

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2025.03.013

藏红花酸纳米脂质体抗酒精性肝损伤活性研究

南 剑¹, 司冠儒^{1,2}, 程浩然¹, 陈锦鸿¹, 李鹏林¹, 李井雷¹, 杨 柳¹

(1. 合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601; 2. 安徽宣酒集团股份有限公司, 安徽 宣城 242000)

摘 要:文章通过乙醇注入法制备了藏红花酸纳米脂质体,利用透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)表征其外观形态结构特征;对白酒灌胃雄性昆明鼠进行酒精性肝损伤诱导建模,同时灌胃藏红花酸纳米脂质体,分析其对酒精性肝损伤的预防和治疗效果。记录酒精性肝损伤模型建立过程中小鼠体质量变化,检测血液和肝脏中各项酒精性肝损伤生理指标,并对小鼠肝组织进行苏木素伊红(H&E)染色,观察肝脏组织形态变化。结果表明,藏红花酸纳米脂质体显著增加了小鼠体内乙醇脱氢酶和乙醛脱氢酶的活性,加快了酒精在小鼠体内的代谢速度,说明藏红花酸纳米脂质体具有一定的抗酒精性肝损伤的活性。

关键词:藏红花酸;纳米脂质体;动物试验;酒精性肝损伤

中图分类号:TS201.4

文献标志码:A

文章编号:1003-5060(2025)03-0376-05

Anti-alcoholic liver injury activities of crocetin loaded nanoliposomes

NAN Jian¹, SI Guanru^{1,2}, CHENG Haoran¹, CHEN Jinhong¹, LI Penglin¹, LI Jinglei¹, YANG Liu¹

(1. School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China; 2. Anhui Xuanjiu Group Co., Ltd., Xuancheng 242000, China)

Abstract: In this paper, crocetin loaded nanoliposomes were prepared by ethanol injection method. The morphological features were observed by transmission electron microscope(TEM). Alcoholic liver injury model was induced using Kunming male mice by oral administration of Baijiu. The anti-alcoholic liver injury activities of crocetin loaded nanoliposomes were investigated. The body weight change of mice was recorded. Major physiological indexes of alcoholic liver injury in the blood and liver were measured. The histomorphological properties of liver tissue were recorded after hematoxylin and eosin(H&E) staining. The results showed that the activities of alcohol dehydrogenase and acetaldehyde dehydrogenase were significantly increased by administration of crocetin loaded nanoliposomes. The metabolism rate of alcohol was accelerated in mice. The present results indicate that crocetin loaded nanoliposome has anti-alcoholic liver injury activities.

Key words: crocetin; nanoliposome; animal test; alcoholic liver injury

0 引 言

酒精性肝损伤是由长时间过量饮酒引起的一种肝病^[1],其形成与酒精代谢途径中产生的各种氧化和炎症相关的中间产物有关。乙醇代谢会增加体内还原型辅酶 I (NADH)的水平,并激活微粒体乙醇氧化系统(MEOS),此途径会产生活性氧(reactive oxygen species, ROS),ROS 在体内

的积累是导致酒精性肝损伤的重要因素^[2],因此体内一些抗氧化途径的激活可以抑制氧化应激对机体的损伤。核因子相关因子 2(Nrf2)途径^[3]有利于防止酒精性肝损伤;过量的酒精摄入会破坏小肠屏障功能,造成肠道环境中脂多糖(LPS)通过小肠屏障进入血液^[4];结合 CD14 受体激活 NF- κ B 释放内源性炎症因子诱发炎症反应并诱导肝细胞凋亡^[5],从而引起肝损伤。尽管酒精性

收稿日期:2022-06-02;修回日期:2022-07-05

基金项目:合肥工业大学产学研校企合作资助项目(W2021JSKF0910)

作者简介:南 剑(1997—),男,甘肃白银人,合肥工业大学硕士生;

李井雷(1986—),男,河北保定人,博士,合肥工业大学教授,硕士生导师。

肝损伤的发病率逐年上升,但是目前对于治疗酒精性肝损伤的手段还不成熟,相对于传统治疗手段,如戒酒、糖皮质激素治疗等,研究开发预防治疗酒精性肝损伤的药物有着广阔的应用前景。

