

# 绿原酸保护由脂多糖诱导引起的大鼠慢性肝脏损伤

杨玉辉<sup>1</sup>, 周艳<sup>1</sup>, 阮征<sup>1</sup>, 米书梅<sup>1</sup>, 周丽丽<sup>1</sup>, 温艳梅<sup>1</sup>, 李小兰<sup>1</sup>, 江敏<sup>1</sup>, 印遇龙<sup>1,2</sup>

(1. 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 生命科学与食品工程学院, 江西南昌 330047)

(2. 中国科学院亚热带农业生态研究所, 湖南长沙 410125)

**摘要:** 本文采用脂多糖诱导建立大鼠慢性肝脏损伤模型, 研究了绿原酸对大鼠慢性肝脏损伤的保护作用。将成年 SD 大鼠随机分 LPS 模型组和绿原酸干预组, 实验持续 28 d 后进行取样。记录大鼠的生长性能和肝脏重量, 并计算肝脏指数; 检测血清中谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、碱性磷酸酶 (ALP) 活性和总胆红素 (TBIL)、总蛋白 (TP) 含量; H&E 染色观察肝组织病理变化; 检测肝脏组织中超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和丙二醛 (MDA) 含量。结果表明, 绿原酸能够显著降低慢性肝脏损伤大鼠的末重、平均日增重和食物转化率 ( $P < 0.05$ ); 显著降低大鼠肝脏重量和肝脏指数 ( $P < 0.05$ ); 显著降低血清中 ALT、AST、ALP 活性和 TBIL 含量 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 降幅分别为 12%、13%、17% 和 50%; 显著升高血清中 TP 含量和肝脏组织中 SOD 活性 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ), 增幅分别为 17% 和 23%; 显著降低肝脏组织中 MDA 含量 ( $P < 0.05$ ), 降幅为 33%; 绿原酸能够改善慢性肝脏损伤大鼠的肝组织结构。因此, 绿原酸对长期脂多糖应激引起的大鼠慢性肝脏损伤有一定的保护作用。

**关键词:** 绿原酸; 保护作用; 肝脏损伤; 脂多糖

文章编号: 1673-9078(2014)7-23-26

## Protective Effects of Chlorogenic Acid on Lipopolysaccharide-induced Chronic Liver Injury in Rats

YANG Yu-hui<sup>1</sup>, ZHOU Yan<sup>1</sup>, RUAN Zheng<sup>1</sup>, MI Shu-mei<sup>1</sup>, ZHOU Li-li<sup>1</sup>, WEN Yan-mei<sup>1</sup>, LI Xiao-lan<sup>1</sup>,  
JIANG Min<sup>1</sup>, YIN Yu-long<sup>1,2</sup>

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, College of Life Science and Food Engineering, Nanchang University, Nanchang 330047, China) (2. Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences, Changsha 410125, China)

**Abstract:** Rats were randomly divided into the model group and chlorogenic acid (CGA)-supplemented group, and at the 28th day the rats were sacrificed. The growth performance, liver weight and liver index of each rat were analyzed. The activities of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and alkaline phosphatase (ALP) and the contents of total bilirubin (TBIL) and total protein (TP) in serum were assayed. Hepatic pathological changes were observed by H&E staining method. The activities of superoxide dismutase (SOD) and the malondialdehyde (MDA) content in liver were determined. Compared with the model group, the finish body weight, average daily gain and food efficiency ratio (FER), liver weight and liver index in CGA-supplemented group were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). The activities of ALT, AST, ALP and the level of TBIL in serum declined significantly ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), and the declining rates were 12%, 13%, 17% and 50%, respectively. TP content in serum and SOD activity in liver were significantly increased ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ), and the increasing rate was 17% and 23%, respectively. MDA content in liver declined significantly ( $P < 0.05$ ), and the declining rate was 33%. H&E staining indicated that the hepatic pathological injury in CGA-supplemented group was attenuated. Therefore, CGA has a protective effect on chronic liver injury induced by lipopolysaccharide.

