

角鲨烯对小鼠急性酒精性肝损伤的保护作用

缪云萍¹, 陈爱瑛¹, 夏志国², 诸葛定娟¹, 程敏¹, 董文彬¹, 郑高利^{1,*}

(1.浙江省医学科学院, 浙江杭州 310013;

2.浙江海力生研究院, 浙江舟山 316000)

摘要:目的:研究角鲨烯对急性酒精性肝损伤的保护作用。方法:60只ICR小鼠随机分为正常组,模型组,阳性组,角鲨烯高、中、低剂量组。正常组和模型组灌胃等体积花生油,阳性组灌胃葵花牌护肝片350 mg/kg;角鲨烯高、中、低剂量组分别灌胃角鲨烯500、250、125 mg/kg,每日1次,30 d后制备急性酒精性肝损伤模型。模型制备16 h后检测肝脏系数,血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)和甘油三酯(TG)水平及肝脏丙二醛(MDA)和还原型谷胱甘肽(GSH)含量。结果:角鲨烯可明显降低血清ALT、AST、TG水平,降低肝组织MDA含量,并提高肝组织GSH含量,且呈明显的剂量依赖性,大剂量还能明显降低肝损伤小鼠的肝脏系数。结论:角鲨烯对小鼠急性酒精性肝损伤具有明显的保护作用,其机制可能与其抗氧化作用有关。

关键词:角鲨烯,肝损伤,酒精,抗氧化

Protective effects of squalene on acute alcohol-induced liver injury in mice

MIAO Yun-ping¹, CHEN Ai-ying¹, XIA Zhi-guo², ZHUGE Ding-juan¹, CHENG Min¹,
DONG Wen-bin¹, ZHENG Gao-li^{1,*}

(1.Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China;

2.Zhejiang Institute of Hailisheng, Zhoushan 316000, China)

Abstract: Objective: To study the protective effects of squalene on acute alcohol-induced liver injury in mice. Methods: Sixty ICR mice were randomly divided into normal group, model group, positive group, and high, midium, low dose group of squalene. The mice of normal group and model group were given peanut oil, positive group were given 350 mg/kg huganpian, and high, midium, low dose group of squalene were given 500 mg/kg, 250 mg/kg, 125 mg/kg squalene. After 30 days ethanol were given to all groups except the normal. The level of glutamic-pyruvic transaminase (ALT), glutamic oxaloacetic transaminase (AST), triglyceride (TG) in serum and the content of malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH) in liver were detected. Results: Squalene could reduce the level of ALT, AST, TG and MDA, and improve the content of GSH. Conclusion: Squalene could protect against acute alcoholic hepatic injury in mice, possibly due to its antioxidant effect.

Key words: squalene; liver injury; alcohol; antioxidant

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)16-0364-03

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.16.065

角鲨烯(squalene)又名鲨烯,于1906年首次从鲨鱼肝脏中分离得到,化学名为2,6,10,15,19,23-六甲基-2,6,10,14,18,22-二十四碳六烯,是一种高度不饱和烃类化合物^[1]。角鲨烯具有增强机体免疫功能、抗氧化、抗衰老、抗疲劳、抗肿瘤等多种生理功能,常被添加到功能性食品和化妆品中^[2-3],但目前尚未见有保肝护肝作用的文献报道。酒精是最常见的

肝脏毒物之一,过量饮酒可致肝脏损伤^[4]。我国酒类消费人群数量庞大,随着酒类消耗量的增加,人们饮食结构的改变,近年来酒精所致的肝损伤呈逐年上升趋势,酒精已成为继病毒性肝炎后导致肝损伤的第二大病因^[5]。目前除戒酒和支持性治疗外,尚无令人满意的酒精性肝损伤防治方法,开发安全有效的防治药物或功能性食品具有重要的临床意义^[6]。本研

收稿日期:2014-12-05

作者简介:缪云萍(1970-),女,硕士,高级实验师,研究方向:新药开发与评价,E-mail:miaoyunping70@163.com。

*通讯作者:郑高利(1963-),男,博士,研究员,研究方向:新药药理与毒理,E-mail:gaoli-z@163.com。

基金项目:国家“重大新药创制”科技重大专项(2013ZX09303005);浙江省医学重点学科群项目(XKQ-010-001)。

究以酒精灌胃制备小鼠急性酒精性肝损伤模型^[7],观察角鲨烯对急性酒精性肝损伤的保护作用,并探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

