

鳕鱼皮胶原蛋白肽对小鼠急性肝损伤的保护作用研究

刘晨晨, 赵玉勤, 杨最素, 丁国芳

(浙江海洋学院食品与医药学院, 浙江省海洋生物医用制品工程技术研究中心, 浙江舟山 316022)

摘要: 本文对鳕鱼皮胶原蛋白肽(CSCP)在小鼠急性肝损伤中的保护作用进行研究。测定 CSCP 的急性毒性作用及最大给药剂量; 建立 CCl₄致小鼠急性肝损伤模型, 检测小鼠血清 ALT、AST 活性以及肝组织匀浆 GSH-Px、SOD 活性以及 MDA 含量; HE 染色观察肝脏病理学改变; 透射电镜观察肝脏微观结构; 蛋白印迹法测定肝组织 Bax、Bcl-2、Cleavage Caspase-3、TNF- α 蛋白表达量。结果表明 CSCP 最大给药量达到 8.0 g/kg, 无小鼠死亡; CSCP 组与模型组比较, 血清中 ALT、AST 的活性显著降低, 最高降幅达到 60% 以上; 肝组织匀浆中 SOD 和 GSH-Px 活性显著增高, 分别增加 23% 和 29%; MDA 含量显著降低, 最高降幅达到 38%; HE 染色观察肝组织结构明显好转; 透射电镜表明肝脏微观结构得到明显改善; Bcl-2 蛋白表达量增加, Bax、Cleavage Caspase-3、TNF- α 蛋白表达量降低。因此, CSCP 对 CCl₄ 小鼠急性肝损伤有较明显的保护作用。

关键词: 鳕鱼皮; 胶原蛋白肽; 急性肝损伤模型

文章编号: 1673-9078(2015)7-18-24

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.7.004

Protective Effect of Cod Skin Collagen Peptides on Acute Liver Injury in Mice

LIU Chen-chen, ZHAO Yu-qin, YANG Zui-sui, DING Guo-fang

(School of Food Science and Medical of Zhejiang Ocean University, Zhejiang Provincial Key Engineering Technology Research Center of Marine Biomedical Products, Zhoushan 316022, China)

Abstract: The protective effects of cod skin collagen peptides (CSCPs) on CCl₄-induced acute liver injury in mice was examined. The acute toxicology dose and the maximal CSCP dose were determined. An acute liver injury model was established by intraperitoneal injection CCl₄ in mice. The activity levels of serum ALT and AST were determined and the GSH-Px, SOD activities, and MDA content in liver homogenates were measured. Liver tissue samples of the mice were stained with hematoxylin and eosin (HE) to observe the effect of CSCP on mouse liver histopathology. Using TEM, the protective effects of CSCP on acute liver injury were examined. Expression of the Bax, Bcl-2, Cleavage Caspase-3, and TNF- α proteins were measured by western blot analysis. For the maximal CSCP dose of 8.0 g/kg, no mice died, indicating that CSCP was safe. ALT and AST activity levels in the serum samples were significantly lower in the CSCP group than the control group, and the maximal decrease was greater than 60%. Additionally, SOD and GSH-Px activity levels in liver homogenates increased significantly by 23% and 29%, respectively. The MDA content in liver homogenates significantly declined and the maximal decrease was 38%. Mouse liver tissue stained with HE revealed improvements in liver histology. The liver microstructure improved substantially based on transmission electron microscope (TEM) observations. Expression levels of Bcl-2 were higher, while the expression levels of Bax, Cleavage Caspase-3, and TNF- α were lower in the CSCP group than the control group. Taken together, CSCP effectively protects against acute liver injury by CCl₄ in mice.

Key words: cod skin; collagen peptide; acute liver injury model

收稿日期: 2014-09-21

基金项目: 浙江省科技厅重大专项 (2013C03036; 2011C02003); 浙江省自然科学基金立项 (LY13C200004, LY12C20005); 舟山市科技计划项目 (2012G21013)

作者简介: 刘晨晨 (1990-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 海洋药物、海洋功能食品

通讯作者: 丁国芳 (1958-), 男, 教授, 研究方向: 海洋药物、海洋功能食品

鳕鱼(*Melanogrammus aeglefinus*)属于鳕形目、鳕鱼科、黑线鳕属,亦称作为“北大西洋鳕鱼”。我国的鳕鱼年加工量可达 40~50 万 t,在生产过程中产生的下脚料有 7%~8% 是鱼皮,大部分被简单加工或者被丢弃,造成资源浪费和环境污染^[1]。近年来国内外有很多关于从鱼类加工下脚料中提取胶原蛋白或肽制品的研究,主要原料以鱼鳞和鱼皮居多^[2]。随着生活方式和生活环境的变化,肝病越来越成为威胁人类健康的主要疾病之一。世界上每年约有 100 万患者死于肝病,其中亚太地区的肝病患者约占全球总数的一半,我国更是肝病的高发地区^[3]。近年来对胶原蛋白肽的研究报道也越来越多,发现胶原蛋白肽有着多种生物活性^[4],但尚未见到关于鳕鱼皮胶原蛋白肽在肝脏损伤的保护方面的报道。

