

脱落酸对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用

李慧萍¹,丁传波¹,徐晓华²,郑毅男¹,李莹¹,高铭彤¹,李婧毓¹,
刘一桐¹,曾露露¹,刘峰^{2*},刘文丛^{1*}

(1. 吉林农业大学中药材学院, 长春 130118; 2. 吉林大学中日联谊医院, 长春 130031)

[收稿日期] 2016-09-05 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 02-0064-06 [中图分类号] S852.32

[摘要] 研究脱落酸(ABA)对四氯化碳所致小鼠急性肝损伤的保护作用。70只ICR小鼠随机分为空白组、空白对照组、模型组、联苯双酯组、ABA高、中、低剂量组,连续ig给药10d,于末次给药1h后,除空白组和空白对照组按0.01 mL/g注射橄榄油外,其余各组均按体重注射体分数10%的CCl₄(CCl₄用橄榄油稀释),6h后,脊椎脱臼处死小鼠,收集血液,检测血清中ALT、AST、TC、TG、HDL-c水平,取肝脏制备肝匀浆测定GSH-Px、MDA、SOD活性,HE染色,光镜下观察肝组织病理变化。结果表明:ABA各剂量组均能明显改善因CCl₄造成肝损伤引起的血脂异常,一定剂量的ABA可以降低肝损伤小鼠血清中ALT、AST水平的升高,降低肝匀浆中小鼠MDA含量,升高SOD、GSH-Px活性,减轻CCl₄对肝组织的病理损伤。ABA对CCl₄致小鼠急性肝损伤具有一定的保护作用,其保护机制可能与改善小鼠因CCl₄致小鼠急性肝损伤引起的血脂异常,清除自由基,抑制脂质过氧化,减轻肝组织的损伤有关。

[关键词] 脱落酸;四氯化碳;肝损伤;保肝作用

Hepatoprotective Effects of Absciscic Acid on Acute Liver Injury Induced by CCl₄ in Mice

LI Hui-ping¹, DING Chuan-bo¹, XU Xiao-hua², ZHENG Yi-nan¹, LI Ying¹, GAO Ming-tong¹,
LI Jing-yu¹, LIU Yi-tong¹, ZENG Lu-lu¹, LIU Feng^{2*}, LIU Wen-cong^{1*}

(1. College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2. China-Japan Friendship Hospital Affiliated Jilin University, Changchun 130031, China)

Abstract: The aim is to study the protective effects of ABA on acute liver injury induced by CCl₄ in mice. Seventy male ICR mice were randomly divided into seven groups: normal control group, vehicle control group, model control group, bife-ndate control group, three different dose of ABA groups consisting of high-dosage group, middle-dosage group and low-dosage group (80, 40, 20 mg/kg). Each group contained ten mice. All of the groups were administered by IG for 10 days. All groups were given CCl₄ (10% CCl₄ in olive oil, i. p.) by body weight, expect normal control group and vehicle control group given olive oil after 1 h at the last administration. After 6 hours, animals were sacrificed by bleeding and blood was collected. The levels of ala-

作者简介: 李慧萍, 硕士生, 从事天然药物研究与开发。

通讯作者: 刘文丛, E-mail: jwlw6803@126.com; 刘峰, E-mail: jdliufeng@163.com。

nine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high density lipoprotein cholesterol (HDL - c) were determined in serum and and superoxide dismutase (SOD) activities, malondialdehyde (MDA), GSH - Px contents in liver tissues were determined. The liver pathological changes were observed. The ABA can improved significantly the dyslipidemia caused by CCl_4 - induced acute liver injury in mice. A certain extent of ABA effectively decreased the levels of ALT and AST in serum and contents of MDA, increased SOD, glutathion peroxidase (GSH - Px) activities in liver. The pathological changes were relieved. ABA has a significantly hepatoprotective effect on CCl_4 - induced acute liver injury in mice. Protective effect of ABA on the liver may be related to its function of improving the dyslipidemia, scavenging free radicals and inhibiting lipid peroxidation, reduceing the pathological changes.

