

# 迷迭香提取物对小鼠急性酒精肝模型保护作用研究

张志毕<sup>1#</sup>, 杨 晖<sup>1#</sup>, 张 媛<sup>1</sup>, 于浩飞<sup>2</sup>, 胡炜彦<sup>2</sup>, 张荣平<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>昆明医科大学生物医学工程研究中心; <sup>2</sup>昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 昆明 650500

**摘要:** 研究迷迭香提取物(Rosemary Extract, RE)对小鼠急性酒精肝损伤的保护作用, 并从酒精代谢、脂代谢、抗氧化和抗炎几个方面探讨其作用机制。将小鼠随机分为空白对照组(Control)、模型组(Model)、欣立得组(Metadoxine Capsules, MC, 200 mg/kg · d), RE 剂量组 80、160、400 mg/kg · d, 给药 30 d 后建立小鼠急性酒精肝损伤模型, 检测血清 ALT、AST、TG、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-10 浓度, 肝脏 MDA、SOD、GSH-Px、ADH 活性, qRT-PCR 检测肝脏脂肪酸合成酶(FAS)、脂肪分化相关蛋白(ADRP)、细胞色素 P450 2E1(CYP2E1)、过氧化物酶体增值物激活  $\alpha$  受体(PPAR $\alpha$ )和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(caspase3) mRNA 的表达, HE 染色观察肝脏组织病理变化。RE 组小鼠血清 ADH 活性升高, ALT、AST 和 TG 含量降低, 醒酒时间缩短, 肝脏组织脂肪变性减轻, 细胞凋亡相关基因 Caspase3 表达降低, 保护机制研究发现 RE 能下调 FAS 和 ADRP 基因表达, 减少肝脏脂肪合成; 提高抗氧化损伤酶 SOD、GSH-Px 活性, 下调酒精代谢中 ROS 合成基因 CYP2E1 和上调抗氧化损伤和炎症基因 PPAR $\alpha$  表达, 使 MDA 浓度降低, 减轻肝脏氧化损伤; 降低炎症因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 浓度, 提高抗炎因子 IL-10 浓度。实验结果表明 RE 对小鼠急性酒精肝损伤具有保护作用, 其作用机制可能与抗氧化、抗炎和脂肪代谢调节有关。

**关键词:** 迷迭香提取物; 急性酒精肝; 氧化损伤; 脂代谢; 炎症

中图分类号: R96

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.2.008

## Protective Effect of Rosemary Extract on Acute Alcoholic Liver Injury in Mice

ZHANG Zhi-bi<sup>1#</sup>, YANG Hui<sup>1#</sup>, ZHANG Yuan<sup>1</sup>, YU Hao-fei<sup>2</sup>, HUWei-yan<sup>2</sup>, ZHANG Rong-ping<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Biomedical Engineering Research Center, Kunming Medical University; <sup>2</sup>School of Pharmaceutical Science & Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming 650500, China

**Abstract:** To study the protection of Rosemary Extract (RE) on acute alcoholic liver injury in mice, and research the mechanism from alcohol metabolism, lipid metabolism, anti-oxidative and anti-inflammation. Mice were randomly divided into control group, model group, Metadoxine Capsules group (MC, 200mg/kg · d), RE group (80, 160, 400 mg/kg · d). The mice were given drugs by gavage 1 time a day and for 30 days. Then, acute alcoholic liver injury model was established by intragastric administration of 56% alcohol (13mg/kg) to the medication and model groups 1h later after the last administration. 12h later, the levels of serum ALT, AST, TG, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 were detected. The contents of hepatic MDA, SOD, GSH-Px, ADH were determined. The mRNA levels of FAS, ADRP, CYP2E1, PPAR $\alpha$  and Caspase3 in liver were also measured by real time PCR. HE staining was performed for observing pathological changes of the liver tissues. Compare with model group, RE can reduce the activity of ADH and contents of ALT, AST, and TG in serum, and shorten the sober time, down regulate Caspase3 expression and relieve acute alcohol liver tissue lesions. The protection mechanism research found that RE can suppress acute ALD by down-regulating FAS and ADRP, which can reduce the TG concentration in serum. RE also cure acute ALD by enhancing the activity of SOD, GSH-Px and expressing of PPAR $\alpha$ , and down-regulating the expression of CYP2E1, to reduce the level of MDA in liver and relieve oxidative damage. RE can reduce the hepatic inflammation by decreasing TNF- $\alpha$ , IL-6 and increasing IL-10. These results showed that RE can protect acute alcoholic liver injury by anti-oxidative, anti-inflammation and regulating lipid metabolism.

