

椒样薄荷多酚对CCl₄所致小鼠肝损伤的保护作用

吕 爽^{1,2},田呈瑞^{1,*}

(1.陕西师范大学食品工程与营养科学学院,陕西西安 710062;

2.西安市农业技术推广中心,陕西西安 710065)

摘要:本文研究了椒样薄荷多酚对CCl₄所致小鼠急性肝损伤的保护作用。结果表明:椒样薄荷多酚高剂量灌胃处理(400 mg/kg BW·d)显著抑制了小鼠血清中碱性磷酸酶(AKP)、血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)活力的升高($p<0.05$)；肝脏病理组织切片观察结果显示,椒样薄荷多酚高剂量灌胃处理小鼠肝细胞结构完整,只有点状坏死,无大面积坏死,进一步表明椒样薄荷多酚对CCl₄所致小鼠肝损伤具有保护作用；另外,椒样薄荷多酚高剂量灌胃处理显著抑制了小鼠血清中总胆固醇(TC)和甘油三酯(TG)含量的升高($p<0.05$)；显著增强了肝脏中超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)两种抗氧化酶活力,显著增强了总抗氧化能力(T-AOC),显著降低了肝脏中丙二醛(MDA)含量($p<0.05$)。说明椒样薄荷多酚在预防和改善肝损伤方面具有一定的应用开发潜力。

关键词:椒样薄荷,多酚,小鼠,肝损伤,保护作用

Protective effect of peppermint polyphenols on CCl₄-induced liver damage in mice

LV Shuang^{1,2}, TIAN Cheng-rui^{1,*}

(1. College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China;

2. Xi'an Agriculture Technology and Popularization Center, Xi'an 710065, China)

Abstract: The protective effect of peppermint polyphenols on CCl₄-induced liver damage in mice was studied in this paper. The results showed that the high dosage treatment(400 mg/kg BW·d) by gavage of peppermint polyphenols significantly inhibited the increase of AKP, ALT, AST activity ($p<0.05$). The pathological tissue biopsies showed that liver cells of mice in high dose group remained intact with a little spotty necrosis, and had no large necrosis area, it further indicated the peppermint polyphenols had protective effect on liver damaged by CCl₄. On the other, the high dosage treatment by gavage of peppermint polyphenols significantly inhibited the elevation of content of TC and TG in serum, and increased the SOD, CAT and T-AOC level in liver, and decreased the content of MDA in liver ($p<0.05$). It showed that peppermint polyphenols had potential to be developed in the aspect of preventing and improving liver damage.

Key words: peppermint; polyphenols; mice; liver damage; protective effect

中图分类号:TS201.1

文献标识码:A

文 章 编 号:1002-0306(2015)22-0358-04

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2015.22.065

CCl₄肝损伤动物模型是目前公认的用来评价肝细胞损伤保护药物的经典动物模型,其表现出来的症状、肝功能检测指标、肝脏病理改变与病毒性肝炎具有相似性^[1]。CCl₄在肝细胞内经过P450 2E1代谢产生三氯甲基自由基(\cdot CCl₃)、二氯甲基自由基(\cdot CCl₂)及过氧化甲基自由基(CCl₃OO \cdot)^[2],其引起了细胞膜和细胞器膜不饱和脂肪酸的过氧化,从而改变了细胞膜的流动性和通透性,破坏了细胞膜的完整性和

正常结构,损伤了肝细胞^[3]。肝损伤除了影响到患者的日常生活,还会引发其他并发症,如继发性出血和急性肝肾功能衰竭等。目前一般采用保肝降酶药物治疗方法,氧化应激是肝损伤的重要原因之一,一些抗氧化剂也可以预防肝损伤。目前国内外对于椒样薄荷的研究主要集中在其精油组分和功效性方面,而对于椒样薄荷多酚的研究较少。本文利用CCl₄所致小鼠肝损伤模型,评价了椒样薄荷多酚对小鼠肝

