

大叶藻黄酮对酒精性肝损伤的保护作用

李 静, 张朝辉*, 段筱杉, 应 锐

(中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 为了深入挖掘大叶藻黄酮(ZF)的生物活性, 提高大叶藻的利用价值, 本实验研究了ZF对酒精性肝损伤的保护作用; 实验采用纤维素酶-超声波辅助复合浸提法提取大叶藻中的天然活性物质黄酮类化合物, 并采用聚酰胺树脂柱层析法对其进行纯化; 研究ZF的体外抗氧化能力; 将60只ICR小鼠随机分成6组, 通过建立酒精性肝损伤模型, 研究ZF对肝损伤的保护作用; 结果显示, 经纯化后ZF的含量达到80%。体外实验表明ZF对DPPH自由基和羟基自由基有清除能力, 具有一定的抗氧化活性; 体内实验表明ZF对酒精性肝损伤小鼠的抗氧化能力、脂质代谢能力以及乙醇代谢能力均有影响。ZF各剂量组与模型组相比, 血清ALT、AST和 γ -GT活性显著降低, 肝组织MDA含量显著降低, 乙醇代谢酶活性显著提高; ZF中、高剂量组小鼠肝组织GSH-Px和SOD活性显著提高, 血脂浓度显著降低。长期过量饮酒可导致小鼠肝脏严重损伤, ZF可以改善小鼠肝组织损伤情况, 对酒精性肝损伤起到保护作用, 其机制可能与增强机体抗氧化能力、调节脂质代谢和乙醇代谢能力有关。

关键词: 大叶藻; 黄酮; 抗氧化; 酒精性肝损伤

中图分类号: S 917.3

文献标志码: A

长期饮酒对机体的多种器官具有毒害作用, 其中对肝脏的损害最为严重, 由其造成的中毒性肝损伤称为酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD), 根据病情及病程, ALD可分为轻症酒精性肝病(mild alcoholic injury, MAI)、酒精性脂肪肝(alcoholic fatty liver, AFL)、酒精性肝炎(alcoholic hepatitis, AH)、酒精性肝纤维化(alcoholic hepatic fibrosis, AHF)和酒精性肝硬化(alcoholic cirrhosis, AC) 5个阶段^[1]。我国因酒精导致的肝损伤病例呈现逐年上升的趋势, ALD是继病毒性肝炎后导致肝损伤的第二大病因^[2]。临床研究表明, ALD的病理学改变是不可逆的, 但临床治疗药物的副作用逐渐突出, 因此从天然植物中提取安全的活性成分并应用于此类疾病的治疗成为关注的焦点^[3]。

黄酮类化合物是一类来源广泛的生物活性物

质, 具有抗氧化^[4]、抗衰老^[5]、降血脂^[6]等生物活性, 研究表明黄酮对许多疾病具有预防及抑制作用, 具有广泛的开发前景^[7]。

大叶藻(*Zostera marina*)是一种生活在咸水环境中的高等植物, 属被子植物门(Angiospermae), 单子叶植物纲(Monocotyledoneae), 沼生目(Helobiae), 隶属于眼子菜科(Potamogetonaceae)大叶藻属^[8]。大叶藻属中的大叶藻、丛生大叶藻(*Z. caespitosa*)、具茎大叶藻(*Z. caulescens*)、宽叶大叶藻(*Z. asiatica*)和矮大叶藻(*Z. japonica*)主要分布在山东、河北、辽宁沿海^[9]。大叶藻属于多年生草本植物, 作为海草床的重要组成部分, 近年来在国内外已经引起了广泛的关注。Kim等^[10]首次从大叶藻中发现黄酮类化合物, 为后续研究大叶藻黄酮的生物活性奠定了基础。

本研究以海洋高等植物大叶藻为原料, 研究

收稿日期: 2015-09-14 修回日期: 2015-11-21

资助项目: 国家自然科学基金(31272705)

通信作者: 张朝辉, E-mail: zhangzh@ouc.edu.cn

大叶藻黄酮的体外抗氧化作用,并建立酒精性肝损伤的模型,研究大叶藻黄酮对酒精性肝损伤的保护作用,以期进一步挖掘大叶藻的价值,提高大叶藻的利用价值,为寻求对酒精性肝损伤有保护作用的天然活性物质提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