目前对于肝损伤研究的动物模型主要包括免疫性、药物性、化学性等几种模型,化学性肝损伤动物模型主要采用 D-半乳糖胺盐酸盐^[5]、CCl₄^[6]、硫代乙酰胺等,其中,CCl₄ 作为较为经典的肝损伤模型,被广泛用于保肝药物或植物提取物、中药提取物的评价,主要体现在它能够比较准确的反映出肝细胞功能、代谢和形态学的变化,其诱导的小鼠组织病理变化与急性肝损伤病症相符。本实验中我们采用鳕鱼皮胶原蛋白肽作用于 CCl₄ 诱导的肝损伤小鼠,在给予药物后检测小鼠血清转氨酶和肝组织匀浆生化指标的变化,并观察小鼠肝组织的病理学和微观结构的变化,蛋白印迹法测定肝组织中 Bax、Bcl-2、Cleavage Caspase-3、TNF- α 蛋白表达量,以此来探究 CSCP 对小鼠肝损伤的保护作用。

1 材料

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

动物用清洁级雄性 ICR 小鼠 60 只,体重 20 \pm 2 g,购于浙江省医学科学院,动物生产许可证号: SCXK(浙)2014-0001。

1.1.2 样品与试剂

鳕鱼皮胶原蛋白肽:本实验室自制,分子量为 5~10 Kd;四氯化碳、戊二醛(国药集团化学试剂有限公司);联苯双酯滴丸(浙江万邦药业公司);多聚赖氨酸、伊红(Sigma 公司);谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、超氧化歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物(GSH-Px)、丙二醛(MDA)试剂盒、BCA 蛋白含量试剂盒及苏木精染液(南京建成生物工程公司);Bax、Bcl-2、Cleavage Caspase-3、TNF- α 抗体(Santa

Cruze); β -actin 抗体、山羊抗小鼠辣根酶标记抗体、山羊抗兔辣根酶标记抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司);细胞裂解液、蛋白上样缓冲液、蛋白 Marker(碧云天生物技术研究所以)。

1.1.3 仪器

752FC 紫外分光光度计,上海光谱仪器有限公司;切片器 RM2135、摊片机 HI1210、烤片机 H1220,Leica(莱卡)公司;OLYMPUS 倒置显微镜,日本 OLYMPUS 公司;HITACHI H-7650 透射电镜,日本日立公司;CF16RXII 日立低温离心机,日本日立公司;恒压电泳仪,(美国 BIO-RAD 公司);凝胶成像系统(美国 Protein Simple 公司)。

2 方法

2.1 CSCP 急性毒理学试验^[7]

2.1.1 预实验

雄性 ICR 小鼠 3 只,禁食 16 h。CSCP 用纯水配成最大浓度 1.5 g/mL(不堵塞过滤器为准),按 10 mL/kg 体重灌胃。观察小鼠日常行为,小鼠活动正常,精神状态良好,无死亡。

2.1.2 最大给药剂量试验

雄性 ICR 小鼠 9 只,体重 20 \pm 2 g,对照组和 CSCP 低剂量组(4.0 g/kg BW)、高剂量组(8.0 g/kg BW),每组 3 只,按照预试验方法操作,观察小鼠日常行为,7 d 后称重处死,解剖观察。

2.2 CSCP 对小鼠急性肝损伤的保护作用

2.2.1 小鼠分组

实验小鼠共分为六组,48 只小鼠随机分组,每组 8 只,分别为对照组、模型组、联苯双酯滴丸阳性对照组(150 mg/kg BW)、CSCP 低剂量组(60 mg/kg BW)、CSCP 中剂量组(150 mg/kg BW)、CSCP 高剂量组(300 mg/kg BW)。在造模前预防灌胃给药,连续 7 d^[8](对照组及模型组给予等量纯水),第 7 d 末次灌胃后按照参考文献方法^[9],将各组小鼠(除对照组外)腹腔注射 0.3% CCl₄ 花生油溶液 10 mL/kg BW,造成小鼠急性肝损伤。造模后小鼠禁食不禁水,24 h 后摘眼球取血,4 $^{\circ}$ C 条件下 3500 r/min,离心 10 min 取血清,用于生化测定。采血后即处死小鼠取肝脏 -80 $^{\circ}$ C 保存。

