

黑米花青苷复方胶囊 对酒精性肝损伤的防治作用

路宏朝^{1,2,3}, 王琦^{1,2}, 张涛^{1,2}, 王杨科¹, 李新生^{1,2,3}

(1. 陕西理工学院生物科学与工程学院, 陕西汉中, 723000;

2. 陕西省资源生物重点实验室, 陕西汉中, 723000;

3. 陕西省黑色有机食品工程技术研究中心, 陕西汉中 723000)

摘要:目的: 研究黑米花青苷复方胶囊在小鼠酒精性肝损伤中的防治作用。方法: 建立小鼠酒精性肝损伤病理模型, 分别灌胃低剂量、高剂量的黑米花青苷复方胶囊进行治疗, 正常组灌胃蒸馏水, 助悬剂组灌胃植物油。第12d, 测定肝组织中超氧化物歧化酶(SOD)活力、丙二醛(MDA)含量、谷胱甘肽(GSH)含量及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白介素- β (IL- β)的水平, 并进行肝脏病理学观察。结果: 黑米花青苷复方胶囊能明显提高肝组织中SOD的活力, 对MDA起到直接清除作用; 还可以提高GSH含量, 降低TNF- α 和IL- β 的水平。病理组织学显示, 黑米花青苷胶囊能显著改善肝细胞的脂肪变性。同时, 助悬剂对药物的效果没有影响。结论: 黑米花青苷复方胶囊能够对酒精性肝损伤的治疗起到一定的效果。

关键词: 花青苷复方胶囊, 酒精性肝损伤, 病理学, 药理学

Preventive and curative effect of black rice anthocyanin compound capsule on alcohol-induced liver injury

LU Hong-zhao^{1,2,3}, WANG Qi^{1,2}, ZHANG Tao^{1,2}, WANG Yang-ke¹, LI Xin-sheng^{1,2,3}

(1. School of Biological Science Technology and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723000, China;

2. Shaanxi Key Laboratory of Bio-Resources, Hanzhong 723000, China;

3. Shaanxi Province Black Organic Food Engineering Technology Research Center, Hanzhong 723000, China)

Abstract: Established pathology model of alcoholic-induced liver injury in mice and cured by poured the black rice anthocyanin compound capsule in low concentration and high concentration into stomach, distilled water for the normal group and plant oil for the suspending agents group. The content of SOD, MDA, GSH and the levels of TNF- α & IL- β in liver homogenate were measured in the 12th day. Hepatic pathological examination was observed. The result showed that the black rice anthocyanin compound capsule could increase SOD activity obviously, clear MDA content directly in hepatic tissue, improve GSH content and reduce TNF- α & IL- β level and improve hepatic steatosis. At the same time, suspension agents basically had no influence on drug effect. Therefore the black rice anthocyanin compound capsule had a particular treatment effect on alcohol liver injury in mice.

Key words: black rice anthocyanin compound capsule; alcoholic-induced liver injury; pathology; pharmacology

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)16-0347-03

黑米具有滋阴补肾、健脾肝、明目活血之功效, 因此黑米又有“补血米”、“长寿米”的美称^[1]。花青苷是由花青啉与各种糖以糖苷键结合形成的糖苷, 存在于黑稻的果实、茎、叶器官的细胞液中^[2-3], 是黑米颜色的主要来源。近年来大量研究发现, 黑米花青苷

是一种较安全的天然色素资源, 兼具有一定的营养和药理作用^[4-8]。胡秋林^[9]以纯化的黑米色素为材料, 用小白鼠做动物营养实验, 结果表明黑米花青苷能提高其抗疲劳能力和抗缺氧能力。秦玉^[10]等研究发现黑米花青苷提取物胶囊具有明显的辅助降血脂作用。杨靖亚^[11]等认为花青素是黄酮类化合物, 具有很好的抗氧化效果, 能有效地抑制癌细胞的浸润和转移。Zhang^[12]等研究发现黑米的抗氧化作用与其中所含的黄酮和花青苷类物质关系密切。而黑米花青苷是否因其抗氧化和抗自由基作用在肝脏损伤中起到保护作用, 目前报道较少。本实验通过建立小鼠酒精性肝损伤病理模型, 采用项目组前期研制的黑米花

收稿日期: 2011-12-27

作者简介: 路宏朝(1980-), 女, 硕士, 讲师, 主要从事动物病理生理学方面的研究。

基金项目: 陕西省教育厅重点实验室项目(09JK249); 陕西省发改委陕南突破发展项目(08SNTFZX-HZ01-1); 陕西省科技厅重点实验室专项研究计划项目(06KJZ-06)。

青苜蓿复方胶囊^[13]进行治疗,探索黑米花青苜蓿复方胶囊预防酒精性肝病的效果。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