大叶藻采自山东青岛栈桥附近海域。将采回的大叶藻清洗烘干,用捣碎机研磨并过40目筛,保存在干燥处备用。

DPPH, sigma公司;联苯双酯滴丸,北京协和药厂;谷丙转氨酶(ALT)试剂盒、谷草转氨酶(AST)试剂盒、 γ -谷氨酰转移酶(γ -GT)试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒、乙醇脱氢酶(ADH)试剂盒、蛋白(TP)定量测定试剂盒均购于南京建成生物工程研究所;甘油三酯(TG)试剂盒、胆固醇(TC)试剂盒均购于北京中生北控生物科技股份有限公司;乙醛脱氢酶(ALDH)试剂盒,长春汇力生物技术有限公司;无水乙醇、Vc、双氧水、水杨酸、七水合硫酸亚铁等均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

WB-200小型高速粉碎机,北京维博创机械设备有限公司;SHA-B恒温振荡器,江苏常州国华电器有限公司;AL204电子天平,梅特勒托利多(上海)有限责任公司;TC-15K-H型电子天平,常熟双杰测试仪器厂;HH-4数显恒温水浴锅,国华电器有限公司;XW-微型漩涡混合仪,上海泸西分析仪器厂;2-16KL高速冷冻离心机, Sigma公司;680型酶标仪,美国BIORAD公司;旋转蒸发仪,德国Heidolph公司;FSH2型高速内切式组织匀浆机,江苏金坛金城国胜实验仪器厂。

1.3 实验动物

SPF级雄性健康ICR(institute of cancer research)小鼠,体质量18~22 g,购于青岛市实验动物和动物实验中心。饲养条件:小鼠置于经84消毒的塑料笼中饲养,温度(22 \pm 3) $^{\circ}$ C,湿度50%~75%,光暗周期12 h/12 h,自由摄食、饮水,适应性喂养1周后开始实验。

1.4 实验方法

大叶藻黄酮的提取 采用纤维素酶-超声波复合辅助浸提法提取黄酮,即称取适量大叶藻粉末,按料液比3:50(g/mL)加入70%(V/V)乙醇,加入0.025 g/g原料纤维素酶,调节酶解pH值为5,酶解温度25 $^{\circ}$ C,酶解30 min,再超声处理15 min,超声功率设置为250 W,55 $^{\circ}$ C浸提3 h,过滤收集滤液。提取3次,合并提取液,浓缩、冷冻干燥即得大叶藻黄酮粗提物。

大叶藻黄酮的纯化 采用聚酰胺树脂柱层析法纯化大叶藻黄酮。纯化条件:大叶藻黄酮粗提物的质量浓度为1.25 mg/mL,上样液pH值为4,上样体积5 BV,上样流速3 BV/h,70%(V/V)乙醇洗脱,洗脱体积6.5 BV,洗脱流速3 BV/h。经2次纯化后黄酮纯度达到80%。

大叶藻黄酮清除DPPH自由基(DPPH \cdot)能力的测定 参照文献[11]中的方法,在10 mL比色管中加入1 mL不同浓度的提取液和2 mL 0.1 mol/L的DPPH乙醇溶液,充分混匀后避光反应20 min,以等体积的提取溶剂和无水乙醇的混合液调零,在517 nm处测定其吸光度,其值为 A_i ;测定1 mL不同浓度的提取液与2 mL无水乙醇的吸光度,其值为 A_j ;测定1 mL提取溶剂与2 mL DPPH乙醇溶液的吸光度,其值为 A_c 。DPPH \cdot 清除率计算公式:

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

大叶藻黄酮清除羟基自由基(\cdot OH)能力的测定 参照文献[12]中的方法,在10 mL比色管中依次加入2 mmol/L的 FeSO_4 溶液3 mL,1 mmol/L的 H_2O_2 溶液3 mL,再加入6 mmol/L的水杨酸溶液3 mL,摇匀,37 $^{\circ}$ C水浴15 min取出,加入1 mL不同浓度的样液,同时加入1 mL超纯水作为对照,用来消除后加的1 mL样液中由于水造成的体系吸光度的降低,定容至10 mL刻度线摇匀,再在37 $^{\circ}$ C条件下水浴15 min,取出后在510 nm处测其吸光值 A_1 ,对照所测吸光值为 A_2 。样液对 \cdot OH清除率的计算公式:

$$\cdot\text{OH清除率}(\%) = \frac{A_2 - A_1}{A_2} \times 100 \quad (2)$$

小鼠酒精性肝损伤模型建立 将60只ICR小鼠适应性饲养1周后,随机分为正常对照组(C),模型对照组(M),阳性对照组(P),大叶藻黄酮低

(FL)、中 (FM)、高 (FH)剂量组， 每组 10 只。 M组、 P组、 FL组、 FM组和 FH组按 0.2 mL/20 g 剂量灌胃 50%乙醇， C组灌胃蒸馏水。 1 h后， P组灌胃 150 mg/kg联苯双酯； FL组、 FM组和 FH组分别灌胃 40、 80和 160 mg/kg大叶藻黄酮； C组和 M组灌胃相应体积的蒸馏水。