**Key words:** rosemary extract; acute alcoholic liver injury; oxidative damage; lipid metabolism; inflammation

酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)是由于过度饮酒导致的肝损伤,也是引发肝脏疾病的重要原因。人体长期饮酒或短期大量饮酒会引起酒精性肝细胞损伤,导致肝细胞发生脂肪变性、炎症和坏

收稿日期: 2016-08-23

接受日期: 2016-11-01

基金项目: 云南省南药研究协同创新中心项目(NY2014002)

# 为共同第一作者

\* 通讯作者 E-mail: zhrp@163.com

死等<sup>[1]</sup>病变,其发病机制与酒精代谢引发的氧化应激、细胞因子释放、线粒体损伤、肝细胞凋亡等密切相关<sup>[2,3]</sup>。

迷迭香(*Rosemarinus officinalis* Linn)属唇形科迷迭香属,我国云南、贵州、广西、海南、新疆等地作为原材料和园林观赏植物大量栽种<sup>[4,5]</sup>。鼠尾草酸是迷迭香提取物中的主要成分之一,具有抗氧化、抗炎、抗菌、抗肿瘤、抗细胞凋亡、保护神经元等活性,在卫生医疗、食品保健等领域都有广泛应用<sup>[6,7]</sup>。结合酒精性肝病发病原因和鼠尾草酸药理活性,推测鼠尾草酸可能对酒精性肝病具有治疗作用,本研究以急性酒精肝损伤小鼠为模型,研究迷迭香提取物中(主要成分为鼠尾草酸)对小鼠急性酒精肝的预防保护作用及作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验药物

迷迭香提取物,主要成分为鼠尾草酸,含量20%,海南舒普生物科技有限公司生产,产品型号CAP20,生产批号:150105;美他多辛胶囊-欣立得,浙江震元制药有限公司。

#### 1.1.2 动物

ICR小鼠,SPF级,雄性,4周龄,20±2 g,购于昆明医科大学实验动物学部,生产许可证号:SCXK(滇)2015-0004。饲养条件:室温20±2℃,相对湿度(60%~70%)。

#### 1.1.3 试剂

丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、甘油三酯(TG)、丙二醛(MDA)、过氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、乙醇脱氢酶(ADH)、以上试剂均购自南京建成生物工程研究所。Mouse TNF- $\alpha$ 、Mouse IL-6、Mouse IL-10 ELISA Kit,杭州联科生物技术股份有限公司。AxyPrep总RNA制备试剂盒,美国Axygen公司。RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit,美国Thermo Scientific公司。荧光定量试剂盒,宝生物工程(大连)有限公司。基因引物合成,上海生工。

#### 1.1.4 仪器

Synergy2多功能酶标仪(美国BIOTEK);Centrifuge 5804R冷冻离心机(德国Eppendorf);CHB-100恒温金属浴(杭州博日科技有限公司);ND-1000核酸蛋白检测仪(美国BDT);显微镜、切片机、EG1160

包埋机(德国Leica);QuantStudioTM 6 Flex实时荧光定量PCR仪(美国Thermo Fisher)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物分组和处理