黑米花青苜蓿复方胶囊 陕西省资源生物重点实验室和陕西省黑色有机食品工程技术研究中心研制并提供,低剂量:含有效成分(黑米花青苜蓿、二苯乙烯苜蓿、茵多糖等)63.098mg/粒;高剂量:含有效成分(黑米花青苜蓿、二苯乙烯苜蓿、茵多糖等)88.339mg/粒^[13];助悬剂 金龙鱼大豆油;考马斯亮蓝试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒、谷胱甘肽(GSH)试剂盒 南京建成生物工程研究所;肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 试剂盒、白介素- 1β (IL- 1β) 试剂盒 北京科盈美科技有限公司;KM小鼠 体重18~22g,雄性,体质健康,毛色光滑雪白,购买于西安交通大学医学院。

玻璃匀浆管,微量移液器,台式离心机,可见分光光度计N772,酶标仪,石蜡切片机,显微镜。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物及分组 将动物随机分为六组:正常组、模型组、助悬剂 I 组、助悬剂 II 组、低剂量组、高剂量组,每组10只,置于通气良好的室内给予充足食物进行分笼饲养。

1.2.2 酒精性肝损伤病理模型建立 通过连续11d对模型组、低剂量组、高剂量组小鼠灌胃50%的酒精0.3mL,建立酒精性肝损伤模型;同时,正常组和模型组每天灌胃蒸馏水0.3mL,助悬剂 I 组灌胃植物油0.95mg/kg/d,助悬剂 II 组灌胃植物油0.57mg/kg/d,低剂量组灌胃低剂量药物3.78mg/kg/d,高剂量组灌胃高剂量药物5.27mg/kg/d。第12d,停止灌胃,处死。

1.2.3 肝组织匀浆相关指标及测定 取肝脏制备肝组织匀浆液,检测肝组织中蛋白质含量、超氧化物歧化酶(SOD)活力、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)含量,肿瘤坏死因子- α 和白介素- 1β 水平,均按试剂盒说明操作。

1.2.4 肝脏病理学检查 取肝组织用10%中性福尔马林固定,常规石蜡包埋,HE染色,普通光镜观察。

1.2.5 统计学处理 原始数据通过SPSS11.0软件中的ANOVA程序处理。

2 结果与分析

2.1 肝组织中SOD活力和MDA含量

与正常组比较,模型组小鼠肝组织匀浆中SOD的活性显著降低,MDA的含量显著上升。与模型组比较,黑米花青苜蓿复方胶囊低剂量和高剂量能显著升高小鼠肝脏中SOD活性,显著降低MDA的含量;两助悬剂组相对于正常组,SOD活力和MDA的含量差异不显著(见表1)。

从实验结果可以看出,模型组的GSH含量较低,但无统计学意义;两助悬剂组与正常组差异不显著;与模型组比较,黑米花青苜蓿复方胶囊低剂量和高剂量组都能显著提高肝组织中GSH的含量(见表2)。

2.2 肝组织中TNF- α 、IL- 1β 的水平

表1 肝组织中SOD的活力和MDA的含量($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Changes of SOD activity and MDA content in liver tissue ($\bar{x}\pm s$)

分组	SOD (U/mgprot)	MDA (nmol/mL)
正常组	67.66 $\pm$ 3.98 ^{ab}	2.24 $\pm$ 0.57 ^{ab}
模型组	48.17 $\pm$ 5.80 ^a	4.64 $\pm$ 0.52 ^{aa}
助悬剂 I 组	60.21 $\pm$ 7.68 ^{ab}	1.66 $\pm$ 0.37 ^{ab}
助悬剂 II 组	64.19 $\pm$ 9.72 ^{ab}	1.60 $\pm$ 0.12 ^{ab}
低剂量组	66.00 $\pm$ 1.96 ^{ab}	2.14 $\pm$ 0.44 ^{ab}
高剂量组	67.82 $\pm$ 6.05 ^{ab}	1.87 $\pm$ 0.51 ^{ab}

注:与正常组比较^a $p<0.05$,^{ap} $p<0.01$;与模型组比较^b $p<0.05$,^{bp} $p<0.01$;表2同。

表2 肝组织中GSH的含量、TNF- α 、IL- 1β 的水平($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Changes of GSH content and TNF- α 、IL- 1β level in liver tissue ($\bar{x}\pm s$)