藏红花酸($C_{20}H_{24}O_4$)是存在于藏红花和栀子果中的一种类胡萝卜素,分子量为 328.40 g/mol,熔点为 285 °C,是一种疏水性化合物,不溶于水和绝大多数有机溶剂,溶于吡啶和二甲基亚砜^[6]。藏红花酸具有抗氧化、抗炎、抗抑郁症、抗动脉粥样硬化、抗癌、抗糖尿病、降血压、降血糖、降血脂等活性^[6],但是极低的水溶性限制了藏红花酸在食品医药等领域的应用,因此寻求一种增强藏红花酸在水分散系中分散性的方法是扩大其应用范围的前提。纳米脂质体是一种在水中由于疏水性而自发形成的类细胞膜结构的球装囊泡,具有一个亲水的核心区域,可以封装亲水性分子。另外,疏水性分子由于疏水力的作用被封装在磷脂双分子层中间^[7]。本文通过灌胃白酒建立酒精性肝损伤小鼠模型,设置灌胃给药藏红花酸纳米脂质体研究藏红花酸抗酒精性肝损伤的活性。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

藏红花酸从栀子果中提取,大豆卵磷脂、乙醇、水飞蓟素均购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司,试剂盒源自南京建成生物工程研究所。

1.2 脂质体的制备

乙醇注入法制备脂质体,方法简述如下:将 200 mg 大豆卵磷脂与 10 mg 藏红花酸共溶于 20 mL 无水乙醇;在 400 r/min 的磁力搅拌器上,将藏红花酸与卵磷脂的乙醇共溶物通过注射器快速滴入 100 mL 去离子水中,反应 1 h;在 45 °C 旋转蒸发器上完全除去乙醇,定容至 100 mL;使用探针式超声仪超声处理 5 min,依次通过 0.45、0.22 μm 的滤膜得到藏红花酸纳米脂质体。

空白纳米脂质体的制备与以上步骤类似,将大豆卵磷脂溶于 20 mL 无水乙醇,后续程序与上述步骤相同。使用 Nano ZS90 马尔文激光粒度仪测量纳米脂质体的水动力学参数,并计算包封率和载药量。

1.3 TEM 表征

将制备的空白纳米脂质体和藏红花酸纳米脂质体溶液稀释 1 000 倍,滴于 200 目铜网格上,用 1% 磷钨酸负染色 1 min,多余的液体用吸水纸吸

附。所有样品在室温下干燥过夜。使用 JEM-2100F 透射电子显微镜(transmission electron microscope,TEM)观察空白纳米脂质体和藏红花酸纳米脂质体的微观结构。

1.4 实验动物和设计

60 只雄性昆明小鼠(20 ± 2) g 购于安徽医科大学实验动物中心。小鼠饲养在聚丙烯笼中,控制温度为(25 ± 2) °C,相对湿度为 50%~70%。小鼠自由获取饲料和无菌水,在 12 h/12 h 明暗循环。适应性训练 1 周后灌胃给药。动物实验经合肥工业大学动物伦理委员会批准。

60 只小鼠被均分为 6 组(每组 10 只):正常对照组(NC),模型对照组(MC),治疗组(T),空白脂质体组(LP),藏红花酸(5 mg/kg)低剂量组(CRL),藏红花酸(20 mg/kg)高剂量组(CRH)。除 NC 组外,其余各组小鼠每天早上 9:00 进行 0.2 mL 高度白酒灌胃诱导酒精性肝损伤,下午 2:00 进行水飞蓟素、空白脂质体以及藏红花酸纳米脂质体灌胃给药,实验持续进行 21 d。

21 d 灌胃给药后 2 h,对各组小鼠进行眼球取血并脱颈处死,其中血液静置 2 h,3 000 r/min 离心取血清 4 °C 保存,取肝脏组织一部分与 4% 多聚甲醛溶液固定,另一部分保存在-80 °C。

1.5 酒精性肝损伤相关参数的测定

严格按照试剂盒说明书测定 5-羟色胺(5-HT)质量浓度,高密度脂蛋白(HDL)和胆固醇(TC)的浓度,谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、乳酸脱氢酶(LDH)、乙醇脱氢酶(ADH)和乙醛脱氢酶(ALDH)的酶活。

1.6 肝脏切片 H&E 染色显微镜观察

将肝组织固定并包埋在石蜡溶液中,切割成 5 μm 厚的切片,按照标准方法对样品进行 H&E 染色以进行组织病理学分析^[8]。将染色样品置于光学显微镜下观察。

1.7 统计学分析

本文数据均以(平均值 \pm 标准差)表示,所有的测试至少重复 3 次。使用 one-way ANOVA 进行显著性分析。NS 表示与 NC 组相比没有显著性差异;与 NC 组相比,* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$ 。