小鼠肝脏指数及抗氧化能力的测定 末次灌胃后， 禁食不禁水 24 h， 称体质量， 眼球取血， 室温放置 30 min后， 7000 r/min下离心 10 min， 取血清低温冷冻保存备用； 同时将小鼠颈椎脱臼处死， 迅速剥离肝脏， 称重并按公式(3)计算肝脏指数； 取小鼠肝脏， 制备 10%的肝脏组织匀浆液备用。 参照试剂盒操作说明分别测定小鼠血清肝功能指标 ALT、 AST和 γ -GT活性， 以及肝组织匀浆 GSH-Px、 SOD活性和 MDA含量。

$$\text{肝脏指数}(\%) = \frac{\text{肝脏质量}(\text{g})}{\text{体质量}(\text{g})} \times 100 \quad (3)$$

小鼠脂质代谢能力及乙醇代谢能力测定 取小鼠血清测定其血脂浓度， 参照试剂盒操作说明测定 TC和 TG浓度； 取小鼠肝脏 10%组织匀浆液， 参照试剂盒操作说明测定肝组织匀浆中 ADH和 ALDH活性。

1.5 统计学分析

实验数据采用 SPSS 19.0软件进行单因素方差分析， 以平均值 \pm 标准差表示， 比较组间差异， $P < 0.05$ 为各组之间差异显著， $P < 0.01$ 为各组之间差异极显著。

2 结果与讨论

2.1 大叶藻黄酮体外抗氧化活性

Vc是常用的抗氧化剂， 是自由基清除实验

最好的对照品^[13]。 Vc对 DPPH·的清除能力高于 ZF， Vc和 ZF的 IC₅₀值分别为 0.051和 0.328 mg/mL， Vc在很小的浓度时清除率就达到 80%以上(图 1-a)。 DPPH·清除能力的测定广泛应用于各类天然产物的自由基清除能力的评价， 是一种稳定的质子自由基^[14]， 结果表明 ZF是一种较有效的 DPPH·清除剂。 ZF对·OH的清除能力略高于 Vc， ZF和 Vc的 IC₅₀值分别为 0.581和 0.699 mg/mL， 且清除能力与浓度具有明显的量效关系。·OH是活性氧中最活泼的自由基之一， 是造成机体过氧化损伤的主要因素^[15]， 结果显示 ZF可以有效清除·OH， 具有一定的抗氧化能力(图 1-b)。

2.2 大叶藻黄酮对小鼠肝脏指数的影响

肝脏指数是实验中反映肝脏功能是否下降、 肝脏是否受损的常用指标。 M组小鼠肝脏指数增加了 15.2%， 与 C组差异显著 ($P < 0.05$)， 表明长期饮酒使肝脏存在受损肿胀的情况； 与 M组相比， ZF各剂量组小鼠肝脏指数显著下降 ($P < 0.01$)， 且趋于正常， 表明 ZF可以抑制长期饮酒造成的肝脏肿胀， 缓解小鼠肝脏受损情况(图 2)。

2.3 大叶藻黄酮对酒精性肝损伤小鼠血清 ALT、 AST和 γ -GT的影响

肝脏是机体最大的解毒器官， 肝脏是否正常对机体非常重要。 ALT绝大多数存在于细胞质中， 是肝细胞受损的重要指标， AST主要存在于线粒体中， 肝细胞出现严重坏死时 AST含量会明显上升， 因此 ALT和 AST是目前最常用的肝功能指标。 γ -GT活性的升高是酒精性肝损伤的重要特征， 该指标能够明显区分非酒精性肝病^[16]。 连续灌胃 6周后， M组小鼠血清 ALT、 AST和 γ -

