翡翠贻贝提取物对小鼠急性肝损伤的保护作用

刘淑集[1,2,3]，潘裕添[4]，刘智禹[2,3]，黄家福[4]，吴晓梅[4]，苏永昌[2,3]，蔡云辉[4]，王茵[2,3]，陈锦权[1]
(1.福建农林大学食品科学学院，福建福州 350002) (2.福建省水产研究所,国家海水鱼类加工技术研发分中心(厦门),福建省海洋生物增养殖与高值化利用重点实验室，福建厦门 361013) (3.福建省海洋生物资源开发利用协同创新中心，福建厦门 361013) (4.菌物工程技术研究中心，闽南师范大学，福建漳州 363000)

摘要：本文研究探讨了翡翠贻贝提取物对小鼠急性肝损伤的保护作用。建立四氯化碳（CCl_4）致小鼠急性肝损伤模型，测定血清天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)含量及肝组织丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)、肿瘤坏死因子 α(TNF-α)和白介素-6(IL-6)含量；采用双向电泳分析肝脏差异表达蛋白；病理切片观察小鼠肝组织病理损伤的情况。结果表明，与模型组相比较，翡翠贻贝提取物各剂量组小鼠 ALT、AST 水平和 MDA 含量均显著降低，SOD、CAT、GSH-Px 和 GSH 含量显著提高，TNF-α 和 IL-6 水平也显著降低（$p<0.01$）。通过双向电泳获得了蛋白质显著差异点 97 个，鉴定出在模型组中有 4 个蛋白高表达，1 个蛋白低表达；在翡翠贻贝提取物组中 3 个蛋白高表达。病理镜检显示小鼠肝脏损伤程度有所减轻。从以上实验结果可推测，翡翠贻贝提取物对 CCl_4 引起的小鼠急性化学性肝损伤具有明显的保护作用。

关键词：翡翠贻贝提取物；四氯化碳；急性肝损伤；双向电泳
文章篇号：1673-9078(2016)8-8-13 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.8.002

Hepatoprotective Activity of *Perna viridis* Extracts Against CCl_4-induced Liver Injury in Mice

LIU Shu-ji[1,2,3], PAN Yu-tian[4], LIU Zhi-yu[2,3], HUANG Jia-fu[4], WU Xiao-mei[4], SU Yong-chang[2,3], CAI Yun-hui[4], WANG Yin[2,3], CHEN Jin-quan[1]
(1.College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China) (2.Fisheries Research Institute of Fujian, National Research and Development Center for Marine Fish Processing (Xiamen), Key Laboratory of Cultivation and High-value Utilization of Marine Organisms in Fujian Province, Xiamen 361013, China) (3.Fujian Collaborative Innovation Center for Exploitation and Utilization of Marine Biological Resources, Xiamen 361013, China) (4.Engineering Technological Center of Mushroom Industry, Minnan Normal University, Zhangzhou 363000, China)

Abstract: Here, the protective effect of *Perna viridis* extract against acute liver injury was explored. A carbon tetrachloride (CCl_4)-induced mouse model of acute liver injury was established, and levels of serum aspartate aminotransferase (AST) and alanine transaminase (ALT), as well as the content of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione (GSH), tumor necrosis factor alpha (TNF-α), and interleukin 6 (IL-6) in hepatic tissues, were determined. Two-dimensional (2D) electrophoresis was used to analyze the differentially expressed proteins in the liver, and pathological damage in liver tissue was observed by pathological sectioning. The results showed that the groups treated with *P. viridis* extract at different doses showed a significant decrease in serum AST and ALT levels and the content of MDA, TNF-α, and IL-6, as well as a pronounced increase in the content of SOD, CAT, GSH-Px, and GSH ($p<0.01$) as compared with levels observed in the model group. The 2D-electrophoresis analysis showed 97 significantly deviating protein spots, four overexpressed proteins, and one protein exhibiting low expression in the model group, and three overexpressed proteins in the *P. viridis*-treated group. Additionally, microscopic pathologic examination revealed decreased liver damage in the *P. viridis*-treated group. These results suggested that the *P. viridis* extract exerted adequate protective effects against CCl_4-induced acute liver injury.

