

原花青素在对乙酰氨基酚诱导的急性肝损伤中的保护作用及机制

陈欢¹, 马磊¹, 黄茹², 郭继光², 陈裕浩², 陈倩竹¹,

姜蓉³, 张力¹, 王亚平³, 李龙江¹

(1. 重庆医科大学基础医学院病理生理学教研室、重庆医科大学干细胞与组织工程研究室, 重庆 400016;

2. 重庆医科大学临床学院, 重庆 400016; 3. 重庆医科大学基础医学院组织胚胎学教研室、

重庆医科大学干细胞与组织工程研究室, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究原花青素在对乙酰氨基酚诱导的急性肝损伤中的保护作用及机制。**方法:**将昆明种小鼠随机分为 6 组, 每组 8 只。分别为 PBS 正常对照组、对乙酰氨基酚(acetaminophen, APAP)模型组、原花青素(100 mg/kg)药物对照组和原花青素药物预处理组(低剂量[10 mg/kg], 中剂量[50 mg/kg]和高剂量组[100 mg/kg])。检测各组小鼠血清丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)和肝匀浆中丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的变化, 并采用 HE 染色观察各组病理形态的改变, Western blot 法测定各组 SOD 蛋白的表达。**结果:**原花青素中、高剂量药物预处理组与 APAP 模型组比较, ALT($F=555.20, P=0.000$)、AST($F=168.51, P=0.000$)、MDA($F=155.15, P=0.000$)明显降低, SOD($F=291.84, P=0.000$)明显升高。病理观察发现, APAP 模型组肝组织结构破坏, 肝细胞水样变性, 中央静脉淤血。原花青素中、高剂量药物预处理组则肝小叶结构清晰, 细胞变性轻微, 无明显淤血。Western blot 结果发现, APAP 模型组中 SOD 蛋白表达被抑制, 而原花青素中、高剂量药物预处理组则表达增加。**结论:**原花青素在对乙酰氨基酚诱导的急性肝损伤中有保护作用, 其机制与药物抗氧化应激作用有关。

【关键词】原花青素; 对乙酰氨基酚; 药物性肝损伤

【中图分类号】R99

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-10-08

Protective effect and mechanism of procyanidin in acute liver injury induced by acetaminophen

Chen Huan¹, Ma Lei¹, Huang Ru², Guo Jiguang², Chen Yuhao², Chen Qianzhu¹,

Jiang Rong³, Zhang Li¹, Wang Yaping³, Li Longjiang¹

(1. Teaching and Research Section of Pathophysiology, Laboratory of Stem cell and Tissue Engineering;

2. College of Clinical Medicine; 3. Teaching and Research Section of Histology and Embryology,

Laboratory of Stem cell and Tissue Engineering, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate protective effect and mechanism of procyanidin in acute liver injury induced by acetaminophen. **Method:** The KM mice were randomly divided into six groups ($n=8$), including PBS control group, acetaminophen model group, procyanidin control group (100 mg/kg) and procyanidin pre-treatment groups including low-dose (10 mg/kg), medium-dose (50 mg/kg) and high-dose groups (100 mg/kg). The activities of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), malondialdehyde (MDA) in the serum and the concentration of MDA in the liver homogenate of the mice were detected by commercial kits. Meanwhile, the pathological changes of the liver were observed by HE staining, and the expression of SOD was determined by Western blot. **Results:** Compared with those in APAP model group, ALT ($F=555.20, P=0.000$), AST ($F=168.51, P=0.000$), MDA ($F=155.15, P=0.000$) in pre-treatment groups of medium-dose and high-dose of procyanidin were significantly lower, while SOD ($F=291.84, P=0.000$) was markedly higher. The damaged liver structure, hydropic degeneration and the central venous congestion were observed in the APAP model group, but the liver injuries in pre-treatment groups of medium-dose and high-dose of procyanidin were slighter. Based on the results of Western blot, SOD protein expression in APAP model group was inhibited, while the pre-treatment with medium-dose and high-dose of procyanidin could rescue its expression.

Conclusion: Procyanidin has a protective role in acetaminophen-induced acute liver injury, and the preliminary mechanism is related to antioxidative character of drug.