ICR雄性小鼠60只,体重20±2 g,随机分为空白对照组、模型组、欣立得组(200 mg/kg·d)、RE低剂量组(80 mg/kg·d)、RE中剂量组(160 mg/kg·d)、RE高剂量组(400 mg/kg·d),10只/组。小鼠适应饲养一周后给药组按剂量灌胃给药,空白对照组和模型组灌胃等剂量生理盐水,每天灌胃1次,共给药30 d。末次给药后1 h,按照参考文献建立急性小鼠酒精肝损伤模型<sup>[8]</sup>,除空白对照组外一次性灌胃56°乙醇,剂量13 mL/kg,禁食不禁水饲养,观察记录小鼠从灌胃乙醇至翻正反射消失时间和恢复时间<sup>[9]</sup>。小鼠乙醇灌胃12 h后摘取眼球取血,获取血清,脱臼处死后取肝脏左叶-80℃保存待用,肝脏右叶4%甲醛固定。

#### 1.2.2 血清ALT、AST、TG、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-10含量检测

全血样品常温放置20 min后3500 rpm 4℃离心10 min,取血清,分装保存于-80℃,按试剂盒操作说明检测ALT、AST、TG、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-10含量。

#### 1.2.3 小鼠肝脏MDA、SOD、GSH-Px、ADH含量测定

称取冷冻的小鼠左叶肝脏约0.1 g加入4℃预冷生理盐水制成10%肝组织匀浆,3500 rpm 4℃离心,取上清,检测蛋白浓度,按照试剂盒操作说明检测MDA、SOD、GSH-Px、ADH含量。

#### 1.2.4 实时荧光定量PCR检测肝脏FAS、ADRP、CYP2E1、PPAR $\alpha$ 、Caspase3基因表达

取小鼠左叶肝脏约30 mg,根据RNA提取试剂盒操作说明提取RNA,检测RNA浓度和纯度,通过逆转录试剂盒逆转录合成cDNA,逆转录反应体系和条件:Total RNA 500 ng, oligo(dT) 18 1  $\mu$ L, Rnase free water 补齐至12  $\mu$ L, 65℃ 5 min, 冰浴降温, 5  $\times$  Reaction buffer 4  $\mu$ L, RNA逆转录酶 1  $\mu$ L, RNA酶抑制剂 1  $\mu$ L, 10 mM dNTP mix 2  $\mu$ L, 42℃ 60 min, 70℃ 5 min 终止反应。cDNA -80℃保存备用。NCBI数据库查询相关基因CDs序列,根据序列在NCBI网站 Pick Primers,并进行 Primer Blast 检索确定引物的特异性,引物序列如表1所示。Real time PCR检测相关基因表达,反应条件:(1)95℃预变性30 s;(2)95℃ 5 s, 60℃ 30 s, 40个循环,反应体系20

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因名称 Gene name	Forward 引物序列 Forward primer sequence(5'-3')	Reverse 引物序列 Reverse primer sequence(5'-3')
$\beta$ -actin	CGTTGACATCCGTAAAGACCTC	TAGGAGCCAGGGCAGTAATCT
FAS	GACTCGGCTACTGACACGAC	CGAGTTGAGCTGGGTTAGGG
ADRP	GTGTGTGAGATGGCCGAGAA	AACAATCTCGGACGTTGGCT
CYP2E1	CTTGCTTGTCTGGATCGCCA	GGGGCAGGTTCCAACCTTCTA
PPAR $\alpha$	GGGTACCCTACGGAGTTCACG	CAGACAGGCACCTTGTGAAAACG
Caspase3	CAGCCAACCTCAGAGAGACA	ACAGGCCCATTTGTCCCATTA

$\mu\text{L}$ 。以  $\beta$ -actin 为内参基因,采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算基因表达的相对变化。