Key words: acute liver injury; carbon tetrachloride; *Perna viridis* extract; two-dimensional electrophoresis

收稿日期：2015-07-17。基金项目：福建省省属公益类科研院所基本科研专项（2014R1003-9）；福建省科技重大专项(2014NZ0001-1)；厦门市科技专项（3502Z20132002）；国家海洋公益性行业科研专项（201405016-1）。作者简介：刘淑集（1981-），女，助理研究员，在职博士生，研究方向：水产品加工及综合利用。通讯作者：陈锦权（1954-），男，教授，博士生导师，研究方向：农产品加工及食品安全控制

肝脏是机体重要的代谢和屏蔽器官，肝损伤是临床常见的危害人类健康的疾病。导致肝损伤的重要原因主要归结于肝毒性物质引起的氧化应激反应，这很可能引发肝癌、酒精性脂肪肝、肝纤维化等多种肝病[1]。随着现代化工业的发展，肝毒性物质的种类越来越多，致使诱导人类肝损伤的几率也大大地增加。四氯化碳（CCl_4）是经典的化学性肝毒剂，注射 CCl_4 导致动物肝损伤是研究保肝及其作用机制最为常用的模型[2]，其机制是 CCl_4 在体内由肝微粒体细胞色素 P450 代谢成 CCl_3 自由基，其代谢产物会产生脂质过氧化作用，并启动过氧化连锁反应，产生具有毒性作用的氢氧离子和超氧阴离子[3,4]进而损伤肝细胞。目前对肝损伤的防治仍是一个全球性的严峻课题，寻找具有抑制肝损伤作用的有效药物对保护人类健康有重要意义。

翡翠贻贝，学名 *Perna viridis*，俗称海红，潮汕俗名淡菜，是一种大众化的海产双壳贝类，主要分布在我国的东海南部、南海、台湾海峡等地。它肉质鲜美，营养价值很高，自古记载具有滋阴、补肝肾、益精血等功效。现代科学研究也表明，从贻贝中提取具有抗炎、抗氧化、抗病毒、抗菌、抗肿瘤等功效的糖胺聚糖、蛋白质、牛磺酸等活性成分，但还未见有关翡翠贻贝活性物质对损伤肝脏起保护作用的报道。因此，本论文通过建立 CCl_4 肝损伤小鼠模型，探讨翡翠贻贝提取物的保护肝损伤作用及其机制，无疑会丰富翡翠贻贝生理功能研究的资料，也可为提高翡翠贻贝的高值化利用开辟一条新途径，也为有效开发利用翡翠贻贝资源提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 原料

1.1.1 原料与实验动物

翡翠贻贝提取物（实验室自制，浅黄色粉末，蛋白质含量 53.40%，糖含量 38.56%）。

昆明种小鼠，SPF 级，60 只（20±2 g/只），雄性，购于上海斯莱克实验动物有限公司（动物许可证号：SCXK（沪）：2012-2002）。饲养环境温度 20~25 ℃，每天日照 12 h，自由取食进水，相对湿度：45%~55%，小鼠适应环境 1 周。

1.1.2 实验试剂

联苯双酯滴丸，购于浙江万邦药业股份有限公司；四氯化碳，分析纯，购于西陇化工股份有限公司；花生油，购于山东鲁花集团有限公司；丙氨酸氨基转移酶（ALT）、天门冬氨酸氨基转移酶（AST）、总蛋白（TP）、白蛋白（ALB）和碱性磷酸酶（ALP）试剂盒购于深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司；丙二醛（MDA）、超氧化物歧化酶（SOD）、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）、过氧化氢酶（CAT）和肿瘤坏死因子 α（TNF-α）和白介素-6（IL-6）测定试剂盒，购于南京建成生物工程研究所；苏木精、伊红购于南昌雨露实验器材有限公司；IPG 胶条（pH 4~7，11 cm）、IPG 缓冲液、二硫苏糖醇（DTT）、溴酚蓝、TEMED、过硫酸铵、十二烷基磺酸钠（SDS）、尿素，购于 GE Healthcare 公司；硫脲、丙烯酰胺、苯甲基磺酰氟、N,N-亚甲基双丙烯酰胺，购于 Sigma 公司；甲醛、甘氨酸、无水乙醇等其它试剂均为国产分析纯。