ICR小鼠 体重18~22 g,雄性,清洁级,由浙江省实验动物中心提供,动物合格证:0014466,动物许可证SCXK(浙)20080033;角鲨烯 含量95%,由浙江海力生生物技术有限公司提供,使用时用花生油配制成25、12.5、6.25 mg/mL的溶液待用;葵花牌护肝片 批号:201305197,购自黑龙江葵花药业股份有限公司,碾磨后用花生油配制成17.5 mg/mL的混悬液待用;无水乙醇 分析纯,使用时蒸馏水稀释成体积分数50%乙醇;三氯醋酸、硫代巴比妥酸、正丁醇等 均为国产分析纯;谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)检测试剂盒 批号分别为:P1404011、P1310011,购自南京建成生物工程研究所;甘油三脂(TG)检测试剂盒 批号:20140328,购自宁波赛克生物科技有限公司;还原型谷胱甘肽(GSH)检测试剂盒 批号:0202251402,购自上海碧云天生物技术有限公司。

BA-815型半自动生化分析仪 上海三科仪器有限公司;MagNA Lyser全自动样品匀浆系统 美国Roche公司;Sartorius BS100S型电子分析天平 北京赛多利斯天平有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组与处理 小鼠随机分为6组,每组10只,分别为正常组,模型组,阳性组,角鲨烯高、中、低剂量组。小鼠灌胃体积为20 mL/kg,正常组和模型组给予等体积花生油,阳性组给予葵花牌护肝片350 mg/kg,角鲨烯高、中、低剂量组分别灌胃给予角鲨烯500、250、125 mg/kg。动物每天给药1次,连续30 d。末次给药后2 h,模型组及各用药组一次性灌胃给予50%乙醇20 mL/kg,正常组给予等体积蒸馏水。

1.2.2 样品采集及指标测定 血清处理及指标测定:小鼠在给予酒精后,禁食不禁水16 h,摘眼球取血,于37 °C水浴10 min,3000 r/min离心5 min,分离出血清,用生化分析仪测定ALT、AST、TG含量。

肝匀浆处理及指标测定:小鼠取血后脱臼处死,迅速取肝脏,用预冷的0.9%生理盐水清洗,滤纸吸干表面水分,称肝重,并计算脏器系数(脏器湿重/体重×100);快速称取0.3 g右叶肝组织,加入预冷的生理盐水,全自动样品匀浆系统制成30%的肝匀浆,硫代巴比妥酸比色法测定MDA含量,二硫代二硝基苯甲酸比色法测定GSH含量,具体操作按相关说明书进行。

1.2.3 数据处理 实验数据以均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用SPSS 16.0软件进行分析。多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),两组间比较采用 q 检验, $p<0.05$ 代表差异有显著性意义, $p<0.01$ 代表差异有极显著性意义。

2 结果与分析

2.1 一般观察

除正常组外,其余各组小鼠乙醇灌胃后,均表现

出不同程度的兴奋、步态不稳、呼吸急促等现象,然后活动开始减少,部分小鼠出现昏睡。角鲨烯各剂量组对酒精诱导的小鼠兴奋及后期的昏睡期状态无明显影响。

2.2 角鲨烯对小鼠体重和肝脏系数的影响

由表1可知,连续30 d灌胃给予角鲨烯500、250、125 mg/kg对小鼠体重无明显影响。酒精造模后小鼠肝脏肿胀明显,肝脏系数极显著($p<0.01$)提高。角鲨烯500 mg/kg可抑制酒精诱导的小鼠肝脏肿胀,明显降低肝脏系数。

表1 角鲨烯对小鼠体重和肝脏系数的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Effect of squalene on body weight and liver index ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量 (mg/kg)	体重(g)		肝脏系数 (g/100g)
		0 d	30 d	
正常组		18.4±2.6	34.1±3.8	3.77±0.13
模型组		18.6±2.5	33.5±4.3	4.56±0.28 ^{##}
阳性组	350	18.6±2.9	32.5±4.3	4.09±0.18 ^{**}
角鲨烯高剂量组	500	18.3±2.7	33.6±4.6	4.19±0.30 [*]
角鲨烯中剂量组	250	18.3±2.6	33.6±5.8	4.35±0.20
角鲨烯低剂量组	125	18.4±2.6	33.3±4.3	4.42±0.56

