



马齿苋提取物对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用及其化学成分分析

施文彩, 赵燕云, 郑璇

Protective effect of *Portulaca oleracea* L. extract on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in mice and its chemical composition analysis

SHI Wencai, ZHAO Yanyun, ZHENG Xuan

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.1006-0111.202101001>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 论著 ·

马齿苋提取物对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用及其化学成分分析

施文彩, 赵燕云, 郑璇 (长海医院临床营养科, 上海 200433)

[摘要] **目的** 探究马齿苋乙醇提取物对四氯化碳所致小鼠急性肝损伤的保护作用, 并对其有效成分进行分析。**方法** 将 80% 乙醇马齿苋提取物经离心、减压蒸馏、真空干燥为全草提取物、上清提取物和沉淀提取物。将 80 只 ICR 雄性小鼠随机分为 8 组: 对照组、肝损伤模型组、马齿苋全草提取物低剂量组、高剂量组、马齿苋上清提取物低剂量组、高剂量组、马齿苋沉淀提取物低剂量组、高剂量组。经口灌胃去离子水或 3 种马齿苋提取物不同剂量混悬液 1 周后, 分别皮下注射橄榄油或 CCl_4 橄榄油溶液, 16 h 后收集血清, 检测小鼠血清 ALT、AST、IL-6 水平, 以评价马齿苋对肝损伤的保护作用。采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF/MS)技术分析马齿苋的有效成分。**结果** 与模型组相比, 马齿苋全草提取物高剂量组小鼠血清 AST、ALT、IL-6 水平显著降低; 沉淀高剂量组小鼠血清 ALT 显著降低($P < 0.05$), IL-6 水平有所降低, 但不具统计学意义; 其他各干预组小鼠血清 AST、ALT、IL-6 水平没有显著性变化。应用 UPLC-Q-TOF/MS 法共鉴别出苹果酸、柠檬酸、亮氨酸、异亮氨酸、腺苷、琥珀酸、染料木素、酪氨酸、苯丙氨酸等 15 种主要成分。**结论** 马齿苋乙醇全草提取物对 CCl_4 急性肝损伤小鼠具有保肝抗炎作用, 可能是 15 种有效成分发挥的联合作用。

[关键词] 马齿苋; 提取物; CCl_4 急性化学性肝损伤; 保护作用

[中图分类号] R914

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2021)06-0504-05

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202101001

Protective effect of *Portulaca oleracea* L. extract on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in mice and its chemical composition analysis

SHI Wencai, ZHAO Yanyun, ZHENG Xuan (Department of Clinical Nutrition, Changhai hospital, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effect of the ethanol extract of *Portulaca oleracea* L. on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in mice, and to analyze its effective components. **Methods** 80% ethanol purslane extract was centrifuged, vacuum distilled and vacuum dried into whole plant extract, supernatant extract and precipitated extract. Eighty ICR male mice were randomly divided into 8 groups: control group, liver injury model group, whole plant extract low-dose group, high-dose group, supernatant extract low-dose group, high-dose group, precipitation extract low-dose group, and high-dose group. After oral administration of distilled water or three kinds of purslane extract suspensions at different doses for 1 week, olive oil or CCl_4 olive oil solution were injected subcutaneously respectively. After 16 hours, serum was collected to detect the levels of ALT, AST and IL-6 to evaluate the protective effect of purslane on acute liver injury. Ultra-high performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF/MS) was used to analyze the effective components of purslane extract. **Results** Compared with the model group, the levels of serum AST, ALT and IL-6 in high-dose whole plant extract group were significantly reduced. The serum ALT level of mice in the high-dose precipitation extract group was significantly reduced ($P < 0.05$). The serum IL-6 level was decreased, but there was no significant difference. There were no significant changes in the levels of serum AST, ALT and IL-6 in the other intervention groups. 15 main components such as malic acid, citric acid, leucine, isoleucine, adenosine, succinic acid, genistein, tyrosine and phenylalanine were identified by UPLC-Q-TOF/MS. **Conclusion** Purslane whole plant ethanol extract has hepatoprotective and anti-inflammatory effects on CCl_4 acute liver injury mice, which may be a combined effect of 15 active components.