### 1.2.5 病理学组织观察

取肝右叶,4% 甲醛溶液固定,脱水、石蜡包埋、切片厚度  $5\ \mu\text{m}$ ,HE 染色,封片,光学显微镜观察肝脏组织病理改变并拍照。

### 1.2.6 统计分析

数据处理分析使用 Graphpad 5.0 软件,数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析。

## 2 实验结果

### 2.1 RE 对醉酒、醒酒时间和 ADH 活力的影响

小鼠醉酒时间-灌胃到翻正反射消失的时间;醒酒时间-翻正反射消失到重新恢复的时间。各实验组小鼠醉酒时间无显著差异。与模型组相比,RE 和欣立得给药组小鼠醒酒时间显著缩短 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。检测肝脏 ADH 活力发现乙醇能诱导 ADH 活力的提高,模型组 ADH 活力比对照组明显增加 ( $P < 0.01$ ),而药物组 ADH 活力比模型组也显著增加 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),RE 通过提高 ADH 活力的醒酒作用明显,见表 2。

表 2 RE 对小鼠醉酒、醒酒时间和 ADH 活力的影响 ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )Table 2 Effect of rosemary extract on drunk time, sober time and ADH activity in mice ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

分组 Group	剂量 Dose (mg/kg · d)	醉酒时间 Drunk time (min)	醒酒时间 Sober time (min)	ADH (U/mg · prot)
Control	-	-	-	$3.32 \pm 0.11^{**}$
Model	-	$39.20 \pm 8.70$	$389.8 \pm 16.84$	$7.83 \pm 0.82$
MC	200	$38.33 \pm 6.32$	$313.13 \pm 18.12^{**}$	$10.67 \pm 1.57^{**}$
RE	400	$41.29 \pm 11.57$	$272.57 \pm 33.29^{**}$	$9.33 \pm 0.83^{**}$
RE	160	$41.09 \pm 12.39$	$275.00 \pm 19.46^{**}$	$9.01 \pm 1.02^{**}$
RE	80	$37.71 \pm 4.90$	$296.14 \pm 35.81^*$	$8.98 \pm 0.66^*$

注:与空白对照组比较, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

表 3 RE 对血清转氨酶和 TG 浓度的影响 ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )Table 3 Effect of rosemary extract on serum ALT, AST and TG content ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

分组 Group	剂量 Dose (mg/kg · d)	ALT (U/L)	AST (U/L)	TG (mmol/L)
Control	-	$28.75 \pm 7.66^{**}$	$29.30 \pm 9.02^{**}$	$1.40 \pm 0.51^{**}$
Model	-	$50.97 \pm 12.38$	$71.09 \pm 9.54$	$2.63 \pm 0.62$
MC	200	$32.45 \pm 9.03^{**}$	$41.80 \pm 12.14^{**}$	$1.56 \pm 0.61^{**}$
RE	400	$32.89 \pm 8.99^{**}$	$46.64 \pm 8.17^{**}$	$1.94 \pm 0.73^{**}$
RE	160	$37.89 \pm 13.65^{**}$	$48.06 \pm 12.36^{**}$	$1.62 \pm 0.86^*$
RE	80	$40.92 \pm 11.60^{**}$	$56.38 \pm 22.12^*$	$1.60 \pm 0.16^*$

## 2.2 RE 对转氨酶、TG 浓度和 Caspase3 基因表达的影响

实验结果显示,RE 各治疗组对小鼠急性酒精肝损伤具有一定的预防保护作用,与模型组比较,转氨酶 ALT 和 AST 均显著程度的下降( $P < 0.05$  或  $P <$

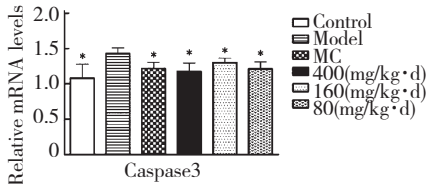


图 1 RE 对肝脏 Caspase3 基因 mRNA 表达的影响( $n = 4$ )