**Key words:** chlorogenic acid; protective effect; liver injury; lipopolysaccharide

脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 也叫做内毒素, 是绝大多数革兰氏阴性细菌细胞壁中的一种成分,

收稿日期: 2014-03-06

作者简介: 杨玉辉 (1992-), 男, 硕士, 研究方向为功能食品与营养代谢  
通讯作者: 阮征 (1978-), 男, 博士, 教授, 研究方向为功能食品与营养代谢

而且是引起机体炎症反应的重要来源之一。革兰氏阴性菌广泛存在于胃肠道、泌尿生殖道和呼吸系统中。研究发现饮食因素 (高脂和高碳水化合物饮食) 和应激 (冷热应激、全身性疾病和营养失调) 会引起血液内毒素的增加<sup>[1~3]</sup>。LPS 能够激发宿主免疫应答导致机体损伤。肝脏是机体清除内毒素和解毒的主要器官,

也是内毒素攻击的首要靶器官。一次高剂量的 LPS 应激会引起急性严重的肝脏损伤<sup>[4]</sup>, 长期低剂量 LPS 应激会引起慢性肝脏损伤。慢性肝脏损伤是一个重要的代谢问题, 最终能够引起肝硬化和末期肝功能衰竭<sup>[5]</sup>。因此, 研究天然植物提取物预防或控制代谢性疾病的效果或机制具有重要的意义。

绿原酸 (Chlorogenic acid, CGA) 是植物体在有氧呼吸过程中经莽草酸途径产生的一种多酚类化合物, 属于羟基肉桂酸类化合物, 在中药材和食物中分布广泛, 因其具有抗菌、抗氧化、抗炎、抗癌、免疫调节和降脂等多种生物活性<sup>[6]</sup>, 而受到广泛的关注。有关研究证实, 绿原酸能够有效的抑制 LPS 引起肝星状细胞的炎症反应<sup>[7]</sup>, 能够保护 LPS 引起的急性肝脏损伤<sup>[4]</sup>。但是关于绿原酸对慢性肝脏损伤作用的研究没有报道。因此, 本研究通过长期低剂量的 LPS 应激建立慢性肝脏损伤模型, 以探讨绿原酸对脂多糖应激引起大鼠慢性肝脏损伤的保护作用及其可能的机制, 为具有生物活性的绿原酸开发提供科学的实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 主要样品与试剂

SPF 级雌性成年 SD 大鼠, 体重  $180 \pm 10$  g, 长沙天勤生物技术有限公司; 脂多糖 (*Escherichia coli* 055:B5), 美国 Sigma 公司; 绿原酸(从金银花中提取), 阿拉丁试剂有限公司; 谷草转氨酶 (AST)、谷丙转氨酶 (ALT)、碱性磷酸酶 (ALP)、总胆红素 (TBIL)、总蛋白 (TP)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 试剂盒 南京建成生物工程研究所; 其他试剂均为分析纯。

#### 1.1.2 主要仪器设备

CX4 型全自动生化仪 Beckman 公司; SC-3614 台式离心机 科大创新股份有限公司中佳分公司; 5418R 型高速冷冻离心机, 德国艾本德公司; AL104 分析天平, 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司; UV-160A 紫外分光光度计, 日本岛津公司; RM2235 切片机, 德国 Leica 仪器公司; Olympus BX51 显微镜, 日本 Olympus 公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 动物分组与饲养

12 只 SD 大鼠经适应性喂养一周后, 随机分为 2 组, 每组 6 只, 分别为 LPS 模型组和 CGA 干预组。CGA 干预组每天灌胃绿原酸 (剂量为  $60$  mg/kg 体重) 溶液 (绿原