[Key words] purslane; extract; acute chemical liver injury of CCl_4 ; protection

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目 (81402680); 上海市浦江人才计划 (17PJD042); 国家市场监督管理总局食品审评中心研究课题 (SSZX-2019-TY-6)

[作者简介] 施文彩, 硕士, 医师, 研究方向: 中西医结合营养, Email: wencaiss@163.com

[通信作者] 郑璇, 博士, 副教授, 副主任医师, 研究方向: 营养与代谢免疫调节, Email: 15921811369@163.com

马齿苋(*Portulaca oleracea* L.)是一种药食两用植物,味酸、性寒,具有清热解毒、凉血消肿之功效。现代药理研究证实其有抗衰老、降血糖、降血脂、抗动脉粥样硬化,以及保肝护肝等方面的药理活性^[1-2]。目前对马齿苋保肝护肝的有效成分还不甚了解。本研究进一步明确马齿苋提取物对四氯化碳致小鼠急性肝损伤具有保护作用,并通过超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF/MS)技术分析马齿苋提取物的主要成分,采用电喷雾电离源正离子模式和负离子模式对色谱流出物进行检测,通过高分辨质谱分析结合相关文献鉴定出苹果酸、柠檬酸、亮氨酸、异亮氨酸、腺苷、琥珀酸、染料木素、酪氨酸、苯丙氨酸等15种主要成分。

1 材料与amp;方法

1.1 动物

80只ICR雄性小鼠,体重18~20g。来源:海军军医大学实验动物中心购买于上海斯莱克实验动物有限公司[生产许可SCXK(沪)2017-005,使用许可SYXK(沪)2017-0004]。

1.2 药物、试剂与amp;仪器

马齿苋干药材(上海雷允上中药饮片厂,产品批号:2012110235);CCl₄溶液、乙醇、NaOH(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);橄榄油(益海嘉里食品营销有限公司);甲醇、乙腈(色谱纯,美国默克公司);甲酸(色谱纯,美国Sigma-Aldrich公司);实验用水(屈臣氏蒸馏水);Agilent 1290 Infinity型超高效液相色谱仪、Agilent 6538 UHD、Accurate-Mass Q-TOF/MS(美国安捷伦公司)。

1.3 马齿苋保肝抗炎作用有效成分筛选

1.3.1 马齿苋提取物混悬液制备

马齿苋药材加15倍80%乙醇,煎煮1h。提取液滤过,滤液减压浓缩至无醇味,加水调节浓度为2g/ml。以10%NaOH溶液调节pH至中性,记为A液。5000r/min,离心10min,上清液记为B液,沉淀记为C液。A、B液分别减压浓缩至半干状态,与C液分别转移至60℃真空干燥,粉碎过120目筛,即得马齿苋全草、上清、沉淀提取物。用去离子水分别配制不同浓度的马齿苋提取物混悬液,超声过夜,4℃储存,备用。

1.3.2 动物实验

ICR雄性小鼠80只,根据体重随机分为8组,分别为对照组、CCl₄急性化学性肝损伤模型组(模型组)、全草提取物低剂量(12.5mg)组(全草低剂量组)、全草提取物高剂量(50mg)组(全草高剂量

组)、上清提取物低剂量(12.5mg)组(上清低剂量组)、上清提取物高剂量(50mg)组(上清高剂量组)、沉淀提取物低剂量(12.5mg)组(沉淀低剂量组)和沉淀提取物高剂量(50mg)组(沉淀高剂量组)。适应性喂养一周后,对照组和模型组小鼠分别经口灌胃0.5ml去离子水,3种提取物的低剂量组和高剂量组小鼠分别以0.5ml对应浓度的马齿苋提取物混悬液连续灌胃7d,并监测体重。7d后,模型组、马齿苋提取物干预组小鼠按照3ml/(kg·BW)分别腹腔注射10%CCl₄橄榄油溶液,对照组小鼠注射等量橄榄油。实验期禁食不禁水,16h后,腹腔注射10%水合氯醛麻醉,摘眼球取血,将血液2000r/min离心15min得血清,于长海医院检验科检测谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST),ELISA试剂盒检测血清IL-6。

1.4 UPLC-Q-TOF/MS检测马齿苋提取物有效成分

1.4.1 马齿苋化学成分数据库的建立

首先,检索马齿苋及其相关种属药材化学成分相关的文献,根据文献报道,收集马齿苋中可能的化学成分信息;其次,通过Agilent提供的“Formula-Database-Generator”软件建立马齿苋中已知化学成分的数据库。

