

苦瓜甾醇对对乙酰氨基酚致小鼠肝损伤的保护作用

杨志刚*, 潘龙银, 王心睿

常熟理工学院生物工程系, 常熟 215500

摘要: 本研究苦瓜甾醇对对乙酰氨基酚所致小鼠肝损伤的保护作用及其作用机制。48 只小鼠随机分为 6 组 ($n=8$): 正常对照组、模型组、阳性对照组和苦瓜甾醇低、中、高剂量 (50、100 和 200 mg/kg) 组。各剂量组小鼠给予苦瓜甾醇连续灌胃 7 d 后, 一次性腹腔注射对乙酰氨基酚 400 mg/kg 制备肝损伤模型, 测定肝组织和血清的生化指标。与各苦瓜甾醇组比较, 模型组小鼠血清中谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 水平显著升高, 白蛋白 (ALB)、总蛋白 (TP) 含量显著降低, 肝组织中丙二醛 (MDA) 含量升高, 超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 活性下降。苦瓜甾醇有助于维持小鼠体内酶防御系统功能, 提高清除自由基的能力, 对对乙酰氨基酚所致小鼠肝损伤具有明显保护作用。

关键词: 对乙酰氨基酚; 小鼠; 肝损伤; 甾醇; 苦瓜

中图分类号: R965

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.12.006

Protective Effect of Phytosterol from *Momordica charantia* on Paracetamol-induced Hepatic Damage in Mice

YANG Zhi-gang*, PAN Long-yin, WANG Xing-rui

Department of Bioengineering, Changshu Institute of Technology, Jiangsu Changshu 215500, China

Abstract: The aim of this study was to investigate the protective effect of phytosterol from *Momordica charantia* on paracetamol-induced hepatic damage in mice. Forty-eight mice were randomly divided into normal control group, model group, bifendate group, phytosterol low, medium and high-dose (50, 100, and 200 mg/kg) groups, with eight mice in each group. Mice in phytosterol low, medium and high-dose groups were administered with phytosterol for 7 d consecutively. After 7 days, all the mice were then intraperitoneally given paracetamol at a dose of 400 mg/kg. The levels of MDA, SOD, GSH-PX in hepatic tissue and ALT, AST, ALB, TP in serum were measured. Compared with phytosterol groups, in the model group, the level of MDA increased while activities of SOD and GSH-PX decreased in hepatic tissue; the activities of ALT, AST in serum increased significantly while the levels of ALB, TP decreased. Phytosterol had good protective effect on paracetamol-induced hepatic damage in mice. Enhancing defense enzyme activities and eliminating free radical in mice may be the action mechanism of phytosterol.

Key words: paracetamol; mice; hepatic damage; phytosterol; *Momordica charantia*

药源性肝炎是一种在临床实践中严重威胁健康的常见病、多发病。由于肝脏首关效应的作用, 一些药物经长期或大量口服后, 代谢物淤积在肝脏组织, 就会损伤肝组织, 引发肝炎。对乙酰氨基酚是临床常用的解热镇痛药, 低剂量不至于损伤肝细胞, 但大剂量或长期服用, 则在肝内代谢过程中产生大量自由基堆积而引起肝细胞膜脂质过氧化, 损伤细胞膜产生细胞毒性, 致使炎症发生, 肝功能受损。

植物甾醇是一类以环戊烷全氢菲为骨架的天然醇类化合物, 天然植物甾醇种类繁多, 主要包括豆甾

醇、 β -谷甾醇、菜油甾醇、菜籽甾醇 4 种无甲基甾醇, 广泛存在于植物细胞与组织中, 已被确认具有免疫调节、消炎退热、降低血脂和胆固醇、减少动脉粥样硬化损伤、清除自由基及护养皮肤等多种生理功效, 广泛应用于食品卫生行业, 深受消费者的青睐^[1-3]。