Fig. 1 Effect of rosemary extract on the expression of Caspase3 mRNA ( $n = 4$ )

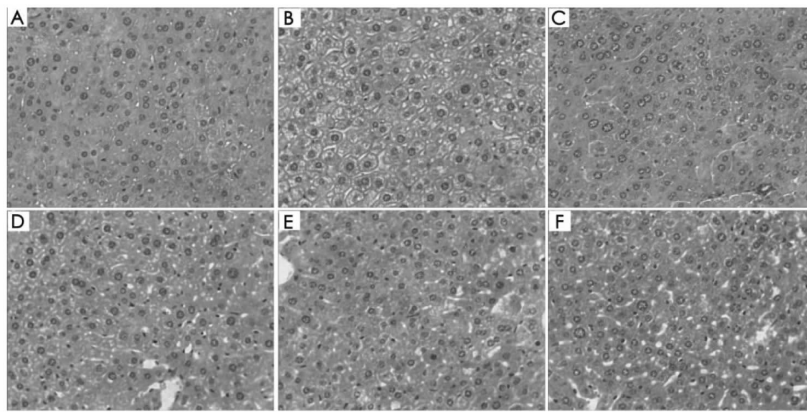


图 2 RE 对肝组织形态学的影响( $400 \times$ )

Fig. 2 Effect of rosemary extract on liver tissue morphology ( $400 \times$ )

注: A: Control; B: Model; C: MC; D: RE(400 mg/kg·d); E: RE(160 mg/kg·d); F: RE(80 mg/kg·d)

## 2.4 RE 对脂代谢 FAS 和 ADRP 基因 mRNA 表达的影响

FAS 基因是脂肪酸合成的关键酶,ADRP 介导血浆中游离脂肪酸向肝细胞内转移,二者过表达时能加速脂肪酸的合成和刺激肝脏细胞吸收脂肪酸并合成 TG,导致肝脏发生脂肪变性。模型组小鼠摄入乙醇后,FAS 和 ADRP 基因表达都显著上调( $P < 0.05$ ),表明体内脂肪酸的合成增加并向肝脏转移。与模型组相比,RE 各剂量组 FAS 基因表达都显著下调( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),RE(400 mg/kg·d) 和 (160 mg/kg·d) 组 ADRP 基因表达显著下调( $P < 0.05$ ),表明 RE 能调控急性酒精摄入导致的脂肪酸合成增加和向肝脏的转移,从而减轻酒精肝损伤,见图 3。

## 2.5 RE 对肝脏 CYP2E1 和 PPAR $\alpha$ 基因 mRNA 表达的影响

CYP2E1 介导的乙醇代谢会产生大量活性氧,

0.01), 血脂浓度也显著降低( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),效果明显,见表 3。乙醇及其代谢产物毒性会诱导肝细胞凋亡,RE 对肝细胞具有保护作用,RE 组小鼠肝脏细胞凋亡 Caspase3 基因 mRNA 的表达显著降低( $P < 0.05$ ),表明细胞凋亡水平降低,见图 1。

## 2.3 RE 对肝脏组织形态学的影响

空白对照组肝脏细胞形态正常完整,组织结构清晰,肝细胞索排列整齐,肝细胞内无脂肪变性。模型组肝脏细胞肿大,细胞界限模糊,包浆成空泡状,表明肝组织脂滴较多,肝细胞完整性被破坏,存在严重脂肪变性。RE 组和欣立得组大部分肝细胞肿胀减轻,胞浆内空泡减少,脂肪变性程度得到缓解,见图 2。

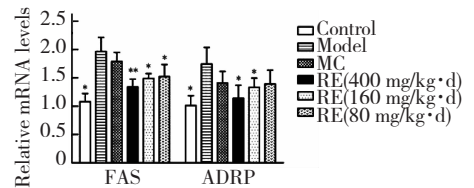


图 3 RE 对肝脏 FAS 和 ADRP 基因 mRNA 表达的影响( $n = 4$ )

