化活性, 超高效液相串联飞行时间质谱技术 (UPLC-ESI-QTOF-MS²) 对 TFATH 进行定性分析, 并构建 CCl₄ 诱导的急性肝损伤模型。结果显示, 纯化后样品黄酮纯度由 8.99% 增至 31.38%, 抗氧化能力也显著提高, 并从其中检测出了 12 种黄酮类物质, 主要为 (iso) vitexin、(iso) orientin 及其糖苷化合物。动物实验结果表明, 与模型组相比, TFATH 给药组小鼠肝脏指数、血清 ALT 和 AST 活性显著降低 9.74%、12.91% 和 33.98%, 肝细胞变性、坏死及炎症浸润现象明显改善; 肝组织中 GSH 含量和 CAT 活性分别提升 54.14%、50.88%, MDA 含量显著降低 66.53%; 另外, TFATH 干预可显著下调 *TNF-α*、*IL-1β*、*IL-6*、*Caspase-3*、*Bax* 和 *Keap1* 基因的表达, 上调 *Bcl-2*、*Nrf2*、*HO-1*、*NQO1* 及 *GCLC* 基因的表达。综上所述, TFATH 通过激活 Keap1/Nrf2 信号通路, 调节氧化应激, 减轻炎症反应, 降低促炎因子的表达并抑制肝细胞凋亡, 从而全方位地改善 CCl₄ 引起的急性肝损伤。该结果为三叶青地上部分资源的开发利用提供理论参考依据。

关键词: 三叶青地上部分总黄酮; 大孔树脂纯化; 抗氧化能力; 组分分析; 急性肝损伤

文章编号: 1673-9078(2026)04-51-64

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.4.0138

Purification, Component Analysis, and Protective Effects of Total Flavonoids from Aerial Parts of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels & Gilg on Acute Liver Injury in Mice

CHEN Yuwei, BI Xin, SUN Yong*

(State Key Laboratory of Food Science and Resources, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: The aim of this study was to optimize the purification process for total flavonoids from the aerial parts of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels & Gilg (TFATH) by using macroporous resin and to evaluate the protective effects of TFATH against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. The effects of different loading conditions and elution conditions on the purification results were investigated using single-factor experiments, and the antioxidant activity of the aerial parts of *Tetrastigma*

引文格式:

陈雨薇, 毕欣, 孙永. 三叶青地上部分总黄酮的分离纯化、组分分析及其对急性肝损伤小鼠的保护作用[J]. 现代食品科技, 2026, 42(4): 51-64.

CHEN Yuwei, BI Xin, SUN Yong. Purification, component analysis, and protective effects of total flavonoids from aerial parts of *Tetrastigma hemsleyanum* diels & gilg on acute liver injury in mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(4): 51-64.

收稿日期: 2025-02-07; 修回日期: 2025-03-25; 接受日期: 2025-03-26

基金项目: 丽水市农林科学研究院横向课题 (HX202107120002)

作者简介: 陈雨薇 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 营养保健与功能食品, E-mail: 3234730489@qq.com

通讯作者: 孙永 (1987-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 营养保健与功能食品, E-mail: yongsun@ncu.edu.cn

hemsleyanum Diels & Gilg was determined before and after purification. TFATH were qualitatively analyzed using UPLC-ESI-QTOF-MS², and an acute liver injury model induced by carbon tetrachloride was established. The results showed that the purity of flavonoids in the purified samples increased from 8.99% to 31.38%, and the antioxidant capacity also significantly improved. Twelve types of flavonoids were identified, primarily including (iso) vitexin, (iso) orientin, and their glycosides. The animal experiment results showed that, compared with the model group, the liver index and serum ALT and AST activities of TFATH-treated mice significantly decreased by 9.74%, 12.91%, and 33.98%, respectively, and the degeneration, necrosis, and inflammatory infiltration of hepatocytes significantly improved. In liver tissue, GSH content and CAT activity increased by 54.14% and 50.88%, respectively, whereas the MDA content significantly decreased by 66.53%. In addition, with the intervention of TFATH, the expression levels of *TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-6*, *caspase-3*, *Bax*, and *Keap1* were significantly downregulated, whereas the expression levels of *Bcl-2*, *Nrf2*, *HO-1*, *NQO1*, and *GCLC* were upregulated. In summary, TFATH comprehensively ameliorates acute liver injury induced by carbon tetrachloride by activating the Keap 1/Nrf 2 signaling pathway, modulating oxidative stress, alleviating inflammatory responses, reducing the expression of proinflammatory cytokines, and inhibiting hepatocyte apoptosis. The results provide a theoretical reference for the development and utilization of resources from the aerial parts of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels & Gilg.

Key words: total flavonoids from aerial parts of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels & Gilg; purification using macroporous resin; antioxidant capacity; composition analysis; acute liver injury

肝脏作为人体最主要的代谢器官,具有解毒、造血、存储能量及合成蛋白质等生理功能,在免疫调节和维持机体稳态方面起关键作用^[1]。急性肝损伤(Acute Liver Injury, ALI)是指肝脏在遭受包括化学性毒物、病毒感染、自身免疫或药物滥用等因素的作用后,导致其在短时间内肝功能出现突发性异常的一种临床病理状态^[2]。若治疗不及时或不当,ALI将持续恶化发展为肝纤维化、肝硬化甚至肝癌,对患者身体健康构成严重威胁^[3]。四氯化碳作为一种肝毒性化合物,在动物实验中常被用来诱导肝损伤模型,对于研究肝损伤的分子机制和发掘潜在的抗肝损伤药物具有重要意义。CCl₄进入机体后,被肝微粒体细胞色素P450酶代谢生成三氯甲基自由基和其它活性氧自由基,引发脂质过氧化反应,进而造成细胞损伤、炎症和凋亡^[4,5]。目前治疗ALI的药物有复方甘草酸苷、水飞蓟宾等,但长期服用会伴随一定副作用。因此,从天然资源中发掘安全有效的活性成分以预防和治疗ALI,是当下的研究热点。

三叶青(*Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg)系葡萄科崖爬藤属多年生草本植物,是一味传统珍稀中草药,主要分布在我国江西、浙江、福建、广西、湖北等地,富含黄酮类、酚酸类、多糖类、三萜和甾体类等多种生物活性成分,具有清热解毒、活血祛风等功效^[6]。据古医书记载,三叶青在民间常被用于治疗肺炎、咳嗽、小儿发热、风湿、毒蛇咬伤等^[7]。现代药理学研究成果揭示三叶青具有保肝、抗炎、抗肿瘤、降血脂等作用^[8],且无抗药性及毒副作用,临床应用广泛。除药用领域外,三叶青也可作为食品原料使用,以三叶青茎叶为主料加

工而成的三叶青茶类产品,具有一定的保健价值^[9,10]。据报道,三叶青地上部分的总黄酮含量高于块根部分^[11,12],具有较高的开发利用前景,对充分利用三叶青地上部分资源具有重要意义。

黄酮类化合物普遍存在于自然界的各类植物中,具有抗衰老、抑菌、免疫调节等多种生理活性^[13]。课题组前期从三叶青叶中鉴定出了23种黄酮和14种酚酸类成分^[14],其提取物可通过抗氧化、抗炎等特性来改善肠道炎症、酒精性和非酒精性脂肪肝病^[15-17],黄酮类物质为其主要功效成分之一。分离纯化是天然产物研究中的基本内容,大孔树脂作为一种高分子吸附材料,因其具有操作简便、经济高效、环境友好、易于再生等优势,常用于黄酮、多糖、生物碱类物质的纯化^[18,19]。因此,本研究采用大孔树脂纯化三叶青地上部分总黄酮,通过动态吸附与解吸实验确定最佳纯化工艺参数,比较样品纯化前后的总黄酮纯度和抗氧化活性,UPLC-ESI-QTOF-MS²技术对黄酮组分进行定性分析,并评估TFATH对急性肝损伤的影响,以期在三叶青地上部分资源的生物活性研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF级7周龄雄性C57BL/6小鼠(20~22 g),购于斯贝福(北京)生物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(京)2019-0001。经南昌大学动物伦理委员会批准(批准号:20220064257)实验动物在温度20~24℃、湿度50%~60%,明暗交替12 h的环境下饲养,自由进食饮水。

1.2 材料与试剂

三叶青茎叶, 由浙江省丽水市农林科学研究院提供。儿茶素标准品, 上海源叶生物科技有限公司; D101 型大孔树脂, 北京索莱宝科技有限公司; 谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽 (GSH)、丙二醛 (MDA)、抗氧化能力 (DPPH、ABTS、FRAP) 试剂盒, 南京建成生物工程研究所; RNAeasyTM 动物 RNA 抽提试剂盒, 碧云天生物科技有限公司; PrimeScriptTM RT 反转录和 TB Green® Premix Ex TaqTM 定量试剂盒, TaKaRa 生物技术有限公司; 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-1 β (IL-1 β)、白介素-6 (IL-6)、白介素-10 (IL-10)、半胱氨酸蛋白酶 3 (Caspase-3)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2)、Kelch 样 ECH 关联蛋白 1 (Keap1)、红系衍生的核转录相关因子 2 (Nrf2)、血红素加氧酶 1 (HO-1)、醌氧化还原酶 1 (NQO1)、谷氨酸半胱氨酸连接酶催化亚基 (GCLC) 引物, 江西阿普斯戴尔生物科技有限公司; 苏木精和伊红染料, 武汉塞维尔生物科技有限公司; 盐酸, 国药集团化学试剂有限公司; 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na)、氢氧化钠、亚硝酸钠、氯化铝、无水乙醇、四氯化碳, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 乙腈和甲酸为色谱纯, 德国默克。

