

[文章编号] 1007-7669(2010)06-0433-04

虾青素对对乙酰氨基酚所致小鼠肝损伤的保护作用

张真, 扶艳, 梁信芳, 苏美琴, 张贤华, 朱铨

(厦门大学医学院 药学系, 福建 厦门 361005)

[关键词] 对乙酰氨基酚; 肝炎, 中毒性; 模型, 动物; 小鼠; 肝损伤; 虾青素

[摘要] 目的 研究虾青素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。方法 40只小鼠随机分为5组($n=8$): 正常对照组、模型组和虾青素低、中、高剂量(50、125和250 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组。各剂量组小鼠给予虾青素连续灌胃7 d后一次性腹腔注射对乙酰氨基酚400 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 制备急性肝损伤模型, 光镜观察肝脏的组织学改变, 测定血清和肝组织的生化指标。结果 与模型组比较, 虾青素组血清中丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶含量明显降低($P<0.01$), 肝组织中丙二醛含量降低, 超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶活性提高($P<0.01$)。结论 虾青素能增强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。

[中图分类号] R965 [文献标志码] A

Protective effect of astaxanthin on paracetamol-induced hepatic damage in mice

ZHANG Zhen, FU Yan, LIANG Xin-fang, SU Mei-qin, ZHANG Xian-hua, ZHU Xuan

(Department of Pharmacy, Medical College of Xiamen University, Xiamen FUJIAN 361005, China)

[KEY WORDS] paracetamol; hepatitis, toxic; models, animal; mice; hepatic damage; astaxanthin

[ABSTRACT] AIM To study the protective effect of astaxanthin on paracetamol-induced hepatic damage in mice. METHODS Forty mice were randomly divided into normal control group, model group, astaxanthin low, medium and high-dose (50, 125, and 250 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) groups, with eight mice in each group. Mice in astaxanthin low, medium and high-dose groups were administered with astaxanthin for 7 d consecutively. After 7 days, all the mice were then intraperitoneally given paracetamol at a dose of 400 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. The levels of ALT, AST in serum and MDA, SOD, GSH-PX in hepatic tissue were measured. RESULTS Compared with the model group, in the astaxanthin groups, the levels of ALT, AST in serum were decreased significantly ($P<0.01$), the level of MDA was decreased while activities of SOD and GSH-PX were increased in hepatic tissue ($P<0.01$). CONCLUSION Astaxanthin has good protective effect on paracetamol-induced hepatic damage in mice. Eliminating free radical, repairing damaged cell membrane and enhancing defense enzyme activities in mice may be the mechanism of action of astaxanthin.

肝炎是一种严重威胁人类健康的常见病、多发病, 根据病因可分为病毒性、酒精性、药源性

[收稿日期] 2010-02-25 [接受日期] 2010-05-06

[基金项目] 福建省厦门市科技计划项目(3502Z20093012)

[作者简介] 张真(1986—), 女, 福建厦门人, 硕士研究生, 主要从事剂型研发及药动学研究。E-mail: albumen_zz@163.com

[通讯作者] 朱铨。Phn: 86-592-218-9597, 86-18959288025。E-mail: zhuxuan@xmu.edu.cn

和自身免疫性肝炎等。目前,药源性肝炎在临床实践中较为常见,其中许多口服药物进入体内后受到肝脏首关效应的影响,长期或大量服用这类药物,药物在肝脏堆积、无法排出就会引起肝组织损伤,引发肝炎,甚至肝癌。人们常盲目认为中药无不良反应,但据报道,中药所致的肝损伤占临床药物性肝损伤总病例的4.8%~32.6%^[1]。另外,如临床常用的解热镇痛药对乙酰氨基酚(paracetamol,商品名:扑热息痛),低剂量不会引起肝损伤,但若长期或大剂量服用,则会在肝内代谢过程中产生自由基而引起肝细胞膜脂质过氧化,并可通过破坏钙稳态而产生细胞毒性,甚至出现肝细胞坏死等^[2]。

虾青素(astaxanthin, 3, 3'-二羟基- β , β' -胡萝卜素-4, 4'-二酮)为一种类胡萝卜素的含氧衍生物,是一种广泛存在于生物体的红色素^[3]。虾青素能有效地淬灭活性氧,是一种极具发展潜力的抗氧化剂^[4]。在虾青素分子中,有很长的共轭双键、羟基和在共轭双键链末端的不饱和酮基,其中羟基和酮基又构成 α -羟基酮,其结构式见图1。这些结构都具有比较活泼的电子效应,能向自由基提供电子或吸引自由基的未配对电子^[5]。可见虾青素的结构特点使其极易与自由基反应而清除自由基,具有抗氧化作用。

