

蓝靛果花色甙对小鼠酒精性肝损伤的影响

刘熙文¹, 宋明洲², 崔明勋², 姜成哲²

(1. 延边大学附属医院; 2. 延边大学农学院; 吉林 延吉 133000)

[摘要] [目的] 探讨蓝靛果花色甙对小鼠酒精性肝损伤的影响。[方法] 取健康雄性昆明种小鼠, 随机分为空白对照组、模型对照组和蓝靛果花色甙低、中、高剂量(0.5, 5.0, 20.0 mg/kg)实验组, 各组分别给予相应剂量的药物, 35 d 后测定小鼠肝肾组织中 MDA, GSH 含量、SOD 活性及肝脏匀浆蛋白质(POD)水平。用显微镜检法检测蓝靛果花色甙对肝原代培养细胞的影响, 行 HE 染色观察肝脏的形态学变化。[结果] 与模型对照组比较, 蓝靛果花色甙中、高剂量实验组肝组织中 MDA 含量明显降低($P < 0.05$), GSH 含量和 SOD 活性明显升高($P < 0.05$), 而蓝靛果花色甙低剂量实验组与模型对照组上述指标间差异均无统计学意义($P > 0.05$)。[结论] 蓝靛果花色甙可降低乙醇对肝脏所造成的损伤。

[关键词] 蓝靛果花色甙; 酒精性肝损伤; 小鼠

DOI: 10.16068/j.1000-1824.2018.04.003

[中图分类号] R 285.5 [文献标志码] A [文章编号] 1000-1824(2018)04-0243-05

Effects of *Lonicera edulis turcz anthocyanin* on alcoholic liver injury in mice

LIU Xiwen¹, SONG Mingzhou², CUI Mingxun², JIANG Chengzhe²

(1. Affiliated Hospital of Yanbian University; 2. Yanbian University College of Agriculture; Yanji 133000, Jilin, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effects of *Lonicera edulis turcz anthocyanin* on alcoholic liver injury in mice. **METHODS** Healthy male kunming mice were randomly divided into blank control group, model control group, *lonicera edulis turcz anthocyanin* low, medium and high (0.5, 5.0, 20.0 mg/kg) dose experimental groups. Each group was given a corresponding dose of medicine. After 35 d, the contents of MDA and GSH, SOD activities and liver homogenate protein (POD) levels in the liver and kidney tissues of mice were determined. Microscopic examination was used to detect the effects of *lonicera edulis turcz anthocyanin* on the primary hepatocyte culture, HE staining was used to observe the morphological changes of liver. **RESULTS** Compared with the model control group, the MDA levels in the liver tissue of the *lonicera edulis turcz anthocyanin* medium and high dose experimental groups were significantly decreased ($P < 0.05$), and the contents of GSH and the activities SOD were significantly increased ($P < 0.05$). However, there was no significant difference in the above indexes between the *lonicera edulis turcz anthocyanin* low dose experimental group and the model control group ($P > 0.05$). **CONCLUSION** *Lonicera edulis turcz anthocyanin* could reduce the damage caused by ethanol to the liver.

Key words: *Lonicera edulis turcz anthocyanin*; alcoholic liver injury; mice

蓝靛果属忍冬科, 是一种椭圆形的蓝紫色浆果, 味酸甜, 生长于中国东北长白山和大兴安岭地区。蓝

靛果含有丰富的氨基酸、维生素 C 及 VP 活性物质, 具有较高的食用价值和药用价值^[1]。花色甙是一种自然色素, 安全无毒, 是以黄酮核为基础的可表现出各种颜色的糖甙, 具有较强的抗氧化能力和活性氧消除能力^[2-3]。花色甙耐热, 耐光, 稳定, 抗突变性强, 多应用于食用色素^[4-6]。本实验探讨了蓝靛果花色甙对小鼠酒精性肝损伤的影响, 旨在为蓝靛果花色甙的应用提供依据。

[收稿日期] 2018-12-02

[作者简介] 刘熙文(1972—), 男(朝鲜族), 副主任医师, 博士, 研究方向为脂肪代谢酶活性调节机制研究。

[通信作者] 姜成哲, Email: ksc66@yeah.net.