1.3 仪器与设备

安捷伦液相色谱-G6500 系列四极杆-飞行时间质谱联用仪, 美国 Agilent 公司; Synergy H1 型酶标仪, 美国伯腾仪器有限公司; LXJ-IIB 型高速离心机, 上海安亭科学仪器厂; Beta 1-8 LSCbasic 型冷冻干燥机, 德国 Martin Christ 冷冻干燥设备有限公司; KZ-II 型组织研磨仪, 武汉塞维尔生物科技有限公司, CFX ConnectTM 型荧光定量 PCR 仪, 美国伯乐公司。

1.4 试验方法

1.4.1 三叶青地上部分总黄酮的提取

三叶青藤茎叶粉碎后过 80 目筛, 60 °C 下烘干, 按照 1:20 料液比 (m/V), 向其中加入体积分数 70% 的乙醇溶液, 60 °C、600 W 功率下超声 1 h, 重复两次超声提取后合并提取液, 离心处理收集上清液, 减压旋蒸挥干乙醇, 真空冷冻干燥后即得三叶青地上部分粗提物。

1.4.2 总黄酮含量测定

采用 $\text{NaNO}_2\text{-AlCl}_3$ 法^[14]进行检测。该反应在室温条件下进行, 在 96 孔板检测孔中加入 25 μL 不同浓度梯度的儿茶素标准溶液或样品溶液, 与 110 μL 质量分

数为 5% 的 NaNO_2 溶液混合反应 5 min, 再加入 15 μL 质量分数为 10% 的 AlCl_3 溶液反应 6 min, 最后加入 100 μL 1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 溶液, 混合均匀后静置反应 15 min, 于 510 nm 下测吸光度值。标准品儿茶素溶液浓度设为 31.25、62.5、125、250、500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 总黄酮含量以每克样品中所含儿茶素当量 ($\text{mg CAE}\cdot\text{g}^{-1}\text{ DW}$) 表示。

1.4.3 大孔树脂的预处理

D101 大孔树脂置于三倍体积的 95% 乙醇溶液 (V/V) 中, 持续浸泡处理 24 h, 使其充分溶胀, 弃去上层破碎树脂漂浮物, 剩余树脂用蒸馏水冲洗至无醇味。再用质量分数为 5% 的稀盐酸溶液浸泡 6 h, 蒸馏水洗至 pH 接近中性, 最后用质量分数为 5% 的氢氧化钠溶液浸泡 6 h, 蒸馏水洗至 pH 接近中性, 收集洗净树脂, 滤水保存备用。

1.4.4 动态吸附与洗脱条件考察

1.4.4.1 上样液 pH 值的确定

选用 30×300 mm 的玻璃层析柱进行预实验。根据预实验结果, 固定上样液流量为 1.5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 分别用 pH 值为 2、3、4、5、6 的相同质量浓度上样液经过装有树脂的层析柱, 计算不同 pH 值下的吸附率。

1.4.4.2 上样液质量浓度的确定

固定上样液流量为 1.5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 上样液 pH 值为 3, 分别用质量浓度为 3、4、5、6、7 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的粗提液经过层析柱, 计算不同上样浓度的吸附率。

1.4.4.3 上样液流量的确定

固定上样液 pH 值为 3, 上样液质量浓度为 4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 分别以 1、1.5、2、2.5、3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流量上样, 计算不同流量下的吸附率。

1.4.4.4 上样量的确定

称取 46 g 预处理后的 D101 大孔树脂, 湿法装柱, 径高比 1:5, 并将 pH 值为 3、质量浓度为 4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的三叶青地上部分粗提液以流量 1.5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 经过层析柱, 每 10 mL 收集一管流出液, 随后测定每管流出液中的黄酮浓度, 并绘制大孔树脂动态吸附曲线, 从而确定最佳上样量。

1.4.4.5 洗脱液体积分数的确定

采用实验所得最佳条件上样, 静置吸附 1 h 后用纯水冲洗至流出液无色。再分别选用体积分数为 50%、60%、70%、80%、90% 的乙醇溶液, 以 1.5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流量洗脱, 收集洗脱液并测定其黄酮质量浓度, 计算不同体积分数乙醇的解吸率。

1.4.4.6 洗脱流量的确定

采用实验所得最佳条件上样, 静置吸附 1 h 后用纯水冲洗至流出液无色。80% 乙醇溶液 (V/V) 分别

在 1、1.5、2、2.5、3 mL·min⁻¹ 的流量下洗脱, 收集洗脱液并测定其黄酮质量浓度, 计算不同洗脱流量下的解吸率。

1.4.4.7 洗脱液用量的确定

采用实验所得最佳条件上样, 静置吸附 1 h 后用纯水冲洗至流出液无色。体积分数为 80% 的乙醇溶液于 1.5 mL·min⁻¹ 流量下洗脱, 每 10 mL 收集一管洗脱液, 测定洗脱液中黄酮质量浓度, 并绘制大孔树脂动态解吸附曲线, 从而确定最佳洗脱体积。

$$Q = \frac{C_0 V_0 - C_1 V_1}{C_0 V_0} \times 100\% \quad (1)$$

$$D = \frac{C_2 V_2}{C_0 V_0 - C_1 V_1} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

Q ——吸附率, %;

D ——解吸率, %;

C_0 ——上样液中黄酮质量浓度, mg·mL⁻¹;

C_1 ——吸附后流出液中黄酮质量浓度, mg·mL⁻¹;

C_2 ——洗脱液中黄酮质量浓度, mg·mL⁻¹;

V_0 ——上样液体积, mL;

V_1 ——吸附后流出液体积, mL;

V_2 ——洗脱液体积, mL。

1.4.5 三叶青地上部分总黄酮纯度的测定

按照单因素实验所确定的最佳上样和洗脱条件, 对三叶青地上部分粗提物进行纯化处理, 收集乙醇洗脱液, 旋蒸后冻干成粉末状物质。参照 1.4.2 计算样品纯化前后的黄酮含量, 并根据以下公式计算黄酮纯度:

$$P = \frac{m}{M} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

P ——黄酮纯度, %;

m ——样品中测得的黄酮质量, mg;

M ——样品质量, mg。

1.4.6 抗氧化能力的测定

1.4.6.1 DPPH 自由基清除能力测定

参考 Zhang 等^[20]的方法, 并稍加修改。将 280 μL 65 μmol·L⁻¹ 的 DPPH 溶液分别加入至 96 孔板检测孔中, 再加入 20 μL 不同浓度梯度的 Trolox 标准溶液或样品溶液, 混合均匀后室温下避光反应 30 min, 在 540 nm 下测其吸光度值。Trolox 标准溶液浓度设置为 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 mmol·L⁻¹, 测定结果以每克三叶青样品中所含 Trolox 当量 (mmol Trolox·g⁻¹ DW) 表示。

1.4.6.2 ABTS⁺自由基清除能力测定

参照 ABTS 试剂盒说明书进行测定操作。将 20 μL

的酶溶液分别加入至 96 孔板检测孔中, 再加入 10 μL 不同浓度梯度的 Trolox 标准溶液或样品溶液, 然后加入 170 μL ABTS 工作液, 室温反应 6 min, 在 405 nm 下测其吸光度值。Trolox 标准溶液浓度设置为 0.1、0.2、0.4、0.8、1.0 mmol·L⁻¹, 测定结果以每克三叶青样品中所含 Trolox 当量 (mmol Trolox·g⁻¹ DW) 表示。

1.4.6.3 Fe³⁺还原能力测定

参照 FRAP 试剂盒说明书进行测定操作。将 180 μL FRAP 工作液分别加入至 96 孔板检测孔中, 再加入 5 μL 不同浓度的 FeSO₄ 标准溶液或样品溶液, 混合均匀后 37 °C 孵育 5 min, 在 593 nm 下测其吸光度值。FeSO₄ 标准溶液浓度设置为 0.15、0.3、0.6、0.9、1.2、1.5 mmol·L⁻¹, 测定结果以每克三叶青样品中所含 FeSO₄ 当量 (mmol FeSO₄·g⁻¹ DW) 表示。

1.4.7 三叶青地上部分黄酮的UPLC-ESI-QTOF-MS²定性分析

参考 Sun 等^[21]的方法, 并稍加修改, 具体实验条件如下:

液相条件: 使用 Agilent EC-C18 保护柱 (3.0 μm×5 mm, 2.7 μm) 和 ZORBAX Eclipse XDB-C18 色谱柱 (4.6 μm×250 mm, 5 μm)。流动相组成为乙腈 (A) 和体积分数为 0.1% 的甲酸水溶液 (B)。洗脱梯度设置为: 0~10 min, 86%~82% B; 10~30 min, 82%~80% B; 30~35 min, 80%~82% B; 35~40 min, 82%~86% B。进样量 2 μL, 流量为 0.5 mL·min⁻¹, 柱温为 40 °C, 并采用 280 nm 和 320 nm 双波长进行检测。

质谱条件: 电喷雾离子源 (ESI), 负离子模式, 裂解电压: 120 V, 碰撞能依次设为 10、15、20、25 和 30 eV。数据的采集与处理通过 Agilent MassHunter Qualitative Analysis 10.0 软件完成。

1.4.8 动物实验

1.4.8.1 动物分组及模型建立

36 只雄性 C57BL/6 小鼠适应性喂养一周后, 随机分为三组 ($n=12$), 分别为对照组 (CON 组)、模型组 (MOD 组) 和三叶青地上部分总黄酮组 (TFATH 组, 300 mg·kg⁻¹, 按体质量计算)。实验期间, TFATH 组每天灌胃给药, CON 组与 MOD 组则每天灌胃质量分数为 0.5% CMC-Na 的溶液, 每天一次, 连续 14 d, 灌胃体积均为 10 mL·kg⁻¹ (按体质量计算)。末次灌胃 2 h 后, CON 组腹腔注射花生油溶液, 其余组腹腔注射体积分数为 0.25% 的 CCl₄ 花生油溶液建立急性肝损伤模型, 注射体积为 10 mL·kg⁻¹ (按体质量计算)。所有小鼠腹腔注射后禁食不禁水, 24 h 后称重, 眼眶取血, 颈椎脱臼处死小鼠。

