红花红色素对小鼠急性 CCl_4 性肝损伤的作用

李晓斐，李志珂，武双婵，丁虹
（武汉大学药学院药理学实验室，湖北武汉 430071）

摘要：本文提取红花红色素并对其体外抗氧化能力及体内护肝作用进行检测。用 0.1 mol/L 的碳酸钠溶液浸泡红花，提取红色素；研究红花红色素对羟自由基、DPPH 的清除作用；建立急性 CCl_4 肝损伤模型，生化法测定小鼠血清中 ALT、AST、ALP 的活性,肝组织匀浆中 CAT、SOD 的活性以及 MDA、GSH 的含量；肝组织 HE 染色，观察对小鼠肝脏组织的影响；蛋白印迹法测定小鼠肝组织 Nrf2、OH-1、NQO1 蛋白表达量。结果表明红花红色素具有很强的体外抗氧化能力。在体内实验中与模型组相比，肝组织损伤情况明显改善；血清中 ALT、AST、ALP 活性显著下降，最高达到 50%以上；肝组织匀浆中 CAT、SOD 活性和 GSH 含量显著升高，最高达到 30%以上，MDA 的含量显著降低，最高达到 36.02%；Nrf2，GSTα 和 NQO1 蛋白表达量增加。红花红色素对急性 CCl_4 性肝损伤有明显保护作用，其机制可能与调节血清酶、抗氧化物酶的活力、含量和通过 Nrf2 通路的抗氧化作用有关。

关键词：红花红色素；肝；四氯化碳；抗氧化物
文章篇号：1673-9078(2013)7-1569-1573

Effect of Safflower Red Pigment on Acute Liver Injury Induced by CCl_4 in Mice

LI Xiao-fei, LI Zhi-ke, WU Shuang-chan, DING Hong
(Department of Pharmacology, Pharmacy College of Wuhan University, Wuhan 430071, China)

Abstract: Safflower red pigment was isolated from safflower by 0.1mol/L $NaCO_3$ aqueous solution and its anti-oxidative and liver protection capability were investigated. Acute injury models were set by CCl_4 in mice. ALT, AST and ALP activities in serum, CAT, SOD activities, MDA content and GSH content in liver homogenates were measured by biochemical assays. Liver tissue of the mice was stained with HE for observing the effect of safflower red pigment on mice liver histopathology. Expression levels of Nrf2, OH-1, NQO1 protein were measured by western blot analysis. Results showed that safflower red pigment had strong antioxidant ability *in vitro*. *In vivo* study showed that, compared with model group, ALT, AST and ALP activities in serum declined significantly and the maximal recline rate was more than 50%. CAT, SOD activities and GSH content in liver homogenates significantly increased, with the maximum increasing rate being more than 30%. MDA content in liver homogenates declined significantly and the maximal decling rate was 36.02%. Expression levels of Nrf2, GSTα and NQO1 were all improved in the safflower red pigment group. The safflower red pigment successfully reduce hepatotoxicity in CCl_4-induced liver injury mice, due to the regulation of serum enzymes ,antioxidant enzymes and antioxidant activity via the Nrf2 pathway.

Key words: safflower red pigment; liver; carbon tetrachloride (CCl_4); antioxidants

红花（*Carthamu stinctorius* L.），又称草红花，属双子叶植物纲、菊科。原产埃及，在欧洲、美洲、澳大利亚和中国等许多地方都有栽培。红花味辛性温，具有活血通经、散瘀止痛的功效，对冠心病、血管栓塞性疾病、传染性肝炎有一定的疗效，可以用于食品、医药、化妆品等多个领域。红花冠中主要是含有黄色素和红色素两种色素，其中黄色素含量较高，提取也较为容易，目前已有大量关于黄色素的研究，如红花黄色素对缺血缺氧造成的心肌损伤的缓解作用[1]、拮抗炎症因子IL-1β的诱导的软骨终板细胞凋亡的作用[2]。红花红色素由于含量低不易提取，所以相关的药理作用研究也较少。近年来，由于红花红色素的提取纯化工艺逐渐成熟，关于红花红色素的性质已经有了一些初步的探究，比如红花红色素可能具有体外抗氧化的活性，但是相关的药理作用的研究较少。