1 材料与方 法

1.1 实验动物与分组 实验动物选用 7 周龄清洁级雄性昆明种小鼠,体质量为(35±5)g,由延边大学实验动物中心提供.取 25 只实验小鼠随机分为空白对照组、模型对照组、蓝靛果花色甙低、中、高剂量(0.5,5.0,20.0 mg/kg)实验组,每组各为 5 只.用 56%(体积分数)乙醇制作小鼠酒精性肝损伤模型,除空白对照组外,其余各组每天灌胃给予乙醇 1 次 0.01 L/kg,连续灌胃 35 d,取蓝靛果花色甙粉末 2 g/L 加入去离子水溶解后再用去离子水稀释至低、中、高不同剂量.蓝靛果花色甙低、中、高剂量实验组分别灌胃给予 0.5,5.0,20.0 mg/kg 花色甙溶液,空白对照组每天灌胃给予 10 mL/kg 去离子水.为了解蓝靛果花色甙对正常小鼠肝的影响,在前期 35 d 实验结束后再加入 2 个组,即蓝靛果花色甙中、高剂量对照组,每天分别灌胃给予 5.0,20.0 mg/kg 蓝靛果花色甙溶液,连续 35 d.

1.2 血清样品的采集与制备 各组小鼠禁食 12 h 后取眼球血,用高速冷冻离心机离心(3 000 r/min, 15 min),取上清液待检测.

1.3 肝组织匀浆的制备 在 4℃ 条件下准确称取小鼠肝组织 0.2 g,用冷生理盐水反复冲洗干净,按照质量(g):体积(mL)=1:9 的比例加入 9 倍的生理盐水,在冰水浴条件下用高速匀浆机制备 10%(质量分数)肝组织匀浆,以 3 000 r/min 离心 20 min,取上清液置于-20℃ 环境中保存,用于测定 MDA,GSH,SOD 及唾液酸(SA)、Na⁺K⁺-ATP 酶值及白蛋白(ALB)水平.

1.4 肝脏抗氧化指标检测

1.4.1 SOD 活性的测定 采用联苯三酚自氧化法,波长为 340 nm,PBS 温度为 29℃,比色杯中加入 2.95 mL PBS,以此为空白调零,之后向比色杯内侧滴加 8~9 μL 联苯三酚溶液,迅速盖上玻璃纸,拇指按住颠倒混匀,放入比色槽,计时 30 s,记录 OD 值.重复 6 次,计算出 OD 值差值的平均值.调整联苯三酚溶液的用量,直至 OD 平均值接近 0.07 后开始测定.向比色杯中加入 2.95 mL PBS,再加入待测样品 20 μL,之后向比色杯内侧滴加联苯三酚溶液,迅速颠倒混匀,测定 OD 值.OD 值差值的平均值为 0.07 时加入待测样品 20 μL,联苯三酚溶液的用量为 7 μL.SOD 活力(U/mL)=(0.07-样品的 OD

值)/0.07×2×(2.95+0.007+0.02)/0.02×样品稀释的倍数.样品的 SOD 比活力=单位体积活力(U/mL)/样品的蛋白含量(g/L).

1.4.2 MDA 含量的测定 采用 TBA 比色法,取样品 0.12 mL,分别加入 8.1%(质量分数)SDS 0.12 mL,双蒸水 0.6 mL,0.2 mol/L 乙酸 0.9 mL,1%(质量分数)的 TBA 溶液 0.9 mL,振荡混匀后放入 90℃ 水浴锅中水浴 15 min,取出冰水浴迅速冷却,以 3 500 r/min 离心 10 min,取上清液,波长为 532 nm,利用紫外分光光度计测定 OD 值.

1.4.3 GSH 含量的测定 利用四氧嘧啶法测定 GSH 水平,取样品稀释液 0.1 mL,分别加入双蒸水 0.5 mL、0.1 mol/L 四氧嘧啶、0.24 mol/L PBS、0.1 mol/L NaOH 溶液各 0.3 mL,混匀,避光静置反应 10 min,加入 0.3 mL 1.0 mol/L 的 NaOH 溶液,混匀,波长为 305 nm,测定 OD 值.