2 结果与讨论

2.1 藏红花酸纳米脂质体的形态结构分析

空白纳米脂质体和藏红花酸纳米脂质体的 TEM 图片如图 1 所示。从图 1 可以看出,空白纳

米脂质体和藏红花酸纳米脂质体均为球状结构, 粒径为 70~100 nm。

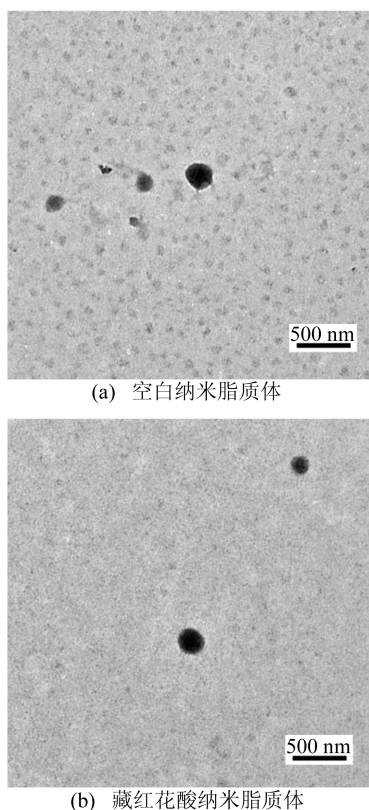


图 1 纳米脂质体和藏红花酸纳米脂质体的 TEM 图片

藏红花酸纳米脂质体的相关参数见表 1 所

列。由表 1 可知, 本文制备的藏红花酸纳米脂质体粒径在 100 nm 之内, 且多分散性指数 (polymer dispersity index, PDI) 在 0.3 以下, Zeta 电位为 -41.23 mV。结果表明, 本文制备的藏红花酸纳米脂质体是一个稳定存在的体系, 平均包封率达到了 55.63%, 平均载药量为 2.71 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。

表 1 藏红花酸纳米脂质体的相关参数

参数	数值
粒径/nm	76.29 \pm 0.20
PDI	0.28 \pm 0.03
Zeta 电位/mV	-41.23 \pm 3.80
包封率/%	55.63 \pm 1.61
载药量/ $\mu\text{g}/\text{mg}$	2.71 \pm 0.08

2.2 酒精性肝损伤对体质量和肝质量的影响

各组小鼠的体质量、肝质量和肝脏指数如图 2 所示。

由图 2 可知, 与 NC 组相比, 随着各组 21 d 内每天摄入 0.2 mL 高度白酒, 21 d 后小鼠的体质量显著下降。在建模过程中 MC 组的小鼠毛色发暗, 并表现出明显的消极行为, 说明酒精性肝损伤建模成功。另外小鼠的肝脏质量也有一定程度的下降。根据肝脏指数的计算, 各组间的肝脏指数没有显著性差异, 表明藏红花没有毒性效果, 因此本文设计的藏红花酸剂量是合理的。