1.4.2 马齿苋提取物溶液制备

取马齿苋适量,加入5ml80%甲醇超声15min,13000r/min离心10min,取上清液供超高效液相色谱仪检测用。

1.4.3 检测条件

1.4.3.1 色谱条件

色谱柱:Waters XSELECT™ HSS T3(100mm×2.1mm,2.5μm);流动相:0.1%甲酸(A)和0.1%甲酸乙腈(B)流动相体系。梯度洗脱程序如下:0~2min,5%B;2~13min,5%→95%B;13~15min,95%B;分析时间15min;流速为0.4ml/min,进样量为3μl。

1.4.3.2 质谱条件

离子源:电喷雾离子化(ESI)正、负离子模式;雾化气压力:50psi;干燥气流速:11L/min;干燥气温度:350℃;毛细管电压:4000V(+)/3500V(-);去簇电压:120V;Mass扫描范围:*m/z*50~1000。

1.5 数据处理

采用SPSS 20.0统计分析软件处理,结果以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单向方差分析检验,组间两两比较,方差齐时采用LSD法,方差不齐时采用Dunnnett's T3法,*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 马齿苋保肝抗炎作用有效成分筛选结果

2.1.1 体重

各组小鼠体重均呈上升趋势, 各组体重差异无统计学意义(见图 1), 初步说明马齿苋提取物对小鼠生长没有明显的毒副作用。

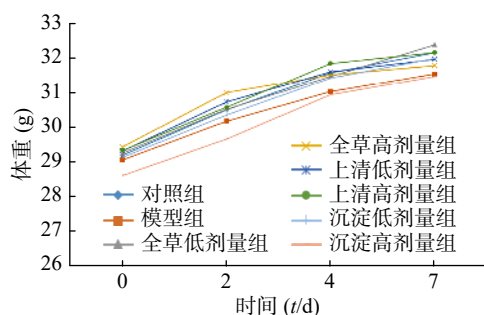


图 1 CCl_4 急性肝损伤模型小鼠 7 天的体重变化

2.1.2 肝功能指标

由图 2 可见, 与对照组相比, CCl_4 急性化学性肝损伤模型组血清 ALT、AST 水平显著升高($P < 0.001$), 说明造模成功。与模型组相比, 全草高剂量组小鼠血清 AST、ALT 水平显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$); 沉淀高剂量组小鼠血清 ALT 显著降低($P < 0.05$), AST 水平有降低趋势但不具有统计学意义。

2.1.3 炎症指标

由图 3 可见, 与对照组相比, CCl_4 急性化学性肝损伤模型组血清 IL-6 水平显著升高($P < 0.01$)。与模型组相比, 全草高剂量组小鼠血清 IL-6 水平显著降低($P < 0.05$), 沉淀高剂量组小鼠血清 IL-6 水平有降低趋势但不具有统计学意义。

2.2 UPLC-Q-TOF/MS 检测马齿苋有效成分结果

2.2.1 质谱数据的采集

取马齿苋样品溶液, 按照“1.4.3”项下进样分

析, 全扫描总离子流图如图 4 所示。

2.2.2 化合物的信息检索与验证

将“Formula-Database-Generator”软件建立的马齿苋已知化学成分数据库导入“Masshunter Qualitative Analysis”软件系统, 依据数据库对马齿苋提取物总离子流质谱图进行鉴定和确证, 将检索到的化学成分信息按照保留时间、质荷比、加合离子情况等进行分类整理。并将化合物按其质荷比在原质谱数据中进行反向提取, 对提取到的质谱信息进行质量准确度的验证并根据同位素峰比例等信息进行元素组成分析。推测出 15 种化合物为马齿苋 80% 乙醇提取物的主要成分, 按照保留时间顺序依次为: 苹果酸、柠檬酸、亮氨酸、异亮氨酸、腺苷、琥珀酸、染料木素、酪氨酸、苯丙氨酸、佛手苷内酯、金莲花碱、6,7-二羟基香豆素、芳樟醇、金色酰胺醇/橙黄胡椒酰胺、金色酰胺醇酯/威南藤酰胺乙酸酯(见表 1), 另外还有多糖、黄酮等化学成分。

3 讨论

马齿苋是一年生肉质草本植物, 是常用的药食两用植物, 已被列入“中国卫生部药食两用名单”, 具有清热解毒、凉血消肿等功效, 特别是在保肝抗炎方面具有较好的功效^[2]。

CCl_4 是经典的化学性肝损伤动物模型的肝毒物, 可破坏肝细胞膜, 从而使胞浆内可溶性酶如 ALT、AST 等渗入血液中, 并最终导致各种类型的肝细胞病变, 甚至坏死^[11]。正常肝内转氨酶的含量约为血中的 100 倍, 1% 的肝特异性细胞坏死即可使血清酶活性增加 1 倍。因此, 转氨酶是肝细胞受损的敏感标志^[12]。因而, 血清中的 ALT、AST 水平的高低可以敏感地反映肝脏细胞膜的受损程度。