1.5 肝脏匀浆蛋白质水平的测定 取 6 支干净的试管,分别加入 60 μL 浓度为 0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mol/L 的标准蛋白溶液,再向各支试管中滴加考马斯亮蓝染色液 3 mL,静置 5 min 后用分光光度计测定波长为 595 nm 时的 OD 值.分别以各管测出的 OD 值为横坐标,各管标准蛋白溶液浓度为纵坐标,绘制标准蛋白曲线.测定各组肝脏匀浆蛋白质浓度时,将各组 10%(质量分数)肝脏匀浆稀释 50 倍,用同样的方法以稀释后的 10%(质量分数)肝脏匀浆代替标准蛋白溶液,测定 OD 值,并根据标准蛋白曲线确定蛋白浓度.

1.6 小鼠肝细胞的制备 脱颈处死小鼠后浸泡于 75%(体积分数)乙醇中 3 min,取出置于无菌纸上,腹部朝上,剪开腹部肌肉暴露腹腔,无菌分离肝脏组织.取分离的肝组织,用 4℃ 平衡盐溶液洗净血污,除去纤维成分及包膜,切碎至细小块状,再次用平衡盐溶液洗去残留的血污,用离心机以 1 000 r/min 离心 4 min,弃去上清液,向沉淀中加入 5~6 倍体积的消化液,置于 37℃ 水浴中加热 15 min,水浴加热的同时反复翻滚摇晃,使细胞分离.加热完成后用含血清培养液 5 mL 洗涤 3 次,除去胰酶,再用 100 目筛网过滤,除去没有被消化的大块组织,再次以 1 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液后加入无血清培养液 5 mL,冲散细胞,以 1 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,加入含血清培养液 1~2 mL(具体根据细胞数量确定),利用显微镜进行观察,计数.

1.7 肝细胞染色 收集肝细胞,调整浓度至 1×10^7 /mL,接种在孔板上,每孔 $100 \mu\text{L}$,给药组分别加入低、中、高剂量蓝靛果花色甙溶液(终质量浓度为 0.1, 0.4, 0.8 g/L),模型对照组和空白对照组继续培养,每组设 3 个复孔.24 h 后分别给模型对照组和蓝靛果花色甙各剂量组加入 100 mmol/L 乙醇,反应 12 h 后测定 OD 值,行 0.4%(质量分数)台盘蓝染色,显微镜下观察比较细胞的染色情况.

1.8 统计学分析 采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析.实验数据以均数±标准偏差($\bar{x} \pm \text{SD}$)表示,多组均数比较采用单因素方差分析,其样本均数之间的两两比较采用 LSD 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 血清生物化学指标 如表 1 所示,与空白对照组比较,模型对照组与蓝靛果花色甙低、中、高剂量实验组 ALT,AST 水平均显著升高($P < 0.05$),而蓝靛果花色甙中、高剂量对照组 ALT 活性较空白对照组略有下降,但差异无统计学意义($P > 0.05$).与空白对照组比较,模型对照组与蓝靛果花色甙低、中、高剂量实验组 ALB 水平均明显升高($P < 0.05$),而蓝靛果花色甙中、高剂量对照组与空白对照组 ALB 水平间差异无统计学意义($P > 0.05$).

2.2 肝脏抗氧化指标 如表 2 所示,与空白对照组比较,模型对照组、蓝靛果花色甙低、中、高剂量实验组 MDA 含量均明显升高($P < 0.05$),GSH 水平和 SOD 活性明显降低($P < 0.05$),蓝靛果花色甙中、高剂量对照组与空白对照组 SOD,GSH,MDA 水平间差异均无统计学意义($P > 0.05$).

表 1 各组小鼠 ALT,AST,ALB 水平比较($\bar{x} \pm \text{SD}$)

| 分组 | ALT /(U/mg pro) | AST /(U/mg pro) | ALB /(g/L) |
|------------------|--------------------|--------------------|---------------|
| 空白对照组 | 20.24±12.95 | 45.81±8.47 | 39.51±3.25 |
| 模型对照组 | 51.20±5.02* | 94.62±23.82* | 24.38±4.37* |
| 蓝靛果花色甙 低剂量实验组 | 50.23±6.29* | 92.08±23.28* | 24.81±8.47* |
| 蓝靛果花色甙 中剂量实验组 | 43.75±3.50* | 87.23±5.77* | 27.06±2.03* |
| 蓝靛果花色甙 高剂量实验组 | 34.33±5.51* | 65.67±16.07* | 33.33±1.73* |
| 蓝靛果花色甙 中剂量对照组 | 18.51±8.06 | 47.75±7.75 | 40.82±2.36 |
| 蓝靛果花色甙 高剂量对照组 | 21.23±5.02 | 45.33±5.25 | 41.31±1.52 |

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$.