表 1 引物序列信息表

Table 1 Primer sequence information

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>TNF-α</i>	TCTCTACTCCTCAGAGCCCC	TGAGTCCTTGATGGTGGTGC
<i>IL-1β</i>	GTCGTACCACAGGCATTGTGATGG	GCAATGCCTGGGTACATGGTGG
<i>IL-6</i>	TCTATACCACTTCACAAGTCGGA	GAATTGCCATTGCACAACCTCTTT
<i>IL-10</i>	AGCATGGCCCAGAAATCAAGGAG	GAGAAATCGATGACAGCGCCTCA
<i>Keap1</i>	TGCACCCAAGGCTTTTGAAC	TAGCAATCCAGCAGCACATG
<i>Nrf2</i>	AGCATTGCACATGGAAGCAG	AACCGCAACGAGAGCAATTG
<i>HO-1</i>	TTCCTCACCTGCAAAAGCAC	ACTGTGCATTGGTGAGTTCC
<i>NQO1</i>	AGCTTTGTGGTGCAAAGTGG	AAGCAACGCACTTCCCAAAC
<i>GCLC</i>	AAGCCTCCTCCTCCAAACTC	GGGCCACTTTCATGTTCTCG
<i>Caspase-3</i>	AGAGACATTCATGGGCCTGAAATAC	CACCATGGCTTAGAATCACACACAC
<i>Bcl-2</i>	AGGATTGTGGCCTTCTTTGA	ACCTACCCAGCCTCCGTTAT
<i>Bax</i>	GGCGAATTGGAGATGAAGT	AAAGTAGAAGAGGGCAACCA
<i>GAPDH</i>	AGACCCACACTTCTCCATTTC	TGAAATGTGCACGCACCAAG

1.4.8.2 小鼠体质量及脏器指数的测定

从灌胃第一天开始每日监测并记录小鼠体质量变化；小鼠处死后解剖采集肝脏、肾脏和脾脏，经生理盐水清洗，滤纸吸干后称重，计算脏器指数。

1.4.8.3 血清生化指标检测

取血后室温静置 1 h，4 000 r·min⁻¹ 离心 15 min，分离血清，按照试剂盒说明书中方法测定小鼠血清谷丙转氨酶（ALT）和谷草转氨酶（AST）活性。

1.4.8.4 肝组织病理学检测

小鼠肝脏置于质量分数为 4% 的多聚甲醛溶液中固定，石蜡包埋后切片，苏木精-伊红（H&E）染色，光学显微镜下观察肝组织病理形态变化。

1.4.8.5 肝组织氧化应激指标检测

称取适量肝组织，按质量（g）：体积（mL）=1:9 的比例加入生理盐水，于 4℃ 下机械匀浆。离心（4 000 r·min⁻¹，4℃，10 min）取上清液，按照试剂盒说明书中方法测定过氧化氢酶（CAT）、超氧化物歧化酶（SOD）、谷胱甘肽（GSH）活性与丙二醛（MDA）含量。

1.4.8.6 实时定量PCR分析

采用离心柱式 RNAeasyTM 动物 RNA 抽提试剂盒分离纯化小鼠肝组织 RNA，分光光度计测定其浓度和纯度。使用 Prime ScriptTM RT 试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA，并按照定量 PCR 试剂盒 TB Green[®] Premix Ex TaqTM 进行荧光定量 PCR 检测。以 GAPDH 为内参基因，运用 2^{-ΔΔCT} 法计算目的基因的相对表达水平。引物由江西阿普斯戴尔生物科技有限公司合成，序列信息如表 1 所示。

1.4.9 数据处理与分析

实验所得数据以平均值 ± 标准差（Means ± SD）表示。通过 SPSS 25.0 统计学软件对其进行单因素 ANOVA 检验，并运用邓肯事后多重比较进行显著性水平分析，*P* < 0.05 表明数据之间存在显著性差异（不同小写字母表示差异显著）。Origin 2021 软件作图。

2 结果与讨论

2.1 大孔树脂纯化工艺参数

2.1.1 上样液 pH 值的确定

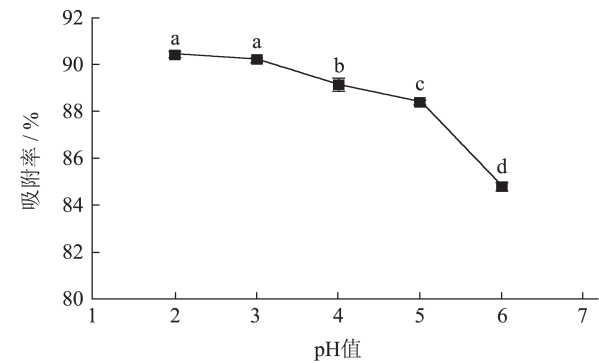


图 1 上样液 pH 值对吸附率的影响

Fig.1 Effect of pH value of loading solution on adsorption rate

注：不同小写字母表示差异显著，*P* < 0.05。下图同。

上样液的 pH 值对大孔树脂的吸附性能具有重要影响。由图 1 可知，随着上样液 pH 值的增加，大孔树脂对三叶青地上部分总黄酮的吸附率不断下降，当 pH 值从 5 增加至 6 时，吸附率从 88.42% 显著下降至

84.79% ($P < 0.05$)。黄酮化合物因其结构中存在较多的酚羟基而呈弱酸性^[22], 在 pH 值偏低的条件下, 其以分子形式存在, 易与大孔树脂上的活性位点相互作用, 因此吸附率较高; 随着溶液 pH 值的增加, 部分黄酮化合物解离成离子形式, 与大孔树脂的氢键作用减弱, 进而导致吸附率降低^[23]。当 pH 值为 2 或 3 时, 大孔树脂的吸附效果无显著性差异, 且上样液本身的 pH 值稍大于 3, 综合考虑, 确定最佳上样液 pH 值为 3。

2.1.2 上样液质量浓度的确定

如图 2 所示, 随着上样液质量浓度的增加, 大孔树脂对三叶青地上部分总黄酮的吸附率呈现出先上升后下降的趋势。当三叶青粗提液的质量浓度为 $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 吸附率最高, 为 89.32%。在此基础上继续提高上样液质量浓度, 吸附率反而不断降低, 可能是因为质量浓度增加的同时, 上样液中的杂质含量也相应增多, 这些杂质可与黄酮化合物竞争吸附大孔树脂活性位点, 并进一步堵塞树脂的孔隙结构, 从而导致吸附率下降^[24]。因此确定最佳上样液质量浓度为 $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

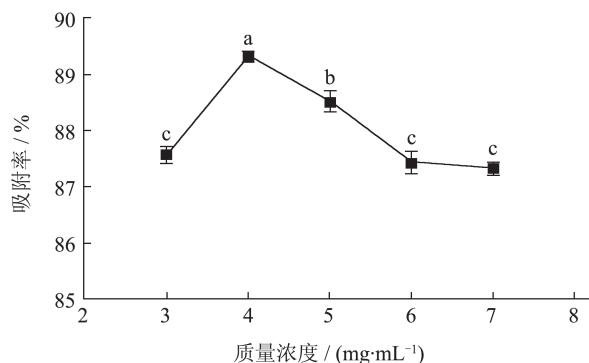


图 2 上样液质量浓度对吸附率的影响

Fig.2 Effect of loading solution concentration on adsorption rate

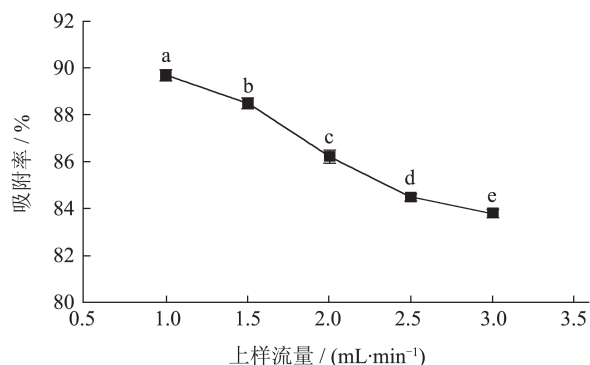


图 3 上样液流量对吸附率的影响

Fig.3 Effect of loading solution flow rate on adsorption rate

2.1.3 上样液流量的确定

上样液流量对吸附率的影响如图 3 所示, 从本实验选取的 5 个流量梯度中可以看出, 吸附率与上样流

量间呈显著负相关, 上样速率越快, 吸附率越低。这是因为在低流速下, 上样液经过大孔树脂的时间延长, 有利于黄酮化合物与大孔树脂间的相互作用, 从而提升吸附效率^[25]。当上样液流量为 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 和 $1.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 时, 两者间吸附率差异较小, 分别为 89.68% 和 88.49%。综合考虑纯化效果和实验周期, 确定最佳上样流量为 $1.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

2.1.4 上样量的确定

大孔树脂动态吸附过程如图 4 所示, 随着上样量的增大, 流出液中黄酮质量浓度也相应增大。 $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 上样粗提液中黄酮质量浓度为 $0.32 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 当上样液体积增加为 80 mL 时, 流出液中黄酮质量浓度约为 $0.04 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 稍大于上样液黄酮质量浓度的 10%, 因此 80 mL 被认定为该曲线的泄露点^[26], 大孔树脂最佳上样量确定为 80 mL。