【Key words】procyanidin; acetaminophen; drug-induced liver injury

作者介绍: 陈欢, Email: chenhuannx@163.com,

研究方向: 肝脏疾病。

通信作者: 李龙江, Email: lljly2003@163.com。

基金项目: 重庆医科大学基础医学院中青年师资资助计划。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150308.2350.025.html>

(2015-03-08)

急性肝损伤(acute liver injury, ALI)是一种全球性的疾病,严重危害人类的健康。引起急性肝损伤的因素有很多,主要包括病毒感染、药物、酒精中毒、食物中毒和辐射损伤等^[1-3]。近年来,由于药物的滥用,使得急性药物性肝损伤(drug-induced liver injury, DILI)的发生率急剧增加。对乙酰氨基酚(acetaminophen, APAP),又称扑热息痛,是临床上广泛应用的解热镇痛药物。长期有意或无意过量服用 APAP,易引起急性肝细胞坏死,导致 ALI^[4],死亡率高。目前,大量报导证实细胞内氧化应激是 APAP 引起急性肝损伤的重要生物学机制之一^[5-8]。研究表明,自由基在体内过量积聚时会损害生物机体,由自由基引起的氧化损伤涉及到一系列疾病的发生发展过程。虽然生物在长期进化过程中形成了相当有效的抗自由基损害机制,但日常代谢中,氧化损伤仍然可以发生在各种细胞器、生物大分子或其聚合体内。因此,很多研究者致力于从天然植物中寻找抗氧化应激生物活性的物质来增强机体的抗氧化能力。

原花青素是葡萄籽中最主要的多酚类物质,属于生物类黄酮的一种,由于其分子结构中具有多电子的酚羟基,使原花青素拥有较强的抗氧化、清除自由基能力。由于氧化应激在 APAP 诱导的急性肝损伤中发挥了重要作用,那么原花青素可否通过抗氧化应激来保护 APAP 所致的急性肝损伤,值得进一步探讨。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

葡萄籽提取物原花青素(大连美仑生物有限公司,纯度>95%);谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)和谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);山羊抗小鼠 SOD-1 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司)。

1.2 动物分组及处理

雄性昆明种小鼠,体质量 18~22 g,共 48 只,购于重庆医科大学实验动物中心[实验动物生产许可证号:SCXK(渝)2012-0002,实验动物使用许可证号:SYXK(渝)2012-0001],标准条件饲养。实验前,将 APAP 加入到预热至 50 ℃PBS (pH 7.4)溶液中配制成新鲜的 APAP 悬液。小鼠随机分为 6 组,分别为 PBS 正常对照组、原花青素(100 mg/kg)药物对照组、APAP 模型组、原花青素预处理组(低剂量 10 mg/kg、中剂

量 50 mg/kg、高剂量 100 mg/kg)。APAP 模型组,小鼠腹腔注射 APAP 悬液(400 mg/kg);PBS 正常对照组以 PBS 取代 APAP;原花青素预处理组,则在注射 APAP 悬液前 30 min,给予小鼠腹腔注射原花青素。8 h 后眼球内眦静脉取血,肝素抗凝,用颈椎脱臼法处死小鼠,取肝脏组织。血标本放置 0.5 h 后,4 ℃ 离心机中以 3 000 r/min 离心 10 min,取血清用于检测 AST 和 ALT 水平,剩余备用。右叶肝脏经 PBS 清洗,10%的甲醛固定,用于后续形态学观察,余下肝脏组织储存在-80 ℃ 冰箱中备用。

1.3 血清 AST、ALT 活性测定

用赖氏法检测小鼠血清中 AST、ALT 活性。具体方法参照试剂盒。

1.4 测定肝脏组织 MDA 的含量和 SOD 的活性

肝匀浆 MDA 测定采用硫代巴比妥酸法,肝细胞 SOD 活力测定采用黄嘌呤氧化酶法,蛋白质的测定采用双缩脲法。以上各指标测定方法参照试剂盒说明书进行。

1.5 HE 染色肝组织病理学变化

10%甲醛固定后的肝组织,常规石蜡包埋、切片、HE 染色,显微镜下观察肝脏组织病理变化。

1.6 Western blot 检查各组 SOD 蛋白的表达

肝脏组织匀浆,蛋白质样品制备,测定蛋白浓度,SDS-PAGE电泳,转膜,封闭,孵育一抗和二抗,ECL 显色。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,计量资料均采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 小鼠血清 ALT、AST 活性