本实验通过建立经典小鼠四氯化碳（carbon tetrachloride，CCl_4）急性肝损伤模型，观察小鼠的肝组织病理学的变化以及小鼠血清和肝组织匀浆生化指标的改变,来研究红花红色素对小鼠的CCl_4急性肝损伤的保护作用，使用Western Blot的方法初步探究了红花红

收稿日期：2013-03-24
基金项目：国家自然科学基金（81273523）
作者简介：李晓斐（1993-），女，本科生，研究方向为药理学；李志珂
通讯作者：丁虹（1964-），女，教授，研究方向为药理学

色素的这种护肝作用的可能机制，同时也对红花红色素的提取纯化和体外抗氧化作用进行了探求验证。

红花在我国的应用历史悠久，在我国的河南、浙江、四川等地都有种植，并且有相关的产业衍生。研究红花的附加值对拓展红花的应用前景有重要作用。本实验中关于红花红色素的护肝作用的研究可以对红花资源的开发利用起到一定的促进作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

昆明鼠36只，雌雄各半，体重18~22 g，由武汉大学实验动物中心提供。

1.2 供试品与试剂

红花；Tris Base（科瑞生物）；邻苯三酚（上海试一化学试剂有限公司）；DPPH（sigma公司）；硫酸亚铁（中国仙桃市第一化工厂）；超氧化物歧化酶（SOD）试剂盒、丙二醛（MDA）含量测定试剂盒、谷胱甘肽（GSH）含量测定试剂盒、过氧化氢酶（CAT）含量测定试剂盒、天门冬氨酸氨基转移酶（AST）含量测定试剂盒、血清丙氨酸氨基转移酶（ALT）含量测定试剂盒、碱性磷酸酶（ALP）试剂盒（试剂盒都来自南京建成生物工程研究所）。

1.3 仪器

离心机（飞鸽牌系列）；分析天平，HANGPING FA1004；超声仪，厦门华益通超声设备有限公司；恒温水浴装置，TB-85型，日本岛津公司；酶标仪，KHB ST-360，上海科华。

1.4 方法

1.4.1 红花红色素的提取

红花100 g，蒸馏水洗至无色，加入1600 mL 0.1 mol/L碳酸氢钠溶液浸泡，超声浸泡15 min，抽滤得滤液，用0.5 mol/L的柠檬酸溶液调节pH至酸性，锡纸包或避光放置过夜。过夜后以5000 r/min离心，收集沉淀。红色素不稳定，将所得红色素沉淀冷冻干燥，得到红色素的冻干粉0.35 g。

1.4.2 红花红色素的体外抗氧化实验

1.4.2.1 DPPH自由基的清除实验

将红花红色素稀释为31.25 mg/L~1000 mg/L之间的一系列浓度，取5 μg红花红色素稀释液与150 μL l20 mg/L DPPH溶液加人同一试管中，摇匀，在黑暗中放置30 min，以无水乙醇为空白在517 nm测定其吸光度A。

清除率计算公式：$[A_0-(A-A_1)]/A_0\times100\%$

注：A_0：空白对照液的吸光度；A：测定组的吸光度；A_1：对照组的吸光度。

1.4.2.2 红花红色素对羟自由基的清除试验

将红花红色素稀释为31.25 mg/L~1000 mg/L之间的一系列浓度。反应体系中含9.8 mmol/L H_2O_2 30 μL，9 mmol/L $FeSO_4$ 30 μL，9 mmol/L水杨酸-乙醇60 μL，不同浓度的待测物溶液30 μL。最后加H_2O_2启动反应，37 ℃反应30 min，以超纯水为参比，在510 nm下测量各浓度的吸光度。考虑到多糖本身的吸收光值，以9 mmol/L $FeS0_4$ 2 mL，9 mmol/L水杨酸一乙醇2 mL，不同浓度的待测物溶液2 mL和2 mL超纯水作为多糖的本底吸收。