1.1.3 实验仪器

BS-220 全自动生化分析仪，深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司；UV-1100 紫外可见分光光度计，上海美谱达仪器有限公司；HH-2 数显恒温水浴锅，金坛市科析仪器有限公司；Centrifuge 5810R 型高速冷冻离心机，德国 Eppendorf 公司；1510-01014C 酶标仪，Thermo Fisher Scientific 公司；Leica EG 1150H 包埋机：德国莱卡公司；SLEE 切片机，Medical an orgentec company；Olympose 显微镜，BS124S 型电子分析天平，德国 Sartorius 公司；IPGphor^{TM} 等点聚焦电泳系统、二维垂直电泳装置，Amersham Pharmacia 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组和给药方法

将 60 只昆明小鼠随机分组，分成正常对照组、模型组、翡翠贻贝提取物低剂量组（L）、中剂量组（M）、高剂量组（H）和药物对照组 6 组，每组 12 只，适应性饲养 1 周。除模型组和正常组灌胃生理盐水外，翡翠贻贝提取物 L、M、H 剂量组分别灌胃 150、250、500 mg/(kg·d)翡翠贻贝提取物，药物对照组灌胃 150 mg/(kg·d)联苯双酯。每天灌胃一次，连续灌胃 30 d，每次灌胃前称量体重，按体重量变化调整灌胃量。末次灌胃后禁食隔夜 16 h，除了正常对照组给予花生油外，其余各组均灌胃 0.20% CCl_4 花生油溶液，自由取食 4 h，再灌胃 1 次，禁食禁水 24 h，摘眼球取血，分离血清，取取肝脏右叶组织于 10%甲醛溶液中固定备用，剩余肝脏组织匀浆。

1.2.2 小鼠脏器指数测定

实验结束时称量小鼠体质量，处死，取小鼠肝脏、胸腺，置于预冷生理盐水中洗去血液，滤纸吸去水分，立即称重，计算指数。计算公式为：脏器指数=脏器重量(mg)/体重(g)×100%。

1.2.3 血清中 AST、ALT、ALB、ALP、TP 含

量测定

摘取眼球取血，4000 r/min，离心 10 min，分离血清，用 BS-220 全自动生化分析仪及其配套试剂盒检测血清中 ALT、AST、ALB、ALP、TP 的含量。

1.2.4 肝组织 MDA、SOD、GSH-Px、CAT、TNF-α、IL-6 含量测定

称取肝组织重量，按照重量（g）:体积（mL）=1:9 的比例加入 9 倍体积生理盐水，剪碎组织，匀浆。3000 r/min，离心 10 min，取上清液，稀释相应倍数，严格按照试剂盒说明书操作，测定吸光度值（OD），计算得到相应的含量。

1.2.5 双向电泳法分离及肝组织差异蛋白点的鉴定

1.2.5.1 肝组织总蛋白质的提取

将肝组织用生理盐水漂洗去除血液，剪碎，液氮中研磨，在冰上加入裂解液(50 mM Tris-HCl，1mM $MgCl_2$，1 mM $CaCl_2$，150 mM NaCl，1% NP-40)匀浆，4 ℃，20000 g 离心 30 min，取上清蛋白分装，-80 ℃保存。采用 Bradford 法[5]测定蛋白质的浓度。

1.2.5.2 双向电泳及图像分析

将提取的肝组织蛋白样品与缓冲液等体积混合，上样于 IPG 胶条槽内，进行水化（12 h，50 v），后进行第一向等电聚焦（IEF）。等电聚焦电泳结束后，平衡 IPG 胶条。然后将平衡好的胶条进行第二向电泳即 SDS-PAGE 垂直板电泳。采用 5%浓缩胶 20 mA，30 min，10%分离胶 30 mA，4 h。第二向电泳结束后凝胶采用 Amersham Pharmacia 的银染法进行染色。利用 Image master 软件对电泳图谱进行匹配，分析差异斑点和差异比值，包括新增或消失的斑点以及差异 1.5 倍以上的斑点。

1.2.5.3 胶内酶解及质谱鉴定分析

将图像分析中得到的差异点进行斑点切取，用碳酸氢铵、乙腈混合液振荡脱色，加入胰蛋白酶（10 ng/mL）酶解，用三氟乙酸和乙腈混合液提取肽段，样品用基质辅助激光解吸飞行时间质谱（MALDI-TOF-MS）分析，所得的结果在 NCBInr 数据库中检索。

1.2.6 组织病理学的观察

取 10%甲醛溶液中固定的小鼠肝脏右叶组织，进行乙醇梯度脱水、二甲苯透明，采用石蜡包埋，切片，厚度为 3 μm，进行苏木精-伊红（HE）染色，封片，显微镜下进行形态学观察，拍照。