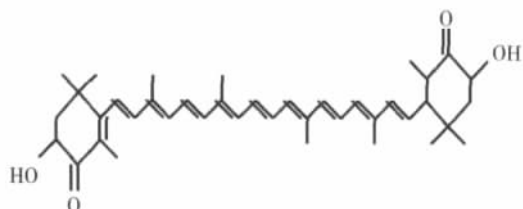


图1 虾青素的结构式

目前国内外对虾青素的研究主要集中在抗衰老、抗癌和增强免疫功能的作用方面^[6,7],另外我们已证实,其对大鼠乙酸性胃溃疡具有一定的治疗作用^[8]。而虾青素对急性肝损伤影响的相关研究尚未见报道。基于其抗氧化作用,本实验观察不同剂量虾青素对小鼠肝损伤的影响,探讨虾青素对小鼠肝损伤的保护作用及作用机制。

材料和方法

动物 SPF级健康雄性昆明种小鼠40只,体重(25±s)g,购自中国科学院上海实验动物中心。
药物与试剂 虾青素购自美国Sigma公司。对乙酰

氨基酚片购自汕头金石制药总厂(批准文号:国药准字H44020968)。丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)和考马斯亮蓝蛋白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。

给药方法与模型建立 将40只昆明小鼠随机分为5组(每组8只),即正常对照组,模型组,虾青素低、中、高剂量组。虾青素不易溶于水,易溶于油,本实验用橄榄油作为溶剂来溶解虾青素。正常对照组和模型组小鼠灌服10 mL·kg⁻¹橄榄油,虾青素各剂量组分别按照低剂量(50 mg·kg⁻¹)、中剂量(125 mg·kg⁻¹)和高剂量(250 mg·kg⁻¹)灌胃给予虾青素,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⁻¹^[9],正常对照组腹腔注射10 mL·kg⁻¹生理盐水。

肝脏系数的计算 小鼠造模24 h后处死,处死前称重,处死后立即摘取肝脏,称量肝脏湿重,计算肝脏系数。肝脏系数计算公式:肝脏系数=肝重(g)/体重(g)。

肝组织病理形态学 取部分肝脏用4%甲醛溶液固定24 h,常规石蜡包埋切片,HE染色,在光镜下观察肝组织的病理学变化。

血清ALT、AST活性测定 采集小鼠血液,分离血清,按照试剂盒方法测定血清中ALT、AST活性。
肝组织蛋白、MDA含量与SOD、GSH-PX活性测定 取部分肝脏称重,加入9倍于肝重的冰生理盐水,用组织匀浆机制得10%肝组织匀浆,取上清液。按照试剂盒方法测定肝组织蛋白、MDA含量与SOD、GSH-PX活性。

统计学分析 利用SPSS13.0统计软件ONE WAY-ANOVA方法进行数据分析,实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异有显著意义。

结 果

肉眼观察 正常对照组小鼠肝脏被膜光滑,色泽红润,弹性良好。而对乙酰氨基酚致肝损伤后的小鼠肝脏体积较大,脆性大,肝脏上有大小不等、颜色深浅不一的淤血和点状斑点。

光镜观察 正常对照组小鼠肝组织内肝小叶结构清晰, 肝细胞排列整齐、大小一致, 胞质丰富, 未见有明显的变性和坏死, 无急、慢性炎症细胞浸润及纤维间隔形成等病理改变。而模型组小鼠肝组织呈局灶性坏死, 坏死灶内肝细胞结构被破坏, 并伴有数量不等的以淋巴细胞为主的炎症细胞浸润, 有3只小鼠肝损伤坏死超过肝小叶1/3。虾青素各剂量组小鼠肝脏与模型组比较肝细胞损伤均有所减轻, 肝细胞变性和坏死有所缓解, 坏死区内可见少量炎症细胞浸润, 高剂量组症状减轻最为明显。见图2。

虾青素对小鼠肝脏系数的影响 小鼠腹腔注射对乙酰氨基酚后, 肝脏出现肿大等病理现象, 肝脏系数变大。模型组肝脏系数为(0.069 ± 0.010), 与正常对照组(0.047 ± 0.003)相比, 明显升高($P < 0.01$); 虾青素低剂量组肝脏系数(0.064 ± 0.007)与模型组相比略有降低, 但无显著差异($P > 0.05$); 而中剂量组、高剂量组肝脏系数[分别为(0.059 ± 0.005)和(0.050 ± 0.004)]则有显著降低($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。

虾青素对小鼠血清ALT、AST活性的影响 给予对乙酰氨基酚后, 模型组小鼠血清中的ALT、AST水平与正常对照组比较均明显升高($P < 0.01$), 说明造模成功。而虾青素低、中、高剂量组小鼠血清中的ALT和AST水平与模型组比较均有显著降低($P < 0.01$)。见表1。