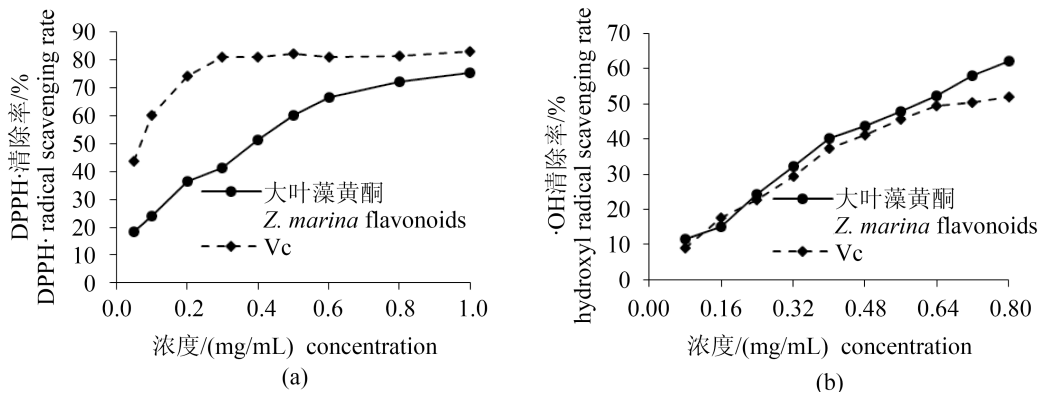


图 1 大叶藻黄酮、 Vc对 DPPH·(a)和·OH (b)的清除能力

Fig. 1 The scavenging activities of *Z. marina* flavonoids and Vc on DPPH· (a) and ·OH (b)

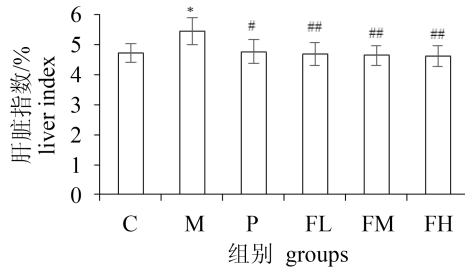


图2 大叶藻黄酮对各组小鼠肝脏指数的影响($n=10$)

与正常组相比, *. $P < 0.05$, **. $P < 0.01$; 与模型组相比, #. $P < 0.05$, ##. $P < 0.01$, 下同

Fig. 2 Effects of *Z. marina* flavonoids on liver index in mice

Compared to normal group, *. $P < 0.05$, **. $P < 0.01$; compared to model group, #. $P < 0.05$, ##. $P < 0.01$, the same below

GT活性分别升高了130.7%、53.8%和70.9%，与C组差异极显著($P < 0.01$ ，图3)，说明长期饮酒已经对小鼠的肝脏造成严重的损伤，小鼠酒精性肝损伤模型建立成功。与M组相比，FL组的ALT活性显著下降($P < 0.05$)，AST和 γ -GT活性极显著下降($P < 0.01$)；FM和FH组的ALT、AST和 γ -GT活性均极显著下降($P < 0.01$)，其中FH组ALT、AST和 γ -GT活性分别下降了39.0%、27.5%和25.7%，3种酶的活性趋于正常水平，说明ZF可以抑制小鼠因酒精造成的ALT、AST和 γ -GT活性的升高，使肝功能得到改善。结果表明ZF对小鼠酒精性肝损伤有一定的保护作用。

2.4 大叶藻黄酮对酒精性肝损伤小鼠肝脏GSH-Px、SOD和MDA含量的影响

乙醇在机体代谢过程中会生成大量的活性氧，如果不能及时清除则会对机体的抗氧化能力产生影响。GSH-Px是机体中催化过氧化氢分解的重要酶，是机体重要的抗过氧化能力的指标之一，对细胞膜结构及功能的完整起到保护作用；SOD是机体重要的自由基清除剂，对机体的氧化与抗氧化能力的平衡起着至关重要的作用；MDA是自由基作用于脂质发生过氧化反应的产物，通过测定MDA的量可以反映机体脂质过氧化的程度，是常用的膜脂过氧化指标^[17]。因此，测定肝脏中GSH-Px、SOD活性以及MDA含量，可以反映小鼠肝脏受乙醇代谢产物损害的程度。M组小鼠肝脏GSH-Px、SOD活性显著降低($P < 0.01$)，分别降低了45.0%和40.8%，与C组差异极显著($P < 0.01$)；MDA含量显著增加了79.0%