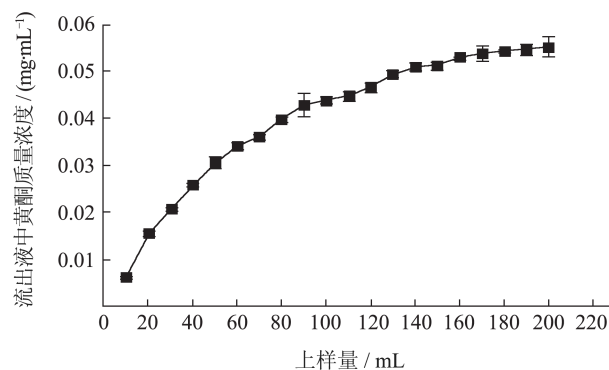


图 4 大孔树脂动态吸附曲线

Fig.4 Dynamic adsorption curve of macroporous resin

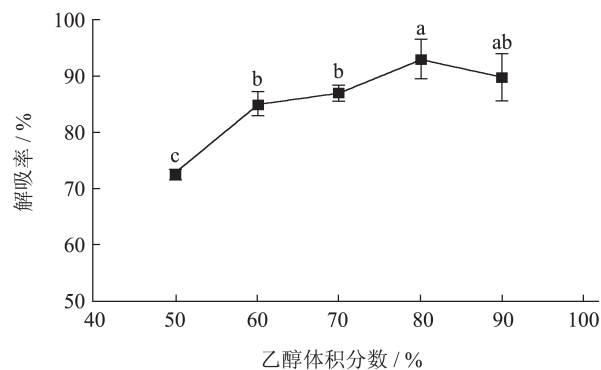


图 5 乙醇体积分数对解吸率的影响

Fig.5 Influence of ethanol volume fraction on desorption rate

2.1.5 洗脱液体积分数的确定

乙醇可以削弱黄酮化合物与大孔树脂间的分子作用力, 因此选用乙醇作为洗脱剂, 以探究不同体积分数乙醇对黄酮化合物解吸效果的影响。结果如图 5 所示, 三叶青地上部分总黄酮的解吸率首先随着乙醇体积分数的增大而增加, 当乙醇体积分数增至 80% 时,

解吸率达到峰值 93%，继续增大乙醇体积分数，解吸率却显著下降。据相关研究报导^[27]，这可能是由于乙醇体积分数过高时，会导致大孔树脂内吸附的醇溶性杂质被一并洗脱下来，从而影响黄酮化合物的正常解吸进程，降低解吸效率。因此确定乙醇洗脱液的最佳体积分数为 80%。

2.1.6 洗脱液流量的确定

由图 6 可知，三叶青地上部分总黄酮的解吸率随着洗脱流量的增加呈现出先上升后下降的趋势，在 1.5 mL·min⁻¹ 流量下，解吸率最高，为 91.81%，且继续增大洗脱流量，解吸率急剧下降，说明洗脱流量过低和过高均显著影响黄酮化合物的解吸率。这是因为在较低的洗脱流量下，吸附在大孔树脂内的黄酮不能被充分地冲洗下来，而在过高的洗脱流量下，乙醇溶液与吸附的黄酮类物质接触时间过短，从而影响解吸效果，解吸率显著降低^[28]。故确定最佳洗脱流量为 1.5 mL·min⁻¹。

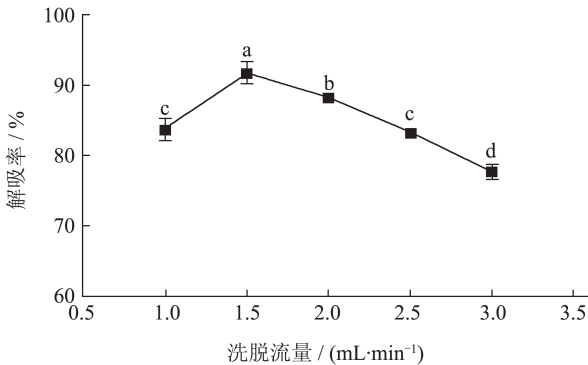


图 6 洗脱流量对解吸率的影响

Fig.6 Effect of eluent flow rate on resolution

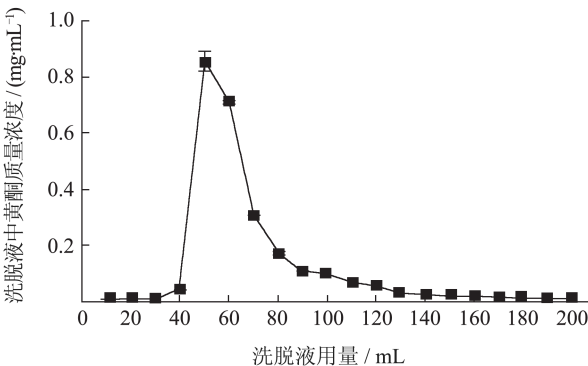


图 7 大孔树脂动态解吸曲线

Fig.7 Kinetics desorption curve macroporous resin

2.1.7 洗脱液用量的确定

大孔树脂动态解吸过程如图 7 所示，随着乙醇溶液用量的增加，洗脱液中的黄酮质量浓度展现出先上升后下降的变化趋势。总体而言，当洗脱液体积为

50 mL 时，黄酮质量浓度达到峰值，为 0.86 mg·mL⁻¹；而当洗脱液体积增至 160 mL 时，其黄酮质量浓度低于 0.02 mg·mL⁻¹，此时绝大部分的黄酮类物质均已被洗脱下来，继续增加洗脱液用量则会导致不必要的溶剂损耗，且不利于后续的洗脱液浓缩，增加时间成本。因此确定最佳洗脱液用量为 160 mL。

2.2 三叶青地上部分总黄酮纯度的测定

采用 D101 大孔树脂分离纯化三叶青地上部分总黄酮，配制 4 mg·mL⁻¹ 的样品粗提液 80 mL，并通过加入适量稀盐酸溶液将其 pH 值调整至 3，以 1.5 mL·min⁻¹ 流量上样，静置吸附 1 h 后用纯水冲洗至流出液无色，160 mL 80% 乙醇溶液（V/V）于 1.5 mL·min⁻¹ 流量下洗脱，洗脱液浓缩后冻干成粉末状物质。如表 2 所示，纯化后的样品总黄酮纯度由 8.99% 提升至 31.38%（*P* < 0.05），约为纯化前的 3.5 倍。徐祥浩等^[29]曾采用 D101 大孔树脂纯化大花红景天中总黄酮，其纯度约为纯化前的 2.06 倍；周泉等^[30]则采用 D101 树脂纯化紫苏叶中总黄酮，其纯度较纯化前约提高 1.81 倍。结果表明，该纯化工艺对 TFATH 具有较好的富集效果。

表 2 样品纯化前后的总黄酮纯度
Table 2 Purity of total flavonoids before and after sample purification

样品名称	总黄酮纯度/%
三叶青地上部分粗提物	8.99 ± 0.42 ^b
纯化后的样品	31.38 ± 0.61 ^a

注：不同小写字母表示差异显著，*P* < 0.05。下表同。

2.3 样品纯化前后的抗氧化能力

通过 DPPH、ABTS、FRAP 三种常用的抗氧化测定方法来探究三叶青地上部分样品纯化前后的抗氧化能力变化，结果如表 3 所示。相较于三叶青地上部分粗提物，纯化后的样品在 DPPH、ABTS⁺ 自由基清除能力以及 Fe³⁺ 还原能力方面均显著提升（*P* < 0.05）。黄酮类化合物被认为是一种天然的抗氧化剂，Wang 等^[31]对比了刺五加样品纯化前后的抗氧化能力，发现纯化后样品的黄酮纯度显著增加，抗氧化能力同样也大幅度提升。该结果进一步证实了黄酮类化合物在发挥抗氧化活性中的重要作用。

表 3 样品纯化前后的抗氧化能力
Table 3 Antioxidant capacity of samples before and after purification

样品名称	DPPH/(mmol Trolox·g ⁻¹ DW)	ABTS/(mmol Trolox·g ⁻¹ DW)	FRAP/(mmol FeSO ₄ ·g ⁻¹ DW)
三叶青地上部分粗提物	0.98 ± 0.03 ^b	1.43 ± 0.05 ^b	1.51 ± 0.03 ^b
纯化后的样品	2.62 ± 0.05 ^a	5.35 ± 0.15 ^a	4.70 ± 0.16 ^a

表 4 纯化后样品中黄酮类化合物的鉴定
Table 4 Identification of flavonoids in purified samples

No.	t_R/min	Formula	[M-H] ⁻ (m/z)			Major fragment ions (m/z)	Identification
			Measured	Calculated	ppm		
F1	11.191	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.073 1	289.071 8	4.63	245.082 0, 203.071 9, 179.035 1, 151.039 4, 125.023 5	Catechin
F2	11.925	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593.1536	593.151 2	4.06	503.117 6, 473.1093, 413.088 6, 383.076 8, 353.067 0, 325.070 1	Vitexin-2''-O-glucoside
F3	14.575	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	449.111 5	449.108 9	5.71	287.055 9, 269.045 2, 259.060 9, 178.998 2, 125.024 0	Eriodictyol-O-hexoside
F4	15.492	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593.155 6	593.151 2	7.43	473.109 9, 429.082 8, 357.061 7, 327.050 8, 309.040 5, 298.048 5	Isoorientin-2''-O-rhamnoside
F5	16.059	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.096 2	447.093 3	6.52	429.082 7, 357.062 6, 327.0518, 297.0404, 285.0407	Isoorientin
F6	16.526	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593.154 9	593.151 2	6.25	473.109 0, 429.08 2, 357.062 0, 327.051 2, 309.040 6, 297.050 5	Orientin-2''-O-rhamnoside
F7	17.608	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.095 8	447.093 3	5.63	357.061 8, 327.051 6	Orientin
F8	20.327	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	577.159 6	577.156 3	5.75	457.114 7, 413.088 8, 311.055 4, 293.046 1	Vitexin-2''-O-rhamnoside
F9	20.794	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	577.160 2	577.156 3	6.79	457.114 6, 413.089 6, 341.067 4, 293.046 4	Isovitexin-2''-O-rhamnoside
F10	21.427	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609.148 8	609.146 1	4.42	301.035 8, 300.028 6	Rutin
F11	22.111	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431.101 1	431.098 4	6.33	341.067 5, 311.056 8, 283.061 7, 269.045 8	Vitexin
F12	22.327	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431.101 4	431.098 4	7.03	341.067 2, 311.056 9, 295.060 9, 283.061 4, 269.045 4	Isovitexin