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析得到 ALT($F=555.20$, $P=0.000$),AST($F=168.51$, $P=0.000$)。APAP 模型组 ALT($P=0.000$)、AST($P=0.000$)活性与 PBS 正常对照组比较明显升高,提示对乙酰氨基酚诱导的小鼠急性肝损伤模型成立。原花青素药物对照组与 PBS 正常组比较,ALT($P=0.176$)、AST($P=0.491$)活性均无显著性差异;原花青素低剂量组与 APAP 模型组比较,ALT($P=0.722$)、AST($P=0.707$)亦无明显差异;而原花青素中、高剂量组与 APAP 模型组比较,ALT($P=0.000$)、AST($P=0.000$)明显降低(表 1)。

2.2 小鼠肝匀浆中 MDA 的含量和 SOD 活性

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析得到 MDA ($F=155.15$, $P=0.000$),SOD($F=291.84$, $P=0.000$)。APAP 模型组 MDA ($P=0.000$)含量与 PBS 正常对照组比较明显升高,SOD($P=0.000$)活性明显降低;原花青素药物对照组与 PBS 正常对照组比较,MDA ($P=0.996$)含量、SOD($P=0.325$)活性无明显差异;原花青素低剂量组与 APAP 模型组比较,MDA ($P=1.000$)、SOD($P=0.511$)无明显改变;原花青素中、高剂量组与 APAP 模型组比较,MDA 明显降低($P=0.000$),SOD 活性明显升高($P=0.000$)(表 2)。

表 1 原花青素对小鼠血清中 ALT 和 AST 的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Tab.1 Effects of procyanidin on plasma ALT and AST levels ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ALT (U/L)	P 值	AST (U/L)	P 值
PBS正常对照组	8	12.61 ± 3.87		18.79 ± 5.32	
APAP 模型组	8	108.06 ± 7.24 ^a	0.000	81.67 ± 4.63 ^a	0.000
原花青素药物对照组	8	16.15 ± 2.46 ^b	0.176	20.90 ± 6.16 ^b	0.491
原花青素低剂量组	8	107.14 ± 3.68 ^c	0.722	80.52 ± 7.19 ^c	0.707
原花青素中剂量组	8	42.40 ± 5.66 ^d	0.000	40.14 ± 6.89 ^d	0.000
原花青素高剂量组	8	42.43 ± 6.26 ^d	0.000	43.34 ± 5.75 ^d	0.000

注:a 与 PBS 正常对照组比较;b 与 PBS 正常对照组比较;c 与 APAP 模型组比较;d 与 APAP 模型组比较

表 2 原花青素对肝脏组织 MDA 含量和 SOD 活性的影响
Tab.2 Effects of procyanidin on hepatic MDA and SOD levels

组别	n	MDA (nmol/mg Prot)	P 值	SOD (U/mg Prot)	P 值
PBS正常对照组	8	6.23 ± 1.30		9.59 ± 0.46	
APAP 模型组	8	25.66 ± 2.40 ^a	0.000	1.07 ± 0.16 ^a	0.000
原花青素药物对照组	8	7.06 ± 1.35 ^b	0.996	9.08 ± 0.71 ^b	0.325
原花青素低剂量组	8	27.04 ± 4.22 ^c	1.000	1.21 ± 0.06 ^c	0.511
原花青素中剂量组	8	7.92 ± 1.37 ^d	0.000	5.49 ± 0.86 ^d	0.000
原花青素高剂量组	8	6.54 ± 1.05 ^d	0.000	6.26 ± 0.84 ^d	0.000