1.2.7 统计学方法

实验数据采用 SPSS10.0 统计软件进行分析，结果都以平均值（mean）±标准差（sd）表示，用 one way-ANOVA 进行单因素方差分析。

2 结果与讨论

2.1 对急性肝损伤小鼠脏器指数的影响

肝脏指数能够反映肝细胞的肿胀和炎性浸润[6]。从表 1 可以看出，相比于正常组，模型组的肝、胸腺有不同程度的增大，且肝脏指数具有显著性差异（p<0.05），说明模型组小鼠的肝损伤严重，有炎症反应发生，表明造模成功。与模型组比较，翡翠贻贝提取物 M、H 剂量组的肝脏指数分别为 3.39%和 3.46%，显著低于模型组肝脏指数（p<0.01）。而 L、H 剂量组的胸腺指数均为 0.17%，明显低于模型组（p<0.05），M 剂量组的胸腺指数与正常组一致。因此可以看出，翡翠贻贝提取物可以对小鼠化学性肝损伤起到一定的保护作用。

表 1 小鼠脏器重量及指数（$\bar{x}\pm s$，n=10）

Table 1 Weight and index of mouse organs ($\bar{x}\pm s$，n=10)

组别	肝脏重量/g	肝脏指数/%	胸腺重量/g	胸腺指数/%
正常组（CON）	1.383±0.046	3.55±0.09	0.045±0.018	0.19±0.04
模型组（MOD)	1.553±0.076$^{\Delta\Delta}$	3.84±0.15$^{\Delta}$	0.086±0.005$^{\Delta\Delta}$	0.23±0.01
低剂量组（L）	1.352±0.076**	3.72±0.16	0.066±0.006**	0.17±0.02*
中剂量组（M）	1.283±0.154**	3.39±0.05**	0.056±0.014**	0.19±0.03
高剂量组（H）	1.372±0.062**	3.46±0.06**	0.055±0.007**	0.17±0.03*
药物组（DRUG）	1.301±0.077**	3.43±0.10**	0.055±0.013**	0.16±0.04**

注：Δ 与正常对照组相比，Δp<0.05，ΔΔp<0.01；*与模型组相比，*p<0.05，**p<0.01。

2.2 对 CCl4 肝损伤小鼠血清 AST、ALT、ALP、ALB 和 TP 活性影响

反映肝细胞的损伤程度最可靠指标包括血清中 AST、ALT 的含量。肝脏发生炎症、坏死等损伤时，AST 和 ALT 从肝细胞内被释放进入血液，导致血清中 AST 和 ALT 活性增高；受损肝脏代谢蛋白质的功能受到障碍，导致血清中 ALB 和 TP 含量降低。从表 2 可以看到，模型组的 AST 和 ALT 分别是正常对照

组的 1.63 倍和 4.04 倍，可见模型组 AST、ALT 水平显著升高（p<0.01），表明造模成功。翡翠贻贝提取物 L、M、H 组的 AST 值依次为 150.60、128.03 和 149.42 U·L-1，分别降低到模型组的 59.16%、50.29%、58.70%，但与正常对照组的 AST 值相当（p<0.05）。翡翠贻贝提取物 L、M、H 组的 ALT 值依次为 65.87、45.23 和 55.32U·L-1，分别比模型组降低了 59.74%、72.36%、66.19%。因此，翡翠贻贝提取物组的 AST 和 ALT 值与模型组相比，均有显著性地降低（p<0.01）。同时 AST/ALT 的比值大于 1，也说明了小鼠肝脏受到了一定的损伤[7]。另外，翡翠贻贝提取物各剂量组的 ALP 含量与正常组 ALP 接近，且显著低于模型组的 ALP 含量（p<0.01）。模型组的 ALB 和 TP 含量显著低于正常组（p<0.01），翡翠贻贝提取物各剂量组能够升高 ALB 和 TP 的含量。以上结果表明翡翠贻贝提取物对化学性肝损伤引起的 AST、ALT、ALP 含量的升高及 ALB、TP 含量的降低均有抑制作用。

表 2 翡翠贻贝提取物对 CCl_4 肝损伤小鼠血清 AST、ALT、ALP、ALB 和 TP 活性的影响（$\bar{x}\pm s$，n=10）

Table 2 Effect of *P. viridis* extract on serum AST, ALT, ALP, ALB, and TP levels in the mice with CCl_4-induced hepatic injury($\bar{x}\pm s$, n=10)