收稿日期:2015-03-20

作者简介:吕爽(1979-),女,博士研究生,主要从事植物资源开发利用方面的研究,E-mail:gracely79@163.com。

* 通讯作者:田呈瑞(1956-),男,教授,主要从事植物资源开发利用方面的研究,E-mail:12502242@qq.com。

基金项目:国家星火计划项目(2007EA851010)。

损伤的保护作用,以期为椒样薄荷多酚多元化开发利用提供一定的数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

椒样薄荷多酚 在西安市农科所三桥农业科技示范园采摘椒样薄荷生殖生长期叶片,用甲醇超声波提取后,滤液真空30℃旋转蒸发浓缩至5 mL左右,将其真空冷冻干燥,用纯净水配制成低、中、高三个剂量组,椒样薄荷多酚含量的测定采用福林酚比色法^[4],以没食子酸为参照标准品,多酚含量为11.6%±1.1% (*n*=6);生理盐水、四氯化碳 购自广东光华化学厂有限公司;联苯双酯滴丸 购自北京协和制药厂;甘油三脂(TG)测定试剂盒、总胆固醇(TC)测定试剂盒、丙二醛(MDA)测定试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒、过氧化氢酶(CAT)测定试剂盒、血清谷丙转氨酶(ALT)测定试剂盒、谷草转氨酶(AST)测定试剂盒和碱性磷酸酶(AKP)测定试剂盒 购自南京建成生物工程研究所;昆明种雄性小鼠 清洁级,许可证号SCXK(京)2011-0012,购自北京大学医学部实验动物科学部。

LGJ-18C冷冻干燥机 北京四环科学仪器厂;FSH-2可调高速匀浆机 金坛市盛蓝仪器制造有限公司;LS-100石蜡包埋机 沈阳市龙首电子仪器有限公司;HY325B石蜡切片机 北京东方德教育科技有限公司;ME21(MSHOT)光学显微镜 日本奥林巴斯(Olympus)公司;Multiskan Go全波长酶标仪 美国热电(上海)科技仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组及给药 将小鼠适应性喂养30 d,随机分为6组,分别为正常对照组、模型对照组、阳性对照组和椒样薄荷多酚低、中、高剂量组,每组10只。椒样薄荷多酚低、中、高剂量组灌药剂量分别为100、200、400 mg/kg BW·d,阳性对照组灌胃联苯双酯(将联苯双酯滴丸以羧甲基纤维素钠溶液溶解)剂量为200 mg/kg BW·d,每天灌胃一次,每次0.5 mL,连续30 d。正常对照组及模型对照组的小鼠给予等量生理盐水。各组小鼠自由摄食、饮水。每周称体重一次,以调整灌胃体积。末次给药2 h后模型对照组、阳性对照组和椒样薄荷多酚低、中、高剂量组腹腔注射0.3 mL 1% (v/v) CCl₄植物油溶液,正常对照组腹腔注射0.3 mL植物油,禁食,自由饮水。禁食12 h后,将小鼠称重后眼眶取血,在常温下1500 r/min离心15 min,37℃放置0.5 h后于2000 r/min离心10 min,分离血清备用。

1.2.2 体重及免疫器官的测定 小鼠处死后,立即摘取肝脏和脾脏,去除系膜及脂肪,用生理盐水漂洗,并用滤纸吸干水分后称重,按照下式计算肝脏指数和脾脏指数^[5]。

$$\text{肝脏指数}(\text{mg/g}) = \text{肝脏质量}/\text{体重} \quad \text{式}(1)$$

$$\text{脾脏指数}(\text{mg/g}) = \text{脾脏质量}/\text{体重} \quad \text{式}(2)$$

1.2.3 血清指标的测定 血清碱性磷酸酶(AKP)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)活性及总胆固醇(TC)、甘油三脂(TG)含量测定方法参考各试剂盒说明书。

1.2.4 肝脏指标的测定 将小鼠肝脏加10倍生理盐水充分研磨,制成10% (m/v)的肝匀浆,以3000 r/min离心10 min,取上清液,按照试剂盒说明书,采用分光光度法测定过氧化氢酶(CAT)活力、超氧化物歧化酶(SOD)活力、丙二醛(MDA)含量、总抗氧化能力(T-AOC)。