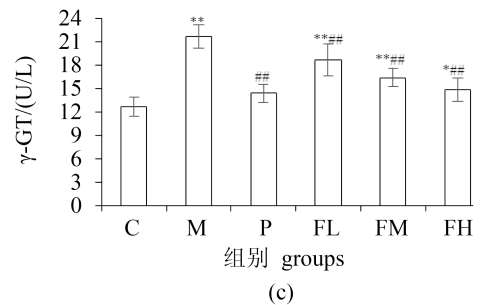
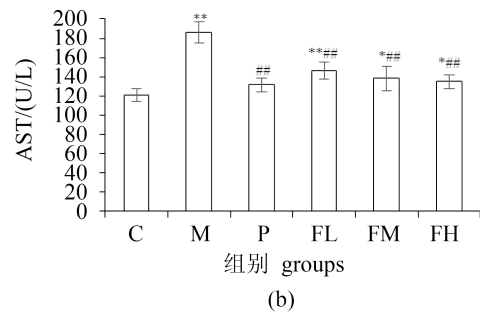
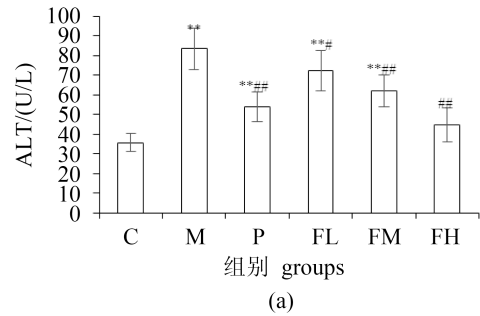


图3 大叶藻黄酮对各组小鼠血清ALT(a)、AST(b)和 γ -GT(c)的影响($n=10$)

Fig. 3 Effects of *Z. marina* flavonoids on the serum ALT(a), AST(b) and γ -GT(c) in mice

($P < 0.01$)，说明酒精导致小鼠肝脏中过氧化物明显升高，而抗氧化能力下降(图4)。与M组相比，FM组GSH-Px和SOD活性分别升高了48.9%和27.7%，差异显著($P < 0.05$)；FH组GSH-Px和SOD活性分别升高了60.1%和44.2%，差异极显著($P < 0.01$)；FL、FM和FH组MDA含量分别下降了31.6%、43.2%和39.3%，差异极显著($P < 0.01$)，说明ZF可以有效阻止饮酒小鼠的肝细胞发生过氧化反应，促使小鼠肝脏内氧化和抗氧化的平衡趋于正常。结果表明ZF可以增强机体的抗氧化能力，其对酒精性肝损伤的保护作用可能与抗氧化作用有关。

2.5 大叶藻黄酮对酒精性肝损伤小鼠血清TC和TG的影响

肝脏是酒精代谢的场所，同时也是脂肪代谢

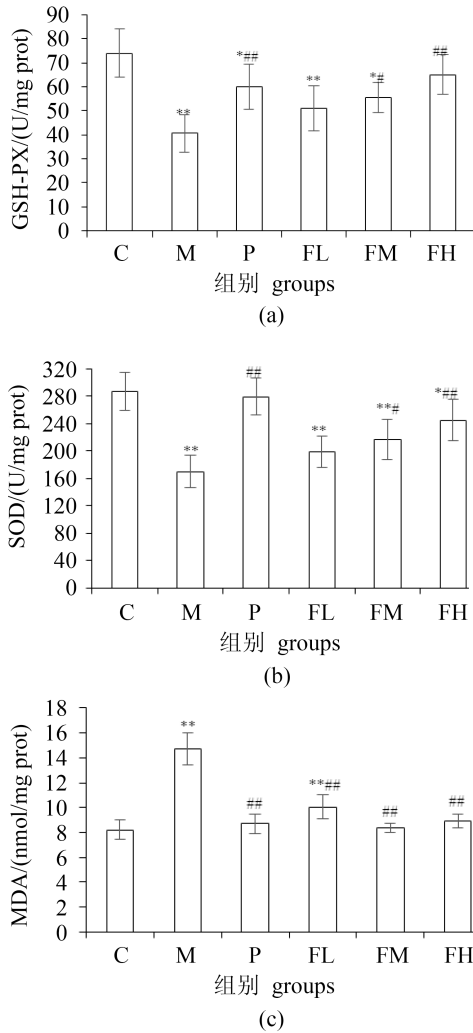


图 4 大叶藻黄酮对各组小鼠肝脏GSH-Px(a)、SOD(b)和MDA(c)的影响(n=10)

Fig. 4 Effects of *Z. marina* flavonoids on the hepatic GSH-Px(a), SOD(b) and MDA(c) in mice

的场所。临床研究显示酒精性脂肪肝与血脂的关系密切,酒精摄入过多则会使脂类物质在肝脏中堆积,如果肝脏发生脂肪性病变则会导致血脂浓度的升高^[18]。因此,血脂浓度可以反映小鼠肝脏脂肪性病变的程度。M组小鼠血清TC、TG含量均显著升高($P < 0.01$),分别升高了21.6%和58.9%,说明长期饮酒会导致小鼠体内TC和TG的堆积,使脂肪代谢受到阻碍(图5)。与M组相比,P、FM和FH组小鼠血清TC、TG含量均显著降低($P < 0.01$)。FH组TC和TG分别降低了14.55%和32.59%,P组分别降低了15.5%和30.8%,说明ZF可以在一定程度上抑制TC和TG的堆积,使血脂浓度趋于正常。结果表明ZF