Groups	AST/(U/L)	ALT/(U/L)	ALP/(IU/L)	ALB/(mg/dL)	TP/(mg/dL)
正常组（CON）	156.20±10.97	41.77±1.63	133.80±9.55	36.67±0.63	61.85±0.98
模型组（MOD)	256.22±13.58$^{\Delta\Delta}$	158.70±7.25$^{\Delta\Delta}$	193.40±7.60$^{\Delta\Delta}$	33.20±1.01$^{\Delta\Delta}$	56.37±2.10$^{\Delta\Delta}$
低剂量组（L）	152.27±9.72**	65.70±6.28$^{**\Delta}$	138.55±9.41**	34.68±0.66**	58.93±0.96$^{**\Delta\Delta}$
中剂量组（M）	128.37±8.34**	46.07±3.31**	114.88±4.86**	34.80±0.32$^{**\Delta\Delta}$	61.60±1.67**
高剂量组（H）	148.75±11.61**	55.15±3.79**	118.67±7.42**	36.20±0.83**	60.05±2.63$^{**\Delta}$
药物组（DRUG）	163.73±7.05**	45.88±3.38**	160.17±7.77$^{*\Delta}$	35.37±0.79$^{**\Delta\Delta}$	62.08±0.94**

注：Δ 与正常对照组相比，Δp<0.05，ΔΔp<0.01；*与模型组相比，*p<0.05，**p<0.01。

表 3 翡翠贻贝提取物对 CCl_4 肝损伤小鼠肝组织中 MDA、SOD、CAT、GHS-Px、TNF-α、IL-6 含量的影响（$\bar{x}\pm s$，n=10）

Table 3 Effect of *P. viridis* extract on levels of MDA, SOD, CAT, GSH-Px, TNF-α, and IL-6 in the liver tissues of mice with CCl_4-induced hepatic injury ($\bar{x}\pm s$，n=10)

组别	MDA /(nmol/mg prot)	SOD /(U/mg prot)	CAT /(U/mg prot)	GSH-Px /(U/mg prot)	GSH /(Umol/g prot)	TNF-α ρ/(ng/L)	IL-6 ρ/(ng/L)
正常组(CON)	2.27±0.20	135.51±4.34	13.28±1.95	1200.01±17.66	29.48±1.75	40.01±1.69$^{**\Delta\Delta}$	93.29±5.12$^{**\Delta}$
型组(MOD)	2.94±0.69$^{\Delta\Delta}$	115.58±4.09$^{\Delta\Delta}$	5.75±2.09$^{\Delta\Delta}$	995.63±19.08$^{\Delta}$	22.42±2.79$^{\Delta}$	60.06±3.06$^{\Delta\Delta}$	143.95±5.71$^{\Delta}$
剂量组(L)	1.49±0.15**	134.83±8.88	6.14±0.37*	1272.20±13.71	20.79±1.84	52.59±2.80$^{\Delta\Delta}$	74.80±4.71$^{**\Delta\Delta}$
中剂量组(M)	1.94±0.78**	129.43±9.13	6.34±0.79**	1291.82±15.18*	24.66±1.43	41.06±2.48$^{**\Delta\Delta}$	80.78±2.21$^{**\Delta\Delta}$
剂量组(H)	1.64±0.06**	127.70±9.18	7.44±0.27**	1113.45±15.09**	45.56±4.04**	46.54±2.66$^{*\Delta\Delta}$	82.39±1.71$^{**\Delta\Delta}$
药物组(DRUG)	2.18±0.24**	134.16±2.63**	7.52±0.94**	1232.38±12.89**	44.42±1.76**	48.04±2.09$^{\Delta\Delta}$	79.85±4.94$^{**\Delta\Delta}$