表 2 各组小鼠 MDA,GSH,SOD 水平比较($\bar{x} \pm \text{SD}$)

| 分组 | MDA /(nmol/mg pro) | GSH /(mg/g pro) | SOD /(U/mg pro) |
|------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|
| 空白对照组 | 0.34±0.14 | 23.18±4.26 | 55.14±12.95 |
| 模型对照组 | 3.45±1.15* | 9.45±6.77* | 32.59±10.49* |
| 蓝靛果花色甙 低剂量实验组 | 3.25±2.45* | 8.43±3.96* | 32.88±9.45* |
| 蓝靛果花色甙 中剂量实验组 | 2.53±1.94* | 12.54±2.36* | 39.02±12.95* |
| 蓝靛果花色甙 高剂量实验组 | 1.25±0.92* | 17.34±2.45* | 43.14±14.95* |
| 蓝靛果花色甙 中剂量对照组 | 0.29±0.14 | 22.82±5.91 | 51.49±11.19 |
| 蓝靛果花色甙 高剂量对照组 | 0.28±0.17 | 24.35±2.25 | 49.62±8.35 |

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$.

2.3 肝脏 $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATP 酶活力 由表 3 所示,与空白对照组比较,模型对照组、蓝靛果花色甙低、中、高剂量实验组酶活性均明显降低($P < 0.05$),蓝靛果花色甙中、高剂量对照组与空白对照组酶活性间差异均无统计学意义($P > 0.05$).

2.4 肝脏 SA 含量 如表 3 所示,与空白对照组比较,蓝靛果花色甙中、高剂量对照组 SA 含量间差异均无统计学意义($P > 0.05$);模型对照组、蓝靛果花色甙低、中、高剂量实验组 SA 含量较空白对照组略有升高,但差异亦无统计学意义($P > 0.05$).

表 3 各组小鼠肝脏 ATP 酶活力及 SA 含量比较($\bar{x} \pm \text{SD}$)

| 分组 | $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATP 酶 /(U/mg pro) | SA /(nmol/g pro) |
|------------------|------------------------------------------------|---------------------|
| 空白对照组 | 12.66±0.42 | 0.064±0.005 |
| 模型对照组 | 7.86±0.31* | 0.067±0.023 |
| 蓝靛果花色甙 低剂量实验组 | 7.88±0.37* | 0.071±0.013 |
| 蓝靛果花色甙 中剂量实验组 | 6.08±0.07* | 0.073±0.012 |
| 蓝靛果花色甙 高剂量实验组 | 7.08±0.95* | 0.072±0.007 |
| 蓝靛果花色甙 中剂量对照组 | 11.32±0.22 | 0.061±0.015 |
| 蓝靛果花色甙 高剂量对照组 | 11.46±0.26 | 0.065±0.005 |

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$.

2.5 各组肝细胞 OD 值 与空白对照组比较,模型对照组、蓝靛果花色甙低、中、高剂量实验组 OD 值均明显降低($P < 0.05$),而蓝靛果花色甙高剂量实验组降低幅度最小,见表 4.

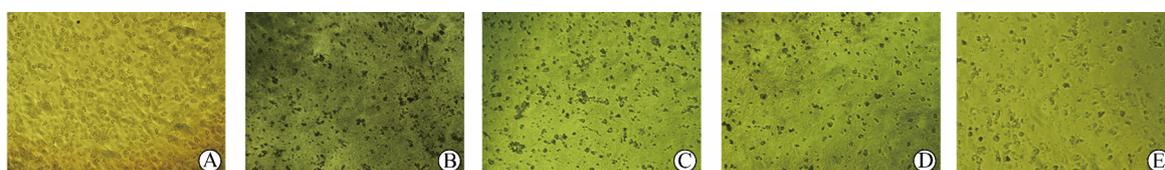
2.6 小鼠肝细胞显微镜下检查 空白对照组正常肝细胞无色透明(图 1A),模型对照组和蓝靛果花色甙各剂量实验组肝细胞可见被染成棕褐色的凋亡细胞(图 1B,C,D),花色甙高剂量实验组被染色的细胞数最少(图 1E).模型对照组、蓝靛果花色甙各剂量实验组与空白对照组比较肝细胞存活率均降低,但蓝靛果花色甙高剂量实验组与空白对照组间差异无统计学意义($P>0.05$).见表 4.