注:a 与 PBS 正常对照组比较;b 与 PBS 正常对照组比较;c 与 APAP 模型组比较;d 与 APAP 模型组比较

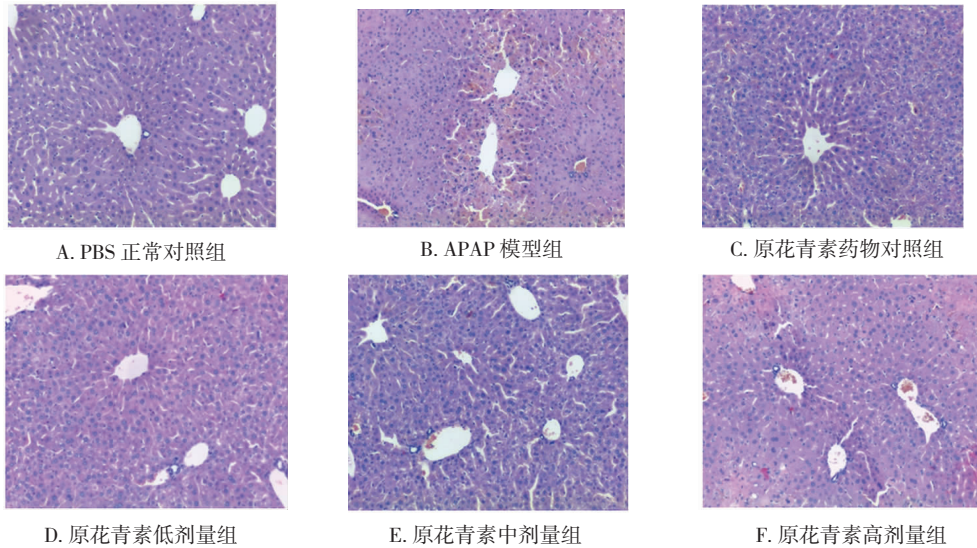


图 1 肝脏组织病理学变化 (HE 染色, 100 ×)

Fig.1 The pathological changes of liver (HE staining, 100 ×)

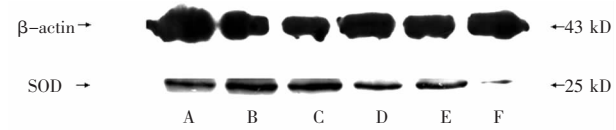
2.3 HE 染色肝组织病理学变化

APAP 模型组结构破坏,肝细胞水样变性,中央静脉淤血 (图 1B)。原花青素药物对照组肝脏组织没有明显病理变化,肝小叶边界清晰,肝细胞轮廓清楚,细胞核体积较大,呈圆形,位于细胞中央,中央静脉结构正常,无淤血 (图 1C)。原花青素中、高剂量组肝小叶结构清晰,细胞变性轻微,无明显淤血 (图 1E、F)。

2.4 Western blot 检查各组 SOD 蛋白的表达

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析得到 SOD/ β -actin ($F=202.879, P=0.000$)。Western blot 结果发现,APAP 模型组

SOD 蛋白表达被抑制,原花青素低、中、高剂量 SOD 蛋白表达量升高。见图 2,表 3。



A. 原花青素低剂量组;B. 原花青素中剂量组;C. 原花青素高剂量组;
D. 原花青素药物对照组;E. PBS 正常对照组;F. APAP 模型组

图 2 肝脏 SOD 蛋白表达

Fig.2 The expression of SOD in liver

表 3 SOD 在各组中的相对表达量

Tab.3 Relative expression of SOD

组别	SOD/ β -actin	P 值
原花青素低剂量组	0.194 $\pm$ 0.006 ^a	0.000
原花青素中剂量组	0.249 $\pm$ 0.006 ^a	0.000
原花青素高剂量组	0.302 $\pm$ 0.017 ^a	0.000
原花青素药物对照组	0.352 $\pm$ 0.005 ^b	0.493
PBS 正常对照组	0.361 $\pm$ 0.031	
APAP 模型组	0.032 $\pm$ 0.003 ^c	0.000

注:a 与 APAP 模型组比较;b 与 PBS 正常对照组比较;c 与 PBS 正常对照组比较

3 讨 论

APAP 诱导的急性肝损伤模型以肝细胞空泡样变及肝细胞广泛坏死为主要病理特征,可引起 ALT 和 AST 的急剧升高。通过复制 APAP 诱导的小鼠急性肝损伤模型,我们发现与 PBS 正常对照组相比较,APAP 模型组 ALT 和 AST 含量显著升高,肝组织结构破坏,肝细胞水样变性,中央静脉淤血。因此,本实验成功复制了 APAP 诱导的急性肝损伤模型。