酸溶解于蒸馏水), 并且腹腔注射脂多糖 (剂量为  $300$   $\mu$ g/kg 体重) 溶液 (脂多糖溶解于无菌生理盐水); LPS 模型组每天灌胃等量的蒸馏水, 并且腹腔注射同样剂量的脂多糖溶液; 实验持续 28 d。实验期间所有大鼠均给予普通饲料饲养, 自由饮水。

#### 1.2.2 实验样本采集

在最后一次灌胃和腹腔注射之后, 大鼠经腹腔注射戊巴比妥钠 (剂量为  $45$  mg/kg 体重), 在麻醉状态下经下腔静脉取血, 并迅速取出肝脏。血液在  $4$   $^{\circ}$ C,  $4000$  r/min, 离心  $15$  min 之后取上清液分装于 EP 管中, 置于  $-80$   $^{\circ}$ C 低温冰箱中保存待测。肝脏在  $0.9\%$  (m/V) 的无菌生理盐水中漂洗之后, 滤纸擦干, 称质量, 并分割成两部分, 一部分用于肝脏形态学观察, 一部分用于其它生化指标的检测。

#### 1.2.3 大鼠生长性能

从实验开始起记录大鼠初始重量, 每周测量并记录大鼠体重和采食量。计算全期平均日采食量、平均日增重和食物转化率 ( $=$ 平均日增重/平均日采食量)。

#### 1.2.4 血清中肝功能指标的测定

取血清在自动生化分析仪上测定谷草转氨酶 (AST)、谷丙转氨酶 (ALT)、碱性磷酸酶 (ALP)、总胆红素 (TBIL)、总蛋白 (TP)。

#### 1.2.5 肝脏形态学观察以及肝脏指数的计算

取大鼠肝脏置于  $10\%$  福尔马林中固定  $24$  h, 用水冲洗后经梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 常规石蜡包埋处理后切成  $5$   $\mu$ m 厚薄片, HE 染色, 在显微镜下观察肝切片的形态学改变。肝脏指数的计算公式:

$$\text{肝脏指数} (\%) = \frac{\text{肝脏重量} (\text{g})}{\text{体重} (\text{g})} \times 100\%$$

#### 1.2.6 肝脏组织中 SOD 活力和 MDA 含量的测定

检测肝脏组织中 SOD 活力和 MDA 含量, 均按照南京建成生物工程研究所试剂盒说明书进行测定。

### 1.3 统计学分析

所有数据使用 SPSS 17.0 统计学软件进行独立样本 t 检验, 结果用平均值  $\pm$  标准误 ( $X \pm SE$ ) 表示,  $P < 0.05$  时差异有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 绿原酸对大鼠生长性能的影响

研究发现长期低剂量的 LPS 刺激会引起机体脂质代谢的紊乱, 导致机体脂肪的积累<sup>[8]</sup>。因此有研究认为肥胖及其相关的代谢性疾病与体内循环的内毒素增加有关<sup>[9]</sup>。Ae-Sim Cho 等研究发现绿原酸能够降低高

脂膳食诱导的肥胖小鼠的体重、内脏脂肪量，同时也降低了血液、脂肪组织、肝脏和心脏中甘油三酯的含量<sup>[10]</sup>。由表1可见，实验开始时两组动物初始体重基本相同；实验四周后，与LPS模型组相比，CGA干预组大鼠末体重、平均日增重和食物转化率显著下降(P<0.05)。

表1 绿原酸对大鼠生长性能的影响

Table 1 Effect of CGA on growth performance in rats

指标	LPS模型组	CGA干预组
初重/g	183.00±2.07	180.40±3.75
末重/g	286.40±4.93	254.60±4.88*
平均日增重/g	3.69±0.14	2.65±0.13*
平均日采食量/(g/d)	18.81±0.78	17.53±0.74
食物转化率	0.20±0.01	0.15±0.01*