2.2.2 小鼠血清转氨酶的测定

血液离心后取上清液,测定 ALT、AST 的活性,按试剂盒说明书操作。

2.2.3 肝脏组织匀浆生化指标的测定

准确取小鼠肝脏,生理盐水漂洗后称重,配制成10%肝组织匀浆,测定GSH-Px、SOD的活性及MDA的含量,按试剂盒说明书操作。

2.2.4 组织病理学 HE 观察

准确取小鼠肝脏1 cm×1 cm左右,立即放入4%多聚甲醛溶液中,固定24 h后,石蜡包埋,制备5 μm切片,HE染色,光镜下观察肝组织病理变化。

2.2.5 透射电镜观察小鼠肝脏的微观结构

准确小鼠肝脏切成0.5 cm×0.5 cm左右的组织块放入2.5%戊二醛固定液,由浙江大学电镜中心协助进行透射电镜检查。

2.2.6 Western Blot 法检测蛋白表达

将新鲜肝脏用液氮研磨准确称量后,与蛋白裂解液(RIPA 1000 μL+PMSF 10 μL)充分裂解,离心后取上清液,根据BCA法测定蛋白含量,取等浓度的蛋白提取液,与5×蛋白上样缓冲液按1:4的比例混合,100℃沸水浴5min,-40℃储存备用。采用SDS-PAGE法,按照实验要求配置分离胶(12%)和浓缩胶(5%),取蛋白样品各10 μL,恒压80 V电泳20 min,转换至电压100 V电泳至结束,取下凝胶在转膜溶液中将蛋白转至PVDF膜上,电流300 mA转膜20 min;将膜置于5%脱脂奶粉中4℃孵育2 h;将膜置于1%BSA工作液稀释后的一抗孵育袋(稀释比例参照使用说明书),4℃孵育过夜;TBST溶液洗膜2×10 min次;加入1:5000的第二抗体4℃孵育2 h, TBST溶液洗膜2×10 min次;ECL法显影,应用Alpha化学发光仪进行扫描并记录光密度强度。

2.2.7 数据处理

采用SPSS 17.0统计软件处理数据。数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同处理间的差异采用one-way ANOVA进行比较分析,以 $P < 0.05$ 为差异显著。

3 结果与讨论

3.1 CSCP 急性毒理学试验结果

通过预试验和最大给药量实验,测得CSCP最大给药量为8.0 g/kg d。在实验期间,CSCP实验各组体重和对照组相比较,CSCP高剂量组体重涨幅相对明显,有统计学意义($P < 0.05$,见表1),实验过程中各组小鼠活动正常,精神状态良好,无不良反应,无死亡。解剖后发现,心、肺、肝、肾、胃、肠等器官肉眼观察均无异常。提示该样品使用安全,基本无毒。

表1 CSCP急性毒理学试验小鼠体重变化

Table 1 Changes in Mouse weights during acute toxicity trials of CSCP

指标	组别		
	对照组	CSCP 低剂组 (4.0 g/kg)	CSCP 高剂组 (8.0 g/kg)
初始体重/g	18.60±0.26	18.66±0.36	18.30±0.43
终末体重/g	23.16±0.76	23.82±1.24	24.16±1.46
体重增加/g	4.56±0.50	5.16±0.88	5.86±1.03 [#]

注: [#]与对照组相比, $P < 0.05$ 。

3.2 CSCP 对小鼠急性肝损伤的保护作用

3.2.1 CSCP 对小鼠行为、体重的影响

对照组小鼠毛发有光泽,活动正常,精神状态良好;模型组小鼠与对照组比较,活动量减少,毛发蓬乱无光泽,精神萎靡,有嗜睡现象;其他组小鼠精神状态与模型组相比状态较好。CSCP高剂量组和联苯双酯滴丸组均可使小鼠体重增加($P < 0.05$),其中CSCP高剂量组小鼠体重增幅高于联苯双酯滴丸组($P < 0.05$)。CSCP高剂量组体重增幅明显,达到5.34±4.23 g,且具有统计学意义($P < 0.05$)。

表2 小鼠体重变化

Table 2 Effect of CSCP on Mouse weights of mice with CCl₄-induced acute liver injury

指标	组别					
	对照组	模型组	联苯双酯 滴丸组	CSCP 低剂组 (60 mg/kg)	CSCP 中剂组 (150 mg/kg)	CSCP 高剂组 (300 mg/kg)
初始体重/g	19.13±0.56	19.23±0.15	18.56±0.49	18.43±0.15	18.40±0.98	18.76±0.32
终末体重/g	23.76±0.84 [*]	22.60±0.20 [#]	21.23±0.65 [*]	21.90±0.30	23.20±0.67	24.10±0.55 ^{*△}
体重增加/g	4.63±0.28	3.37±0.05 [#]	2.67±0.16	3.47±0.15	4.80±0.31	5.34±0.23 [△]

注: [#]与对照组相比, $P < 0.05$; ^{*}与模型组相比, $P < 0.05$; [△]与联苯双酯滴丸组相比, $P < 0.05$ 。

3.2.2 CSCP 对血清 ALT、AST 活性的影响

如表3数据可以得出,与对照组比较,模型组小鼠ALT、AST活性显著升高($P < 0.05$),分别达到105.87±5.18(U/L)、133.26±2.37(U/L),显示小鼠肝脏

损伤严重。CSCP各剂量组和联苯双酯滴丸组均可降低ALT活性($P < 0.05$),其中CSCP中剂量组较为显著,降低至38.48±3.64(U/L),优于联苯双酯滴丸组。CSCP各剂量组和联苯双酯滴丸组均可显著降低AST