大量研究表明细胞内氧化应激是 APAP 引起急性肝损伤的重要生物学机制之一。在正常安全剂量下,绝大部分的 APAP 通过与 3-磷酸腺苷-5 磷酸硫酸酯和二磷酸尿苷葡萄糖醛酸结合从而被排出体外,而仅有不到 5% 的 APAP 由细胞色素 P450 氧化生成乙酰苯胺醌(N-acetyl-p-benzoquinone imine,NAPQI),NAPQI 通过与还原型谷胱甘肽或谷胱甘肽转移酶结合迅速被清除从而达到解毒作用^[9-10]。但是在 APAP 毒性剂量下,细胞色素 P450 将其大量氧化为具有高度活性的中间代谢产物 NAPQI,超过了肝脏清除 NAPQI 的能力,最终导致 GSH 的耗尽,并抑制其合成^[9],氧自由基清除能力减弱。同时,增多的 NAPQI 与细胞内的蛋白质(如线粒体蛋白)以共价键的形式结合,从而引起氧化应激,产生许多活性氧(超氧阴离子、过氧化氢、羟自由基等)。活性氧可引起脂质氧化反应,使得 MDA 的含量增加,SOD 活性减弱,最终导致肝细胞变性坏死。本实验结果显示,在 APAP 模型中,体内 SOD 活性下降,MDA 含量增加,表明 APAP 会引起肝脏组织发生氧化应激,这与诸多文献报导结果一致。Zhang 等^[11]发现原花青素可以降低小鼠肝组织中 MDA 和 ROS 的含量,提高 SOD 活性,提示原花青素对自由基引起的脂质过氧化具有抑制作用。本实验观察到,在原花青素中、高剂量组,体内 SOD 活性明显增

加,MDA 的含量显著减少,由此说明原花青素可能是通过减轻氧化应激反应而达到保护 APAP 诱导的急性肝损伤。此外,Western blot 结果显示,APAP 模型组中的 SOD 蛋白表达受到抑制,而低、中、高剂量组的原花青素能够减弱 APAP 对 SOD 的抑制效应,进一步证实其发挥保护作用与药物的抗氧化应激有关。但是,原花青素药物对照组与 PBS 正常对照组相比,SOD 蛋白表达量和活性均没有升高,而它却能减轻 APAP 对 SOD 的表达和活性的抑制。故原花青素对 APAP 诱导的急性肝损伤的保护作用并不是通过直接激活 SOD 来发挥效应,而可能是影响了 APAP 抑制 SOD 信号通路的某个中间环节,详细机制尚需进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Ostapowicz G,Fontana RJ,Schiødt FV,et al.Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States[J].Ann Intern Med,2002,137(12):947-954.
- [2] Svobodová AR,Galandáková A,Sianská J,et al.Acute exposure to solar simulated ultraviolet radiation affects oxidative stress-related biomarkers in skin,liver and blood of hairless mice[J].Biol Pharm Bull,2011,34(4):471-479.
- [3] Davis ML,Hashemi N.Acute liver failure as a rare initial manifestation of peripheral T-cell lymphoma[J].World J Hepatol,2010,2(10):384-386.
- [4] Holt MP,Ju C.Mechanisms of drug-induced liver injury[J].AAPS J,2006,8(1):E48-E54.
- [5] Bauer I,Vollmar B,Jaeschke H,et al.Transcriptional activation of heme oxygenase-1 and its functional significance in acetaminophen-induced hepatitis and hepatocellular injury in the rat[J].J Hepato,2000,33(3):395-406.
- [6] Jaeschke H.Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury[J].J Gastroenterol Hepatol,2000,15(7):718-724.
- [7] Jaeschke H,Knight TR,Bajt ML.The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity[J].Toxicol Lett,2003,144(3):279-288.
- [8] Song Z,McClain CJ,Chen T.S-Adenosylmethionine protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice[J].Pharmacology,2004,71(4):199-208.
- [9] Henderson CJ,Wolf CR,Kitteringham N,et al.Increased resistance to acetaminophen hepatotoxicity in mice lacking glutathione S-transferase Pi[J].Proc Natl Acad Sci U S A,2000,97(23):12741-12745.
- [10] Hazelton GA,Hjelle JJ,Klaassen CD.Effects of cysteine pro-drugs on acetaminophen-induced hepatotoxicity[J].J Pharmacol Exp Ther,1986,237(1):341-349.
- [11] 张波,沈新南,张亚东,等.原花青素对小鼠乙醇性肝损伤的保护作用机制[J].卫生研究,2007,36(3):295.

(责任编辑:冉明会)