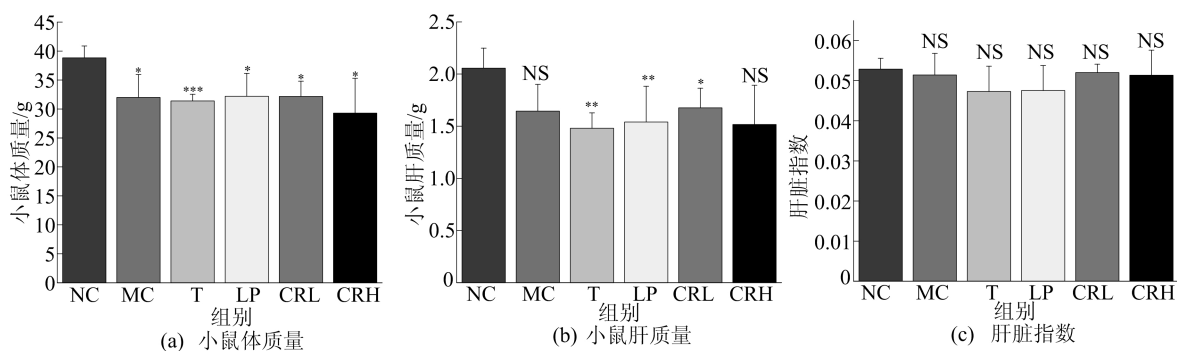


图 2 各组小鼠的体质量、肝质量和肝脏指数

2.3 藏红花酸对小鼠生化指标的影响

藏红花酸纳米脂质体对酒精性肝损伤小鼠生化指标的影响如图 3 所示。由图 3a、图 3b 可知: 连续摄入 21 d 高度白酒造成的酒精性肝损伤会导致小鼠体内高密度脂蛋白 (HDL) 浓度下降, 小鼠肝脏内胆固醇 (TC) 浓度升高; 与 NC 组相比, MC 组的胆固醇浓度显著上升, 这可能是由于酒精性肝损伤引起脂滴的累积; 而 CRL 组与 CRH 组的胆固醇浓度与 NC 组相比没有显著性差异,

说明藏红花酸的摄入对酒精性肝损伤有一定的拮抗效果。由图 3c~图 3e 可知, ALT 和 AST 酶活在各组之间没有显著性差异。酒精性肝损伤还会导致小鼠体内 LDH 的酶活显著上升, LDH 是一种器官损伤的标志物^[9], LDH 水平的增高表明在酒精性肝损伤过程中小鼠器官损伤的发生。由图 3f 可知, 5-HT 的质量浓度在酒精性肝损伤模型的建立过程中没有显著性变化, 与 MC 组相比, T 组、CRL 组和 CRH 组的 5-HT 质量浓度仍

有下降的趋势。5-HT 作为一种抑制性神经递质,会影响机体的精神情绪^[10],因此藏红花酸脂质体给药组小鼠在摄入酒精后,消极行为现象减少。由图 3g 和图 3h 可知,与 NC 组相比, CRL 组和 CRH 组的乙醇脱氢酶(ADH)和乙醛脱氢酶(ALDH)的活性显著增高,其他组没有显著性差异。ADH 和 ALDH 是与机体代谢酒精紧密相关

的 2 种酶,摄入体内的酒精跟随血液流入肝脏,乙醇脱氢酶催化乙醇与 NAD⁺ 反应生成乙醛和 NADH,乙醛又在乙醛脱氢酶的催化下与 NAD⁺ 反应生成乙酸和 NADH。