注：Δ 与正常对照组相比，Δp<0.05，ΔΔp<0.01；*与模型组相比，*p<0.05，**p<0.01。

2.3 对 CCl_4 肝损伤小鼠肝脏中 MDA、SOD、CAT、GHS-Px、TNF-α、IL-6 含量的影响

导致肝损伤最可能的原因及表现是机体脂质过氧化和氧化体系指标的变化。MDA 是脂质过氧化代谢的终产物，其可通过增加膜的通透性，破坏细胞膜结构而导致细胞损伤，还可直接激活 Kupffer 细胞，分泌 TNF-α 等细胞因子。TNF-α 能够促进细胞凋亡进而直接损伤肝细胞，也可诱导机体炎症反应的重要递质如 IL-6 的生成，引发局部炎症细胞浸润，从而加重肝脏的炎症。此外，氧化应激是疾病发病的重要机制。SOD、CAT、GSH-Px 和 GSH 是肝脏重要的抗氧化酶和还原物质，测定其变化可反应组织细胞内氧化应激水平[8]。从表 3 可以看出，模型组的 MDA 含量比正常对照组显著增加了 29.52%（p<0.01）。而翡翠贻贝提取物 L、M、H 剂量组 MDA 含量明显低于模型组（p<0.01），分别降低了 49.32%，34.01%和 44.22%，说明翡翠贻贝提取物对肝损伤小鼠 MDA 的增加具有抑制作用。模型组小鼠的 SOD、CAT、GSH-Px、GSH 指标均比正常组显著降低，而翡翠贻贝提取物各剂量组能够恢复由 CCl_4 引起的这些抗氧化酶系的含量，提高机体的氧化应激水平，对于保护肝细胞起重要作用，其作用机制可能与抗过氧化、减少有毒细胞因子的释放有关。在细胞因子方面，模型组小鼠的 TNF-α 和 IL-6 显著升高，各剂量翡翠贻贝提取物能够降低细胞因子 TNF-α 和 IL-6 的含量，间接保护肝细胞，从另一层面说明其具有一定的护肝功效。

2.4 小鼠肝组织差异蛋白的表达分析

分别取正常对照组、CCl_4 损伤模型组和翡翠贻贝提取物剂量组 3 个组的肝组织蛋白进行 2D-双向电泳，每组取 3 个重复，采用 Image Master 2D Platinum 软件进行图像分析，蛋白斑点在等电点 pI=3.00~10.00 范围内蛋白斑点分布最多，得到总胶点数为 23077 个，其中每组得到的胶点数分别为 7732、8058 和 7287 个。正常对照组与 CCl_4 损伤模型组大部分蛋白点的匹配率为 75.76%，与翡翠贻贝提取物剂量组大部分蛋白点的匹配率为 76.06%。共获得差异 1.5 倍以上的蛋白质显著差异点 97 个，其中重复点 28 个，非重复点 69 个。CCl_4 损伤模型组与正常对照组相比，有 27 个蛋白表达明显增强，12 个蛋白表达明显降低；翡翠贻贝提取物剂量组与正常对照组相比，有 12 个蛋白表达明显增强，18 个蛋白表达明显降低；翡翠贻贝提取物剂量组与 CCl_4 损伤模型组相比，有 5 个蛋白表达明显增高，23 个蛋白表达明显降低。对其中表达明显差异的蛋白点进行质谱鉴定，结果显示，钙网蛋白（登录号：CALR_MOUSE）、重组细胞角蛋白 8（登录号：K2C8_MOUSE）、过氧化物还原酶（登录号：PRDX2_MOUSE）和 Rho GEP 解离抑制因子 α（登录号：GDIR2_MOUSE）等在 CCl_4 损伤模型小鼠组织中高表达。Chiqnard 等[9]研究表明肝癌患者血液中的钙网蛋白及其裂解片段高于正常人及肝癌高危人群。本实验中钙网蛋白在肝损伤时表达上调，与 Chiqnard 的研究结果相吻合。过氧化物还原酶属于抗氧化蛋白超家族，作为一种氧化应激内源性生物标记物，在多种肿瘤细胞中高表达[10]。细胞角蛋白 CK8 是多条与肿瘤形成有关的信号通路的上游靶基因。Arginase-1 是一种双核锰金属蛋白酶，高度特异性表达于正常肝组织中，在肝硬化组织[11]、乙型肝炎组织[12]的表达量较低，因此可作为肝细胞一个特异性和敏感性的标记物[13]。本实验结果也表明 Arginase-1（登录号：ARG11_MOUSE）在 CCl_4 损伤模型小鼠组织中低表达；RNA 结合蛋白具有抑制炎症反应的作用，还可和某些细胞转录后负调控因子协同作用来减少一些特殊的促炎因子如 TGF-β_1 的生物合成[14]。TGF-β1 是最主要的促纤维化因子，而肝纤维化活动程度与血清 TNF-α、HA 相关。S-腺苷甲硫氨酸合成酶（SAM）是肝脏主要的甲基供体，且具有转硫的作用，可合成抗氧化作用的谷胱甘肽参与肝脏的解毒[15]。实验中蛋白质鉴定结果表明，RNA 结合蛋白 K（登录号：HNRPK_MOUSE）、S-腺苷甲硫氨酸合成酶（登录号：METK1_MOUSE）等在翡翠贻贝提取物剂量组小鼠肝组织中表达上调，揭示了翡翠贻贝提取物可能通过清除肝脏线粒体产生的过量活性氧，降低 TNF-α 含量，抑制肝纤维化，从而达到保护肝损伤的作用。