2.4 三叶青地上部分总黄酮的定性分析

纯化后的样品中黄酮类化合物的定性结果如图 8 和表 4 所示，共鉴定出了 12 种黄酮类物质。

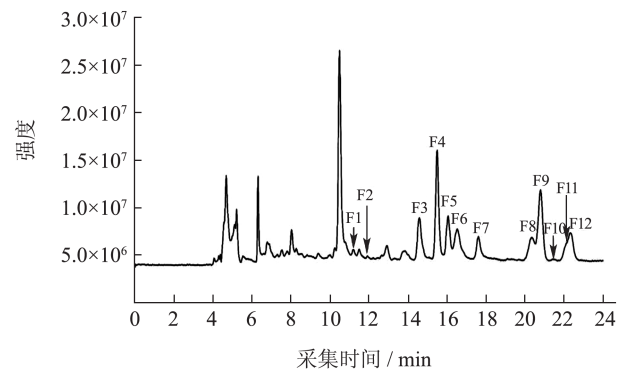


图 8 纯化后样品在负离子模式下的 LC-MS 总离子流图

Fig.8 LC-MS total ion chromatogram of purified sample in negative ion mode

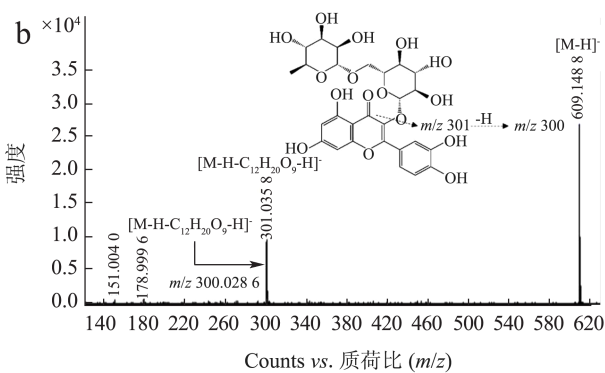
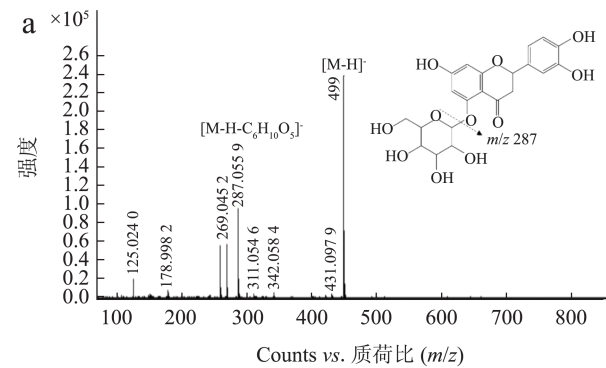


图 9 部分黄酮类化合物的 MS² 质谱图及其裂解规律

Fig.9 MS² spectrogram and fragmentation rule of some flavonoids

注：a 为 eriodictyol-O-hexoside，b 为 rutin。

峰 F1 ($m/z=289.073\ 1$) 主要碎片离子为 $m/z\ 245.082\ 0$ ($[M-H-CO_2]^-$)、 $m/z\ 203.071\ 9$ ($[M-H-C_3H_2O_3]^-$) 和 $179.035\ 1$ ($[M-H-C_6H_6O_2]^-$)，根据参考文献^[32]鉴定为 catechin。

峰 F2、F8、F9、F11、F12 被鉴定为 (iso) vitexin 及其衍生物。峰 F11 ($m/z=431.101\ 1$) 和峰 F12 ($m/z=431.101\ 4$) 互为同分异构体，参照文献^[33]并通过与标品对比出峰时间，初步鉴定为 vitexin 和 isovitexin，二者的主要碎片离子包括 $m/z\ 311$ ($[M-H-C_4H_8O_3]^-$) 和 $m/z\ 283$ ($[M-H-C_4H_8O_3-CO]^-$)。峰 F2 ($m/z=593.153\ 6$) 由于失去一分子葡萄糖基团和一分子水生成碎片离子 $m/z\ 413.088\ 6$ ($[M-H-glucose-H_2O]^-$)，而其它碎片离子 $m/z\ 503.117\ 6$ 、 $m/z\ 413.088\ 6$ 、 $m/z\ 383.076\ 8$ 、 $m/z\ 353.067\ 0$

和 m/z 325.070 1 则是由其糖苷基团开环产生^[21], 因此峰 F2 被鉴定为 vitexin-2"-O-glucoside。峰 F8 (m/z =577.159 6) 和峰 F9 (m/z =577.160 2) 失去一个鼠李糖基团后得 vitexin 和 isovitexin, 根据化合物的出峰顺序及质谱数据, 峰 F8 和 F9 鉴定为 vitexin-2"-O-rhamnoside 和 vitexin-2"-O-rhamnoside。

峰 F3 (m/z =449.111 5) 二级质谱如图 9a 所示, 产生主要碎片离子 m/z 287.055 9 ($[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$), 推测其为失去一分子己糖基团形成, 根据文献报道^[34], 初步判定该物质为 eriodictyol-O-hexoside。

峰 F4、F5、F6、F7 被鉴定为 (iso) orientin 及其衍生物。峰 F5 和峰 F7 互为同分异构体。峰 F5 (m/z =447.096 2) 的主要碎片离子为 m/z 429.082 7 ($[M-H-H_2O]^-$)、 m/z 357.062 6 ($[M-H-C_3H_6O_3]^-$) 和 m/z 327.051 8 ($[M-H-C_4H_8O_4]^-$), 推测其为 isoorientin^[21]。峰 F7 (m/z =447.095 8) 的主要碎片离子包括 m/z 357.061 8 ($[M-H-C_3H_6O_3]^-$) 和 m/z 327.051 6 ($[M-H-C_4H_8O_4]^-$), 被鉴定为 orientin^[21]。峰 F4 (m/z =593.155 6) 和峰 F6 (m/z =593.154 9), 失去一个鼠李糖基团后得 isoorientin 和 orientin, 根据化合物的出峰顺序和质谱数据, 峰 F4 和 F6 鉴定为 isoorientin-2"-O-rhamnoside 和 orientin-2"-O-rhamnoside。

峰 F10 (m/z =609.148 8) 首先失去一分子芸香糖基生成 m/z 301.035 8 ($[M-H-C_{12}H_{20}O_9]^-$), 再失去一个氢离子生成 m/z 300.028 6 特征碎片, 其二级质谱及裂解规律如图 9b 所示, 参照文献^[35]推测为 rutin。

2.5 三叶青地上部分总黄酮对四氯化碳诱导急性肝损伤小鼠的保护作用

2.5.1 TFATH对ALI小鼠体质量及脏器指数的影响

如图 10a 所示, 在为期 14 d 的灌胃给药期间, 各组小鼠体质量均有增长, 且组间体质量变化无显著性差异, 表明 TFATH 灌胃给药对小鼠正常生理发育无不良影响。经腹腔注射并禁食 24 h 后, 三组小鼠体质量均显著减轻, 禁食是导致体质量下降的主要因素。

脏器指数是脏器质量与体质量的比值, 是评估脏器健康状态的一个重要指标, 脏器指数增加表明器官充血、水肿, 而指数下降则反映器官萎缩、生长迟滞或退化^[36]。实验结果显示 (图 10b), 与对照组 (3.75%) 相比, 模型组小鼠肝脏指数 (4.62%) 显著增加 ($P<0.05$), 说明实验造模成功; 与模型组相比, TFATH 给药干预后, 小鼠肝脏指数显著降低 9.74% ($P<0.05$)。各组间小鼠脾脏、肾脏指数 (图 10c~10d) 无明显差异。综上所述, CCl_4 主要作用于小鼠的肝脏, 导致肝脏肿胀等病理变化, 而对脾脏和肾脏的影响相