分组	GSH (mg/mL)	TNF- α (pg/mL)	IL- 1β (pg/mL)
正常组	2.39 $\pm$ 0.15	18.94 $\pm$ 1.50	67.55 $\pm$ 30.68 ^b
模型组	1.84 $\pm$ 0.60	21.22 $\pm$ 2.89	100.96 $\pm$ 27.65 ^a
助悬剂 I 组	2.26 $\pm$ 0.32	15.54 $\pm$ 2.82 ^{ab}	83.89 $\pm$ 12.70
助悬剂 II 组	2.81 $\pm$ 0.41	16.01 $\pm$ 1.56 ^{ab}	58.46 $\pm$ 9.26 ^{ab}
低剂量组	3.80 $\pm$ 1.23 ^{ab}	12.85 $\pm$ 2.45 ^{ab}	84.27 $\pm$ 20.36
高剂量组	4.53 $\pm$ 1.36 ^{ab}	10.91 $\pm$ 1.17 ^{ab}	70.39 $\pm$ 23.67 ^b

与模型组比较,低剂量组、高剂量组TNF- α 水平差异极显著;低剂量组IL- 1β 水平差异不显著,而与高剂量组差异显著(见表2)。两助悬剂组与正常组比较,TNF- α 、IL- 1β 的水平差异都不显著(见表2)。

2.3 肝组织病理变化

正常组肝组织结构正常,肝小叶结构清楚,肝细胞条索明显,无变性坏死、炎性细胞细胞浸润以及纤维组织增生,具体见图1(a)。模型组肝细胞条索紊乱,小叶边缘呈纤维化,肝细胞结构不完整,细胞膜破损,胞浆疏松,胞质内可见大小不等、数量不一的脂肪空泡,炎性细胞细胞浸润,胆汁大量淤积,小叶内出现多个点状坏死,如图1(b)所示。助悬剂 I 组和助悬剂 II 组肝小叶结构基本清晰,肝细胞结构完整,无明显变性,如图1(c)、1(d)所示。低剂量组肝细胞条索状不明显,脂肪变性及炎症细胞浸润均较模型组减轻,无大片状坏死,如图1(e)所示。高剂量组肝小叶结构清晰,肝索无明显异常,接近正常状态,无明显病理变化,如图1(f)所示。

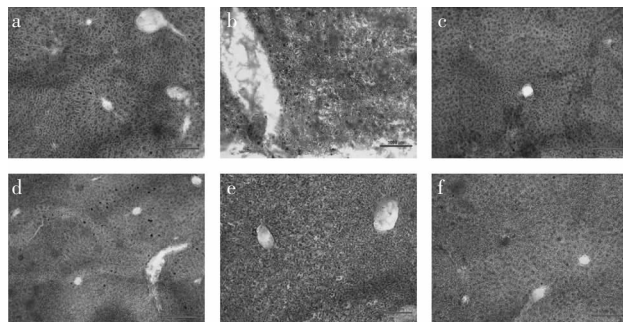


图1 各实验组小鼠肝脏组织形态学影响(HE)

Fig.1 Hepatic tissue of mice from different groups (HE)

注:a.正常组,b.模型组,c.助悬剂 I 组,d.助悬剂 II 组,e.低剂量组,f.高剂量组。

3 结果与讨论

目前,酒精性肝病(ALD)已经成为一种世界性疾病,发病率每年呈上升趋势,成为仅次于病毒性肝炎的第二大肝病。机体摄入的酒精90%~95%都是在肝脏中进行代谢,主要机制是通过产生过量氧自由基,导致肝细胞膜脂质过氧化及肝细胞损伤^[14]。本实验采用50%酒精灌胃的方法建立小鼠酒精性肝损伤模型,11d后,肝脏中的MDA的水平显著升高,SOD含量显著下降。病理组织学观察发现,肝脏出现纤维化,肝细胞脂肪变性明显,并伴有炎性细胞浸润、坏死。结果表明,本实验成功复制了小鼠酒精性肝损伤模型。

本实验中,低剂量组和高剂量组小鼠肝脏中SOD的活力显著升高,且随着药物浓度的增加而增强,表明黑米花青苷复方胶囊可诱导SOD的表达,提高机体清除自由基的能力。MDA含量的高低直接反映肝脏中脂质过氧化损伤程度,低剂量和高剂量药物都能显著降低肝脏中的MDA含量。说明黑米花青苷复方胶囊对肝脏的保护作用可能与增强机体清除自由基及抑制自由基反应的能力、防止过度脂质过氧化有关。但高剂量组与低剂量组之间没有差异。GSH作为机体细胞内重要的抗氧化组分,参与自由基的清除。长期饮酒者,肝细胞内谷胱甘肽含量明显降低或耗竭,以线粒体最为明显,从而加剧了线粒体结构和功能的损害。本研究通过测定GSH含量来反映谷胱甘肽过氧化物酶(GSH—PX)活性的高低。结果发现,黑米花青苷复方胶囊低剂量和高剂量都可以显著提高GSH的活性,由此可分析,黑米花青苷复方胶囊保肝作用可能还与其能够维持线粒体的正常结构有关。