活性,而 CSCP 高剂量组较为显著,抑制率达到 62.14% ($P<0.05$), 与联苯双酯滴丸组效果相当。CSCP 中、高剂量组的 ALT、AST 活性显著低于模型组($P<0.05$), CSCP 低剂量组的 ALT、AST 值也是低于模型组, 但

是不如中、高剂量组明显。随着 CSCP 浓度的增加, 小鼠血清中 ALT、AST 含量逐渐降低, 呈现明显的剂量依赖性, 对肝脏的保护作用增强。

表 3 CSCP 对小鼠血清 ALT、AST 活性的影响

Table 3 Effects of CSCP on serum ALT and AST activities in mice with liver injuries induced by CCl₄

指标	组别					
	对照组	模型组	联苯双酯滴丸组	CSCP 低剂组 (60 mg/kg)	CSCP 中剂组 (150 mg/kg)	CSCP 高剂组 (300 mg/kg)
ALT(U/L)	29.57±1.36*	105.87±2.18 [#]	60.93±2.84*	57.16±1.91	38.48±1.64 [△]	54.15±1.16* [△]
AST(U/L)	23.14±1.44*	133.26±2.37 [#]	30.55±0.92*	67.33±2.46	53.30±2.15*	50.94±1.33* [△]

注: [#]与对照组相比, $P<0.05$; *与模型组相比, $P<0.05$; [△]与联苯双酯滴丸组相比, $P<0.05$ 。

表 4 CSCP 对小鼠肝组织匀浆 GSH-Px、SOD 的活性及 MDA 含量的影响

Table 4 Effect of CSCP on GSH-Px and SOD activities and MDA content in mice with liver injuries induced by CCl₄

指标	组别					
	对照组	模型组	联苯双酯滴丸组	CSCP 低剂组 (60 mg/kg)	CSCP 中剂组 (150 mg/kg)	CSCP 高剂组 (300 mg/kg)
GSH-Px(u/mg prot)	67.45±3.35	34.44±2.65 [#]	56.16±1.36*	37.30±2.67	40.56±1.69*	48.08±2.32* [△]
SOD(U/mg prot)	8.43±0.85	4.37±0.91 [#]	6.95±0.74*	4.65±0.32	5.24±0.64*	5.71±0.25*
MDA(nmol/mg prot)	4.24±0.63	8.42±0.33 [#]	4.91±0.98*	6.25±0.16	5.63±0.63*	5.26±0.18* [△]

注: [#]与对照组相比, $P<0.05$; *与模型组相比, $P<0.05$; [△]与联苯双酯滴丸组相比, $P<0.05$ 。

3.2.3 CSCP 对肝组织匀浆 GSH-Px、SOD 的活性及 MDA 含量的影响

由表 4 可以得出, 模型组与对照组比较, SOD、GSH-Px 活性明显降低 ($P<0.05$), 降幅分别为 48.81% 和 49.25%。而 CSCP 中、高剂量组与模型组比较, SOD、GSH-Px 的活性明显升高, 幅度分别为 33.33% 和 38.09%, 其中 CSCP 高剂量组和联苯双酯滴丸组效果显著 ($P<0.05$), 其中 CSCP 高剂量组的作用效果与联苯双酯滴丸组相当, 说明 CSCP 可以使肝脏中的抗氧化能力增强, 对肝损伤有一定的保护作用, 并存在着明显的剂量关系。而模型组 MDA 含量升高至对照组的 2 倍, 达到 $8.4±1.3$ (nmol/mg prot)。与模型组比较, CSCP 各剂量组和联苯双酯滴丸组 MDA 含量明显降低, 其中 CSCP 高剂量组和联苯双酯滴丸组有着显著性差异 ($P<0.05$), 其中联苯双酯滴丸组相对 CSCP 高剂量组作用效果较好, 说明 CSCP 可以使机体肝组织脂质过氧化程度减轻, 减少 MDA 的分解, 这同时也表明了 CSCP 可以减轻肝细胞的损伤程度。

3.2.3 CSCP 对肝组织的病理学影响

HE 染色后光镜下观察, 对照组肝小叶结构完整, 肝索呈放射状排列, 肝细胞呈多边形, 细胞质嗜酸性, 细胞核位于中央, 可见双核(图 1-A)。模型组肝小叶结构不完整, 肝索排列紊乱, 大量空泡, 肝细胞肿胀, 细胞质浊肿, 细胞核固缩, 中央静脉周围有不等量炎

症细胞浸润, 可见肝细胞脂肪变性, 部分细胞坏死, 损伤严重(图 1-B)。联苯双酯滴丸组肝小叶结构较为完整, 有少量空泡, 肝索排列清晰, 少量细胞核固缩(图 1-C)。CSCP 高剂量组肝小叶基本完整, 肝索规律, 肝细胞少量坏死(图 1-F)。CSCP 低(图 1-D)、中(图 1-E)剂量组与模型组相比, 在一定程度上减少了炎症细胞的浸润、减轻肝细胞损伤程度, 但效果不如 CSCP 高剂量组(图 1-F)和联苯双酯滴丸组(图 1-C), CSCP 高剂量组和联苯双酯滴丸组效果相近。结果见图 1。