Fig. 3 Effect of rosemary extract on the expression of FAS and ADRP mRNA ( $n = 4$ )

损伤细胞,并影响 PPAR $\alpha$  的功能,导致脂代谢异常,发生氧化损伤和炎症反应,损伤肝脏细胞。乙醇诱导 CYP2E1 的表达,模型组小鼠肝脏 CYP2E1 基因表达显著升高( $P < 0.05$ ),并导致 PPAR $\alpha$  表达下调( $P < 0.05$ )。与模型组相比,RE 给药组和欣立得组 CYP2E1 基因表达显著下调( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),相应的,RE 给药组 PPAR $\alpha$  表达显著上调( $P < 0.05$

或  $P < 0.01$ ), 但欣立得组 PPAR $\alpha$  表达无明显变化, 见图 4。根据该结果推测 RE 能减轻小鼠肝脏氧化损伤和炎症损伤减轻。

## 2.6 RE 对肝脏 MDA、SOD、GSH-Px 含量的影响

乙醇及其代谢产物会导致肝脏发生氧化损伤, 检测肝脏 MDA 浓度发现, 与空白对照组相比, 模型组小鼠肝脏 MDA 浓度显著增加 ( $P < 0.01$ ), 表明肝脏组织中发生严重的氧化损伤。与模型组相比, RE 组和欣立得组 MDA 浓度都显著降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。SOD 和 GSH-Px 是重要的抗氧化酶, 模型组中, SOD 和 GSH-Px 活力都显著下降 ( $P < 0.01$ )。与模型组相比, RE 给药组和欣立得组都能显著增

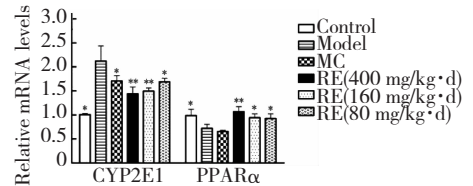


图 4 RE 对肝脏 CYP2E1 和 PPAR $\alpha$  基因 mRNA 表达的影响 ( $n = 4$ )

Fig. 4 Effect of rosemary extract on the expression of CYP2E1 and PPAR $\alpha$  mRNA ( $n = 4$ )

加 SOD 活力 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), RE 400 mg/kg · d 组和欣立得组能显著增加 GSH-Px 活性 ( $P < 0.01$ ), 发挥抗氧化活性保护肝脏。

表 4 RE 对肝脏 MDA、SOD、GSH-Px 含量的影响 ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

Table 4 Effect of rosemary extract on hepatic MDA, SOD, GSH-Px content ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

分组 Group	剂量 Dose( mg/kg · d)	MDA (nmol/g · prot)	SOD (U/mg · prot)	GSH-Px (U/mg · prot)
Control	-	20.83 ± 10.06 **	144.71 ± 22.04 **	203.35 ± 14.11 **
Model	-	45.17 ± 10.07	93.47 ± 8.84	135.44 ± 25.27
MC	200	26.39 ± 3.13 **	107.58 ± 7.31 *	192.16 ± 29.76 **
RE	400	23.30 ± 7.61 **	114.14 ± 5.16 **	169.26 ± 20.09 **
RE	160	23.25 ± 5.53 **	106.34 ± 18.68 *	139.33 ± 21.21
RE	80	31.87 ± 7.70 *	105.43 ± 16.05 *	126.08 ± 26.84

## 2.7 RE 对血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-10 含量的影响

炎症是导致肝损伤的重要原因, 与空白对照组比较, 模型组致炎因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 显著增加 ( $P < 0.01$ ), 而抗炎因子 IL-10 显著降低 ( $P < 0.01$ ), 表明肝脏发生严重的炎症反应。与模型组比较, RE (400 mg/kg · d)、(160 mg/kg · d) 和欣立得组 TNF-