清除率计算公式：$[(A_0-A_x-A_{xo})/A_0]\times100\%$

注：A0：空白对照液的吸光度；Ax：加入多糖溶液后的吸光度；Axo：不加显色剂 H_2O_2 多糖溶液的吸光度。

1.4.3 四氯化碳急性肝损伤治疗实验

1.4.3.1 动物分组

36只实验小鼠随机分为空白组、模型组、阳性对照组、红花红色素高浓度组（20 mg/kg）、红花红色素中浓度组（10 mg/kg）、红花红低浓度组（5 mg/kg），每组各6只。建立CCl_4小鼠急性肝损伤模型，第5 d，空白组腹腔注射大豆油0.1 mL/g，模型组腹腔注射1%的CCl_4大豆油溶液。所有小鼠同室分笼饲养，正常饮食、进水，室温(20±2) ℃。空白组、CCl_4损伤模型组每天灌服双蒸水0.1 mL/g，阳性对照组每天灌服谷胱甘肽0.5 mL/g，红花红色素保护组每天分别灌服不同浓度的红花红色素稀释液0.1 mL/g，共7 d。于最后一次灌药后24 h处死老鼠，并进行眼球取血，常温4000 r/min离心10 min，留取上清液。剪取内脏保存。

1.4.3.2 血清转氨酶检测

取血清上清液，按试剂盒操作步骤ALT、AST、ALP的活力值以及血清总蛋白的含量。

1.4.3.3 肝组织匀浆生化指标的检测

取肝组织匀浆（生理盐水）上清液，按照试剂盒操作步骤，测得SOD、CAT的活力和GSH、MDA的总含量以及肝组织匀浆中总蛋白的含量。

1.4.3.4 组织病理学观察

留取相同部位肝组织，用10%福尔马林固定，石蜡包埋，切片，HE染色，光镜观察肝组织病理变化。

1.4.3.5 Western Blot法测定肝组织匀浆的Nrf2、HO-1、GSTα含量

根据BCA法测得的蛋白含量，用生理盐水将肝组织匀浆（蛋白裂解液）上清液稀释至同一浓度(2000 μg/mL)，加入4×的上样缓冲液，沸水浴5 min，-40 ℃保存备用；取样10 μL，进行SDS-PAGE凝胶电泳（分离胶为10%），恒压80 V电泳30 min，换至120 V电泳至结束取下凝胶进行转膜；流200 mA转膜10 min，

封闭液室温封闭 PVDF 膜过夜。剪下不同区带的 PVDF 膜，分别入 1:250 的 Nrf2、HO-1、GSTα、β-actin 第一抗体，室温孵育 1 h，TBST 振摇漂洗 3×5 min 次；加入 1:5000 的第二抗体室温孵育 45 min，TBST 振摇漂洗 3×5 min 次；ECL 法显色，暗室中曝光 2 min，显影定影。

2 结果与讨论

2.1 体外抗氧化实验

表 1 红花红色素、V_c及 BHT 对 DPPH 和羟自由基的清除能力

Table 1 Comparsion of the DPPH and OH scavenging activities of safflower red pigment, VC and BHT

分组	IC_{50}	
	DPPH/(mg/L)	OH·/(mg/L)
红花组	461.91±19.86	460.70±13.85
BHT 组	890.84±17.13	1254.69±24.56
VC 组	335.60±10.44	554.69±10.74

BHT和VC是食品工业中常用的抗氧化剂[3]。本次实验中，我们采用DPPH和OH·这两种自由基清除实验，用BHT和Vc对DPPH自由基的清除能力作对照。在DPPH清除实验中，红花红色素、BHT和Vc的IC_{50}值（清除50%的自由基所需要的浓度）分别是461.91±19.86 μg/mL、890.84±17.13 μg/mL和335.60± 10.44 μg/mL，显示出红花红色素的清除能力显著强于BHT。在OH·清除实验中，红花红色素、BHT和Vc的IC_{50}值分别是460.70±13.85、1254.69±24.56和554.69±10.74，显示出红花红色素的清除能力明显强于Vc和BHT，结果见表1。这表明红花红色素具有预防和减轻肝的氧化性损伤的能力。

2.2 红花红色素对血清 ALT、AST、ALP 含量的影响

四氯化碳（CCl_4）是一种广泛用于评估保肝作用的药物和植物提取物的肝毒性剂[4]。在肝损伤检测中，常用到血清转氨酶的测定。当肝细胞受到损伤时，如果仅有细胞膜通透性轻度改变时，ALT轻度升高，肝细胞大量破坏时，AST、ALT可大幅度增高，因此，血清中这两种酶活性的增高在一定程度上反映了肝细胞损害的程度。胆汁酸浓度的升高可促进ALP合成，所以ALP是胆汁淤滞的重要酶指标，无论肝内或者肝外胆道阻滞时，ALP含量均升高[5~6]。故选用ALT、AST、ALP这三个指标来反映肝损伤的情况。