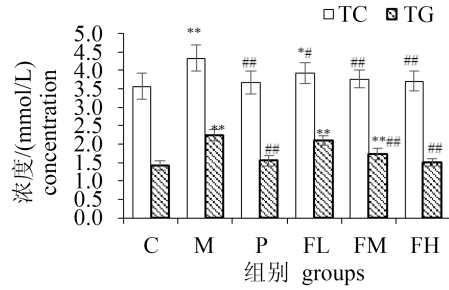


图 5 大叶藻黄酮对各组小鼠血清TC和TG的影响(n=10)

Fig. 5 Effects of *Z. marina* flavonoids on the serum TC and TG in mice

对酒精性肝损伤的保护作用可能与调节脂质代谢有关。

2.6 大叶藻黄酮对酒精性肝损伤小鼠肝脏ADH和ALDH的影响

乙醇在ADH催化下生成乙醛,乙醛再经ALDH催化生成乙酸,乙酸再以乙酰CoA的形式进入三羧酸循环,最后氧化成二氧化碳和水排出体外^[19]。因此,影响乙醇代谢速率的关键酶是ADH和ALDH,酶活性升高有助于加快乙醇代谢,减轻乙醇对机体的毒害作用。M组小鼠肝脏ADH和ALDH活性显著下降($P < 0.01$),分别下降了58.0%和63.7%,说明酒精性肝损伤小鼠肝脏中的乙醇代谢酶活性受到抑制,酒精性肝损伤与乙醇代谢酶的活性密切相关(图6)。与M组相比,P组和ZF各剂量组小鼠肝脏ADH和ALDH活性均显著升高($P < 0.01$),FH组ADH和ALDH活性分别升高了124.3%和97.8%,说明ZF可以提高乙醇代谢酶的活性,进而提高乙醇在肝脏中的代谢速率,缩短乙醇及其代谢产物在体内的停留时间,

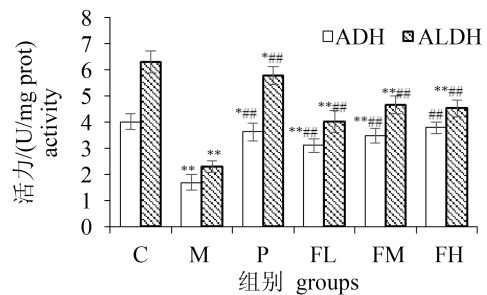


图 6 大叶藻黄酮对各组小鼠肝脏ADH和ALDH的影响(n=10)

Fig. 6 Effects of *Z. marina* flavonoids on the hepatic ADH and ALDH in mice

避免积累,减轻对肝脏的损害。

3 结论

本研究以海洋高等植物大叶藻为原料,经提取、纯化得到大叶藻黄酮,成功建立酒精性肝损伤模型,研究大叶藻黄酮的体外抗氧化活性及其对小鼠酒精性肝损伤的保护作用。刘超群等^[20]研究表明,大蒜多糖可以降低酒精性肝损伤引起的血清ALT、AST活性水平,增加肝组织GSH-Px、SOD活性,降低肝组织MDA含量,表明大蒜多糖对酒精性肝损伤有一定的保护作用;孟宪军等^[21]研究表明北五味子(*Schisandra chinensis*)藤茎总三萜化合物对酒精性肝损伤有保护作用;本实验结果显示大叶藻黄酮具有一定的体外抗氧化活性,其对小鼠酒精性肝损伤有明显的保护作用,因此推测大叶藻黄酮对酒精性肝损伤的作用机制与大蒜多糖、北五味子藤茎总三萜化合物等相似,其机制可能与调控各种代谢酶的活性有关,即大叶藻黄酮能够提高机体的GSH-Px、SOD、ADH和ALDH活性水平,使乙醇由ADH途径代谢成乙醛,且ALDH活性的提高加快了乙醛的代谢,GSH-Px和SOD活性的提高能够提升乙醇代谢产生的活性氧的清除率,从而减少乙醇代谢产物对机体的损伤,具体作用机制还有待进一步研究。本研究为大叶藻的综合开发利用以及为寻找对酒精性肝损伤有保护作用的天然活性物质提供了理论依据。