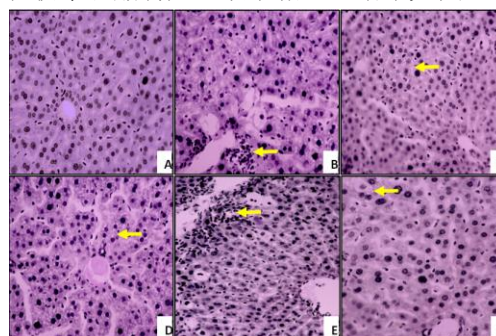


图 1 CSCP 对小鼠急性肝损伤保护作用中肝组织形态变化图(光镜下), HE 染色 ($\times 400$)

Fig.1 Effect of CSCP on liver histopathology in mice with liver injuries induced by CCl₄ (light microscope), HE staining ($\times 400$)

注: A: 对照组, 肝小叶和肝索结构完整; B: 模型组, 肝索结构无规律, 有炎症细胞浸润(↑); C: 联苯双酯滴丸组, 肝小叶较为完整, 细胞质内少量空泡(↑); D: CSCP 低剂量组

(60 mg/kg), 细胞质内空泡较多(↑); E: CSCP 中剂量组 (150 mg/kg), 肝门管区有大量炎症细胞浸润(↑); F: CSCP 高剂量组 (300 mg/kg), 肝小叶和肝索较为完整, 细胞质内少量空泡(↑)。

3.2.4 透射电镜观察小鼠肝脏的微观结构

小鼠肝脏透射电镜显示, 对照组小鼠的肝脏细胞器完整, 胞质内有较多线粒体, 核仁明显, 有发达的粗面内质网(图 2-A)。而模型组核膜模糊、不清晰, 部分破裂或缺失, 胞质内线粒体高度肿胀, 粗面内质网扩张, 溶酶体聚集; 核固缩; 异染色质边聚明显, 胞质内大量空泡样变化的空泡体(图 2-B)。联苯双酯滴丸组细胞器大致正常, 线粒体较完整, 有轻度的肿胀, 胞质肿胀减少, 内质网无明显扩张, 有少量的核固缩(图 2-C)。CSCP 高剂量组大多数微细结构已恢复, 核膜达到正常水平, 线粒体、粗面内质网、高尔基体等基本结构清晰, 溶酶体数目大大减少, 细胞核无明显异常(图 2-F)。CSCP 低(图 2-D)、中(图 2-E)剂量组与模型组相比, 在一定程度上减轻了肝脏组织损伤的程度和范围, 但效果不如 CSCP 高剂量组和联苯双酯滴丸组(图 2-F), CSCP 高剂量组和联苯双酯滴丸组效果相近。结果见图 2。

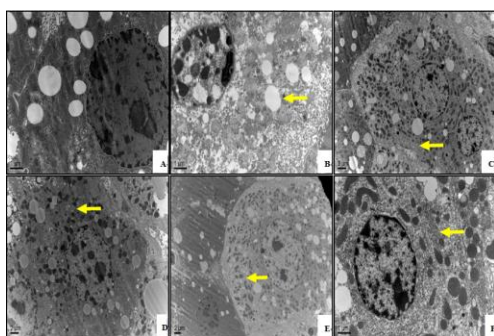


图 2 CSCP 对小鼠急性肝损伤保护作用中肝组织形态变化图(电镜下)(×5000)

Fig.2 Effect of CSCP on liver histopathology in mice with liver injuries induced by CCl₄ (TEM; ×5,000)

注: A: 对照组, 细胞器完整, 胞质内有较多线粒体; B: 模型组, 核膜模糊, 形态异常, 异染色质边聚明显, 胞质内大量空泡(↑); C: 联苯双酯滴丸组, 细胞器大致正常, 线粒体较完整, 有少量空泡(↑); D: CSCP 低剂量组 (60 mg/kg), 核膜较为模糊, 胞质内空泡较多(↑); E: CSCP 中剂量组 (150 mg/kg), 核膜较为清晰, 空泡数量减少(↑); F: CSCP 高剂量组 (300 mg/kg)核膜达到正常水平, 内质网等结构较为清晰(↑)。

3.2.5 Western blotting 结果

蛋白电泳条带结果如图 3 所示, 经 Alpha 化学发光系统数据分析后各基因的蛋白表达水平示意图如图 4 所示。Western Blot 结果显示, 在 CCl₄ 肝损伤模型组中, Bax 蛋白表达水平上升, Bcl-2 蛋白表达水平降