Key words: abscisic acid; carbon tetrachloride; liver injury; hepatoprotective effect

脱落酸 (abscisic acid, ABA) 是一种常见的植物激素之一,在植物生命周期中起着重要的调节作用,包括调节植物生长、发育、分化、休眠等;调节植物对多种逆性环境的抗逆反应,如抗旱、抗寒、抗低温等^[1-2]。近年来的研究表明,脱落酸抗糖尿病^[3-4]、抗癌^[5-6]、抗炎^[7-8]并对心血管细胞、干细胞等有显著的调节作用^[9-10],有可能对于多种疾病的治疗起重要的作用,脱落酸可能在防治动物疾病,保障畜牧业发展的同时,为提高人民生活水平,促进人类健康发挥着巨大作用。目前对于脱落酸对四氯化碳致小鼠肝损伤的影响,尚未见研究报告,本研究探讨了四氯化碳对小鼠造成急性肝损伤保护作用及其机制,以期为临床应用脱落酸治疗化学药物引起肝脏等脏器损伤的动物提供科学的实验依据。

1 材料与方法

1.1 药物、试剂与仪器 ABA 购于美国 Sigma 公司,谷氨酸氨基转移酶 (ALT) (批号:20160122)、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) (批号:20160122)、丙二醛 (MDA) (批号:20160123)、超氧化物歧化酶 (SOD) (批号:20160123)、谷胱甘肽氧化酶 (GSH - Px) (批号:20160122) 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所, TG、TC、HDL - C (批号:20160115) 试剂盒购于北京北化康泰临床试剂有限公司,联苯双脂 (北京太洋药业有限公司)、四氯化碳购于北京化工厂。BP211D 电子天平 (德国 Sartorius 公司), SpectraMax Plus384 连续光谱扫描式酶标仪 (美国

分子仪器公司)、中佳 HC - 2517 高速离心机 (安徽中科中佳科学仪器有限公司)。

1.2 动物分组及给药 SPF 级雄性 ICR 小鼠 (18 ~ 22 g), 购自吉林大学白求恩医学院实验动物中心, 许可证号为 SCXK - (吉) 2007 - 0003。将小鼠随机分为 7 组, 每组 10 只, 分别为空白组、空白对照组、模型组、联苯双酯组、ABA 高、中、低 (80、40、20 mg/kg) 剂量组, ABA 用 0.5% 的 CMC - Na 助悬, 空白组和模型组灌胃于 0.5% CMC - Na, 空白对照组灌胃 ABA, 剂量为 40 mg/kg, 各给药组给药 10 d, 第 10 天给药结束后, 除空白组、空白对照组注射橄榄油外, 其余各组均腹腔注射 10% 的 CCl_4 (CCl_4 用橄榄油稀释), 建立急性肝损伤模型。腹腔注射后禁食不禁水, 6 h 后摘取眼球, 收集血液, 30 min 后, 在 4200 r/min、4 °C 下离心 10 min, 吸取血清。摘除肝脏, 用冰的生理盐水洗净脏器上的血液, 擦干后称重。血清、肝脏在 - 70 °C 冰箱里保存以待检测各项生化指标。

1.3 生化指标的测定 小鼠血清: 按试剂盒说明用 SpectraMax Plus384 连续光谱扫描式酶标仪测定 ALT 和 AST 活性以及血脂指标 (TC、TG、HDL - C)。取各小鼠肝脏相同部位的肝组织, 用 4 °C 生理盐水按质量比 1:9, 制备 10% 的肝匀浆, 4200 r/min, 4 °C 下离心 10 min, 取上清液, 按试剂盒说明用 SpectraMax Plus384 连续光谱扫描式酶标仪测定 MDA、SOD 和 GSH - Px 活性。

1.4 肝组织病理学观察 取小鼠肝脏相同部位的

部分肝脏组织进行病理学组织观察,用体积分数为10%的甲醛固定,固定后的肝组织乙醇脱水,石蜡包埋,HE 染色,在光学显微镜下观察。

1.5 统计学处理 实验所得数据均用统计软件SPSS17.0 中 One – way ANOVA 进行处理,各组数据均用 Mean ± SD 表示。 $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 ABA 对 CCl₄ 致肝损伤小鼠血清中 ALT 和 AST 的影响 空白对照组与空白组相比,小鼠血清中 ALT 和 AST 没有明显变化,提示 ABA 对正常小

鼠肝脏不具有破坏作用,而模型组与空白组相比,模型组血清中 ALT、AST 水平极显著升高 ($P < 0.01$),说明小鼠造模成功;与模型组相比,ABA 中剂量组(40 mg/kg)与联苯双酯(150 mg/kg)均能显著性降低小鼠血清 ALT 水平 ($P < 0.05$),高、低剂量对此无影响;而 ABA 高、中、低三个剂量给药组与联苯双酯组均能显著性降低小鼠血清中 AST 水平 ($P < 0.05$),提示 ABA 具有明显的保肝活性,在降低 AST 水平方面,高剂量组与阳性组相比不具有显著性差异,提示在降低 AST 水平上,其与阳性组相当,结果见表 1。