由实验结果可知，与正常组相比，模型组的AST、ALT、ALP值显著增高（$P<0.05$或$P<0.01$），表明模型组肝组织损伤严重，而各红花红色素保护组的AST、ALT、ALP值显著低于模型组（$P<0.05$或$P<0.01$），低剂量不明显。随着红花红色素的浓度降低，对肝脏的保护作用逐渐下降，结果见表2。

表 2 红花红色素对血清 AST、ALT、ALP 活性的影响

Table 2 Effect of safflower red pigment on serum ALT, AST and ALP activities in mice with liver injury induced by CCl4

分组	ALT/(U/L)	AST/(U/L)	ALP/(U/L)	TP/(U/L)
空白组	5.12±1.84	12.30±3.05	19.37±6.74	8.43±0.432
模型组	14.32±3.77$^{\#\#}$	35.40±16.78$^{\#}$	68.19±12.83$^{\#\#}$	7.42±0.46$^{\#\#}$
谷胱甘肽组	8.85±1.75*	17.93±1.04*	36.83±12.47**	8.08±0.38*
红色素高剂量组（20 mg/kg）	6.64±2.32**	14.99±8.94*	21.97±9.26**	8.17±0.32*
红色素中剂量组（10 mg/kg）	8.10±2.35*	17.45±2.87*	40.61±20.95*	8.06±0.33*
红色素低剂量组（5 mg/kg）	11.47±2.03	20.52±5.36	54.95±8.16	7.99±0.31

注：$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$ vs 空白组；$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$ vs 模型组。

2.3 红花红色素对肝组织中 SOD、CAT 活力和 GSH、MDA 含量的影响

超氧化物歧化酶（SOD）是一种重要金属酶，是体内氧自由基清除系统的首要防线。在肝细胞受到自由基攻击时，作为机体的保护性机制，肝脏内 SOD 也可因其耗竭而减少[7]。谷胱甘肽（GSH）可以互通过还原型和氧化型的相转化而起到抗氧化的作用，一般来说肝损伤越严重，GSH 的含量越下降。过氧化氢酶（CAT）是一种酶类清除剂，可促使 H_2O_2 分解为分子氧和水，清除体内的过氧化氢，肝损伤程度越重，肝脏内的 CAT 的含量越少[8]。丙二醛（MDA）为脂质过氧化的终产物，肝损伤程度越重，肝脏内的 MDA 含量则越高[9]。故通过测定肝组织匀浆中的 SOD、GSH、CAT、MAD 指标，来反映肝损伤的程度。

模型组与空白组相比，其 SOD、CAT 的活力和 GSH 的含量明显降低，而且红花红色素保护组的

SOD、CAT 活力和 GSH 的含量较模型组均有明显增加，说明红花红色素对小鼠的急性肝损伤有一定程度的治疗和保护的作用，使肝脏内的抗氧化功能增强，并且疗效与红花红色素所用的剂量成正比关系。模型组与空白组相比，MDA 的含量明显增高，而且红花红色素保护组的 MDA 含量较模型组均有明显降低，其中红高组最接近空白组，说明红花红色素抑制了 MDA 的产生，减少了 MDA 的分解，从而减小了 MDA 分解所引起的细胞损伤，这也说明红花红色素有助于肝脏的抗氧化功能。结果见表 3。

表3 红花红色素对肝组织中SOD、CAT活性以及GSH、MDA含量的影响

Table 3 Effect of safflower red pigment on SOD, CAT activities and GSH,MDA content in mice with liver injury induced by CCl_4

分组	SOD/ (10U/mg Pro)	CAT/ (U/mg Pro)	GSH /(mg/mg Pro)	MDA/ (nmol/mg Pro)
空白组	207.91±26.38	16.09±2.44	11.77±1.58	2.50±0.77
模型组	142.02±22.63$^{\#\#}$	5.52±1.52$^{\#}$	6.64±1.19$^{\#\#}$	4.22±0.91$^{\#\#}$
谷胱甘肽组	180.03±15.73**	11.37±1.68**	8.30±1.29*	2.83±0.59*
红色素高剂量组（20mg/kg）	198.03±26.18**	13.14±3.94**	8.77±1.05*	2.70±0.61*
红色素中剂量组（10mg/kg）	173.77±17.03*	11.56±4.40**	8.44±1.11*	2.89±0.67*
红色素低剂量组（5mg/kg）	168.63±22.63*	10.27±4.44*	7.12±0.63*	3.10±0.60