虾青素对小鼠肝组织MDA含量及SOD、GSH-PX

表1 虾青素对小鼠血清ALT、AST活性的影响

$n = 8, \bar{x} \pm s, U \cdot L^{-1}$

组别	ALT	AST
正常对照	44 ± 19	14 ± 5
模型	267 ± 10 ^a	255 ± 20 ^a
虾青素低剂量(50 mg · kg ⁻¹)	222 ± 18 ^{cd}	199 ± 13 ^{cd}
虾青素中剂量(125 mg · kg ⁻¹)	130 ± 17 ^{ef}	39.2 ± 1.6 ^{ef}
虾青素高剂量(250 mg · kg ⁻¹)	91 ± 4 ^{ef}	24 ± 6 ^{ef}

经单因素方差分析, 两两比较: 与正常对照组比较, $^aP < 0.01$; 与模型组比较, $^dP < 0.01$

活性的影响 给予对乙酰氨基酚后, 模型组小鼠肝组织MDA含量与正常对照组比较显著升高($P < 0.01$), SOD及GSH-PX活性显著降低($P < 0.01$)。虾青素各剂量组的MDA含量有不同程度的降低, 低剂量组降低较少, 而中、高剂量组与模型组相比均有显著降低($P < 0.01$)。虾青素低、中剂量组的SOD活性与模型组相比没有明显升高, 高剂量组则显著升高($P < 0.01$)。而虾青素低、中、高剂量组GSH-PX活性与模型组相比均有显著升高($P < 0.01$)。见表2。

讨 论

对乙酰氨基酚是替代阿司匹林(aspirin)的解热镇痛药, 大剂量或长期服用时, 可导致严重毒性效应。由其诱导的小鼠急性肝损伤模型是一种中毒性肝炎、肝坏死模型, 尤以肝脏小叶中央区坏死为常见。对乙酰氨基酚进入体内经肝细胞色

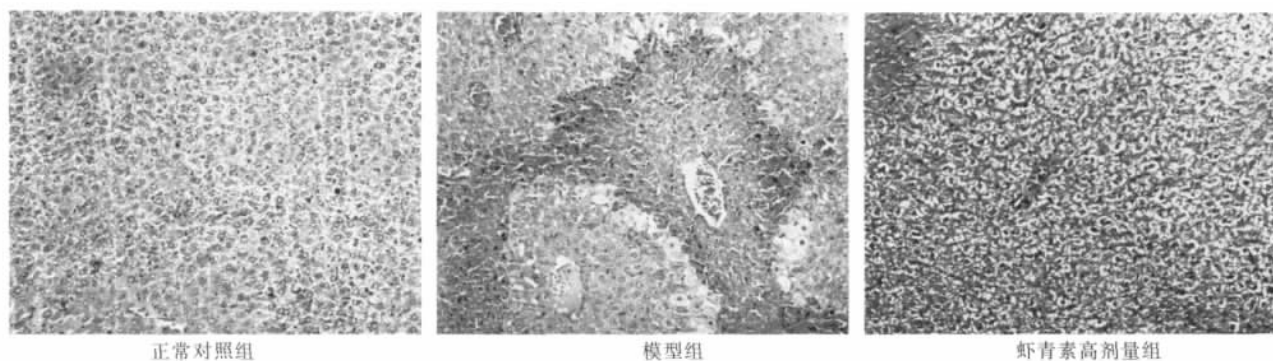


图2 小鼠肝组织病理学改变(HE染色, ×100)

表2 虾青素对小鼠肝组织MDA含量及SOD、GSH-PX活性的影响

$n = 8, \bar{x} \pm s$

组别	MDA/mmol · mg ⁻¹ Pro	SOD/U · mg ⁻¹ Pro	GSH-PX/U · mg ⁻¹ Pro
正常对照	1.13 ± 0.29	314 ± 42	311 ± 5
模型	2.6 ± 0.5 ^a	213 ± 65 ^a	119 ± 19 ^a
虾青素低剂量(50 mg · kg ⁻¹)	2.55 ± 0.27 ^{cd}	237 ± 83 ^{cd}	194 ± 15 ^{cd}
虾青素中剂量(125 mg · kg ⁻¹)	1.4 ± 0.4 ^{ef}	253 ± 67 ^{bd}	262 ± 11 ^{ef}
虾青素高剂量(250 mg · kg ⁻¹)	0.95 ± 0.08 ^{ef}	330 ± 31 ^{ef}	321 ± 12 ^{ef}

经单因素方差分析, 两两比较: 与正常对照组比较, $^aP > 0.05$, $^bP < 0.05$, $^cP < 0.01$; 与模型组比较, $^dP > 0.05$, $^eP < 0.01$