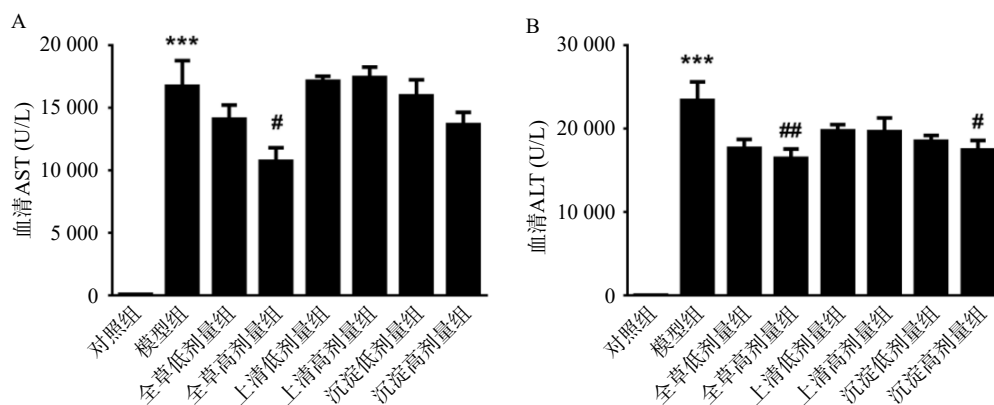


图 2 CCl_4 急性肝损伤模型各组小鼠 7 天的肝功能情况

A. AST 的变化情况; B. ALT 的变化情况

*** $P < 0.001$, 与对照组比较; # $P < 0.05$ 、## $P < 0.01$, 与模型组比较

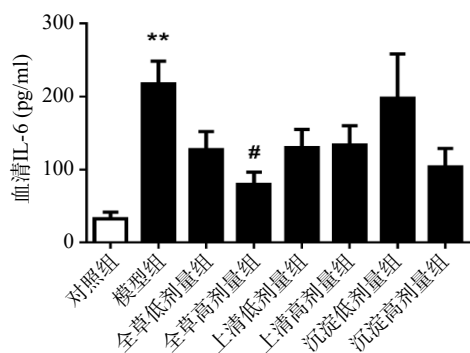


图3 CCl₄急性肝损伤模型各组小鼠7天血清中IL-6水平

***P*<0.01, 与对照组比较; #*P*<0.05, 与模型组比较

本研究以 CCl₄ 诱导的急性肝损伤小鼠模型为研究对象, 考察了马齿苋乙醇提取物的保肝抗炎作用, 结果显示, 高剂量马齿苋全草提取物可以显著降低 CCl₄ 导致的肝损伤和炎症。马齿苋沉淀提取物能够显著降低 CCl₄ 诱导的急性肝损伤小鼠血清 ALT 水平, 对血清 AST 和 IL-6 水平有降低趋势但不具有统计学意义。马齿苋沉淀提取物对降低 CCl₄ 导致的肝损伤和炎症有一定效果, 但效果不及全草提取物, 说明马齿苋上清提取物可能也含有效成分, 与沉淀提取物共同发挥保肝作用。因此, 从