注：$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$ vs 空白组；$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$ vs 模型组。

2.4 红花红色素对肝组织的病理学影响

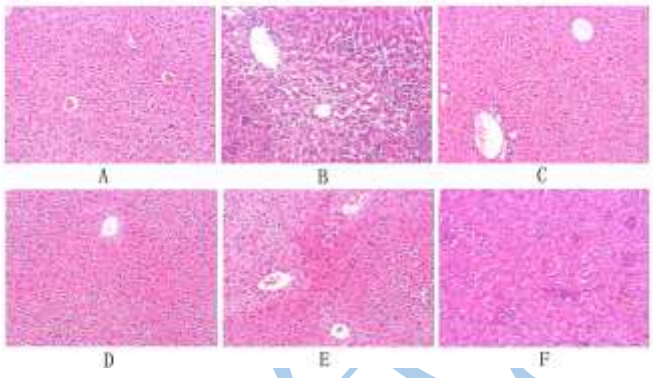


图1 红花红色素对肝脏组织病理学的影响（100×）

Fig.1 Effect of safflower red pigment on liver histopathology (100×)

注：A：空白组，B：四氯化碳模型组，C：谷胱甘肽组，D：红花红色素组（20 mg/kg），E：红花红色素组（10 mg/kg），F：红花红色素组（5 mg/kg）。

小鼠肝脏病理切片显示，空白组小鼠的肝脏结构正常，肝细胞索呈明显的放射状，汇管区无变性、坏死及炎症细胞浸润等病变，总体观察，肝细胞形态正常。CCl_4模型组小鼠肝脏呈现显著的肝细胞碎片性坏死、汇管区扩大、有较多炎细胞浸润等病变。谷胱甘肽阳性对照组，偶见细胞坏死，汇管区少量炎症细胞浸润。红花高剂量组肝脏组织均最接近空白组，汇管区正常无扩大，肝小叶结构基本完整，肝细胞少有坏死。低、中剂量组的肝脏组织较模型组也有一定改善，但与红花高剂量组比较，中剂量组效果稍差，低剂量组最差。结果见图1。

2.5 红花红花素对 Nrf2、OH-1、NQO1 表达水平的影响

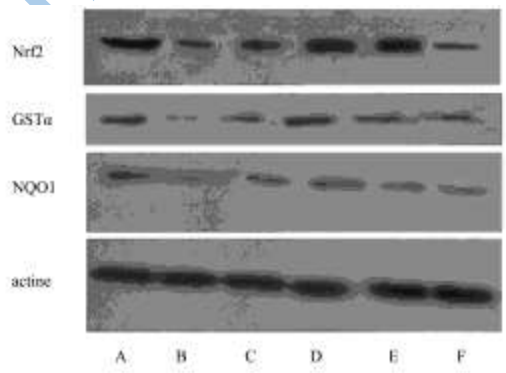


图 2 CCl_4介导的肝损伤小鼠的肝组织中 Nrf2、GSTα、NQO1 的表达

Fig.2 Expression of Nrf2, GSTα, NQO1 in mice liver with liver injury induced by CCl4

注：A：空白组，B：四氯化碳模型组，C：谷胱甘肽组（阳性对照），D：红花红色素组（20 mg/kg），E：红花红色素组 10 mg/kg），F：红花红色素组（5 mg/kg）。

在四氯化碳诱导的肝损伤的发病机制中，高活性的代谢物引起的氧化应激起到了关键作用，而越来越多的证据表明Nrf2在第二阶段的抗氧化和排异反应中起到了重要的作用[10]。本次试验是首次证明红花红色素能够通过Nrf2通路提高抗氧化物酶的活性。与其他研究结果一致，本次研究表明，在CCl_4损伤模型组中，Nrf2、GSTα、NQO1的蛋白表达水平明显降低，表明

CCl_4可以引起氧化性肝损伤。与CCl_4损伤模型组比较，红花红色素保护组中，Nrf2、GSTα、NQO1的蛋白表达水平有效地提升，表明了红花红色素能够通过Nrf2通路对氧化性肝损伤起到治疗作用。至于其对Nrf2通路的具体作用机制，还需后续试验的进一步研究。结果见图2，表4。