2.5 小鼠肝组织形态学观察

将小鼠肝右叶固定在 10%甲醛溶液中，经过脱水、切片、石蜡包埋、苏木精-伊红染色、镜检等过程后观察各组小鼠肝组织形态，结果如图 1 所示。图 1a 中正常对照组小鼠肝脏的肝细胞结构完整，肝小叶结构清晰，以中央静脉为中心呈放射状排列，未见肝细胞变性、坏死，无炎细胞浸润。而模型组肝小叶失去正常结构，肝索排列紊乱，肝中央静脉周围有大范围的肝细胞肿大、坏死、变性，核固缩，并伴有弥漫性炎细胞浸润（见图 1b）。翡翠贻贝提取物 L、M、H 剂量组和药物对照组大部分肝小叶结构，形态基本正常，肝细胞结构完整，肝细胞肿大、炎细胞浸润和肝细胞坏死程度较模型组均明显降低，可能与翡翠贻贝提取物能够降低 MDA 的含量有关，起到保护细胞膜结构，减轻肝细胞的炎性浸润的作用。

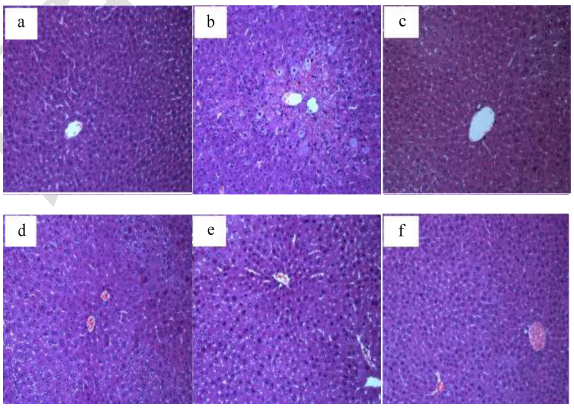


图 1 小鼠肝组织形态图

Fig. 1 Histopathological sections of mouse liver tissues

注：a：正常组；b：模型组；c：低剂量 L 组；d：中剂量 M 组；e：高剂量 H 组；f：药物组。

3 结论

本论文通过建立 CCl_4 急性肝损伤小鼠模型研究了翡翠贻贝提取物对受损的小鼠肝脏的保护作用，结果表明翡翠贻贝提取物能够抑制由 CCl_4 引起的小鼠血清 ALT、AST 和 ALP 值的升高，提高小鼠血清中 ALB 和 TP 的含量。同时，还可以降低肝脏 MDA 的含量，提高体内 SOD、CAT、GSH-Px 和 GSH 等抗氧化酶系的含量，提高机体的氧化应激水平，对于保护肝细胞起重要作用，其机制可能与抗过氧化、减少有毒细胞因子的释放有关。对细胞因子的检测也显示能够降低因子 TNF-α 和 IL-6 的水平，间接保护肝细胞；

肝组织病理学观察也证实翡翠贻贝提取物能够减轻小鼠肝细胞肿大、炎性浸润以及坏死严重程度。进一步对肝组织蛋白进行 2-D 电泳及质谱分析发现，钙网蛋白、重组细胞角蛋白 8、过氧化物还原酶和 Rho GEP 解离抑制因子 α 等在 CCl_4 损伤模型小鼠组织中高表达；Arginase-1 在 CCl_4 损伤模型小鼠组织中低表达；S-腺苷甲硫氨酸合成酶、RNA 结合蛋白 K 和铁蛋白抗体在翡翠贻贝提取物剂量组小鼠组织中高表达，揭示翡翠贻贝提取物可能通过清除肝脏线粒体产生的过量活性氧，抑制肝纤维化，从而达到保护肝损伤的作用。综上所述，翡翠贻贝提取物对急性化学性肝损伤小鼠具有较好的保护作用，为翡翠贻贝提取物往保肝护肝药物的临床应用开发奠定了一定的研究基础，但其确切的作用机制还有待于进一步的研究与证实。