对较小, 三叶青地上部分总黄酮能有效缓解 CCl_4 诱导的小鼠肝损伤。

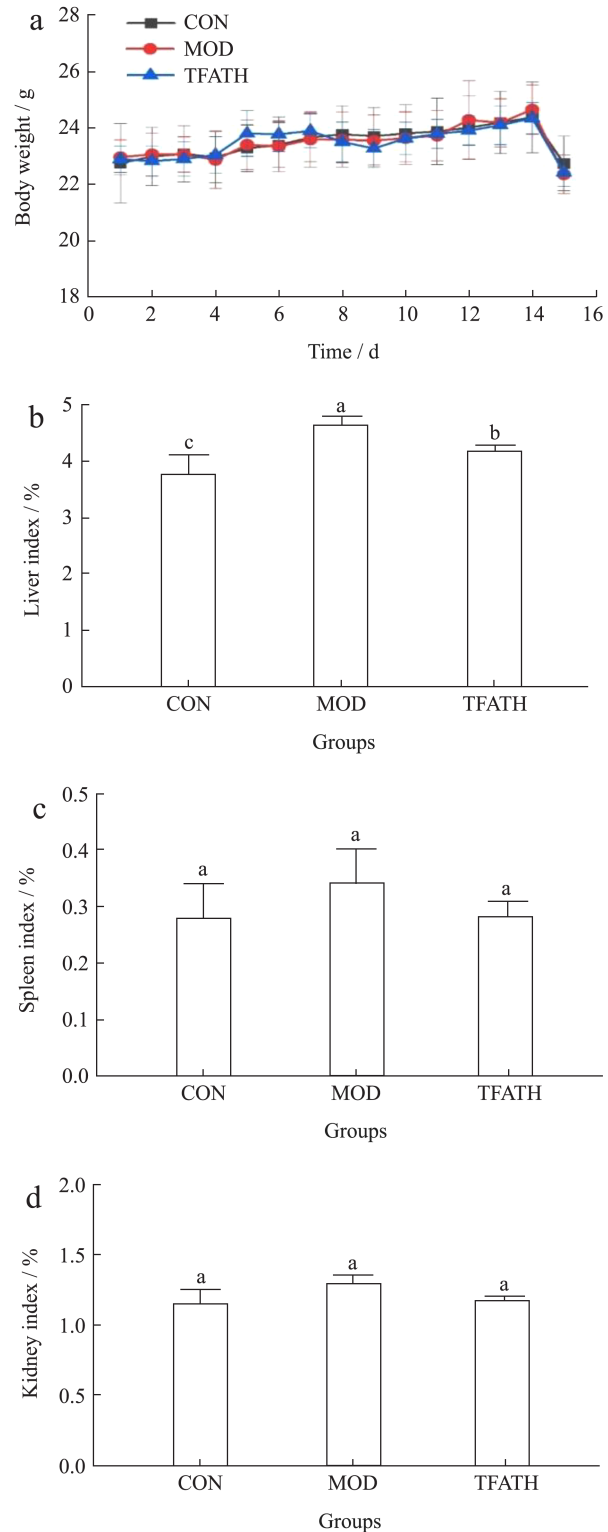


图 10 TFATH 对 ALI 小鼠体质量及脏器指数的影响

Fig.10 Effect of TFATH on body weight and organ index in mice with acute liver injury

2.5.2 TFATH对ALI小鼠肝功能指标的影响

在正常生理状态下, ALT 和 AST 主要存在于肝细

胞内部,然而当肝细胞受损时,细胞膜通透性增加或发生破裂,进而促使这两种酶大量释放入血。通过检测血清中的ALT和AST水平,可以评估肝细胞的损伤程度,结果如图11所示。MOD组小鼠ALT和AST这两种酶活性(109.73 和 $82.01\text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$)显著高于CON组(10.29 和 $18.17\text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$)($P<0.05$),这一结果表明腹腔注射 CCl_4 能够诱导肝损伤,并再次证实 CCl_4 造模的有效性。TFATH组可显著逆转以上血清指标水平,ALT和AST活性较MOD组下降了 12.91% 和 33.98% ($P<0.05$),揭示TFATH对于改善ALI小鼠的肝功能具有积极作用。

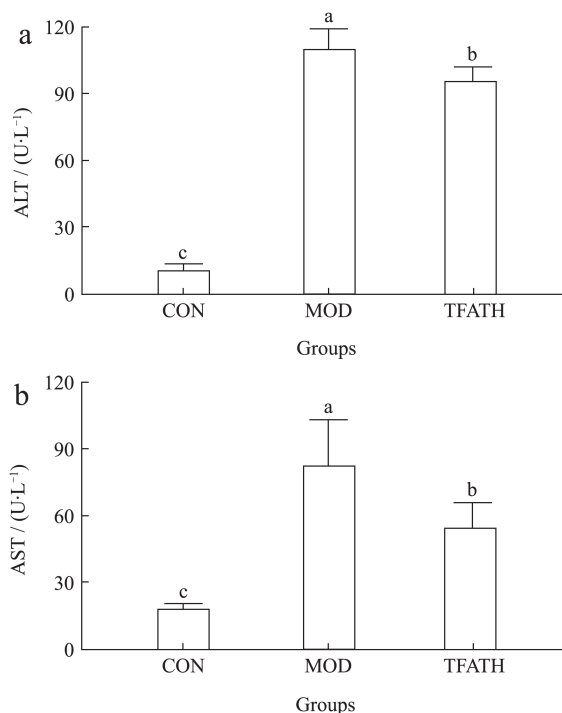


图 11 TFATH 对 ALI 小鼠肝功能指标的影响

Fig.11 Effect of TFATH on liver function indexes in mice with acute liver injury

2.5.3 TFATH对ALI小鼠肝组织病理学形态的影响

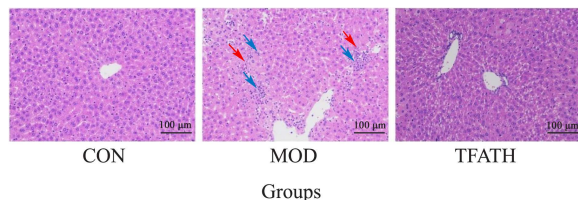


图 12 TFATH 对 ALI 小鼠肝组织病理学形态的影响

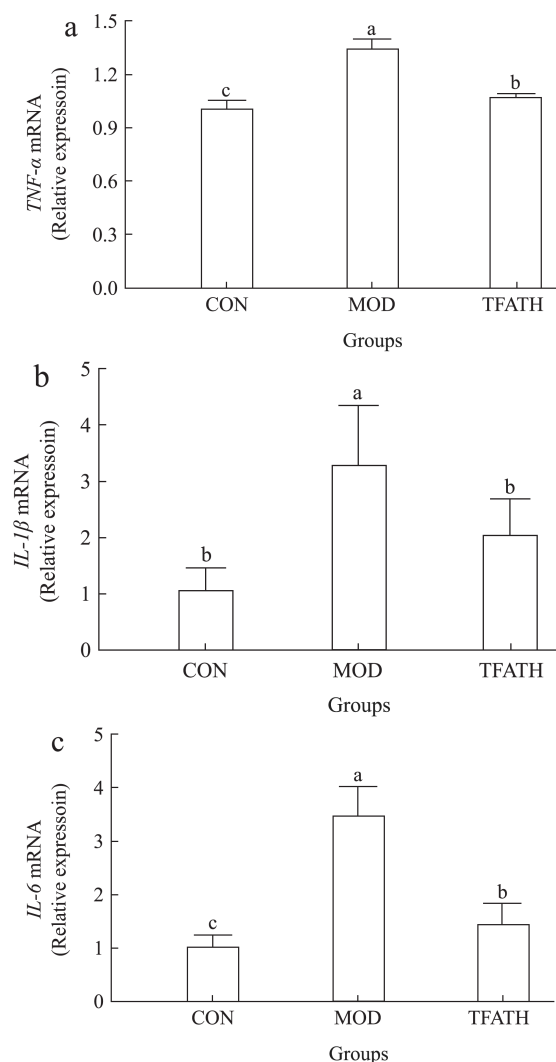
Fig.12 Effect of TFATH on liver histopathology in mice with acute liver injury

H&E 染色(图12)结果可知,CON组肝细胞排列规则、整齐,肝窦无明显扩张或挤压,相邻肝小叶之间的门管区无明显异常,未见明显的炎症改变;而MOD组中央静脉、汇管区周围可见多处坏死灶(红

色箭头),大量肝细胞坏死,胞核固缩深染、碎裂,坏死灶周围并伴有少量的粒细胞及淋巴细胞浸润(蓝色箭头),胞质内可见体积微小的圆形空泡;与MOD组相比,TFATH组肝细胞变性、坏死及淋巴细胞浸润现象均明显减少,表明TFATH干预能够改善由 CCl_4 诱导的小鼠肝组织病理损伤。

2.5.4 TFATH对ALI小鼠肝脏炎症状态的影响

通过检测炎症细胞因子 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-6 和 IL-10 的基因表达水平,以评估小鼠肝脏炎症状态,结果如图13所示。 CCl_4 诱导的肝损伤小鼠中,促炎细胞因子($\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-6) mRNA表达水平较CON组显著升高($P<0.05$),表明存在严重肝脏炎症,而TFATH处理组显著下调了这些促炎细胞因子的表达($P<0.05$);同时,与CON组相比,MOD组中抗炎细胞因子 IL-10 的mRNA表达水平显著下降($P<0.05$),TFATH组中 IL-10 的mRNA表达水平虽然有所提升,但相较于模型组无显著性差异。这些结果表明,TFATH能够有效减轻ALI小鼠的肝脏炎症,主要通过下调促炎细胞因子的表达来实现。



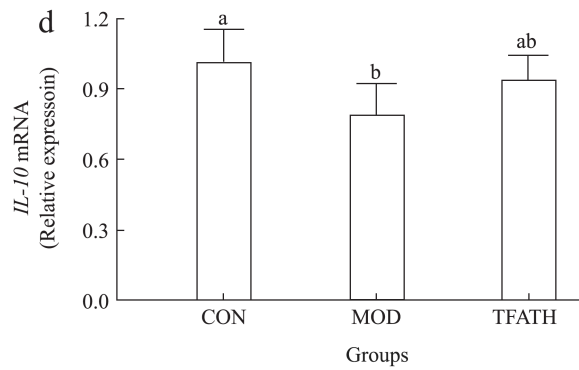


图 13 TFATH 对 ALI 小鼠肝脏炎症状态的影响

Fig.13 Effect of TFATH on liver inflammation in mice with acute liver injury

2.5.5 TFATH对ALI小鼠肝细胞凋亡的影响

细胞凋亡是急性肝损伤的重要特征,通过 RT-qPCR 法检测小鼠肝组织中凋亡相关基因 *Caspase-3*、*Bax* 和 *Bcl-2* 的 mRNA 表达水平,结果见图 14。*Caspase-3* 是凋亡过程中的关键执行酶,在 CCl_4 的刺激下其表达水平显著上调 ($P < 0.05$),促进了细胞凋亡进程。与此同时, CCl_4 处理组中促凋亡基因 *Bax* 的 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$),抗凋亡基因 *Bcl-2* 的 mRNA 表达水平显著下降 ($P < 0.05$)。与模型组相比,TFATH 显著抑制了 *Bax*、*Caspase-3* 的表达,增加了 *Bcl-2* 的表达 ($P < 0.05$),说明 TFATH 对 CCl_4 诱导的急性肝损伤的保护作用与抑制肝细胞凋亡有关。