$\alpha$  浓度显著降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), RE 各剂量组和欣立得组 IL-6 浓度显著降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 显示肝脏炎症反应减轻。RE (400 mg/kg · d) 能显著增加抗炎因子 IL-10 浓度 ( $P < 0.05$ ), 发挥抗炎活性, RE 其他剂量组和欣立得组 IL-10 浓度无显著变化, 见表 5。

表 5 RE 对血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-10 含量的影响 ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

Table 5 Effect of rosemary extract on serum TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

分组 Group	剂量 Dose(mg/kg · d)	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)
Control	-	34.02 ± 4.11 **	43.89 ± 6.94 **	174.65 ± 19.75 **
Model	-	88.87 ± 8.56	99.91 ± 10.65	89.34 ± 14.43
MC	200	75.44 ± 10.37 *	78.32 ± 8.88 **	87.53 ± 14.54
RE	400	78.24 ± 5.13 **	70.19 ± 13.18 **	113.67 ± 18.75 *
RE	160	79.47 ± 7.90 *	71.11 ± 14.90 **	99.26 ± 9.20
RE	80	79.22 ± 13.59	86.38 ± 12.48 *	98.86 ± 11.24

## 3 讨论与结论

迷迭香是目前世界上广泛应用的天然抗氧化剂之一, 其含有的鼠尾草酸有抗氧化、抗炎症等多种活

性, 有报道鼠尾草酸对四氯化碳引起的肝损伤具有保护作用<sup>[10]</sup>。酒精及其代谢产物具有细胞毒性, 是导致肝损伤的重要原因, 长期大量饮酒会诱发酒精肝, 严重的酒精肝为发展为肝硬化、肝坏死、肝癌等。

研究认为,酒精代谢导致的氧化应激、炎症和脂代谢紊乱是酒精性肝病发生的重要原因<sup>[11]</sup>,本实验也发现,急性酒精肝损伤模型小鼠体内,肝脏组织MDA浓度升高,抗氧化损伤酶SOD和GSH-Px活性降低,炎症因子TNF- $\alpha$ 和IL-6浓度升高,抗炎因子IL-10浓度降低,表明肝脏内存在氧化损伤和炎症反应,结合血清学检测、肝脏病理切片、凋亡基因检测,急性酒精肝损伤会导致血液转氨酶ALT、AST和甘油三酯浓度升高,肝脏组织损伤严重,Caspase3基因表达增加。

小鼠预服RE能有效的保护急性摄入酒精造成的肝损伤,转氨酶ALT、AST和TG都显著的降低,病理切片显示肝脏组织损伤减轻,凋亡基因Caspase3表达也降低,表明细胞凋亡水平也相应下降。从抗氧化、抗炎和脂代谢调控三个方面研究RE保护急性酒精肝损伤的作用机制。我们发现,RE通过下调乙醇代谢通路中产生活性氧的关键基因CYP2E1表达,并上调PPAR $\alpha$ 的表达。PPAR $\alpha$ 是一种磷酸化蛋白,能够调节脂肪细胞的分化,增强机体对胰岛素的敏感性,抑制炎症因子的生成以及炎症的形成,参与调节脂肪代谢相关基因的表达,CYP2E1能抑制PPAR $\alpha$ 的激活,当PPAR $\alpha$ 低表达时会加剧炎症和氧化应激的发生<sup>[12]</sup>。RE的保护作用使肝脏氧化损伤和炎症损伤减轻,肝脏MDA浓度显著下降,炎症因子TNF- $\alpha$ 和IL-6浓度下降,相应的抗氧化酶SOD、GSH-Px和抗炎因子IL-10浓度增加,发挥抗氧化活性和抗炎活性保护肝损伤。脂代谢紊乱是酒精肝形成的重要因素,FAS是脂肪酸合成的限速酶<sup>[13]</sup>,ADRP负责将游离的脂肪酸转移到肝脏中,合成脂质<sup>[14]</sup>,RE能下调FAS和ADRP基因的表达,减缓脂肪酸的合成和转移速率,是肝脏中TG的合成减少,减轻脂肪变性。