低, Cleavage Caspase-3、TNF-α 蛋白表达水平明显增加, 显示 CCl₄ 通过破坏 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达平衡, 促使 Cleavage Caspase-3 的活化, 从而引发肝细胞的凋亡。与模型组比较, CSCP 高剂量组和联苯双酯滴丸组中 Bax、Cleavage Caspase-3、TNF-α 蛋白表达水平显著降低 (P<0.05), Bcl-2 蛋白表达水平上升 (P<0.05), 其中联苯双酯滴丸组效果相对好于 CSCP 高剂量组。结果表明 CSCP 对 Bax、Cleavage Caspase-3、TNF-α 蛋白表达量具有明显的下调作用, 对 Bcl-2 蛋白表达量具有明显的上调作用, 提示 CSCP 能够通过抑制细胞凋亡关键因子的表达, 来对肝损伤起到保护作用。至于其对细胞凋亡通路的具体作用机制, 还需要进行进一步的研究。

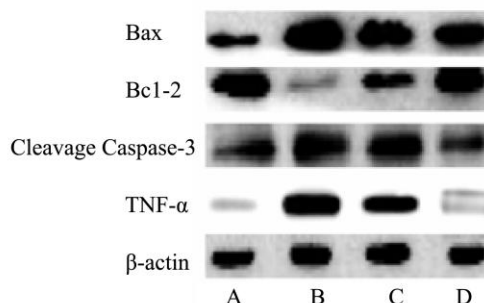


图 3 CCl₄ 诱导的肝损伤小鼠的肝组织中 Bax、Bcl-2、Cleavage Caspase-3、TNF-α 的蛋白表达

Fig.3 Expression of the Bax, Bcl-2, Cleavage Caspase-3, and TNF-α proteins in mice with liver injuries induced by CCl₄

注: A: 对照组, B: 模型组, C: CSCP 高剂量组, D: 联苯双酯滴丸组。

4 讨论

CCl₄ 所诱导的肝损伤毒性机制十分复杂, 可能是 CCl₄ 进入体内后, 经肝微粒体细胞色素 P450 酶依赖的单加氧酶系代谢后, 生成了 OOCCL₃ 和 CCL₃, 可以使肝细胞受到损伤, 细胞膜通透性发生改变, 转氨酶透过损伤细胞膜溢出, ALT、AST 将会有大幅度的升高^[10]。所以, 血清中 ALT、AST 活性的高低在一定程度上反应了肝细胞损伤程度。故选用 ALT、AST 指标来反应肝损伤情况。本实验中 CSCP 各剂量组与模型组比较能够较好的抑制损伤小鼠血清中 ALT、AST 的升高, 其中 CSCP 高剂量组和联苯双酯滴丸组效果相当, 均可使 ALT、AST 低于模型组 (P<0.05), 提示 CSCP 对肝损伤保护效果较好。

谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 和超氧化歧化酶 (SOD) 反映着体内抗氧化水平, 机体在正常情况下, GSH-Px、SOD 维持在正常水平, 抵抗自由基对机体的攻击。当自由基攻击肝细胞膜上的磷脂分子时, 促