苦瓜甾醇对肝损伤影响的相关研究尚未见报道。本实验观察对肝损伤模型小鼠施加不同剂量苦瓜甾醇后的生理指标变化, 探讨苦瓜甾醇对小鼠肝损伤的保护作用及机理。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级 ICR 健康雄性小鼠 48 只, 体重 (25 ± 3)

g,南通大学实验动物中心提供,许可证号 SCXK(苏)2014-001。

1.2 药物与试剂

苦瓜甙醇提取物 BMSE(按黄贤校等方法^[4]实验室制备,纯度 85.36%);对乙酰氨基酚(天津市健生制药有限公司);谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、丙二醛(MDA)、白蛋白(ALB)、考马斯亮蓝蛋白(TP)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。其余试剂均为分析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 分组与造模

小鼠 48 只,随机分为 6 组:正常对照组,模型对照组(浓度 40 mg/mL,即 4 g 对乙酰氨基酚溶于 100 mL 生理盐水中,腹腔注射 10 mg/kg,现用现配)、阳性对照组(联苯双酯 60 mg/kg)、苦瓜甙醇低剂量组(50 mg/kg)、中剂量(100 mg/kg)、高剂量(200 mg/kg),每组 8 只。本实验用橄榄油作为溶剂来溶解联苯双酯和苦瓜甙醇。

1.3.2 给药

正常对照组和模型对照组小鼠灌服 10 mg/kg 橄榄油,阳性对照组和苦瓜甙醇各剂量组分别按照剂量给予相应的药物,每日早、晚各给药一次,连续给药 7 d,最后一次给药后 2 h 开始禁食,除正常对照组外其余各组一次性腹腔注射对乙酰氨基酚 400 mg/kg^[5],正常对照组腹腔注射 10 mg/kg 生理盐水,禁食(自由饮水);24 h 后,各组经眼球后静脉丛取血,测定血清中 ALT、AST、ALB、TP 的含量;取肝脏,用 4 °C 生理盐水冲洗,滤纸吸干,称重,计算肝脏系数(肝脏重量/体重)。取肝右叶相同部位 0.2 g 肝组织,以 1.8 mL 4 °C 生理盐水制成 10% 肝匀浆,3500 rpm 离心 10 min,取上清液待测,测定各组肝组

织 SOD、MDA、GSH-PX。部分肝脏切片镜检,观察肝脏损伤程度。

1.3.3 血清及肝组织生化指标检测

摘除小鼠眼球取血,静置,3000 rpm,离心 15 min,按试剂盒说明测定血清中 ALT、AST 活性及 ALB、TP 含量;取出肝脏,用 4 °C 生理盐水冲洗,滤纸吸干后称重,取部分肝脏,剪碎后加入 9 倍生理盐水,在冰浴中用电动玻璃匀浆机制 10% 肝匀浆液,3000 rpm 离心 15 min,取上清液,按试剂盒说明测定肝组织中 SOD、GSH-PX 活性和 MDA 含量。

1.4 统计学方法

实验数据以“平均值 ± 标准差”表示,应用统计软件 SPASS13.0 进行 *t* 检验和方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 苦瓜甙醇对肝损伤小鼠血清中 ALT、AST 活性及 ALB、TP 含量的影响

结果见表 1。肝损伤模型组小鼠血清中 ALB、TP 水平与正常对照组比较,显著降低($P < 0.01$),而 ALT、AST 水平和肝脏系数与正常对照组比较显著增加($P < 0.01$)。苦瓜甙醇低剂量组小鼠与对肝损伤模型组比较,血清中 ALB、TP 水平略有升高,ALT、AST 水平和肝脏系数略有降低,但未显现统计学差异,而苦瓜甙醇中、高剂量组小鼠血清中 ALB、TP 水平显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),ALT、AST 水平和肝脏系数显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且呈现良好的剂量依赖性。