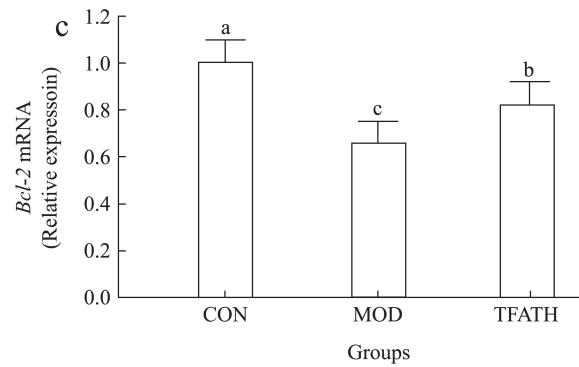
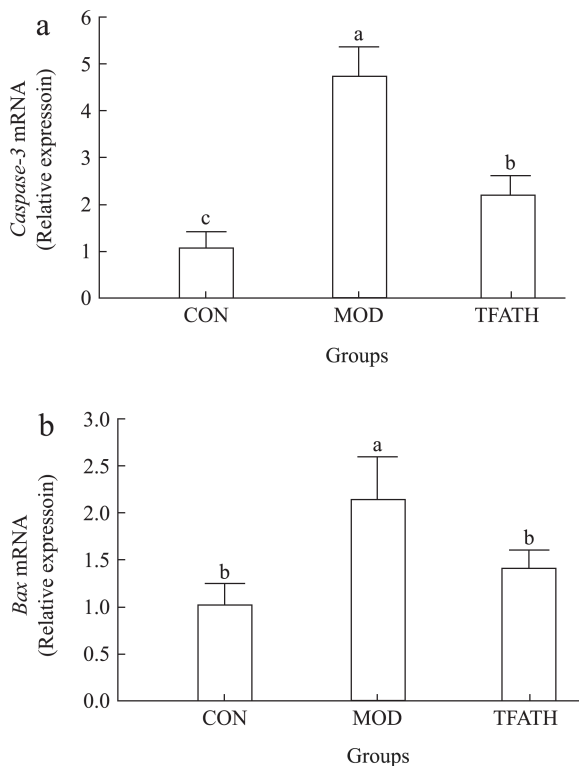


图 14 TFATH 对 ALI 小鼠肝细胞凋亡的影响

Fig.14 Effect of TFATH on hepatocyte apoptosis in mice with acute liver injury

2.5.6 TFATH对ALI小鼠肝脏氧化应激指标的影响

氧化应激是 CCl_4 诱导肝损伤的关键因素,使用生化试剂盒检测 GSH、CAT、SOD 和 MDA 等指标以评估小鼠肝脏氧化应激水平。GSH 是一种重要的非酶性抗氧化剂和自由基清除剂;CAT、SOD 是生物体内关键的抗氧化酶,负责清除活性氧自由基,维护细胞氧化还原平衡。图 15a 结果显示,与对照组相比,模型组小鼠肝脏中 GSH 含量降低 52.75%,CAT 活性降低 41.24%,SOD 活性降低 19.54% ($P < 0.05$);与模型组相比,TFATH 组中 GSH 含量和 CAT 活性分别提升了 54.14% 和 50.88% ($P < 0.05$),SOD 活性虽有升高趋势,但无统计学意义。MDA 作为脂质过氧化过程的主要终产物,在 CON 组小鼠肝脏中含量 ($0.94 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}$) 较低,经 CCl_4 诱导后其含量 ($7.14 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}$) 显著上升 ($P < 0.05$),说明肝细胞发生了严重的脂质过氧化损伤;TFATH 组中 MDA 含量较模型组显著降低 66.53% ($P < 0.05$)。综上所述,TFATH 可以通过增强肝脏抗氧化能力和减少脂质过氧化,有效缓解肝损伤。

2.5.7 TFATH对ALI小鼠肝脏Keap1/Nrf2信号通路相关基因表达的影响

Keap1/Nrf2 信号通路是细胞内一种关键的抗氧化应激调节机制,其中 Keap1 在正常条件下抑制 Nrf2 活性,阻止其进入细胞核。在氧化应激条件下,Nrf2 被激活并释放入核,进而上调包括 HO-1 和 NQO1 在内的抗氧化酶基因表达。此外,Nrf2 还促进 GCLC 的表达,增强谷胱甘肽的合成,共同提升细胞的抗氧化防御能力^[37]。为了进一步探究 TFATH 对急性肝损伤小鼠氧化应激水平的影响,测定了 Keap1/Nrf2 信号通路相关基因的表达,结果如图 15b 所示。相比于 CON 组,MOD 组中 *Keap1* 基因 mRNA 表达水平上调 ($P < 0.05$),Nrf2 及其下游相关基因 *HO-1*、*NQO1*、

GCLC 的 mRNA 表达水平均显著下调 ($P < 0.05$)；相比于 MOD 组，TFATH 组中 *Keap1* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$)，而 *Nrf2*、*HO-1*、*NQO1* 及 *GCLC* 的 mRNA 表达水平均有所提升。结果表明，TFATH 通过激活 *Keap1*/*Nrf2* 信号通路来改善 CCl_4 诱导的肝脏氧化应激损伤。

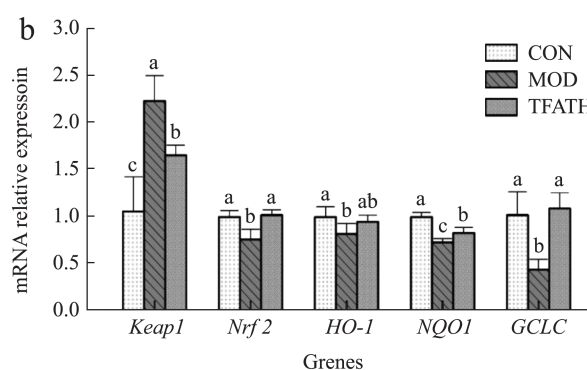
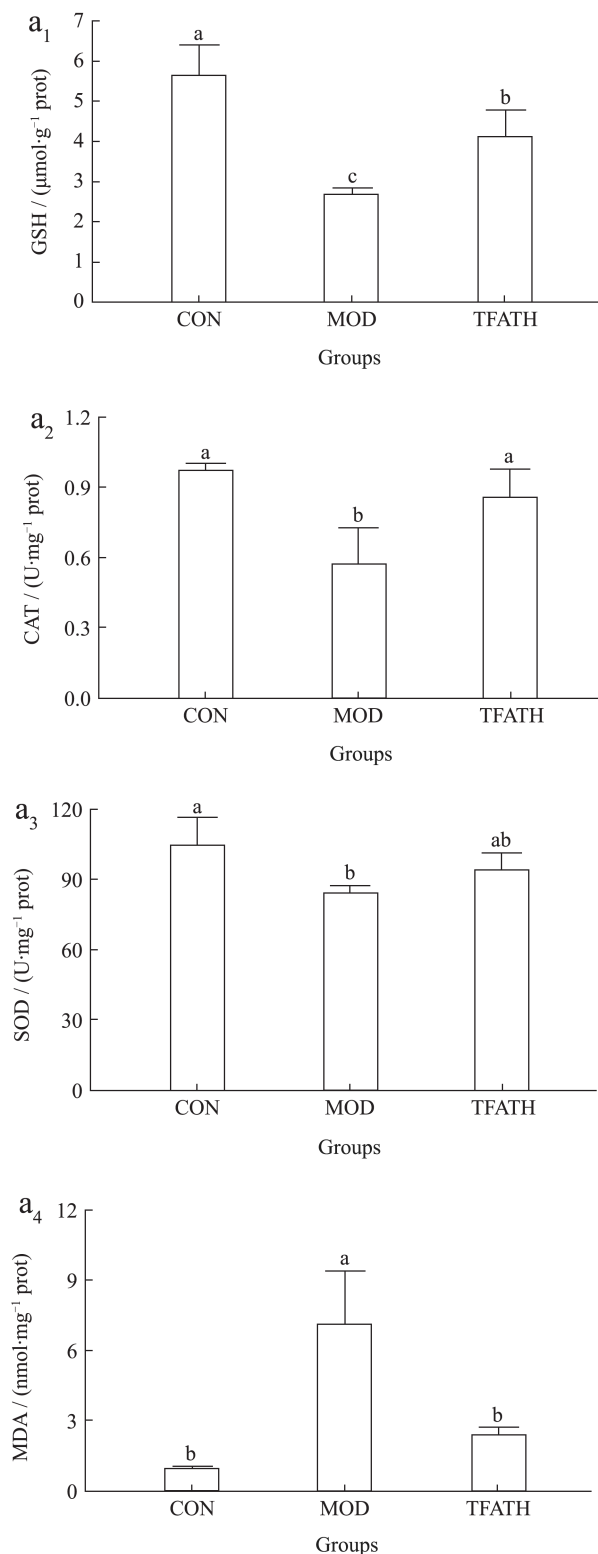


图 15 TFATH 对 ALI 小鼠肝脏氧化应激的影响

Fig.15 Effect of TFATH on oxidative stress of liver in mice with acute liver injury

3 结论

本研究以提高三叶青地上部分总黄酮纯度为目的，利用 D101 大孔树脂对三叶青地上部分粗提取物中总黄酮进行分离纯化，并通过单因素实验考察上样液 pH 值、上样液质量浓度、上样流量及上样量、洗脱液体积分数、洗脱液流量和洗脱量等因素对黄酮纯化效率的影响。确定最佳工艺为：上样液 pH 值为 3、上样液质量浓度 $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、上样流量 $1.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 、上样量 80 mL 、乙醇体积分数 80%、洗脱流量 $1.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 、洗脱液用量 160 mL ，在此条件下，三叶青地上部分总黄酮纯度相比之前约提高了 3.5 倍，其它杂质含量大幅度降低，表明该纯化工艺合理可行。且随着纯化后样品黄酮含量的提高，其抗氧化活性也相应提高。UPLC-ESI-QTOF-MS² 对纯化后样品中的总黄酮进行定性分析，发现三叶青地上部分黄酮主要为 (iso) vitexin、(iso) orientin 及其糖苷化合物。