参考文献

[1] Soni M G, Mehendale H M. Role of tissue repair in toxicologic interactions among hepatotoxic organics [J]. Environ Health Perspect, 1998, 106(1): 6307

[2] Ni Cheng, Naiyan Ren, Hui Gao, et al. Antioxidant and hepatoprotective effects of S*chisandra chinensis* pollen extract on CCl_4-induced acute liver damage in mice [J]. Food and Chemical Toxicology, 2013, 55: 234-240

[3] Petersen K F, Oral E A, Dufour S, et al. Leptin reverses insulin resistance and hepatic steatosis in patients with severe lipodystrophy [J]. J. Clin. Invest., 2002, 109: 1345

[4] Nasser M Rizk, D Stammsen, G Preibisch, et al. Leptin and tumor necrosis factor-alpha induce the tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription proteins in the hypothalamus of normal rats in vivo [J]. Endocrinology, 2001, 142(7): 3027

[5] Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 72, 248-254

[6] 陈伟,何颖,蒋定文.木蹄复方水提物对小鼠化学性肝损伤的保护作用研究[J].李时珍国医国药,2013,24(3):605-607
CHEN Wei, HE Ying, JIANG Ding-wen. Protective effect of *Fomes* fomentarius extracts on CCl4-induced acute liver injury in mice [J]. Lishizhen Medicine and Material Medical Research, 2013, 24(3): 605-607

[7] 王睿,孙鹏,赵欣.虫茶粗多糖对四氯化碳诱导小鼠肝损伤预防效果研究[J].现代食品科技,2015,31(5):6-11
WANG Rui, SUN Peng, ZHAO Xin. Protective effects of crude polysaccharide in insect tea against carbon tetrachloride-induced hepatic damage in mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(5): 6-11

[8] T Jayakumar, E Ramesh, P Geraldine. Antioxidant activity of the oyster mushroom, *Pelurotus ostreatus* on CCl_4-induced liver injury in rats [J]. Food and Chemical Toxicology, 2006, 44: 1989-1996

[9] Nicolas Chignard, Sufen Shang, Hong Wang, et al. Cleavage of endoplasmic reticulum proteins in hepatocellular carcinoma: detection of generated fragments in patient sera original research [J]. Article Gastroenterology, 2006, 130: 2010-2022

[10] 段婷,姚兵.过氧化物还原酶蛋白家族与疾病[J].医学研究生学报,2015,28(1):98-101
DUAN Ting, YAO Bing. The peroxiredoxins protein family and related disease [J]. Journal Medical Postgraduate, 2015, 28(1): 98-101

[11] Shigeki Sekine, Reiko Ogawa, Michael T Mcmanus, et al. Dicer is required for proper liver zonation. [J]. The Journal of Pathology, 2009, 219(3): 365-372

[12] 肖峰,顾春燕,钱铮,等.乙型肝炎组织精氨酸酶 1 的表达与其组织学分级的相关性[J].江苏医药,2013,39(1):68-70
XIAO Feng, Gu Chun-yan, QIAN Zheng, et al. Association of arginase-1 expression with histological grading and staging in type B hepatitis [J]. Jiangsu Med. Journal, 2013, 39(1): 68-70

[13] Benjamin C Yan, Can Gong, Jie Song, et al. Arginase-1: A new immunohisto-chemical marker of hepatocytes and hepatocellular neoplasms [J]. Am. J. Surg. Pathol., 2010, 34(8): 1147-1154

[14] Katsanou V, Papadai O, Milatos S, et al. HuR as a negative posttranscriptional modulator in inflammation [J]. Mol. Cell, 2005, 19(6): 777-789

[15] 杨静,王旻,韦平和.S-腺苷甲硫氨酸的临床及药理研究进展[J].药学进展,2001,25(3):164-167
YANG Jing, WANG Wen, WEI Ping-he. The development of clinical and pharmacological study on S-addnosyl -L-methionine [J]. Progress in Pharmaceutical Sciences, 2001, 25(3): 164-167