注：结果用平均值±标准误(X±SE)表示。\*表示与LPS模型组比较有显著性差异(P<0.05)；\*\*表示与LPS模型组比较有极显著性差异(P<0.01)。下同。

## 2.2 绿原酸对大鼠肝功能指标的影响

表2 绿原酸对大鼠肝功能指标的影响

Table 2 Effect of CGA on liver function in rats

指标	LPS模型组	CGA干预组
ALT/(U/L)	88.75±3.25	77.80±2.58*
AST/(U/L)	226.75±11.34	197.40±5.80*
ALP/(U/L)	175.00±8.50	145.25±6.90*
TBIL/(mg/L)	0.88±0.07	0.44±0.05**
TP/(g/L)	70.92±1.49	83.28±1.87**

LPS作为细菌内毒素，能够诱导多种器官损伤，包括肝脏、心脏、胃肠道、肾脏、大脑和肺等。肝脏是机体代谢的重要器官，承担着维持生命的重要功能，包括分泌、排泄，调节蛋白质、脂肪和碳水化合物的新陈代谢等。肝脏还是人体内最大的解毒器官，能够抵御有毒化学物质、酒精、病毒性感染和代谢超负荷等的侵袭<sup>[11]</sup>。当肝脏出现损伤时人体的物质代谢会出现障碍，并影响其他器官的功能，严重时甚至会危及生命。肝脏功能代谢有关的各项指标可以有效反映肝脏功能的基本状况。ALT、AST和ALP主要存在于肝脏中，当肝脏受损时会导致肝细胞膜通透性增大，酶会进入血液，使血清中ALT、AST和ALP显著增高<sup>[12]</sup>。而且血液中TBIL和TP的含量也是肝功能检测常见的指标。因此检测血清中的ALT、AST、ALP、TBIL和TP水平可反映肝组织受损或病变情况。由表2可见，与LPS模型组相比，CGA干预组大鼠血清中ALT、AST、ALP和TBIL的水平显著下降(P<0.05或P<0.01)，TP的水平显著升高(P<0.01)，说明绿原酸对