表 1 ABA 对肝损伤小鼠血清中 ALT 和 AST 的影响

组别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	谷丙转氨酶 U/L	谷草转氨酶 U/L
空白组	–	44.98 ± 4.47	33.34 ± 4.46
空白对照组	40	45.28 ± 4.14	34.21 ± 9.22
联苯双酯组	150	63.11 ± 6.37 ^{**}	69.81 ± 24.42 ^{**}
模型组	–	123.14 ± 44.73 ^{##}	96.88 ± 13.38 ^{##}
ABA 高剂量组	80	145.12 ± 30.72	60.46 ± 7.34 ^{**}
ABA 中剂量组	40	110.93 ± 25.34 [*]	80.45 ± 11.71 [*]
ABA 低剂量组	20	120.92 ± 32.84	83.96 ± 14.60 [*]

注:与空白组比较, ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{**} $P < 0.01$, ^{*} $P < 0.05$

2.2 ABA 对 CCl₄ 致肝损伤小鼠血清中血脂的影响 空白对照组与空白组小鼠相比,小鼠血清中 TG、TC、HDL – C 水平基本持平,表明 ABA (40 mg/kg)不影响正常小鼠血脂水平。而空白组与模型组相比,模型组 TG、TC 水平明显升高 ($P < 0.01$),HDL – C 水平明显降低 ($P < 0.01$),说明小鼠血脂出现异常,造模成功。而通过提前灌胃 ABA 干预各组中,高剂量组显著性降低了小鼠 TG 水平 ($P < 0.05$),极显著性降低了 TC 水平 ($P < 0.01$),

极显著的升高了小鼠血清中 HDL – C 水平 ($P < 0.01$),中剂量的 ABA 极显著性的降低了小鼠 TG、TC 水平 ($P < 0.01$),极显著的升高了小鼠 HDL – c 水平 ($P < 0.01$),低剂量的 ABA 显著性的降低了小鼠 TG 水平,显著性升高了 HDL – C 水平,极显著性降低了小鼠 TC 水平,ABA 各个给药剂量在调节肝损伤小鼠上皆优于联苯双酯组,揭示了 ABA 能够很好的修正小鼠因 CCl₄ 所致肝损伤而引起的血脂异常,结果见表 2。

表 2 ABA 对肝损伤小鼠血清中 TC、TG 和 HDL – C 的影响

组别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	甘油三酯/(mmol · L ⁻¹)	胆固醇/(mmol · L ⁻¹)	高密度脂蛋白/(mmol · L ⁻¹)
空白组	–	1.18 ± 0.084	2.55 ± 0.132	2.73 ± 0.192
空白对照组	40	1.19 ± 0.191	2.56 ± 0.199	3.06 ± 0.654
联苯双酯组	150	1.22 ± 0.303 ^{**}	2.65 ± 0.106 ^{**}	2.79 ± 0.492 ^{**}
模型组	–	1.54 ± 0.231 ^{##}	3.49 ± 0.127 ^{##}	2.00 ± 0.576 ^{##}
ABA 高剂量组	80	1.26 ± 0.143 [*]	2.56 ± 0.174 ^{**}	3.46 ± 0.654 ^{**}
ABA 中剂量组	40	1.14 ± 0.152 ^{**}	2.31 ± 0.331 ^{**}	2.78 ± 0.439 ^{**}
ABA 低剂量组	20	1.26 ± 0.097 [*]	2.20 ± 0.239 ^{**}	2.65 ± 0.626 [*]

2.3 ABA 对 CCl₄ 致肝损伤小鼠肝组织抗氧化活性和脂质过氧化水平影响 与空白组相比,注射 CCl₄ 后的模型组小鼠肝脏中 SOD 和 GPx 活性极显著性降低 ($P < 0.01$),MDA 水平极显著性升高 ($P < 0.01$),揭示了经 CCl₄ 造模小鼠抗氧化防御能力

降低,细胞膜被破坏,引起了脂质过氧化反应。而 ABA 提前干预组能够逆转肝细胞中抗氧化酶的降低,MDA 含量的升高,说明 ABA 对 CCl₄ 所致小鼠肝损伤有一定的保护作用,且高、中剂量的保护作用与联苯双酯组相当(表 3)。