注:与正常组比较: #代表差异显著($p<0.05$), ##代表差异极显著($p<0.01$); 与模型组相比: *代表差异显著($p<0.05$), **代表差异极显著($p<0.01$); 表2、表3同。

2.3 角鲨烯对血清ALT、AST、TG水平的影响

由表2可知,酒精可诱导肝损伤,使血清中肝功能相关酶ALT和AST水平明显升高,并极显著($p<0.01$)提高血清TG含量。与模型组比较,角鲨烯各剂量组均可显著($p<0.05$)降低血清TG含量,角鲨烯500 mg/kg组的血清ALT和AST水平显著($p<0.05$)降低,250 mg/kg组血清AST水平显著($p<0.05$)降低。总之,角鲨烯可剂量依赖性的降低血清ALT、AST、TG水平。

表2 角鲨烯对小鼠血清ALT、AST及TG水平的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of squalene on mouse serum ALT, AST and TG levels ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量 (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	TG (mmol/L)
正常组		40.5±7.4	109±36	1.62±0.22
模型组		103.7±34.4 ^{##}	171±38 [#]	3.17±1.33 ^{##}
阳性组	350	70.3±9.7 [*]	121±37 [*]	1.87±0.75 [*]
角鲨烯高剂量组	500	76.9±20.4 [*]	132±31 [*]	1.77±0.65 ^{**}
角鲨烯中剂量组	250	98.0±32.0	138±29 [*]	1.92±0.88 [*]
角鲨烯低剂量组	125	89.6±25.8	140±39	1.78±0.83 [*]

2.4 角鲨烯对肝脏MDA、GSH含量的影响

由表3可知,酒精引起小鼠肝损伤的同时,诱导抗氧化系统损伤,可显著($p<0.05$)降低肝脏GSH水平,并极显著($p<0.01$)提高过氧化产物MDA含量。角鲨烯500、250 mg/kg组均可显著($p<0.05$)升高肝脏GSH

(下转第377页)

- 单胞菌病技术的建立[J]. 湖南农业科学, 2010(4):126-128.
- [32] CHIANG Y, TSEN H, CHEN H, et al. Multiplex PCR and a chromogenic DNA macroarray for the detection *Listeria monocytogens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterobacter sakazakii*, *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp. and *Pseudomonas fluorescens* in milk and meat samples[J]. Journal of Microbiological Methods, 2012, 88(1):110-116.
- [33] 于艳艳, 丁甜, 刘东红. 原料乳中嗜冷菌快速检测新技术研究进展[J]. 食品工业科技, 2014, 35(11):359-362.
- [34] 李萍, 温平威, 许恒毅, 等. 流式细胞术在食源致病菌检测中应用的研究进展[J]. 食品工业科技, 2013, 34(14):375-379.
- [35] 何世斌, 柴连琴, 谭珺隽, 等. 荧光原位杂交技术的研究进展[J]. 植物科学学报, 2014(2):199-204.

- [36] 张森, 陈瑛, 吴忆宁, 等. 荧光原位杂交技术的应用进展[J]. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 2014(6):90-93.
- [37] YAMAGUCHI N, KITAGUCHI A, NASU M. Selective enumeration of viable *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. in milk within 7h by multicolor fluorescence *in situ* hybridization following microcolony formation[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2012, 113(6):746-750.
- [38] WANG Y, HAMMES F, DE ROY K, et al. Past, present and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology[J]. Trends in Biotechnology, 2010, 28(8):416-424.
- [39] R GER M, ACKERMANN M, REICHL U. Species-specific viability analysis of *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* and *Staphylococcus aureus* in mixed culture by flow cytometry[J]. BMC Microbiology, 2014, 14(1):56.