使机体抗氧化系统瓦解, 而进一步表现在抗氧化酶活性的降低^[11]。

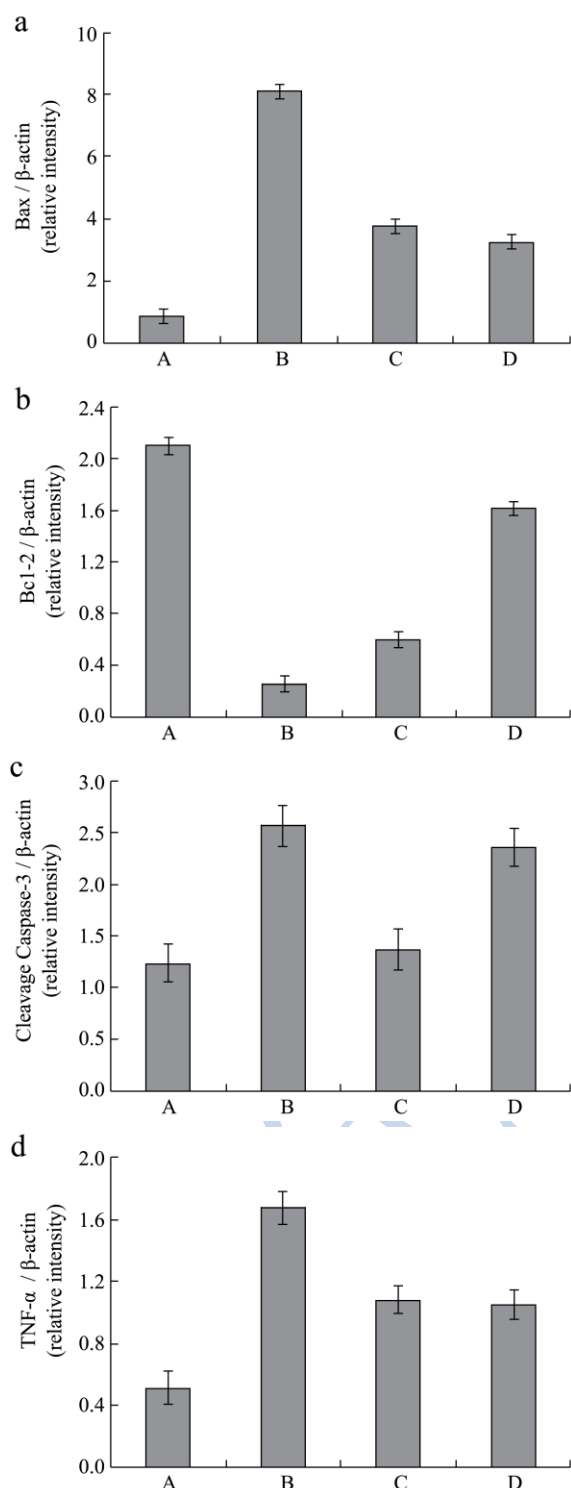


图 4 CCl₄诱导的肝损伤小鼠肝脏中各相关蛋白表达水平示意图

Fig.4 Protein expression levels in mice with liver injuries induced by CCl₄

注: 图 4a: Bax 蛋白表达水平示意图, 模型组表达量显著升高, CSCP 高剂量组表达量降低; 图 4b: Bcl-2 蛋白表达水平示意图, 模型组表达量显著降低, CSCP 高剂量组表达量升高; 图 4c: Cleavage Caspase-3 蛋白表达示意图, 模型组表达量显著

升高, CSCP 高剂量组表达量降低; 图 4d: TNF- α 蛋白表达示意图, 模型组表达量显著升高, CSCP 高剂量组表达量显著降低。*与对照组相比, $P < 0.05$; *与模型组相比, $P < 0.05$, Δ 与联苯双酯滴丸组相比, $P < 0.05$ 。

而自由基也可以直接引起肝细胞的脂质过氧化, 导致脂质过氧化物的发生, 若机体肝损伤越严重, 作为脂质过氧化的最终产物丙二醛(MDA)含量则会越高。MDA 含量在一定程度上可以间接反映机体细胞受到自由基攻击的程度^[12]。所以选用 GSH-Px、SOD、MDA 这三个指标来反映肝损伤的程度。实验结果表明, 模型组抗氧化活性降低, 脂质过氧化产物增加, 与模型组比较, CSCP 各剂量组抗氧化活性增强, 抑制脂质过氧化产物的分解, 其中 CSCP 高剂量组和联苯双酯滴丸组效果显著 ($P < 0.05$), 达到对小鼠肝损伤的保护作用。

通过 HE 染色后在光镜下对小鼠肝组织形态进行观察, 我们可以看出, 模型组肝组织损伤较为严重, 而经过 CSCP 各剂量组和联苯双酯滴丸组处理后, 小鼠肝细胞损伤程度减轻, 其中 CSCP 高剂量组的效果好于 CSCP 低、中剂量组, 与联苯双酯滴丸组效果相近。通过透射电镜下对小鼠肝组织形态进行观察, 结果显示模型组粗面内质网水肿, 特别是线粒体高度肿胀, 肝细胞损伤严重。CSCP 各剂量组和联苯双酯滴丸组处理后, 肝细胞细胞器逐渐完整, 线粒体恢复正常, 细胞形态有所好转, 特别是 CSCP 高剂量组和联苯双酯滴丸组较为明显, 对肝脏的保护效果相近。

为了进一步探索 CSCP 保护小鼠急性肝损伤的机制, 我们通过 Western blotting 实验检测 Bax、Bcl-2、Cleavage Caspase-3、TNF- α 的蛋白表达, 通过血清肝组织匀浆生化指标的检测、HE 染色和透射电镜观察小鼠肝组织形态, 可以看出 CSCP 各剂量组中高剂量组有着较好的保护效果, 所以在 Western blotting 实验中设置了对照组、模型组、CSCP 高剂量组和联苯双酯滴丸阳性药物组。在 CCl₄ 诱导的肝损伤的机制中, 自由基的介导发挥着重要的作用, 自由基具有双重效应, 一方面使机体发生脂质过氧化; 另一方面促使肿瘤坏死因子 (TNF- α) 的生成。大量的自由基打破了体内的平衡水平, 导致线粒体膜发生脂质过氧化, 通过干预线粒体呼吸链并形成超氧阴离子(O₂⁻)而加剧线粒体损伤, 诱发细胞的凋亡^[11]。细胞凋亡通常包括两条途径, 死亡受体介导 (外源性)和线粒体凋亡 (内源性), 在细胞凋亡中 Bcl-2 蛋白家族和 Caspase 家族发挥着重要作用^[13]。Bax、Bcl-2 分别是 Bcl-2 家族中最有代表性的抗凋亡和促凋亡基因, 它们对细胞是否进入凋亡状态有着重要意义。Cleavage Caspase-3 是

Caspase 家族中执行细胞凋亡的主要蛋白酶之一,活化的 Cleavage Caspase-3 可以引起 Caspase 的级联反应,最终导致细胞的凋亡^[14]。TNF- α 参与了肝损伤的发生,如酒精性肝炎、急性肝衰竭以及肝纤维化,在 CCl₄ 所诱导的肝脏中 TNF- α 的水平升高,进一步诱导肝细胞的死亡^[9]。在本实验中,模型组 Bax、Cleavage Caspase-3、TNF- α 蛋白表达水平升高, Bcl-2 蛋白表达水平降低,显示小鼠肝细胞损伤严重。而 CSCP 高剂量组 Bax、Cleavage Caspase-3、TNF- α 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$), Bcl-2 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$)。