表 3 ABA 对肝损伤小鼠肝脏中 SOD、GSH - Px 和 MDA 的影响

组别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	超氧化物歧化酶 U/mg(Prot)	丙二醛 U/mg(Prot)	谷胱甘肽过氧化物酶/(mg · g ⁻¹)(Prot)
空白组	-	50.46 ± 7.98	0.65 ± 0.125	1250.35 ± 156.54
空白对照组	40	51.38 ± 9.85	0.64 ± 0.141	1153.48 ± 327.92
联苯双酯组	150	48.51 ± 7.47 **	1.32 ± 0.279 *	1085.88 ± 159.37 **
模型组	-	35.08 ± 7.11 ##	1.68 ± 0.268 ##	821.18 ± 92.11 ##
ABA 高剂量组	80	51.36 ± 6.15 **	1.37 ± 0.271 *	1025.59 ± 75.81 *
ABA 中剂量组	40	47.15 ± 3.98 **	1.74 ± 0.239	1133.65 ± 137.42 **
ABA 低剂量组	20	44.67 ± 5.28 *	1.68 ± 0.305	984.50 ± 182.62

2.4 ABA 对急性肝损伤小鼠肝组织病理学的影响 光镜下可看到空白组与空白对照组小鼠,肝细胞排列紧凑,大小均一,呈放射状排列,无明显的病理改变;模型组小鼠,肝细胞排列不规则,呈现灶状坏死,炎细胞浸润,细胞核大小不等,细胞出现溶解等,肝小叶界限模糊,有些可明显看到双核紧连。与模型组相比,ABA 及联苯双酯组能不同程度的改善肝细胞的变性坏死,其中高、中剂量组与联苯双酯组能明显改善肝脏损伤程度,使大部分细胞结构完整。揭示 ABA 对四氯化碳致小鼠肝损伤有一定的保护作用(图 1)。

3 讨论与小结

CCl₄ 诱导的肝损伤模型是急性肝损伤研究的典型模型,因其诱发急性肝损伤病理学表现为肝细胞变性、坏死、炎性细胞浸润,与临床病毒性肝炎病理变化极为相似。CCl₄ 在肝细胞中通过细胞色素 P450 的作用分解为三氯甲烷自由基(CCl₃ ·),该自由基能与蛋白质共价结合导致蛋白合成障碍,引起脂质分解代谢紊乱,CCl₃ · 能迅速与氧结合转化为过氧化三氯甲烷自由基(CCl₃O₂ ·),引起一系列的脂质过氧化反应^[11-13]。

肝组织是谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶

(AST)富集的场所,当肝细胞受到损伤或坏死时,大量的 ALT 和 AST 外泄至血清中,此时二者在血清中含量较高,因此,血清中的转氨酶含量高低,是检测肝细胞是否有损伤的重要指标。本实验中,模型组小鼠血清中含有较多的 ALT 和 AST,与空白组有极显著差异 ($P < 0.01$),说明小鼠肝脏受损较为严重,联苯双酯和 ABA 中、低剂量组能够显著性的抑制 ALT 和 AST 的增加 ($P < 0.05$),ABA 高剂量对 ALT 水平无明显的影响,但能显著性降低 AST 水平,揭示 ABA 具有一定的保肝活性。

肝脏在酯类物质代谢过程中具有重要作用,肝脏受到损伤时,酯类物质代谢受到障碍,血液中血脂发生紊乱,出现异常。CCl₄ 是较为常见的肝毒性物质,进入肝脏后,通过脂质过氧化引起肝损伤,造成肝脏中血脂异常,表现为 TG 在血清中积累,TC 水平升高,HDL - c 水平降低。本实验中,ABA 与联苯双酯组均能够明显的降低小鼠血清中 TG 和 TC 水平,明显的升高 HDL - c 水平,其中给药组中剂量组在改善小鼠血脂异常方面与与联苯双酯组基本一致,提示 ABA 可能是通过改善小鼠因 CCl₄ 造成肝损伤而引起的血脂异常,起到保肝作用,这可能是 ABA 保护受损伤肝脏的重要机制之一。