1.2.5 肝脏组织病理学观察 将各组小鼠的新鲜肝脏切成小块,用10%福尔马林固定,脱水后进行石蜡包埋,然后经过切片和脱蜡处理,利用常规HE染色后,在光学显微镜下观察肝脏细胞的病理形态学变化。

1.3 数据处理

实验数据表示为平均值±标准差($\bar{X}\pm SD$),采用Excel 2007和SPSS 17.0统计软件进行数据处理、显著性检验。

2 结果与分析

2.1 椒样薄荷多酚对CCl₄所致急性肝损伤小鼠肝脏指数和脾脏指数的影响

椒样薄荷多酚对CCl₄所致急性肝损伤小鼠肝脏指数和脾脏指数的影响见表1。

表1 各组小鼠肝脏指数和脾脏指数($\bar{X}\pm SD$, *n*=10)

Table 1 Liver and spleen index of mice in each group ($\bar{X}\pm SD$, *n*=10)

组别	肝脏指数(mg/g)	脾脏指数(mg/g)
正常组	41.68±2.71 ^c	3.52±0.23 ^c
模型组	52.11±2.87 ^a	4.52±0.43 ^a
阳性组	44.92±2.05 ^d	3.74±0.37 ^{bc}
低剂量组	50.49±4.02 ^{ab}	4.35±0.46 ^{ab}
中剂量组	48.10±1.90 ^{bc}	4.09±0.51 ^{abc}
高剂量组	47.23±2.59 ^{cd}	3.92±0.24 ^{abc}

注:同列不同字母表示显著性差异(*p*<0.05);表2~表4同。

从表1可知,与正常组相比,模型组肝脏指数和脾脏指数显著升高(*p*<0.05),表明CCl₄造模能够引起小鼠的肝脏、脾脏肿大。与模型组相比,阳性组(联苯双酯药物)和椒样薄荷多酚中剂量、高剂量组能够降低小鼠肝脏指数,统计学分析具有显著性差异(*p*<0.05),且高剂量组与阳性组(联苯双酯药物)效果无显著性差异,说明椒样薄荷多酚中、高剂量组能够抑制CCl₄所致小鼠肝脏肿大现象。与模型组相比,阳性组(联苯双酯药物)能够降低脾脏指数(*p*<0.05),椒样薄荷多酚低剂量、中剂量和高剂量组脾脏指数虽有所减少,但统计学分析显示与模型组无显著性差异。

2.2 椒样薄荷多酚对CCl₄所致急性肝损伤小鼠血清AKP、ALT和AST活力的影响

椒样薄荷多酚对CCl₄所致急性肝损伤小鼠血清AKP、ALT和AST活力的影响结果见表2。

血清中AKP活力的升高可作为衡量肝脏受损程度的指标之一。从表2可知,与正常组相比,模型组AKP活力显著升高(*p*<0.05)。阳性组和椒样薄荷多酚中剂量组和高剂量组血清中AKP活力显著低于模型组AKP活力(*p*<0.05),其中,中、高剂量组效果无显著性差异。

表2 椒样薄荷多酚对小鼠血清AKP、ALT和AST活力的影响
($\bar{X} \pm SD$, n=10)

Table 2 Effect of peppermint polyphenols on AKP, ALT, and AST activities in serum of mice ($\bar{X} \pm SD$, n=10)

组别	AKP(U/L)	ALT(U/L)	AST(U/L)
正常组	60.71±5.90 ^c	29.34±4.92 ^c	33.34±3.61 ^c
模型组	113.44±12.54 ^a	125.60±11.54 ^a	103.58±8.04 ^a
阳性组	69.12±13.24 ^c	65.51±9.46 ^d	58.84±10.88 ^d
低剂量组	107.25±10.77 ^a	102.39±15.15 ^b	92.39±7.52 ^b
中剂量组	91.63±10.82 ^b	89.06±9.57 ^c	73.42±12.98 ^c
高剂量组	82.60±10.31 ^b	77.45±13.49 ^c	75.55±11.04 ^c

如果1%的肝细胞坏死,可以使血清中ALT浓度增加1倍^[6]。从表2可知,与正常组相比,模型组ALT活力显著增加($p<0.05$)。统计学分析显示,阳性组和椒样薄荷多酚低剂量、中剂量、高剂量组ALT活力均显著低于模型组($p<0.05$),其中,中、高剂量组效果无显著性差异。