参考文献:

- [1] Orman E S, Odena G, Bataller R. Alcoholic liver disease: Pathogenesis, management, and novel targets for therapy[J]. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2013, 28(suppl.1): 77-84.
- [2] Diehl A M. Liver disease in alcohol abusers: Clinical perspective[J]. *Alcohol*, 2002, 27(1): 7-11.
- [3] 康莉娜, 马婷婷, 赵珮, 等. 黄参茎叶多酚对四氯化碳所致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. *现代食品科技*, 2015, 31(3): 18-23.
- Kang L N, Ma T T, Zhao P, *et al.* The hepatoprotective effect of polyphenols from *Sphallerocarpus gracilis* stem leaves against CCl₄-induced acute hepatic damage in mice[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2015, 31(3): 18-23 (in Chinese).
- [4] Wan P F, Sheng Z L, Han Q, *et al.* Enrichment and purification of total flavonoids from Flos Populi extracts with macroporous resins and evaluation of antioxidant activities in vitro[J]. *Journal of Chromatography B*, 2014, 945-946: 68-74.
- [5] Ghasemzadeh A, Ghasemzadeh N. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human[J]. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2011, 5(31): 6697-6703.
- [6] 李国莉, 赵伟明, 杨建军, 等. 大豆异黄酮降血脂作用的研究[J]. *食品科学*, 2006, 27(10): 528-531.
- Li G L, Zhao W M, Yang J J, *et al.* Effects of soy isoflavones on hyperlipidemia rats[J]. *Food Science*, 2006, 27(10): 528-531 (in Chinese).
- [7] Benavente-García O, Castillo J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: New findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(15): 6185-6205.
- [8] 孙京沙. 大叶藻总黄酮的提取, 纯化及抗衰老活性的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
- Sun J S. The extraction, purification and anti-ageing property of flavonoids from *Zostera marina* L.[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014 (in Chinese).
- [9] 李渊, 孙典荣, 李文涛, 等. 基于matK、rbcL和ITS序列的5种大叶藻系统发育研究[J]. *水产学报*, 2011, 35(2): 183-191.
- Li Y, Sun D R, Li W T, *et al.* Phylogenetic relationship in five Zosteraceae species based on matK, rbcL, and ITS partial sequences[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(2): 183-191 (in Chinese).
- [10] Kim J H, Cho Y H, Park S M, *et al.* Antioxidants and inhibitor of matrix metalloproteinase-1 expression from leaves of *Zostera marina* L.[J]. *Archives of Pharmacal Research*, 2004, 27(2): 177-183.
- [11] 郭雪峰, 岳永德, 汤锋, 等. 用清除有机自由基DPPH法评价竹叶提取物抗氧化能力[J]. *光谱学与光谱分析*, 2008, 28(7): 1578-1582.
- Guo X F, Yue Y D, Tang F, *et al.* Detection of antioxidative capacity of bamboo leaf extract by scavenging organic free radical DPPH[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2008, 28(7): 1578-1582 (in Chinese).
- [12] 石玉平, 卢挺, 王永宁. 油菜蜂花粉中黄酮类物质清除羟基自由基的研究[J]. *食品科学*, 2005, 25(11): 300-