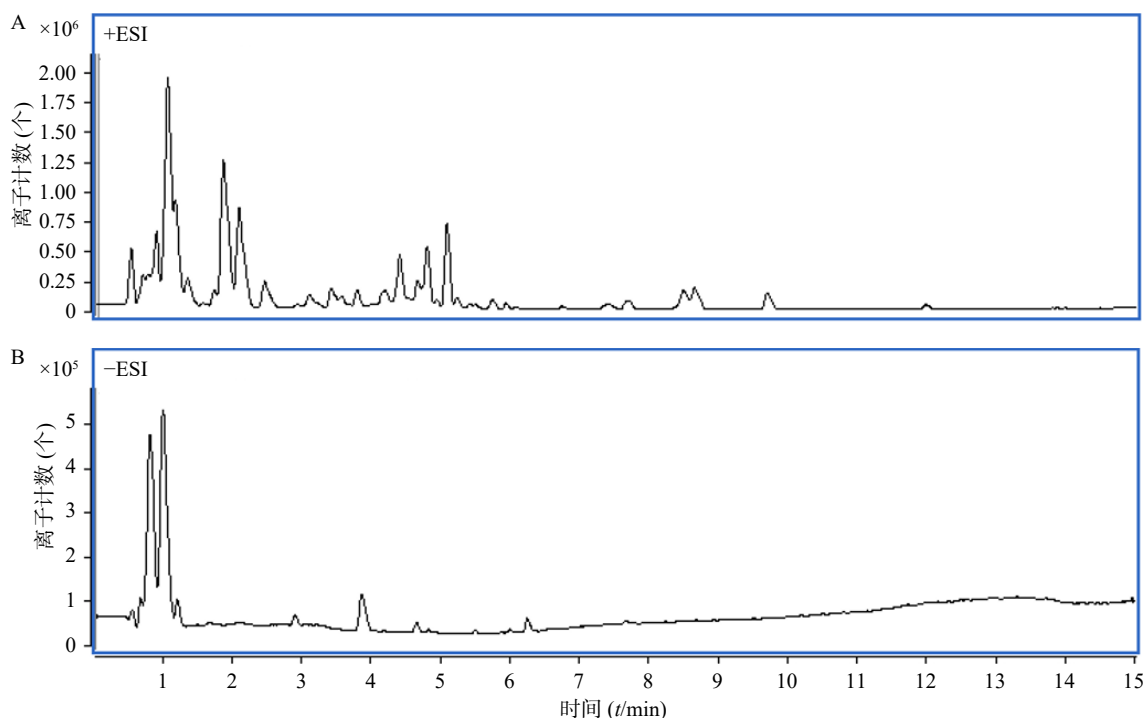


图4 马齿苋化学成分的 UPLC-Q-TOF/MS 总离子流图

A. 正离子模式; B. 负离子模式

表1 马齿苋提取物 UPLC-Q-TOF/MS 分析结果

时间(<i>t_R</i> /min)	分子式	离子峰归属	质荷比		偏差	化合物
			理论值	实测值		
0.847	C ₄ H ₆ O ₅	[M-H] ⁻	133.0142	133.0147	-0.49	苹果酸 ^[3-4]
1.019	C ₆ H ₈ O ₇	[M-H] ⁻	191.0197	191.0198	-0.62	柠檬酸 ^[3]
1.097	C ₆ H ₁₃ NO ₂	[M+H] ⁺	132.1019	132.1014	3.91	亮氨酸 ^[5]
1.203	C ₆ H ₁₃ NO ₂	[M+H] ⁺	132.1019	132.1015	2.72	异亮氨酸 ^[4]
1.293	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	[M+H] ⁺	268.104	268.1047	-2.55	腺苷 ^[6]
1.305	C ₄ H ₆ O ₄	[M-H] ⁻	117.0193	117.0197	-3.23	琥珀酸 ^[3]
1.555	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M+NH ₄] ⁺	288.0866	288.0867	-0.21	染料木素 ^[7]
2.053	C ₉ H ₁₁ NO ₃	[M+NH ₄] ⁺	199.1077	199.1074	1.69	酪氨酸 ^[5]
2.168	C ₉ H ₁₁ NO ₂	[M+H] ⁺	166.0863	166.0859	2.03	苯丙氨酸 ^[5]
3.567	C ₁₂ H ₈ O ₄	[M+NH ₄] ⁺	234.0761	234.0765	-1.81	佛手柑内酯 ^[8]
4.638	C ₁₂ H ₁₃ NO ₃	[M+H] ⁺	220.0968	220.0967	0.61	金莲花碱 ^[9]
4.929	C ₉ H ₆ O ₄	[M-H] ⁻	177.0193	177.0192	0.98	6,7-二羟基香豆素 ^[5]
7.301	C ₁₀ H ₁₈ O	[M+COOH] ⁻	199.034	199.1342	-1.21	芳樟醇 ^[10]
8.646	C ₂₅ H ₂₆ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	403.2016	403.2029	-3.12	金色酰胺醇/橙黄胡椒酰胺 ^[9]
9.685	C ₂₇ H ₂₈ N ₂ O ₄	[M+H] ⁺	445.2122	445.2128	-1.34	金色酰胺醇酯/咸南藤酰胺乙酸酯 ^[9]