2.2 苦瓜甙醇对肝损伤小鼠肝组织中 SOD、GSH-PX 活性和 MDA 含量的影响

结果见表 2。与正常对照组比较,小鼠肝脏 SOD、GSH-PX 活性在对乙酰氨基酚致肝损伤模型组

表 1 小鼠血清中 ALT、AST 活性,TP、ALB 含量和肝脏指数($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 ALT,AST activity,TP,ALB content and liver index in mice liver ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/Kg)	Liver index (g/100g)	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALB (mmL/g)	TP (mmL/g)
正常组 Control group	-	4.75 ± 0.43	56.12 ± 10.03	28.56 ± 9.09	87.63 ± 6.53	1.85 ± 0.32
模型组 Model group	-	6.82 ± 0.36 ^{###}	302.09 ± 25.12 ^{###}	278.35 ± 32.05 ^{###}	54.32 ± 4.35 ^{###}	0.61 ± 0.28 ^{###}
联苯双酯组 Bifendate group	60	5.83 ± 0.42 ^{**}	89.23 ± 29.15 ^{**}	47.12 ± 16.23 ^{**}	80.54 ± 4.22 ^{**}	1.65 ± 0.32 ^{**}
苦瓜甙醇组 BMSE group	50	6.30 ± 0.50	253.34 ± 38.54	205.21 ± 56.52	59.53 ± 5.21	0.88 ± 0.21
	100	6.04 ± 0.42 [*]	164.45 ± 28.51 [*]	102.14 ± 34.03 ^{**}	67.27 ± 3.68 [*]	1.29 ± 0.38 [*]
	200	5.61 ± 0.62 ^{**}	102.33 ± 19.10 ^{**}	56.34 ± 13.12 ^{**}	78.56 ± 5.65 ^{**}	1.62 ± 0.41 ^{**}

注:与正常对照组相比,^{*} $P < 0.01$;与模型组相比,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

Note:Compare with control,^{**} $P < 0.01$;Compare with model,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

显著降低 ($P < 0.01$), 而 MDA 含量显著增加 ($P < 0.01$)。与对乙酰氨基酚致肝损伤模型组比较, 苦瓜甾醇低剂量组小鼠肝脏组织中 SOD、GSH-PX 活性升高, MDA 含量下降, 但未显现统计学差异, 而苦

瓜甾醇中、高剂量组小鼠肝脏组织中 SOD、GSH-PX 活性均显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), MDA 含量显著下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且呈现良好的剂量依赖性。

表 2 小鼠肝脏组织中 SOD、GSH-PX 活性, MDA 含量 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 SOD, GSH-PX activity and MDA content in mice liver ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/Kg)	SOD (U/mgpro)	MDA (nmol/mgpro)	GSH-PX (U/mgpro)
正常组 Control group	-	302.32 ± 31.01	1.25 ± 0.29	325.78 ± 35.07
模型组 Model group	-	209.12 ± 53.19 ^{##}	2.63 ± 0.45 ^{##}	139.56 ± 43.10 ^{##}
联苯双脂组 Bifendate group	60	285.57 ± 25.78 ^{**}	1.47 ± 0.33 ^{**}	298.23 ± 36.11 ^{**}
苦瓜甾醇组 BMSE group	50	226.78 ± 28.13	2.34 ± 0.56	189.67 ± 25.56
	100	253.56 ± 38.16 [*]	1.87 ± 0.34 [*]	245.14 ± 36.00 [*]
	200	294.09 ± 29.45 ^{**}	1.35 ± 0.43 ^{**}	318.23 ± 46.31 ^{**}

注: 与正常对照组相比, ^{**} $P < 0.01$; 与模型组相比, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。

Note: Compare with control, ^{**} $P < 0.01$; Compare with model, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。

2.3 苦瓜甾醇对肝损伤小鼠肝组织的影响

实验可见, 正常对照组小鼠肝脏外观呈现红褐色, 大小形态正常, 表面被膜光滑, 色泽红润, 质软而脆, 镜下结构清晰, 未见明显变性和坏死; 模型对照组小鼠肝脏明显肿大, 弹性减弱, 表面有点状出血, 镜下呈现局灶性坏死症状; 苦瓜甾醇各剂量组和阳性对照组可以减轻肝细胞损伤程度, 显著改善细胞变性和坏死, 有效地保护肝脏, 尤其是苦瓜甾醇高剂量组作用显著, 效果与阳性对照组相近; 结果见表 3、图 1。肝损伤程度分级: “-”: 正常肝组织; “+”: 肝细胞变性或点状坏死; “++”: 肝细胞变性或局灶性坏死; “+++”: 肝小叶不到 1/3 肝细胞坏死。