素 P-450 代谢后, 绝大部分产物分别与硫酸和葡萄糖醛酸结合后从尿中排出体外, 仅很少一部分生成毒性中间产物 *N*-乙酰-对-苯醌亚胺 (*N*-acetyl-p-benzoquinone, NAPQI) 与肝脏内还原型谷胱甘肽 (GSH) 结合, 并与巯基复合物形式从尿中排出。但当对乙酰氨基酚剂量过大时, 其代谢过程中产生的大量 NAPQI 超过了 GSH 的解毒能力, 于是未被清除的 NAPQI 与肝细胞大分子如蛋白质共价结合, 引起肝细胞坏死, 细胞通透性增强, 使转氨酶释放入血, 造成转氨酶升高。此外, 对乙酰氨基酚在肝内代谢过程中产生自由基可引起肝细胞膜脂质过氧化, 并可通过破坏钙稳态而产生细胞毒性, 导致肝损伤^[2,10]。

本研究结果表明, 虾青素对对乙酰氨基酚所致肝损伤后的小鼠肝脏系数、AST、ALT、MDA、SOD 和 GSH-PX 都有改善作用。各剂量组肝脏系数减少, 说明虾青素能抑制对乙酰氨基酚引起的肝脏炎症反应, 抑制肝脏肿大, 减轻肝脏损伤。当肝细胞膜受到损害时, ALT、AST 被释放进入血液, 使血清中 ALT 和 AST 的水平增加。虾青素能明显降低血清 ALT、AST 的水平, 说明虾青素能使细胞膜防御功能增强, 在一定程度上可以修复受损的细胞膜, 保护肝细胞, 避免肝细胞受损。MDA 是脂质过氧化物的最终产物, 可以严重破坏细胞膜结构, 导致细胞肿胀、坏死。本研究的虾青素各剂量组 MDA 含量均有降低, 说明虾青素有一定的抗自由基与抗氧化作用, 抑制脂质过氧化反应, 抑制细胞肿胀坏死, 对对乙酰氨基酚所致的肝损伤有显著的保护作用。SOD 能够有效清除氧自由基, 虾青素能够提高 SOD 的活性从而减轻细胞损伤。当对乙酰氨基酚的剂量过大时, 其代谢产生的 NAPQI 超过 GSH 的解毒能力, 发生肝损伤, 虾青素各剂量组能够提高 GSH 的活性, 从而增强肝脏的解毒能力, 使肝脏损伤减轻, 并保护小鼠不发生对乙酰氨基酚中毒死亡。

综上所述, 虾青素对对乙酰氨基酚所致的小

鼠肝损伤具有明显的保护作用, 其作用机制可能是虾青素能够抑制大剂量的对乙酰氨基酚引起的炎症反应, 修复受损细胞膜, 降低肝细胞膜通透性, 减少转氨酶的含量, 还能抑制脂质过氧化反应以及提高体内 SOD、GSH-PX 等酶的活性从而起到保护肝脏的作用。另外, 虾青素对对乙酰氨基酚所致肝损伤的作用机制是否还与虾青素代谢产物的作用或者虾青素影响对乙酰氨基酚的代谢过程和代谢产物有关, 尚待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 刘平, 袁继丽, 倪力强. 重视中药的肝损伤问题[J]. 中国新药与临床杂志, 2007, 26(5): 388-392.
- [2] 张宝旭, 贾凤兰, 阮明. 对乙酰氨基酚诱发小鼠肝毒性机制的实验研究[J]. 卫生毒理学杂志, 2003, 17(1): 31.
- [3] KAMATH BS, SRIKANTA BM, DHARMESH SM, *et al.* Ulcer preventive and antioxidative properties of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*[J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 590(1-3): 387-395.
- [4] FASSETT RG, HEALY H, DRIVER R, *et al.* Astaxanthin vs placebo on arterial stiffness, oxidative stress and inflammation in renal transplant patients(Xanthin), a randomised controlled trial [J]. *BMC Nephrol*, 2008, 9: 17.
- [5] 陈晋明, 王世平, 马佃珍, 等. 虾青素抗氧化活性研究[J]. 营养学报, 2007, 29(2): 163-169.
- [6] HIGUERA-CIAPARA I, FELIX-VALENZUELA L, GOYCOOLEA FM. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2006, 46(2): 185-196.
- [7] 张晓丽, 刘建国. 虾青素的抗氧化性及其在营养和医药应用方面的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(1): 258-262.
- [8] 杨琼, 张真, 朱铨, 等. 虾青素对大鼠乙酸性胃溃疡的治疗作用[J]. 药学学报, 2009, 44(5): 558-560.
- [9] 李海燕, 金向群, 邱琳, 等. 黄芩苷预防对乙酰氨基酚所致小鼠肝损伤的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(5): 50-51.
- [10] OZDEMIRLER G, AYKAC G, UYSAL M, *et al.* Liver lipid peroxidation and glutathione-related defence enzyme system in mice treated with paracetamol[J]. *J Appl Toxicol*, 1994, 14(4): 297-299.