以上研究结果表明,RE能通过抗氧化、抗炎和脂代谢调控,减轻酒精诱导肝损伤。迷迭香提取物作为重要的食品添加剂,在开发为解酒护肝保健食品和药品方面具有广阔的前景。

#### 参考文献

- 1 Yin HQ, Choi YJ, Kim YC, *et al.* *Salvia miltiorrhizabunge* and its active component cryptotanshin one protects primary cultured rat hepatocytes from acute ethanol induced cytotoxicity and fatty infiltration. *Food Chem Toxicol*, 2009, 47: 98.
- 2 Song ZY, Ion Deaciuc, Song M, *et al.* Silymarin protects a-

- against acute ethanol induced hepatotoxic in mice. *Alcohol ClinExp Res*, 2006, 30: 407.
- 3 Wu N(吴娜), Cai GM(蔡光明), He Q(何群). Oxidative stress and hepatic injury. *World Chin J Dig*(世界华人消化杂志), 2008, 16: 3310-3315.
- 4 Yin GD(殷国栋), Gao Z(高政), Zhang YP(张燕平). Research advance in introduction cultivation and utilization of *Rosmarinusofficinalis*. *J Southwest ForestUniv*(西南林学院学报), 2010, 30: 82-84.
- 5 Chen DM(陈德茂), Kang XP(扛兴屏). Eco-adaptability and reproduction technique of *Rosmarinusoffconalis* in qian-nan region of guizhou. *GuizhouAgricSci*(贵州农业科学), 2009, 37: 25-27.
- 6 Xia TJ(夏田娟), Bi LW(毕良武), Zhao ZD(赵振东). Research progress in biological activity of carnosic acid. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2014, 26: 490-493.
- 7 Hu WY(胡胡彦), Yu HF(于浩飞), Zhang RP(张荣平). Protective effect of carnosic acid on  $\beta$ -Amyloid protein induced hippocampal neuron injury. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2014, 26: 1538-1543.
- 8 Du ZC(杜正彩), Deng JG(邓家刚), Huang HX(黄慧学), *et al.* Effect of mango leaf extract on acute alcoholic liver injury in mice. *Chin J ExpTradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2013, 19: 250- 253.
- 9 Gao XQ(高学清), Wang HY(汪何雅), Qian H(钱和), *et al.* Sober-Up effect of Radix Puerariae and FlosPueraria for treating acute alcohol poisoning mice. *J Food Sci Biotech*, 2012, 31: 621-627.
- 10 Duan XY(段晓燕), Zhang Z(张净), Pan Q(潘勤), *et al.* Effect of carnosic acid on the changes of serum biochemical parameters and liver histology in obese rats with non-alcoholic steatohepatitis. *J ClinHepatoil*(实用肝脏病学杂志), 2012, 15: 295-298.
- 11 Tilg H, Moschen AR, Kaneider NC, *et al.* Al. Pathways of liver injury in alcoholic liver disease. *J Hepatol*, 2011, 55: 1159-1161.
- 12 Tao Y(陶妍), Wu GF(吴高峰), Yang JC(杨建成), *et al.* Effect of PPAR $\alpha$  on the pathogenesis of alcoholic fatty liver disease. *ProgrVeterin Med*(动物医学进展), 2012, 33: 71-74.
- 13 Yellen P, Foster DA. Inhibition of fatty acid synthase induces pro-survival Akt and ERK signaling in K-Ras-driver cancer cells. *Cancer Lett*, 2014, 353: 258-263.
- 14 Chang BH, Li L, Paul A, *et al.* Protection against fatty liver but normal adipogenesis in mice lacking adipose differentiation-related protein. *Mol Cell Biol*, 2006, 26: 1063-1076.