2.7 肝脏病理学检查 空白对照组肝组织结构清晰,干细胞呈索状排列,未见发生病变(图 2A);模型对照组、蓝靛果花色甙低、中剂量实验组可见肝窦紊

乱、细胞结构消失、部分核溶解等病变发生(图 2B,C,D),花色甙高剂量实验组病变略有减轻(图 2E).

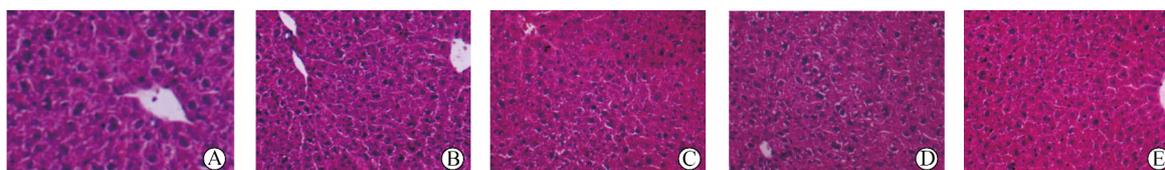
表 4 各组小鼠肝细胞 OD 值比较($\bar{x}\pm SD$)

| 分组 | OD 值 | 存活率/% |
|--------------|------------|------------|
| 空白对照组 | 0.64±0.12 | — |
| 模型对照组 | 0.15±0.02* | 27.25±0.72 |
| 蓝靛果花色甙低剂量实验组 | 0.12±0.03* | 24.19±1.62 |
| 蓝靛果花色甙中剂量实验组 | 0.17±0.02* | 25.79±1.35 |
| 蓝靛果花色甙高剂量实验组 | 0.39±0.11* | 41.15±0.84 |



A:空白对照组; B:模型对照组; C:蓝靛果花色甙低剂量实验组; D:蓝靛果花色甙中剂量实验组; E:蓝靛果花色甙高剂量实验组.

图 1 各组肝细胞显微镜下观察所见 HE ×100



A:空白对照组; B:模型对照组; C:蓝靛果花色甙低剂量实验组; D:蓝靛果花色甙中剂量实验组; E:蓝靛果花色甙高剂量实验组.

图 2 各组肝脏病理学检查显微镜下观察所见 HE ×100

3 讨论

ALB 由肝实质细胞合成,当肝脏受到损伤时,ALB 的合成亦受到影响.本实验结果显示,模型对照组 ALB 水平明显降低,提示乙醇引起了肝脏损伤,而蓝靛果花色甙低、中剂量实验组与空白对照组 ALB 水平间有显著差异,提示低、中剂量蓝靛果花色甙对肝脏未起到保护作用.研究结果显示,酒精性肝损伤程度与脂质过氧化有关系,当组织受到损伤时可出现过强氧化作用,而 MDA 是反映过强氧化作用的指标之一. SOD 是机体内清除自由基的重要抗氧化酶,它的活力大小反映机体的抗氧化及清除自由基能力,乙醇的摄入可减弱 SOD 活性,加速肝脏损伤^[7-9].本实验结果显示,模型对照组 SOD 水平

较空白对照组明显降低,提示模型对照组肝脏受到损伤,蓝靛果花色甙低剂量实验组与模型对照组 SOD 水平间无明显差异,而花色甙中、高剂量实验组较模型对照组 SOD 水平有所升高,但较空白对照组仍有降低,提示高剂量蓝靛果花色甙对酒精性肝损伤只有一定的保护作用.GSH 是含巯基的微量抗氧化物质,在细胞内有丰富的含量,在保持细胞完整性方面发挥着重要的作用.本实验结果显示,蓝靛果花色甙低剂量对 GSH 水平未见产生影响,而中、高剂量实验组 GSH 水平略有升高,且高剂量实验组与空白对照组间无显著差异,提示高剂量蓝靛果花色甙对酒精性肝损伤具有保护作用.研究^[10-13]结果亦认为高剂量蓝靛果花色甙溶液对乙醇造成的肝 GSH 水平降低有保护作用.SA 是一种天然的碳水化