- 302.
- Shi Y P, Lu T, Wang Y N. Studies on the hydroxy-group free radical eliminated of flavonoids of *Elaeagnus angustifolia* L. flower[J]. *Food Science*, 2005, 25(11): 300-302 (in Chinese).
- [13] 张惠芳, 周瑜珍, 陈嘉璐, 等. 酸枣多糖对小鼠CC14急性肝损伤的作用[J]. *现代食品科技*, 2014, 30(9): 33-37.
- Zhang H F, Zhou Y Z, Chen J L, *et al.* Effect of polysaccharides from wild jujube on acute liver injury induced by CCl₄ in mice[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(9): 33-37 (in Chinese).
- [14] 熊双丽, 卢飞, 史敏娟, 等. DPPH自由基清除活性评价方法在抗氧化剂筛选中的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(8): 380-383.
- Xiong S L, Lu F, Shi M J, *et al.* Advancement of evaluation methods about DPPH radical scavenging activity in Screening Antioxidant[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(8): 380-383 (in Chinese).
- [15] Özyürek M, Bektaşoğlu B, Güçlü K, *et al.* Hydroxyl radical scavenging assay of phenolics and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method using catalase for hydrogen peroxide degradation[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 616(2): 196-206.
- [16] 刘亮亮. 壳寡糖、氨基葡萄糖对酒精性肝损伤小鼠的保护作用研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008.
- Liu L L. Protective effects of glucosamine and chitooligosaccharide in alcohol liver injury mice[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2008 (in Chinese).
- [17] 周斌. 姬菇多糖纯化及其对小鼠急性肝损伤保护作用研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2012.
- Zhou B. Polysaccharide from *Pleurotus cornucopiae* purification and its effects on acute hepatic injury in mice[D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2012 (in Chinese).
- [18] Wakabayashi I. Associations between heavy alcohol drinking and lipid-related indices in middle-aged men[J]. *Alcohol*, 2013, 47(8): 637-642.
- [19] Gemma S, Vichi S, Testai E. Individual susceptibility and alcohol effects: Biochemical and genetic aspects[J]. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 2006, 42(1): 8-16.
- [20] 刘超群, 陈静, 黄雪松, 等. 大蒜多糖对慢性酒精中毒小鼠肝损伤的保护作用[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2012, 38(1): 23-27.
- Liu C Q, Chen J, Huang X S, *et al.* Protective effects of garlic polysaccharide on liver injury in mice with chronic alcoholism[J]. *Journal of Jilin University (Medicine Edition)*, 2012, 38(1): 23-27 (in Chinese).
- [21] 孟宪军, 邓静, 朱力杰, 等. 北五味子藤茎总三萜对小鼠酒精性肝损伤的保护作用[J]. *食品科学*, 2013, 34(15): 228-231.
- Meng X J, Deng J, Zhu L J, *et al.* Protective effect of triterpenoid from *Schisandra chinensis* (Turcz) baill rattan against alcoholic liver disease in mice[J]. *Food Science*, 2013, 34(15): 228-231 (in Chinese).

Protective effect of flavonoids from *Zostera marina* against chronic alcohol hepatic injury in mice

LI Jing, ZHANG Zhaohui*, DUAN Xiaoshan, YING Rui

(College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: The aim of this study was to investigate the protective effect and its mechanism in the context of antioxidant of flavonoids from *Zostera marina* (ZF) on chronic alcohol hepatic injury in mice. This study would provide scientific basis for the prevention of chronic alcohol hepatic injury. ZF were extracted by the combination of cellulose and ultrasonic wave assisted and purified by polyamide resin column chromatography. The scavenging DPPH and hydroxyl free radicals abilities of ZF were studied. To establish chronic alcohol hepatic injury model, 60 ICR mice were randomly divided into 6 groups (10 mice per group): normal group (C), model group (M), positive group (P), FL group treated with ZF at dose of 40 mg/kg·d, FM group treated with ZF at dose of 80 mg/kg·d and FH group treated with ZF at dose of 160 mg/kg·d. Mice in normal group were treated with distilled water by gavage, and mice in other groups were treated with 50% alcohol by gavage. 60 min later, mice in normal group and model group were given distilled water, positive group mice were given bifendate and other group mice were given ZF of different doses. After 6 weeks of treatment, all mice were killed and blood samples were taken to measure the activities of ALT, AST, γ -GT and the contents of TC and TG. And liver was taken to detect the activities of GSH-Px, SOD, ADH, ALDH and the content of MDA. The ZF flavonoids content reached 80% after purification. The antioxidant activity of ZF was evaluated by in vitro experiments. In vivo experiments, the liver index of model group was significantly increased, while the liver index of ZF treated groups was significantly lower than that of model group. These results suggest that ZF have some protective effect against alcohol hepatic injury. The activities of ALT, AST, γ -GT and lipid levels in serum and the MDA content of liver in model group significantly increased; the activities of GSH-Px, SOD and ethanol metabolic enzymes of liver in model group evidently decreased, indicating that chronic consumption of alcohol resulted in a serious hepatic injury in mice, and the model of chronic alcohol hepatic injury of mice succeeded. Compared with model group, ZF groups significantly reduced the activities of ALT, AST, γ -GT and lipid levels in serum, the content of MDA in liver increased the activities of GSH-Px, SOD and ethanol metabolic enzymes. The results show that ZF protected mice against chronic alcohol hepatic injury by increasing antioxidant capacity, regulating lipid metabolism and alcohol metabolism. Long-term excessive drinking can lead to hepatic injury; ZF have protective effects against chronic alcohol hepatic injury, and the mechanism is related to antioxidant capacity, lipid metabolism and alcohol metabolism.

Key words: *Zostera marina*; flavonoids; antioxidant; alcoholic hepatic injury

Corresponding author: ZHANG Zhaohui. E-mail: zhangzh@ouc.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31272705)