表 4 红花红花素对 Nrf2、OH-1、NQO1 表达水平的影响

Table 4 Effect of safflower red pigment on expression of GSTα, Nrf2 and NQO1 in rat liver in rats with liver injury induced by CCl_4

分组	GSTα/actine%	Nrf2/actine%	NQO1/actine%
空白组	31.21±4.13	62.62±11.65	40.43±4.89
模型组	18.93±10.85$^{\#}$	30.43±6.21$^{\#}$	15.65±4.81$^{\#}$
谷胱甘肽组	22.53±4.92	37.63±8.36	28.32±3.37*
红色素高剂量组(20mg/kg)	42.56±5.97*	65.43±10.19*	41.81±6.46*
红色素中剂量组(10mg/kg)	32.63±3.46*	60.53±9.14*	32.52±5.83*
红色素低剂量组(5mg/kg)	24.79±4.03	41.05±8.61	29.40±3.82

注：$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$ vs 空白组；$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$ vs 模型组。

3 结论

本实验通过优化红色素的提取工艺，加入超声萃取等得到了高纯度红花红色素，进而开展了红花红色素对体内外抗氧化的作用的研究，得到红花红色素无论在体内还是体外都有良好的抗氧化功能的结论，还通过实验证明了红花红色素的治疗肝损伤与 Nrf2 通路有关。作为一种常用的食品添加剂，红花红色素还具有良好的保肝护肝作用，说明红花红色素有一定的市场发展前景。至于其对 Nrf2 通路的具体作用机制，还需后续试验的进一步研究。

参考文献

[1] 朴永哲,金鸣,臧宝霞,等.红花黄色素改善大鼠缺氧心肌能量代谢的研究[J].中草药,2003,34(5):349-439
Piao Y Z, Jin M, Zang B X, et al. Study of safflower yellow on improving energetic metabol ism in hypoxic myocardium of rats[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2003, 34(5): 349-439

[2] 张宇,赵永见,周泉,等.羟基红花黄色素 A 拮抗 IL-1β 诱导软骨终板细胞凋亡的作用机制[J].中国药理学通报,2011, 27(12):1704-1709.
Zhang Y, Zhao Y J, Zhou Q, et al. The anti-apoptotic effect on Hydroxy safflower yellow A on end-plate chondrocytes induced by IL-1β [J]. Chin Pharmacol Bull, 2011, 27(12): 1704-1709

[3] 胡雅飞,于海歌,梁先敏.p,p'-DDE 和 β-BHC 联合染毒对大鼠离体支持细胞脂质过氧化的影响[J].环境与健康杂志,2007,24(11):845-847
Hu Y F, YU H G, Liang X M. Combined Effects of p, p'-DDE and β-BHC on Lipid Peroxidation in Rat Sertoli Cells in vitro [J]. Journal of Environment and Health, 2007, 24(11): 845-847

[4] Bhathal P S, Rose N R, Mackay I R, et al, Strain differences in mice in carbon tetrachloride-induced liver injury [J]. Br J Exp Pathol ,1983, 64(5): 524-533

[5] 朱维平,张敏,李玮,等.现代肝脏病诊疗学[M].天津科学技术出版社,2010
Zhu W P, Zhang M, Li W, et al. The modern liver disease diagnostics[M].Tianjin Science and Technology Press, 2010

[6] Girish C, Pradhan S C, Hepatoprotective activities of picroliv, curcumin, and ellagic acid compared to silymarin on carbon-tetrachloride- induced liver toxicity in mice [J]. J Pharmacol Pharmacother, 2012, 3(2): 149-155

[7] Moselhy S S, Ali H K. Hepatoprotective effect of cinnamon extracts against carbon tetrachloride induce oxidative stress and liver injury in rats [J]. Biol Res, 2009, 42(1): 93-98

[8] Webb C, Twedt D. Oxidative stress and liver disease [J]. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 2008, 38(1): 125-135

[9] Masalkar P D, Abhang S A. Oxidative stress and antioxidant status in patients with alcoholic liver disease [J]. Clinica Chimica Acta, 2005, 355(1-2): 61-65

[10] Lian F, Wang X D. Enzymatic metabolites of lycopene induce Nrf2-mediated expression of phase II detoxifying/ antioxidant enzymes in human bronchial epithelial cells [J]. Int J Cancer, 2008, 123(6): 1262-1268