在本研究中,藏红花酸通过提高小鼠体内 ADH 和 ALDH 的酶活来增强酒精的代谢,进一步达到预防和治疗酒精性肝损伤的效果。

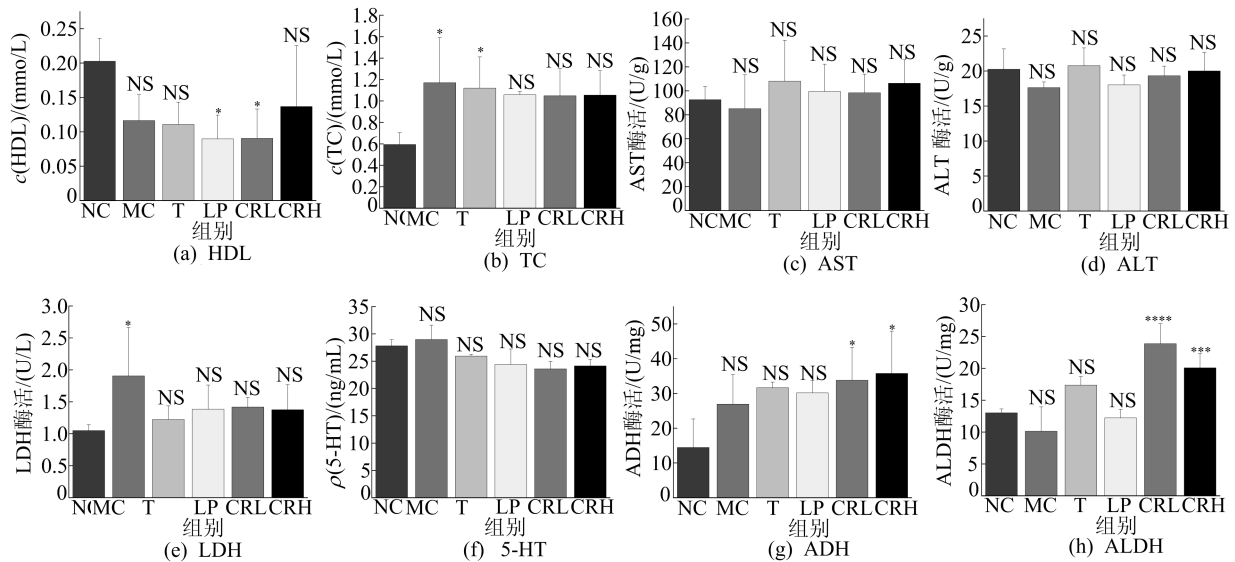


图 3 藏红花酸纳米脂质体对酒精性肝损伤小鼠生化指标的影响

2.4 肝脏组织病理切片分析

小鼠肝脏病理学切片图如图 4 所示。从图 4 可以看出:NC 组小鼠肝组织细胞排列规则整齐,没有明显的炎症浸润和脂滴积累;与 NC 组相比, T 组的细胞变形严重,排列松散,巨噬细胞数量增多,水飞蓟素对肝脏细胞有一定保护作用,具体表

现为 T 组肝细胞坏死面积减少, CRL 组与 CRH 组也表现出相似的效果,其中巨噬细胞数量减少,表明酒精性肝损伤的模型中炎症症状减轻。文献 [11] 报道,藏红花酸可以通过减轻 RAW264.7 细胞中 NO 和 TNF- α 的水平来发挥抗炎效果,这与本文实验结果一致。

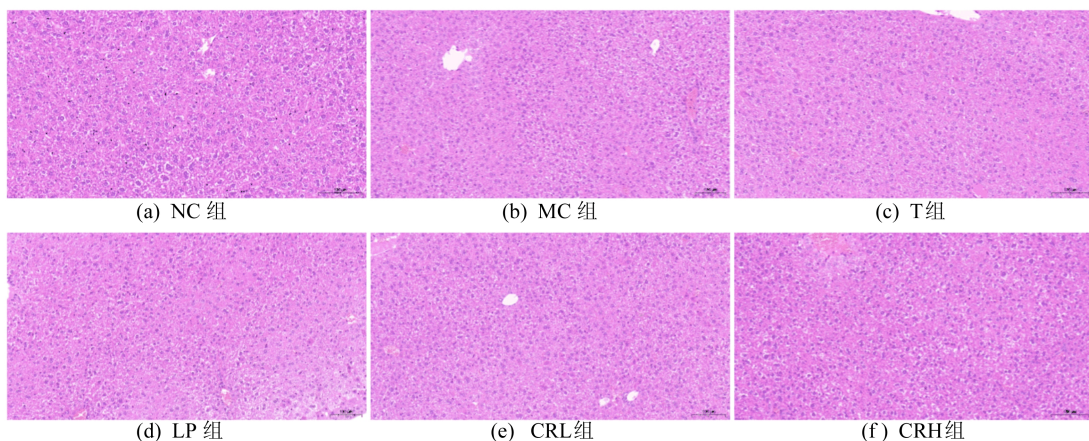


图 4 小鼠肝脏病理学切片图

3 讨 论

酒精性肝损伤是由于过量摄入酒精导致的酒

精性肝病,已经成为继病毒性肝炎致肝损伤之后导致肝损伤的又一大病因^[11]。一般认为,氧化应激和炎症是导致酒精性肝损伤的两大主要诱

因^[3]。本文主要确定了藏红花酸纳米脂质体通过增加 ADH 和 ALDH 的活性加速酒精在体内的代谢来发挥抗酒精性肝损伤活性。

为了研究藏红花酸的水分散性和生物利用度,本文以纳米脂质体为载体封装藏红花酸,不仅极大地增强了藏红花酸的水分散性,还有利于对小鼠的灌胃给药。藏红花酸对于酒精性肝损伤的治疗效果十分有效。与对照模型组小鼠相比,在每天 0.2 mL 的高度白酒摄入后藏红花酸脂质体表现出积极的行为;且小鼠体内 ADH 和 ALDH 的水平显著上升,这 2 种酶直接参与体内酒精代谢,催化酒精在体内代谢生成乙酸,此过程伴随产生的 NADH 激活微粒体乙醇氧化系统(MEOS)和 NADPH 氧化酶(NOX),并且会产生 ROS^[12],这将导致机体氧化压力的增强,进一步加剧酒精性肝损伤。藏红花酸作为一种抗氧化剂,对活性氧和自由基有较强的清除能力^[13]。藏红花酸纳米脂质体的摄入不仅加速了酒精在体内的代谢,而且会降低酒精代谢过程中产生的氧化压力,对酒精性肝损伤的预防和治疗具有重大意义。另外,藏红花酸显著的抗炎能力也是藏红花酸具有抗酒精性肝损伤活性的另一大原因。根据文献^[5]报道,酒精的摄入会损害肠道屏障,导致肠道环境中炎症性多糖 LPS 通过肠道屏障进入血液循环,到达肝脏组织,通过诱导炎症的发生和肝脏细胞的凋亡加剧酒精性肝损伤。