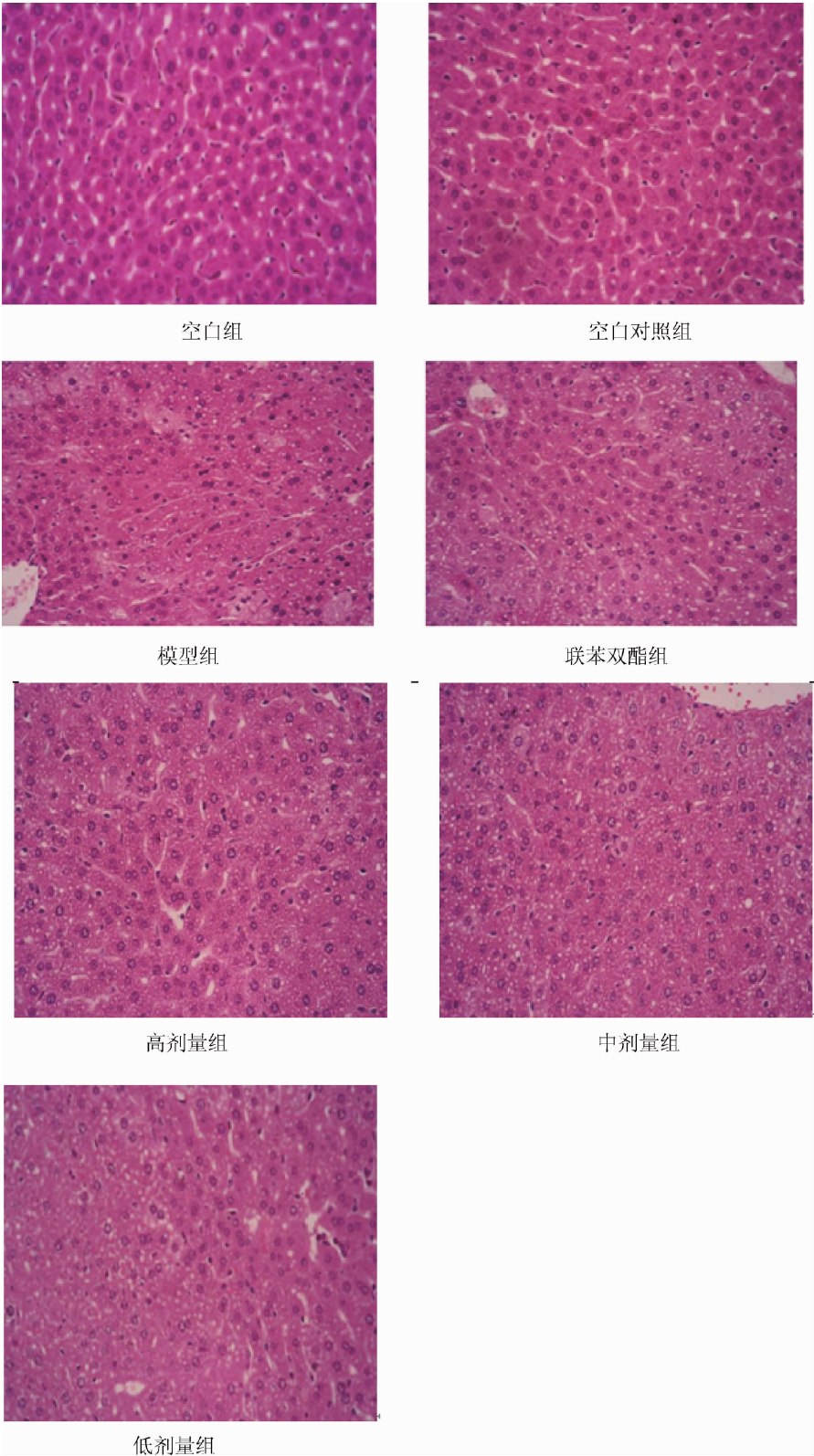


图1 肝脏病理学观察(HE, ×200)

SOD 是一种抗氧化酶,它在预防由自由基引起的肝损伤中起到重要的作用,是抗氧化的第一道防

线,它又可以将超氧阴离子歧化为 H_2O_2 ,而 GSH - Px 是灭活氧自由基的一种酶,可将 H_2O_2 转化为

H₂O, 还可以阻断体内脂质过氧化的进程, 使脂质过氧化物还原成的羟基化合物^[14]。MDA 是氧自由基和生物膜不饱和脂肪酸发生脂质氧化反应的代谢产物, 其含量的变化可间接地反映组织中氧自由基含量的变化。因此可通过测定 SOD、MDA 含量来反映机体抗氧化的能力^[15]。本实验中, 模型组小鼠肝脏 MDA 水平升高, 抗氧化酶 SOD 活性及 GSH - Px 水平降低, 揭示小鼠肝脏抗氧化防御系统降低, 同时引起脂质过氧化反应。ABA 预处理组逆转了这种趋势, 高剂量相对于模型组而言, 对肝脏内指标均有明显改善, 低剂量和中剂量对肝脏中 MDA 水平无明显影响, 但能很好地改善 SOD 活性和 GSH - Px 水平, 减轻其损伤, 揭示了一定剂量的 ABA 可能通过提高小鼠抗氧化防御系统, 抑制脂质过氧化水平而保护肝脏, 这可能是其保护肝脏的另一重要机制。