血清中AST活力上升是炎症的指标,也是组织坏死的重要指标^[7]。只有肝脏发生严重坏死和破坏时,才会引起血清中AST活力升高。从表2可知,与正常组相比,模型组AST活力有显著升高($p<0.05$),统计学分析显示,阳性组和椒样薄荷多酚低剂量、中剂量、高剂量组中AST活力显著($p<0.05$)低于模型组,且中、高剂量组效果无显著性差异。

2.3 椒样薄荷多酚对CCl₄所致急性肝损伤小鼠血清中TC和TG含量的影响

椒样薄荷多酚对CCl₄所致急性肝损伤小鼠血清中TC和TG含量的影响结果见表3。

表3 椒样薄荷多酚对小鼠血清中TC、TG含量的影响
($\bar{X} \pm SD$, n=10)

Table 3 Effect of peppermint polyphenols on the content of TC and TG in serum of mice ($\bar{X} \pm SD$, n=10)

组别	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)
正常组	4.33±0.47 ^d	1.16±0.18 ^c
模型组	5.54±0.48 ^a	1.99±0.26 ^a
阳性组	4.58±0.54 ^{cd}	1.40±0.22 ^d
低剂量组	5.31±0.29 ^{ab}	1.87±0.26 ^{ab}
中剂量组	5.08±0.52 ^{abc}	1.66±0.20 ^{bc}
高剂量组	4.79±0.59 ^{bcd}	1.54±0.25 ^{cd}

从表3可以看出,与正常组相比,模型组血清中TC和TG含量均显著升高($p<0.05$),说明CCl₄引起肝损伤后会导致小鼠血清中TC和TG含量的积累,而给予椒样薄荷多酚不同剂量组给药后,TC和TG含量均有不同程度的降低。统计学分析显示,椒样薄荷多酚高剂量组TC含量显著低于模型组($p<0.05$),且与正常组和阳性组无显著性差异,TG含量也显著低于模型组($p<0.05$),且与阳性组无显著性差异。

2.4 椒样薄荷多酚对CCl₄所致急性肝损伤小鼠抗氧化能力的影响

椒样薄荷多酚对CCl₄所致急性肝损伤小鼠抗氧

化能力的影响见表4。

表4 椒样薄荷多酚对小鼠肝脏抗氧化能力的影响($\bar{X} \pm SD$, n=10)

Table 4 Effect of peppermint polyphenols on antioxidant activities in liver of mice ($\bar{X} \pm SD$, n=10)

组别	CAT (U/mg prot)	SOD (U/mg prot)	MDA (nmol/mg prot)	T-AOC (U/mg prot)
正常组	22.24±2.78 ^a	38.53±4.84 ^a	3.02±0.29 ^d	1.61±0.12 ^a
模型组	15.49±1.12 ^d	29.80±4.33 ^c	8.08±0.89 ^a	1.01±0.15 ^c
阳性组	20.14±2.54 ^b	36.20±4.76 ^a	5.13±0.93 ^c	1.43±0.12 ^b
低剂量组	16.26±1.36 ^{cd}	31.24±4.87 ^{bc}	7.33±1.17 ^{ab}	1.11±0.15 ^{cd}
中剂量组	18.27±1.87 ^{bc}	34.42±4.19 ^{abc}	6.86±0.85 ^b	1.23±0.13 ^{cd}
高剂量组	18.13±1.52 ^{bc}	35.06±3.23 ^{ab}	5.94±0.71 ^c	1.34±0.11 ^{bc}

SOD是体内将活性氧自由基代谢的主要功能性酶,它能将细胞内外产生的活性氧自由基代谢成过氧化氢,生成的过氧化氢在CAT和谷胱甘肽过氧化酶的催化下能分解成水,从而清除自由基,抑制细胞和组织的氧化损伤^[8]。从表4可看出,与正常组相比,模型组中SOD酶活及CAT酶活均显著降低($p<0.05$),阳性组和椒样薄荷多酚高剂量组中SOD酶活显著高于模型组($p<0.05$),阳性组和椒样薄荷多酚中、高剂量组CAT酶活显著高于模型组($p<0.05$)。统计学分析显示,高剂量组中SOD酶活与正常组和阳性组均无显著性差异,CAT酶活与阳性组无显著性差异。