4 结 论

本研究通过制备的藏红花酸纳米脂质体提高藏红花酸在水中的分散性,进一步提高藏红花酸在小鼠体内的生物利用度。低剂量和高剂量的藏红花酸纳米脂质体对于酒精性肝损伤模型均有一定的预防和治疗效果,藏红花酸纳米脂质体的给药显著提高了小鼠肝脏组织中乙醇脱氢酶和乙醛脱氢酶的活性,增加了酒精在小鼠体内的代谢效率,降低了小鼠血清中乳酸脱氢酶的活性和器官损伤的程度。研究结果表明,藏红花酸纳米脂质体对酒精性肝损伤具有一定的预防和治疗效果,因此本文对于研究藏红花酸预防和治疗酒精性肝损伤的机理有一定的参考价值,藏红花酸对于预防和治理酒精性肝损伤有着广阔的应用前景。

er disease; utility of animal models[J]. World J Gastroenterol, 2018, 24(45):5063-5075.

- [2] LEUNG T M, NIETO N. CYP2E1 and oxidant stress in alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease[J]. J Hepatol, 2013, 58(2):395-398.
- [3] XIA T, ZHANG J, YAO J, et al. Shanxi aged vinegar protects against alcohol-induced liver injury via activating Nrf2-mediated antioxidant and inhibiting TLR4-induced inflammatory response[J]. Nutrients, 2018, 10(7):805.
- [4] SARUMATHI A, SETHUPATHY S, SARAVANAN N. The protective efficacy of spirulina against bacterial endotoxin potentiated alcoholic liver disease[J]. Journal of Functional Foods, 2014, 9:254-263.
- [5] MILLER A M, HORIGUCHI N, JEONG W I L, et al. Molecular mechanisms of alcoholic liver disease: innate immunity and cytokines[J]. Alcoholism(Clinical and Experimental Research), 2011, 35(5):787-793.
- [6] CERDA-BERNAD D, VALERO-CASES E, PASTOR J J, et al. Saffron bioactives crocin, crocetin and safranal: effect on oxidative stress and mechanisms of action[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2022, 62(12):3232-3249.
- [7] XIA S, TAN C, ZHANG Y, et al. Modulating effect of lipid bilayer-carotenoid interactions on the property of liposome encapsulation[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2015, 128:172-180.
- [8] YU F M, ZHANG Z W, YE S W, et al. Immunoenhancement effects of pentadecapeptide derived from *Cyclina sinensis* on immune-deficient mice induced by Cyclophosphamide[J]. Journal of Functional Foods, 2019, 60:103408.
- [9] GAO H, ZHANG W, WANG B, et al. Purification, characterization and anti-fatigue activity of polysaccharide fractions from okra(*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench)[J]. Food Funct, 2018, 9(2):1088-1101.
- [10] LI Y H, LI J J, XU F Q, et al. Gut microbiota as a potential target for developing anti-fatigue foods[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2021, 63(8):3065-3080.
- [11] 孟文文, 刘慧茹, 张文光. 中药防治酒精性肝病作用机制的研究进展[J]. 中草药, 2022, 53(3):868-881.
- [12] JIANG X, ZHOU Y, ZHANG Y, et al. Hepatoprotective effect of pyrroloquinoline quinone against alcoholic liver injury through activating Nrf2-mediated antioxidant and inhibiting TLR4-mediated inflammation responses [J]. Process Biochemistry, 2020, 92:303-312.
- [13] LI J, NAN J, WU H, et al. Middle purity soy lecithin is appropriate for food grade nanoliposome: preparation, characterization, antioxidant and anti-inflammatory ability [J]. Food Chemistry, 2022, 389:132931.

(责任编辑 闫杏丽)

[参 考 文 献]

- [1] LAMAS-PAZ A, HAO F, NELSON L J, et al. Alcoholic liv-