3 讨论与结论

肝损伤的防治目前仍是一个全球性的严峻课

题。通过建立实验性肝损伤动物模型, 筛选保肝药物, 探索保肝作用机制, 具有重要的现实意义^[6]。对乙酰氨基酚是解热镇痛药, 临床上常作为阿司匹林的替代用药, 长期服用时或大剂量使用时可导致严重毒性效应。实验中小鼠腹腔注射对乙酰氨基酚后, 肝脏出现中毒性肝炎、肝坏死等病理现象, 形成肝损伤模型^[7,8]。苦瓜甾醇各剂量组小鼠肝脏系数减少, 说明对乙酰氨基酚引起的肝脏炎症反应受到了苦瓜甾醇的抑制, 肝脏损伤程度减轻, 肝脏肿大被缓解。

血清中 ALT、AST 的含量是评价肝损伤的重要标志。当肝细胞受到损害时, 细胞膜通透性改变, ALT、AST 释放入血液, 致使血清中 ALT 和 AST 的含量上升。灌服苦瓜甾醇组小鼠能保持血清 ALT、AST 的较低水平状态, 表明灌服苦瓜甾醇在一定程

表 3 苦瓜甾醇对肝损伤小鼠肝组织病理改变的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 3 Pathological changes of tissue in mice liver ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/Kg)	不同肝损伤程度动物数 Number of liver damaged mice			
		-	+	++	+++
正常组 Control group	-	7	1	0	0
模型组 Model group	-	0 ^{##}	1	2 ^{##}	5 ^{##}
联苯双脂组 Bifendate group	60	2 [*]	4 ^{**}	2	0 ^{**}
苦瓜甾醇组 BMSE group	50	0	2 [*]	5 ^{**}	1 ^{**}
	100	0	4 ^{**}	4 [*]	0 ^{**}
	200	1 [*]	5 ^{**}	2	0 ^{**}

注: 与正常组比较, ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control, ^{##} $P < 0.01$; Compared with model, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。

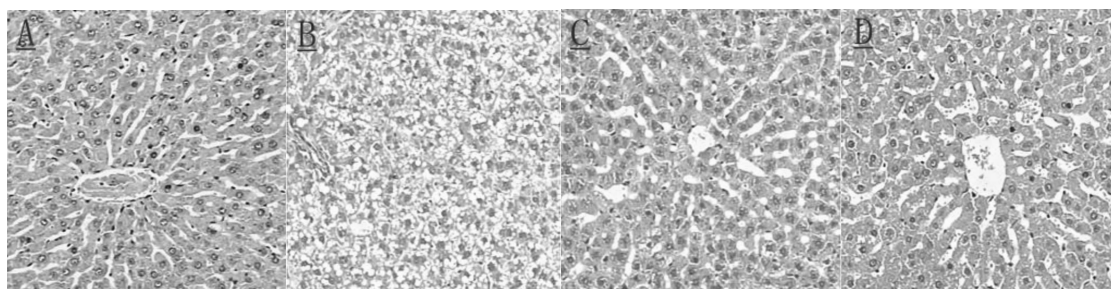


图1 对照组(A)、模型组(B)、苦瓜甾醇高剂量组(C)、联苯双酯组(D)中小鼠肝组织病理变化(HE染色,25×)

Fig. 1 Histopathological changes of rat liver from control group (A), model group (B), phytosterol group (high-dose) (C) and bifendate group (D) (HE staining, 25 ×)

度上缓减了对乙酰氨基酚对小鼠肝细胞膜的急性损伤。肝细胞内 ALB、TP 具有抗氧化剂、损伤修复功能,在肝功能受损时合成与分泌减少^[9]。本实验中苦瓜甾醇中高剂量灌服组小鼠肝细胞 ALB、TP 含量明显高于模型组,表明苦瓜甾醇有助于 ALB、TP 蛋白合成与分泌,有效预防肝组织遭受急性损伤引发细胞代谢紊乱。