TNF- α 和IL-1 β 是介入ALD损伤的重要炎症因子。在肝脏中TNF- α 主要由激活的Kupffer细胞产生,而酒精可间接激活Kupffer细胞^[15]。TNF- α 会引起许多与肝损伤有关的介质如IL-1 β 的出现,同时诱导其他炎性介质产生。另一方面,酒精诱导的TNF- α 的肝再生功能被逆转,反而诱导肝细胞的凋亡。有研究表明,TNF- α 基因被敲除的小鼠不会得酒精肝^[16]。在本实验中,低剂量组、高剂量组TNF- α 水平都显著下降,说明两药物具有减轻炎症因子对肝细胞造成损伤的作用。IL-1 β 的水平只有在高剂量组中明显降低,说明高剂量的药物能够减弱肝细胞的炎症反应。同时组织学观察,模型组小鼠肝细胞结构不完整,细胞膜破损,胞浆疏松,胞质内出现大量空泡,胆汁淤积,并伴有纤维化出现;低剂量和高剂量组症状都有所减轻,尤其高剂量组显著地改善肝小叶变性、坏死的范围和程度,进一步表明,黑米花青苷复方胶囊对酒精所致的肝损伤具有一定保护作用。

本研究中两助悬剂组灌胃植物油的量分别与低剂量组、高剂量组灌胃药物中的植物油量相同。而与

正常组比较,两助悬剂组的SOD活力、MDA含量、GSH和TNF- α 水平都没有影响,同时病理组织学观察,助悬剂组肝脏也无明显病变,说明它们不影响黑米花青苷复方胶囊的效果。因此,选用此助悬剂是较为安全的。

综上所述,黑米花青苷复方胶囊对小鼠酒精性肝损伤有较好的保护作用,但其确切机制尚需深入研究。

参考文献

- [1] 孔令瑶. 黑米中生物活性物质的研究[D]. 无锡:江南大学, 2008.
- [2] 曹小勇,李新生. 黑米花色苷类色素研究现状及展望[J]. 氨基酸和生物资源, 2002, 24(1): 3-6.
- [3] 王锋,邓洁,谭兴和,等. 花色苷及其共色作用研究进展[J]. 食品科学, 2008, 29(2): 472-476.
- [4] Seok H N, Sun P C, Mi Y K, et al. Antioxidative activities of bran extracts from twenty one pigmented rice cultivars[J]. Food Chemistry, 2006, 94: 613-620.
- [5] 王艳龙,石绍福,韩豪,等. 中国黑米花色苷研究现状及展望[J]. 中国生化药物杂志, 2010, 31(1): 63-66.
- [6] 李春阳,许时婴,王璋. 葡萄籽原花青素结构单元的红外光谱分析[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(4): 47-51.
- [7] Li xingsheng, Long shuming, Wu sanqiao, et al. Investigation of anthocyanin extraction from black rice and light stability of anthocyanin-containing alcoholic drink[J]. CIGR Journal, 2011, 13(Special issue): 151-159.
- [8] 吴三桥,史隋孝,丁锐,等. 黑米中花青苷色素的测定方法研究[J]. 氨基酸和生物资源, 2002, 24(3): 66-68.
- [9] 胡秋林. 黑米色素药理动物实验研究报告[J]. 武汉食品工业学院学报, 1997, 12(3): 10-12.
- [10] 秦玉,凌文华. 黑米花色苷提取物胶囊对高血脂症病人的降血脂作用[J]. 食品科学, 2008, 29(10): 540-542.
- [11] 杨靖亚,吴宏忠,胡峰,等. 天然抗氧化剂-抗癌转移的新途径[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2007, 12(4): 366-370.
- [12] Zhang Ming wei, Guo Bao jiang, Chi Jian wei, et al. Antioxidations and their correlation with total flavones and anthocyanin contents in different black rice varieties[J]. Agric Sci China, 2005, 38(7): 1324-1334.
- [13] 石绍福. 黑米花青苷组分分析及软胶囊研制[D]. 汉中:陕西理工学院, 2011.
- [14] 李业钊,李航. 乙醇代谢酶与乙醇性肝损伤[J]. 医学综述, 2008, 14(18): 2788-2791.
- [15] Horie Y, Kato S, Ohki E, et al. Hepatic micro vascular dysfunction in endotoxemic rats after acute ethanol administration[J]. Alcohol Clin Exp Res, 2000, 24(5): 691-698.
- [16] Kishore R, Hill J R, McMullen M R, et al. ERK 1/2 and Egr-1 contribute to increased TNF- α production in rat Kupffer cells after chronic ethanol feeding[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002, 282(1): 6-15.