因此, ABA 可能是通过修复小鼠细胞膜, 制止 ALT、AST 外泄; 调节因肝损伤引起的血脂异常; 提高抗氧化防御系统和抑制脂质过氧化水平; 减轻肝组织病理学损伤, 保护伤损的肝脏。这为 ABA 在保肝方面的开发利用提供了一定的理论依据。

参考文献:

- [1] Cutler S R, Rodriguez P L, Finkelstein R R, *et al.* Absciscic acid; emergence of a core signaling network[J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2010, 61: 651 - 679.
- [2] Kim T H, Bohmer M, Hu H Nishimura N, *et al.* Guard cell signal transduction network: advances in understanding absciscic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2010, 61: 561 - 591.
- [3] Bruzzone S, Bodrato N, Usai C, *et al.* Absciscic acid is an endogenous stimulator of insulin release from human pancreatic islets with cyclic ADP ribose as second messenger[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283 (47): 32188 - 32197.
- [4] Guria J, Hontecillas R, Ferrer G, *et al.* Loss of PPAR γ immune cells impairs the ability of absciscic acid to improve insulin sensitivity by suppressing monocyte chemoattractant protein - 1 expression and macrophage infiltration into white adipose tissue

- [J]. *J Nutr Biochem*, 2008, 19: 216 - 228.
- [5] Guzzo J, Jobin M P, Delmas F, *et al.* Regulation of stress response in *Oenococcus oeni* as a function of environmental changes and growth phase[J]. *Intl J Food Microbiol*, 2000, 55(1(3)): 27 - 31.
- [6] 马秋野, 武步强, 卢永刚, 等. 脱落酸对 SMMC - 7721 人肝癌细胞诱导分化作用的研究 [J]. 昆明医学院学报, 2006(3): 14 - 18.
- [7] Bodrato N, Franco L, Fresia C Guida L, *et al.* Absciscic acid activates them urine microg - lial cell line N9 through the second messenger cyclic ADP - ribose [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284 (22): 14777 - 14787.
- [8] Guria J, Misyak S A, Hontecillas R, *et al.* Absciscic acid ameliorates atherosclerosis is by suppressing macrophage and CD4 (+) T cell recruitment into the aortic wall[J]. *J Nutr Biochem*, 2010, 21 (12): 1178 - 1185.
- [9] Magnone M, Bruzzone S, Guida L, *et al.* Absciscic acid released by human monocytes activates monocytes and vascular smooth muscle cell responses involved in atherogenesis [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284 (26): 17808 - 17818.
- [10] Scarfi S, Ferraris C, Fruscione F, *et al.* Cyclic ADP - ribose - mediated expansion and stimulation of human mesenchymal stem cells by the plant hormone absciscic acid[J]. *Stem Cells*, 2008, 26(11): 2855 - 2864.
- [11] Mantawy E M, Tadros M G, Awad A S, *et al.* Insights into the antifibrotic mechanism of methyl palmitate: impact on nuclear factor kappa B and proinflammatory cytokines[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, 258(1): 134.
- [12] Recknagel, R O. A new direction in the study of carbon tetrachloride hepatotoxicity[J]. *Life Science*, 1983, 33: 401 - 408.
- [13] Recknagel R O, Glende E A, Jr Dolak J A, *et al.* Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity [J]. *Pharmacology and Therapeutics*, 1989, 43: 139 - 154.
- [14] 赵文玺, 金梅花, 李天, 等. 草苈蓉水萃取物对四氯化碳致肝损伤小鼠肝脏氧化应激的干预作用. 中国中药杂志 [J]. 2013, 38(6): 875 - 878.
- [15] Esterbauer H, Schaur R J, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4 - hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes [J]. *Free Radic Biol Med*, 1991, 11(1): 81 - 128.

(编辑: 侯向辉)