MDA 是膜脂过氧化产物,其浓度间接反映机体细胞膜系统受损程度;SOD 为超氧自由基清除因子,其含量可间接反映机体清除自由基的能力^[10,11]。本实验中苦瓜甾醇各剂量组小鼠相比较模型组,MDA 含量均有降低,SOD 活力均有提高,表明苦瓜甾醇有助于清除自由基,抑制脂质过氧化反应,防止细胞膜受损,迟滞细胞肿胀坏死,对对乙酰氨基酚所致肝损伤有显著的保护作用。GSH-PX 是机体中广泛存在的一种含硒抗氧化酶,可以清除由活性氧和羟自由基诱发的脂质过氧化物,以阻断脂质过氧化连锁反应,保护细胞膜结构和功能的完整性^[12]。当对乙酰氨基酚摄入量过大时,其代谢产物量超过 GSH 的清除能力,加剧膜脂质过氧化,引发肝损伤,苦瓜甾醇有助于保持 GSH 活性和肝脏解毒能力,缓减肝脏受损程度。

综上所述,苦瓜甾醇有助于缓减对乙酰氨基酚引发肝组织炎症反应,维持体内 SOD、GSH-PX 等酶活性,抑制脂质过氧化反应,防止细胞膜受损和细胞代谢紊乱,从而起到对急性肝损伤的保护作用,可能成为肝损伤预防与治疗的候选辅助药物。

参考文献

- Xu SW(许世卫). Goals and strategies of china food and nutrition development in 2020. *Food Nutr China*(中国食物与营养),2011,17(9):5-13.
- Rudkowska I. Plant sterols and stanols for healthy ageing.

- Maturitas*,2010,66:158-162.
- Woyenqo TA,Ramprasath VR,Jones PJ. Anticancer effects of phytosterols. *Eur J Clin Nutr*,2009,63:813-820.
- Huang XX(黄贤校),Gu KR(谷克仁),Zhao YF(赵一凡),*et al.* Extration of soybean phytosterol. *China Oils Fats*(中国油脂),2008,33(9):54-57.
- Yang XL(杨秀兰),Zhao C(赵聪),Zheng M(郑敏),*et al.* Experimental investigation of acetaminophen hepatotoxicity in mice. *Sichuan Med J*(四川医学),2006,27:888-889.
- Pei LP(裴凌鹏),Hui BD(惠伯棣). Protective effects of astaxanthin on acute alcohol liver injury in mice. *J Jiangsu Univ,Med Ed*(江苏大学学报,医学版),2008,18:303-306.
- Ozdemirler G,Aykac G,Uysal M,*et al.* Liver lipid peroxidation and glutathione-related defence enzyme system in mice treated with paracetamol. *J Appl Toxicol*,1994,14:297-299.
- Zhang Z(张真),Fu Y(扶艳),Liang XF(梁信芳),*et al.* Protective effect of astaxanthin on paracetamol-induced hepatic damage in mice. *Chin J New Drugs Clin Rem*(中国新药与临床杂),2010,29:433-436.
- Hu YX(胡怡秀),Liu XY(刘秀英),Hu YM(胡余明),*et al.* Effects and mechanisms of Gantaikang on liver injury induced by carbon tetrachloride in mice. *China Tropical Med*(中国热带医学),2002,2:303-306.
- Liu AJ(刘安军),An L(安磊),Chen Y(陈影),*et al.* Therapeutic effects of bovine articular cartilage on adjuvant-induced arthritis. *Mod Food Sci Technol*(现代食品科技),2010,26:122-125.
- Liu AJ(刘安军),Ma TJ(马天娇),Chen Y(陈影),*et al.* Protective effect of astaxanthin on the acute liver injury induced by CCl₄ in mice. *Mod Food Sci Technol*(现代食品科技),2010,26:1197-1199.
- Pei LP(裴凌鹏),Chang Z(常铮),Jin ZL(金宗濂). Effects of flavone of *Pueraria lobata* Ohwi on antioxidative action in aged mice. *Acta Nutr Sin*(营养学报),2004,26:505-506.