进一步对三叶青地上部分总黄酮的药理活性进行研究，成功建立四氯化碳诱导的急性肝损伤小鼠模型，从肝脏指数、血清肝功能指标、组织病理学变化、炎症状态、细胞凋亡及氧化应激等多个方面，评估了 TFATH 对 CCl_4 诱导的 ALI 小鼠的保护作用。结果表明，TFATH 干预可以显著降低 ALI 小鼠肝脏系数、血清 ALT 和 AST 水平，减轻肝细胞变性、坏死及炎症浸润等病理改变，降低促炎细胞因子 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-6 基因的表达，减轻肝脏炎症；TFATH 通过下调 ALI 小鼠肝脏促凋亡基因 *Bax*、*Caspase-3* 的表达，上调抗凋亡基因 *Bcl-2* 的表达，进而抑制肝细胞凋亡；TFATH 干预显著增加 ALI 小鼠肝脏抗氧化酶活性，减少过氧化产物 MDA 的含量，并通过上调 *Nrf2*、*HO-1*、*NQO1* 和 *GCLC* 基因的表达，激活 *Keap1*/*Nrf2* 信号通路发挥抗氧化作用。综上所述，TFATH 对 CCl_4

诱导的 ALI 小鼠具有保护作用, 其作用机制与激活 Nrf2/Keap1 信号通路、调节氧化应激、减轻炎症反应和抑制肝细胞凋亡有关。

参考文献

- [1] YU C, CHEN P, MIAO L, et al. The role of the NLRP3 inflammasome and programmed cell death in acute liver injury [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(4): 3067.
- [2] DAI C, ZHANG X, LIN J, et al. Nootkatone supplementation ameliorates carbon tetrachloride-induced acute liver injury via the inhibition of oxidative stress, NF- κ B pathways, and the activation of Nrf2/HO-1 pathway [J]. Antioxidants, 2023, 12(1): 194.
- [3] XU Y, ZHANG Z, WANG B, et al. *Flammulina velutipes* polysaccharides modulate gut microbiota and alleviate carbon tetrachloride-induced hepatic oxidative injury in mice [J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 847653.
- [4] LU Y H, HONG Y, ZHANG T Y, et al. Rosmarinic acid exerts anti-inflammatory effect and relieves oxidative stress via Nrf2 activation in carbon tetrachloride-induced liver damage [J]. Food Nutr Res, 2022, 66.
- [5] EL-KASHEF D H, ZAGHLOUL R A. Ameliorative effect of montelukast against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity: Targeting NLRP3 inflammasome pathway [J]. Life Sciences, 2022, 304: 120707.
- [6] ZHANG L, LI B, WANG M, et al. Genus *Tetragastria*: A review of its folk uses, phytochemistry and pharmacology [J]. Chinese Herbal Medicines, 2022, 14(2): 210-233.
- [7] HU W, ZHENG Y, XIA P, et al. The research progresses and future prospects of *Tetragastria hemsleyanum* Diels et Gilg: A valuable Chinese herbal medicine [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2021, 271: 113836.
- [8] JI T, JI W W, WANG J, et al. A comprehensive review on traditional uses, chemical compositions, pharmacology properties and toxicology of *Tetragastria hemsleyanum* [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2021, 264: 113247.
- [9] 刘莉.花草茶的主要成分及功效[J].现代食品,2019,16:102-104.
- [10] 洪春桃,沈登峰,魏斌,等.不同部位与处理对三叶青茶总黄酮含量的影响[J].浙江农业科学,2019,60(7):1200-1202.
- [11] 洪霞,赖小芳,邱莉萍,等.2种生态型三叶青生长发育与总黄酮含量的比较[J].浙江农业科学,2018,59(8):1337-1339,1343.
- [12] 阮明颖.不同产地三叶青总黄酮及多糖含量的测定[J].当代化工研究,2021,22:19-23.
- [13] SHEN N, WANG T, GAN Q, et al. Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity [J]. Food Chemistry, 2022, 383: 132531.
- [14] 孙永.三叶青化学成分及其抗氧化和抗癌活性的研究[D].南昌:南昌大学,2018.
- [15] WU T, WANG X, XIONG H, et al. Bioactives and their metabolites from *Tetragastria hemsleyanum* leaves ameliorate DSS-induced colitis via protecting the intestinal barrier, mitigating oxidative stress and regulating the gut microbiota [J]. Food & Function, 2021, 12(23): 11760-11776.
- [16] XIAO L, XIONG H, DENG Z, et al. *Tetragastria hemsleyanum* leaf extracts ameliorate NAFLD in mice with low-grade colitis via the gut-liver axis [J]. Food & Function, 2023, 14(1): 500-515.
- [17] TAO K, PENG H, BI X, et al. Effect of *Tetragastria hemsleyanum* leaves and extract supplementation on liver metabolomics and the gut microbiota in alcohol-induced liver injury [J]. Food Bioscience, 2024, 58: 103617.
- [18] LI J, CHASE H A. Development of adsorptive (non-ionic) macroporous resins and their uses in the purification of pharmacologically-active natural products from plant sources [J]. Natural Product Reports, 2010, 27(10): 1493-1510.
- [19] YANG Y, LIANG Q, ZHANG B, et al. Adsorption and desorption characteristics of flavonoids from white tea using macroporous adsorption resin [J]. Journal of Chromatography A, 2024, 1715: 464621.
- [20] ZHANG B, DENG Z, RAMDATH D D, et al. Phenolic profiles of 20 Canadian lentil cultivars and their contribution to antioxidant activity and inhibitory effects on α -glucosidase and pancreatic lipase [J]. Food Chemistry, 2015, 172: 862-872.
- [21] SUN Y, TSAO R, CHEN F, et al. The phytochemical composition, metabolites, bioavailability and *in vivo* antioxidant activity of *Tetragastria hemsleyanum* leaves in rats [J]. Journal of Functional Foods, 2017, 30: 179-193.
- [22] WANG X H, WANG J P. Effective extraction with deep eutectic solvents and enrichment by macroporous adsorption resin of flavonoids from *Carthamus tinctorius* L [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2019, 176: 112804.
- [23] QIN D, HE C, GAO Y, et al. Optimization of total flavonoids purification process in rose by uniform design method [J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2024,54(9): 946-957.
- [24] NIE C, ZHU P, MA S, et al. Purification, characterization and immunomodulatory activity of polysaccharides from stem lettuce [J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 188: 236-242.
- [25] ZHAN J, LIANG Z, LI J, et al. Pulsed electric field-ultrasonic assisted extraction combined with macroporous resin for the preparation of flavonoids from *Pericarpium Citri Reticulatae* [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2022, 46(10): e16823.
- [26] WANG W, DONG S, ZHANG W, et al. Study on adsorption/resolution properties, enrichment and purification of phenolic substances of *Inonotus hispidus* by macroporous adsorption resin [J]. Industrial Crops and Products, 2024, 216: 118661.
- [27] 张沛,吴楠,宋志军,等.响应面法优化大孔树脂纯化黄芩毛蕊异黄酮工艺[J].食品工业科技,2021,42(10):209-214.
- [28] ZHANG X, WANG R, ZHAO Y, et al. Separation and purification of flavonoids from *Polygonum cuspidatum* using macroporous adsorption resin [J]. Pigment & Resin Technology, 2021, 50(6): 574-584.
- [29] 徐祥浩,王莹,庞青云,等.大孔树脂富集大红景天总黄酮及抗氧化活性研究[J].特产研究,2024,46(2):103-109,114.
- [30] 周泉,唐恺,张偶,等.大孔树脂分离纯化紫苏叶总黄酮的工艺研究[J].食品安全导刊,2023,10:136-139.
- [31] WANG X, SU J, CHU X, et al. Adsorption and desorption

- characteristics of total flavonoids from *Acanthopanax senticosus* on macroporous adsorption resins [J]. *Molecules*, 2021, 26(14): 4162.
- [32] ZHAO Y, CHU S, GUI S, et al. Tissue-specific metabolite profiling of *Fallopia multiflora* (Heshouwu) and *Fallopia multiflora* var. *angulata* by mass spectrometry imaging and laser microdissection combined with UPLC-Q/TOF-MS [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2021, 200: 114070.
- [33] GUO Y P, YANG H, WANG Y L, et al. Determination of flavonoids compounds of three species and different harvesting periods in *Crataegi folium* based on LC-MS/MS [J]. *Molecules*, 2021, 26(6): 1602.
- [34] PETROPOULOS S A, TAOFIQ O, FERNANDES Â, et al. Bioactive properties of greenhouse-cultivated green beans (*Phaseolus vulgaris* L.) under biostimulants and water-stress effect [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2019, 99(13): 6049-6059.
- [35] SUN Y, QIN Y, LI H, et al. Rapid characterization of chemical constituents in *Radix tetrastigma*, a functional herbal mixture, before and after metabolism and their antioxidant/antiproliferative activities [J]. *Journal of Functional Foods*, 2015, 18: 300-318.
- [36] YU H H, QIU Y X, LI B, et al. *Kadsura heteroclita* stem ethanol extract protects against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice via suppression of oxidative stress, inflammation, and apoptosis [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, 267: 113496.
- [37] SUZUKI T, TAKAHASHI J, YAMAMOTO M. Molecular basis of the KEAP1-NRF2 signaling pathway [J]. *Molecules and Cells*, 2023, 46(3): 133-141.