(上接第365页)

含量,降低肝脏MDA水平,呈明显的剂量依赖性。

表3 角鲨烯对小鼠肝脏MDA、GSH含量的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)
Table 3 Effect of squalene on MDA and GSH contents in mouse liver ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量(mg/kg)	MDA(nmol/g)	GSH(μ mol/g)
正常组		34.0 \pm 10.4	0.915 \pm 0.396
模型组		74.9 \pm 27.9 ^{##}	0.586 \pm 0.247 [#]
阳性组	350	46.1 \pm 26.4 [*]	0.853 \pm 0.283 [*]
角鲨烯高剂量组	500	22.82 \pm 7.0 ^{**}	0.896 \pm 0.375 [*]
角鲨烯中剂量组	250	44.6 \pm 24.1 [*]	0.878 \pm 0.296 [*]
角鲨烯低剂量组	125	68.1 \pm 20.5	0.759 \pm 0.283

3 结论与讨论

短时期大量摄入酒精可引起急性酒精性肝损伤,研究表明氧化应激和脂质过氧化作用对酒精性肝损伤的发生、发展起着关键作用^[8-9]。酒精进入人体后,大部分在十二指肠和空肠吸收,在体内代谢过程中产生过量的自由基,可导致肝细胞膜的脂质过氧化及体内GSH的耗竭^[10]。在体内氧化还原系统中,GSH则是体内最主要的抗氧化成分;而MDA是脂质过氧化反应的终产物,其含量的多少直接反映了机体脂质过氧化损伤的程度。本研究结果显示,模型组小鼠肝组织MDA含量极显著($p<0.01$)增加,GSH水平显著($p<0.05$)降低,而角鲨烯能明显拮抗一次性大量摄入乙醇的小鼠肝脏MDA含量升高以及GSH水平的降低,其中以角鲨烯500 mg/kg的作用最为明显。过度摄入酒精可造成 α -磷酸甘油增加,从而加强TG合成,导致TG蓄积,使血清TG水平升高^[11-12]。本实验中急性酒精肝损伤模型能显著($p<0.05$)升高小鼠的TG含量,角鲨烯可有效降低因急性酒精肝损伤引起的TG含量升高,且高剂量作用明显。ALT、AST主要存在于肝细胞内,是人体代谢过程中必不可少的“催化剂”,当肝细胞发生炎症、坏死等损伤时可释放到血液中,致使血清中的水平升高,因此ALT、AST是反应肝细胞损伤的敏感指标。角鲨烯可显著抑制急性酒精肝损伤引起的血清ALT、AST升高,且呈一定的剂

量依赖性。

综上可知,角鲨烯对急性酒精性肝损伤具有显著的保护效果,其机制可能与角鲨烯抑制乙醇导致的肝细胞膜脂质过氧化,阻止MDA形成,避免肝功能的损害等有关。

参考文献

- [1] Psomiadou E, Tsimidou M. On the role of squalene in olive oil stability[J]. J Agric Food Chem, 1999, 47(10):4025-4032.
- [2] 许瑞波, 刘玮炜, 王明艳, 等. 角鲨烯的制备及应用进展[J]. 山东医药, 2005, 45(35):69-70.
- [3] Bhilwade HN, Tatewaki N, Nishida H, et al. Squalene as novel food factor[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2010, 11(8):875-880.
- [4] Waluga M, Hartleb M. Alcoholic liver disease[J]. Wiad Lek, 2003, 56(1-2):61-70.
- [5] 全国酒精性肝病调查协作组, 迟宝荣. 全国酒精性肝病的多中心调查分析[J]. 中华消化杂志, 2007(4):231-234.
- [6] Bouneva I, Abou-Assi S, Heuman DM, et al. Alcoholic liver disease[J]. Hospital Physician, 2003, 39:31-38.
- [7] 赵云霞, 陶明焯, 程光宇, 等. 黑牛肝菌多糖对小鼠酒精性肾损伤保护作用的研究[J]. 食品工业科技, 2013(20):368-371.
- [8] Gao B, Bataller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets[J]. Gastroenterology, 2011, 141(5):1572-1585.
- [9] Cederbaum AI, Lu Y, Wu D. Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury[J]. Arch Toxicol, 2009, 83(6):519-548.
- [10] Mann RE, Smart RG, Govoni R. The epidemiology of alcoholic liver disease[J]. Alcohol Res Health, 2003, 27(3):209-219.
- [11] French SW. Biochemical basis for alcohol-induced liver injury[J]. Clin Biochem, 1989, 22(1):41-49.
- [12] Tang CC, Huang HP, Lee YJ, et al. Hepatoprotective effect of mulberry water extracts on ethanol-induced liver injury via anti-inflammation and inhibition of lipogenesis in C57BL/6J mice[J]. Food Chem Toxicol, 2013, 62:786-796.