MDA含量的高低可以反映细胞受自由基攻击的程度^[9]。从表4可看出,与正常组相比,模型组中MDA含量显著提高($p<0.05$),与模型组相比,阳性组和椒样薄荷多酚中、高剂量组肝脏中MDA含量显著降低($p<0.05$),统计学分析显示,高剂量组与阳性组效果无显著性差异。

T-AOC能力指机体整个氧化防御体系的状态,该体系主要通过三种途径发挥氧化防御的作用:一是消除自由基和活性氧以免引发脂质过氧化;二是分解过氧化氢物,阻断过氧化链;三是螯合对氧化起催化作用的金属离子^[10]。从表4可看出,与正常组相比,模型组T-AOC能力显著降低($p<0.05$),与模型组相比,阳性组和椒样薄荷多酚中、高剂量组T-AOC能力显著提高($p<0.05$),且高剂量组与阳性组效果无显著性差异。

2.5 椒样薄荷多酚对CCl₄所致急性肝损伤小鼠肝脏组织形态学的影响

不同实验组中小鼠肝脏病理组织学观察结果见图1。

病理组织学切片结果显示,正常组的小鼠肝细胞排列整齐,形态正常,结构完整且胞浆丰富,细胞核大而圆,核质分布均匀(见图1A)。模型组肝细胞具有明显损伤,主要表现为肝细胞发生肿胀或破裂,细胞核大小不等,呈现不同程度固缩,细胞质疏松,肝细胞有点状及碎片状坏死,坏死处,肝细胞有弥漫性水肿,部分肝细胞发生水样变性,且细胞胞浆空泡明显(图1B)。阳性对照组未见肝细胞肿胀或破裂,有部分肝细胞胞浆疏松,有点状坏死,部分细胞核发生一

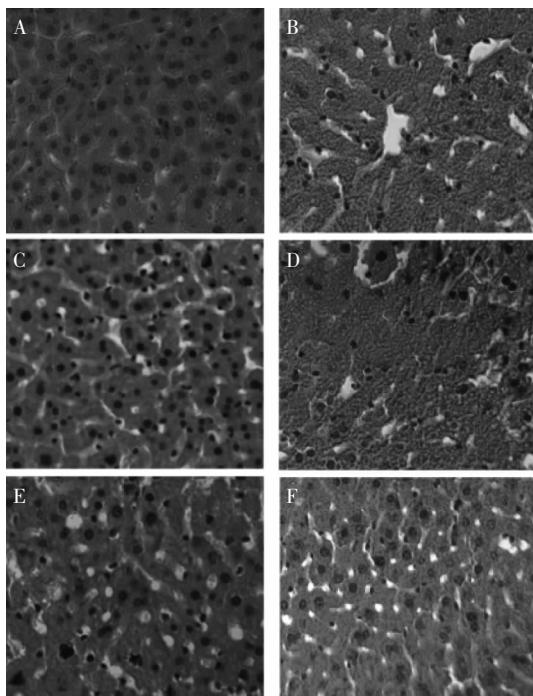


图1 小鼠肝组织病理学形态观察(HE×400)

Fig.1 Hepatic pathological observations of mice (HE×400)

注: A正常组, B模型组, C阳性组, D低剂量组, E中剂量组, F高剂量组。

定程度固缩(图1C)。椒样薄荷多酚低、中剂量组肝细胞表现出点状或片状坏死,部分细胞破裂,细胞核发生不同程度固缩(图1D~E)。椒样薄荷多酚高剂量组小鼠肝细胞排列整齐,结构完整,部分肝细胞胞浆疏松,有点状坏死,而无大片坏死,有少部分细胞核发生一定程度固缩(图1F)。