综上所述, CSCP 可能通过抑制 TNF- α 基因的表达,下调促凋亡基因 Bax,上调抗凋亡基因 Bcl-2 蛋白表达,抑制细胞凋亡执行蛋白 Cleavage Caspase-3 的活化,来达到保护肝细胞的作用。

5 结论

本文通过以小鼠 CCl₄ 急性肝损伤模型为基础,进行了动物实验,开展 CSCP 对体内保护作用的研究,结果显示 CSCP 在体内有着较好的抗氧化活性,能够抑制脂质过氧化物的发生,改善肝损伤小鼠的病理学结构,抑制 Bax、Cleavage Caspase-3、TNF- α 与细胞凋亡相关基因的蛋白表达水平,表明 CSCP 对 CCl₄ 诱导的急性肝损伤具有一定的保护作用。

参考文献

- [1] 孙丽平,汪东风,张莉.利用鳕鱼皮蛋白制备热反应型肉香调味基料的研究[J].中国海洋大学学报,2009,39(2):249-252
SUN Li-ping, WANG Dong-feng, ZHANG Li. Study on preparation of process meaty flavor by maillard reaction of hydrolyzing pollock skin protein [J]. Periodical of Ocean University of China, 2009, 39(2):249-250
- [2] Takeshi N, Nobutaka S. Isolation of collagen from fish waste material-skin, bone and fins [J]. Food Chemistry, 2000, 68(3): 277-281
- [3] Issa R, Zhou X, Constantinou C M, et al. Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking [J]. Gastroenterology, 2004, 126(7):1795-1808
- [4] Song L N, Huang X D, Lei H, et al. Hepatocyte proliferation and damaged β -cell protective effect of a new hepatocyte stimulate peptide(sHSP) from shark liver [J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2007, (4): 306-311
- [5] 夏道宗,于新芬,倪达美,安吉白茶、桑叶复合功能性饮料对 D-半乳糖致小鼠氧化损伤的拮抗效应研究[J].现代食品科技,2013,29(7):1482-1485
XIA Dao-zong, YU Xin-fen, NI Da-mei. Antagonism Effects of a Compound Functional Beverage with Camellia sinensis L. and Morus alba L. on D-Galactose Induced Oxidative Damage in Mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29 (7):1482-1485
- [6] 张惠芳,周瑜珍,陈嘉璐,等.酸枣多糖对小鼠 CCl₄ 急性肝损伤的作用[J].现代食品科技,2014,30(9):33-37
ZHANG Hui-fang, ZHOU Yu-zhen, CHEN Jia-lu, et al. Effect of Polysaccharides from Wild Jujube on Acute Liver Injury Induced by CCl₄ in Mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(9):33-37
- [7] 张京楼.鳕鱼皮多肽的益生菌发酵工艺探索及体外抗氧化性能研究[D].烟台:烟台大学,2012
ZHANG Jing-lou. Preparation of Peptides by Probiotic Fermentation from Cod Skin and its Antioxidant Properties in Vitro [D]. Yantai: Yantai University, 2012
- [8] Shuai Z, Binan L, Xu H, et al. Protection of the flavonoid fraction from rosa laevigata michx fruit against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice [J]. Food and Chemical Toxicology, 2014, 55: 60-69
- [9] Jie Q M, Jie D, Li Z, et al. Hepatoprotective properties of sesamin against CCl₄ induced oxidative stress-mediated apoptosis in mice via JNK pathway [J]. Food and Chemical Toxicology, 2014, 64: 41-48
- [10] 李晓斐,李志珂,武双婵,等.红花红色素对小鼠急性 CCl₄ 性肝损伤的作用[J].现代食品科技,2013,29(7):1569-1573
LI Xiao-fei, LI Zhi-ke, WU Shuang-chan, et al. Effect of Safflower Red Pigment on Acute Liver Injury Induced by CCl₄ in Mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(7): 1569-1573
- [11] Yun C T, Jung C L, Chuan S C, et al. Esculetin ameliorates carbon tetrachloride-mediated hepatic apoptosis in rats [J]. International Journal Of Molecular Science, 2011, 12: 4053-4067
- [12] Yu W H, Chia F T, Wen H C, et al. Protective effects of Dunaliella salina-a carotenoids-rich alga, against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice [J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46 (10): 3311-3317
- [13] Chio S, Lew K L, Xiao H, et al. Sulforaphane induced cell death in human prostate cancer cells is regulated by inhibitor of apoptosis family proteins and Apaf-1 [J]. Carcinogenesis, 2007, 28(1):151-162
- [14] Olsson M, Zhivotovsky B. Caspases and cancer [J]. Cell Death Differ, 2011, 18(9):1441-1449

现代食品科技