本研究可以看出,马齿苋沉淀及上清中均存在保肝抗炎的有效成分,且沉淀提取物可能起主要作用,但马齿苋发挥保肝抗炎作用是沉淀与上清提取物中有效成分共同发挥的。中药是世界四大传统医药体系中理论最完整、医疗实践最丰富、疗效最确切的传统医药体系^[13]。因为中药的复杂性,中药的药效机制研究一直是个难点。有学者归因于中药功效相关的多成分、多靶点、多环节之间组成的一个相互协同与制约的复杂网络^[14]。笔者认为,与马齿苋全草提取物相比,沉淀提取物的抗炎保肝作用较差的原因可能是马齿苋的抗炎保肝作用是通过多成分、多靶点、多环节的相互协同作用实现的,且需维持一定的药物浓度才能显著性的发挥抗炎保肝作用。

为了进一步分析马齿苋抗炎保肝作用的有效成分,本研究通过UPLC-Q-TOF/MS技术对该全草提取物进行分析和鉴定,初步发现约有15种主要化学成分。已研究发现,苹果酸、柠檬酸、琥珀酸为小分子有机酸,具有抗肿瘤、抑菌、抗血栓、抗病毒等作用^[15];亮氨酸、异亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸等氨基酸为营养增补剂;6,7-二羟基香豆素等化合物是自然界重要的天然有机化合物,具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤等多种功效^[16]。因而,马齿苋提取物能够发挥抗炎护肝作用可能是由以上主要化学成分共同作用的结果,具体的作用机制有待深入研究。

【参考文献】

- [1] FARKHONDEH T, SAMARGHANDIAN S, AZIMI-NEZHAD M, et al. The hepato-protective effects of *Portulaca oleracea* L. extract: Review[J]. *Curr Drug Discov Technol*, 2019, 16(2): 122-126.
- [2] 施文彩, 薛凡, 李菊红, 等. 马齿苋的药理活性研究进展[J]. *药学服务与研究*, 2016, 16(4): 291-295.
- [3] 郭志峰, 刘鹏岩, 傅承光. 离子排斥色谱法测定马齿苋中低分子羧酸[J]. *色谱*, 1996, 14(1): 50-52.
- [4] 金天云, 沈涛, 周明星, 等. 马齿苋的化学成分及其生物活性研究[J]. *中国药学杂志(英文版)*, 2016, 25(12): 898-905.
- [5] 丁怀伟, 姚佳琪, 宋少江. 马齿苋的化学成分和药理活性研究进展[J]. *沈阳药科大学学报*, 2008, 25(10): 831-838.
- [6] XIANG L, XING D M, WANG W, et al. Alkaloids from *Portulaca oleracea* L[J]. *Phytochemistry*, 2005, 66(21): 2595-2601.
- [7] ZHU H B, WANG Y Z, LIU Y X, et al. Analysis of flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by UV-vis spectrophotometry with comparative study on different extraction technologies[J]. *Food Anal Methods*, 2010, 3(2): 90-97.
- [8] 向兰, 邢东明, 王伟, 等. 马齿苋的化学成分研究进展[J]. *亚太传统医药*, 2006, 2(7): 64-68.
- [9] YANG Z J, LIU C J, XIANG L, et al. Phenolic alkaloids as a new class of antioxidants in *Portulaca oleracea*[J]. *Phytother Res*, 2009, 23(7): 1032-1035.
- [10] 刘鹏岩, 靳伯礼, 郭志峰, 等. 马齿苋挥发油的GC-MS分析[J]. *河北大学学报:自然科学版*, 1994, 14(3): 72-74.
- [11] LIU X F, ZHENG C G, SHI H G, et al. Ethanol extract from *Portulaca oleracea* L. attenuated acetaminophen-induced mice liver injury[J]. *Am J Transl Res*, 2015, 7(2): 309-318.
- [12] ZHOU Y X, XIN H L, RAHMAN K, et al. *Portulaca oleracea* L.: a review of phytochemistry and pharmacological effects[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 1-11.
- [13] JIN L. From mainstream to marginal? Trends in the use of Chinese medicine in China from 1991 to 2004[J]. *Soc Sci Med*, 2010, 71(6): 1063-1067.
- [14] 邓小敏, 郭超峰. 网络药理学背景下的中药药效机制及疗效评价研究[J]. *医学与哲学(A)*, 2012, 33(10): 67-68.
- [15] 王媚, 吴皓. 中药有机酸类成分的提取分离及测定方法研究进展[J]. *南京中医药大学学报*, 2004, 20(3): 190-192.
- [16] 张韶瑜, 孟林, 高文远, 等. 香豆素类化合物生物学活性研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2005, 30(6): 410-414.

[收稿日期] 2021-01-03 [修回日期] 2021-11-05

[本文编辑] 陈盛新