3 结论

3.1 椒样薄荷多酚中、高剂量组对CCl₄所致小鼠肝脏肿大现象保护作用显著,对脾脏肿大现象无显著保护作用。

3.2 高剂量椒样薄荷多酚能够抑制CCl₄所致肝损伤小鼠血清中AKP、ALT和AST酶活力升高,但抑制效果不如联苯双酯药物。小鼠肝脏病理组织切片观察结果表明,椒样薄荷多酚高剂量组小鼠肝细胞结构

完整,只有点状坏死,无大面积坏死,进一步说明高剂量椒样薄荷多酚对CCl₄所致小鼠肝损伤具有一定保护作用。

3.3 高剂量椒样薄荷多酚显著抑制CCl₄所致肝损伤小鼠血清中TC和TG含量的升高,其效果与联苯双酯药物相当。

3.4 高剂量椒样薄荷多酚显著抑制CCl₄所致小鼠肝脏中SOD和CAT两种抗氧化酶活力降低,且对于MDA含量的升高和T-AOC能力的降低也有显著的抑制作用,效果均与联苯双酯药物相当。

参考文献

- [1] Werber LW, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model[J]. Critical Reviews in Toxicology, 2001, 33(2): 105–132.
- [2] Malekinejad H, Alizadeh A, Cheraghi H, et al. The protective effect of liquorice plant extract on CCl₄-induced hepatotoxicity in common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. Proceedings of the Veterinary Research Forum, 2010, 1(3): 158–164.
- [3] Adzet T, Camarasa J, Laguna JC. Hepatoprotective activity of polyphenolic compounds from *Cynara scolymus* against CCl₄ toxicity in isolated rat hepatocytes[J]. Journal of Natural Products, 1987, 50(4): 612–617.
- [4] 凌关庭. 抗氧化食品与健康[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 342–343.
- [5] 杜蓉, 王晓洁, 阮新, 等. 富锗大麦苗对小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 食品科学, 2009, 30(21): 371–373.
- [6] 史坤, 张泽生, 张民, 等. 苹果多酚对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国食品学报, 2011, 11(3): 9–12.
- [7] 王忠壮, 万鲲, 胡晋红, 等. 平肝胶囊及太白楳木对大鼠急性肝损伤的研究[J]. 中国药学杂志, 2002, 37(3): 186–188.
- [8] 昌友权, 杨世杰, 李红, 等. 肉豆蔻提取物对GaIN致大鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(1): 118–119.
- [9] Zhang Y, Jia Y, Yang M, et al. The impaired disposition of probe drugs is due to both liver and kidney dysfunctions in CCl₄-model rats[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2012, 33(3): 453–458.
- [10] 伍小燕, 唐爱存. 含羞草总黄酮对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 实用临床医药杂志, 2010, 14(19): 9–11.
- [15] Bi Y, Tian S, Liu H, et al. Effect of temperature on chilling injury, decay and quality of Hami melon during storage [J]. Postharvest Biology and Technology, 2003, 29(2): 229–232.
- [16] Flores H E, Galston A W. Analysis in higher plants by high performance liquid chromatography[J]. Journal of Plant Physiology, 1982, 69(1): 701–705.
- [17] 刘俊, 吉晓佳, 刘有良. 检测植物组织中多胺含量的高效液相色谱法[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(6): 596–598.
- [18] 罗自生, 席筠芳, 楼健. 热处理减轻柿果冷害与内源多胺的关系[J]. 中国农业科学, 2003, 36(4): 429–432.
- [19] 季作梁, 洪汉君, 张昭其, 等. 多胺与芒果贮藏冷害的研究[J]. 热带作物学报, 1998, 19(3): 28–32.
- [20] Zhang X H, Shen L, Li F J, et al. Hot air treatment-induced arginine catabolism is associated with elevated polyamines and proline levels and alleviates chilling injury in postharvest tomato fruit[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2013, 93(4): 3245–3251.
- [21] Cao S F, Yang Z F, Zheng Y H. Effect of 1-methylcyclopene on senescence and quality maintenance of green bell pepper fruit during storage at 20 °C[J]. Postharvest Biology and Technology, 2012, 70: 1–6.
- [22] Jiang Y M, Chen F A. Study on polyamine change and browning of fruit during cold storage of lychee (*Litchi chinensis Sonn.*)[J]. Postharvest Biology and Technology, 1995, 5(3): 245–250.