合物, 研究结果显示在肝硬化的肝细胞癌变过程中肝脏 SA 水平显著增高. 本实验结果显示, 模型对照组、蓝靛果花色甙各剂量实验组肝脏 SA 水平与空白对照组比较没有显著差异, 可能原因认为是本实验共灌胃 35 d, 可能在 35 d 内乙醇灌胃的程度不足以形成肝硬化. ATP 酶是生物膜上的一种蛋白质, 在组织细胞和细胞器膜上均存在, 它在物质运输、能量转换和信息传递等方面发挥着重要作用^[13-15]. 本实验结果显示, 与空白对照组比较, 模型对照组和蓝靛果花色甙低、中、高剂量实验组 ATP 酶水平均明显降低, 蓝靛果花色甙中、高剂量对照组与空白对照组间没有显著的差异, 提示乙醇可降低肝脏 ATP 酶活性, 而蓝靛果花色甙低、中、高剂量花色甙未能恢复 ATP 酶活性. 台盼蓝无法染色正常肝细胞, 但可染色死亡的肝细胞. 本实验结果显示, 空白对照组正常肝细胞未被染色, 而模型对照组、蓝靛果花色甙各剂量实验组大部分肝细胞被染色, 蓝靛果花色甙高剂量组被染色的细胞数明显减少. 本实验显微镜下观察结果显示, 模型对照组、蓝靛果花色甙低、中剂量实验组存在肝窦紊乱、细胞结构消失、部分核溶解等变化, 而高剂量实验组略有缓解. 总之, 蓝靛果花色甙具有抗氧化性, 高剂量蓝靛果花色甙对酒精性肝损伤具有一定的保护作用.

[参 考 文 献]

[1] 王振宇, 杨玲. 蓝靛果的研究利用现状及其发展前景[J]. 安徽科技学院学报, 2009(3): 18-20.
 [2] 王宏涛, 叶云, 肖顺林, 等. 蓝靛果乙酸乙酯提取物对胃溃疡大鼠胃黏膜血管活性物质的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2007, 34(3): 360-361.
 [3] 无锡轻工业学院, 天津轻工业学院. 食品分析[M]. 2 版. 北京: 中国轻工业出版社, 2002: 216-219.
 [4] Kinnosuke O, Norihiko T, Norio S, et al.. Chemical structures of two anthocyanin from purple sweet potato [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31(6): 2127-2130.

[5] Shi ZL, Bassa IA, Gabriel SL, et al.. Anthocyanin pigments of sweet potato[J]. *Food Sci*, 1992, 57(3): 755-757, 770.
 [6] 刘安军, 王雅静, 郑捷, 等. 富铬盐藻对小鼠酒精性肝损伤的保护作用[J]. 现代食品科技, 2011(12): 1425-1427.
 [7] 杜时雨, 房龙, 赵洪川, 等. 脂质过氧化反应在大鼠急性酒精性肝损害中的作用[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2008(7): 600-602.
 [8] 孙怡宁. 酒精性肝病发病机制的研究进展[J]. 国外医学: 消化系统疾病分册, 1999, 19(2): 97-101.
 [9] 阚国仕, 杨奉仪, 陈红漫, 等. 胡萝卜多糖的分离纯化及抑制小鼠酒精肝损伤作用研究[J]. 食品科技, 2011(7): 165-168.
 [10] Kavitha G, Damodara VR, Paramahasa M, et al.. Role of nitric oxide in alcohol-induced changes in lipid profile of moderate and heavy alcoholics[J]. *Alcohol*, 2008, 42(1): 47-53.
 [11] Sudheer KM, Adrienne LK, Kelly Ka, et al.. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of alcohol and obesity-induced fatty liver diseases[J]. *Free Radical Bio Med*, 2008, 44(7): 1259-1272.
 [12] Monica D, Alessandra I, Antonella R, et al.. Protective effect of hydroxytyrosol and its metabolite homovanillic alcohol on H₂O₂ induced lipid peroxidation in renal tubular epithelial cells[J]. *Foodchem Toxicol*, 2008, 46(9): 2984-2990.
 [13] Chan TY. Oxidative DNA damage, antioxidants and cancer[J]. *J Pineal Res*, 1996, 20: 187-191.
 [14] 王艳林, 韩钰, 钱京萍. 枳椇子抗脂质过氧化作用的实验研究[J]. 中草药, 1994, 25(6): 306-307.
 [15] Nordberg J, Arner ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2001, 31(11): 1287-1312. ☒