脂多糖应激引起慢性肝脏损伤大鼠的肝脏功能损伤具有一定的修复作用。

## 2.3 绿原酸对大鼠肝脏形态学以及肝脏指数的影响

影响

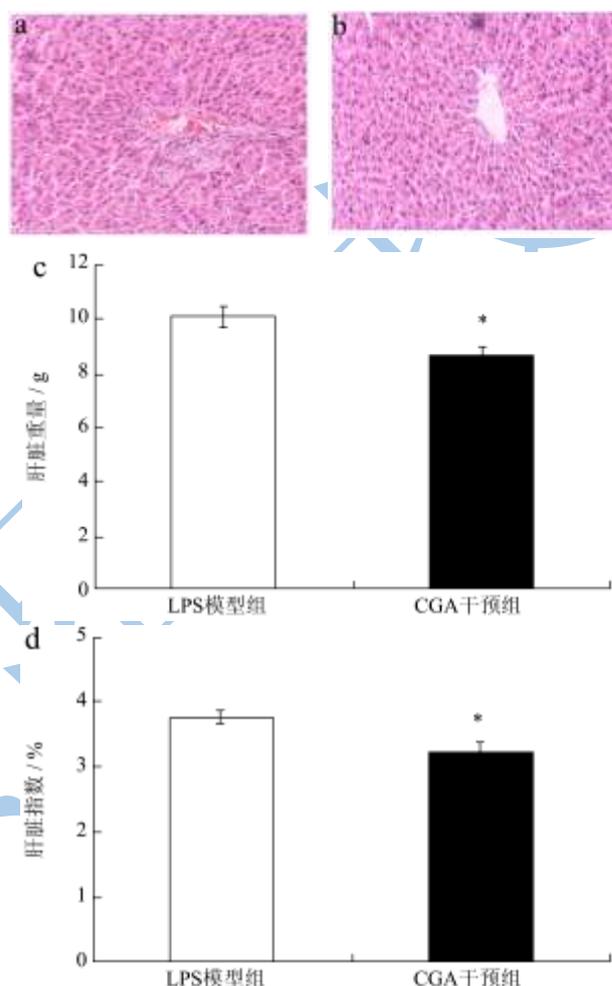


图1 绿原酸对肝脏组织形态学(×200)以及肝脏指数的影响

Fig.1 Effect of CGA on liver morphology (×200) and liver index in rats

注：a：LPS模型组；b：CGA干预组；c：绿原酸对大鼠肝脏重量的影响；d：绿原酸对大鼠肝脏指数的影响。

在正常生理状态下，肝脏组织H&E染色切片图显示肝细胞排列整齐，以中央静脉为中心呈放射状排列，肝细胞形状规则，细胞分界清，排列致密而均一，无细胞变性和异常<sup>[13]</sup>。由本实验肝组织H&E染色切片图可见，LPS模型组大鼠肝细胞损伤严重，正常的组织结构明显消失，肝细胞索排列紊乱，大部分肝窦消失，中央静脉区与汇管区肝细胞坏死，并伴有大量炎性细胞浸润(图1a)。CGA干预组大鼠肝脏组织结构基本恢复正常(图1b)。由图1c、d可见，与LPS模型组相比CGA干预组大鼠肝脏重量和肝脏指数显

著下降 ( $P < 0.05$ )。说明绿原酸对长期脂多糖应激引起慢性肝脏损伤大鼠的肝脏组织结构和功能的保护有积极作用。

## 2.4 绿原酸对大鼠肝脏组织 SOD 活力和 MDA

### 含量的影响

SOD 是一个重要的机体超氧阴离子自由基清除剂, 可以抑制自由基引起的脂质过氧化反应<sup>[4]</sup>。在肝细胞受到自由基攻击时, 肝脏组织中的 SOD 会因其消耗量增加而减少。MDA 作为脂质过氧化产物之一, 可以反映体内脂质过氧化水平, 间接反映细胞氧化损伤程度<sup>[11]</sup>。肝损伤程度越重, 肝脏组织中的 MDA 含量则越高。Qisen Xiang 等研究发现每 5 d 给予大鼠腹腔注射 LPS (剂量为 1mg/kg 体重) 一次, 35 d 之后, 大鼠肝脏中 SOD 的活性显著下降, MDA 的含量显著升高<sup>[3]</sup>。由表 3 可见, 与 LPS 模型组相比, CGA 干预组大鼠肝脏组织中 SOD 显著升高 ( $P < 0.05$ ), MDA 显著降低 ( $P < 0.05$ )。表明绿原酸能够有效抑制大鼠肝脏的脂质过氧化水平, 清除自由基, 从而起到保护肝脏氧化损伤的作用。

表 3 绿原酸对大鼠肝组织 SOD 活力和 MDA 含量的影响

Table 3 Effect of CGA on SOD activity and MDA content in rats

指标	LPS 模型组	CGA 干预组
SOD 活性/(U/mg pro)	123.27±5.94	151.41±5.83*
MDA 含量/(nmol/mg pro)	1.38±0.11	0.92±0.10*

## 3 结论

LPS 诱导肝损伤是肝损伤的一种常用模型, 可用来检测或研究药物或其它生物活性物质对肝损伤的保护作用。我们的研究发现, 在本实验条件下, 绿原酸能够减轻肝功能损伤和肝组织结构损伤, 提高肝脏的抗氧化能力。因此, 绿原酸能够有效保护 LPS 诱导引起的大鼠慢性肝脏损伤, 在功能性食品和膳食补充剂等领域具有很大的开发潜力。

### 参考文献

[1] Hall D M, Buettner G R, Oberley L W, et al. Mechanisms of circulatory and intestinal barrier dysfunction during whole body hyperthermia [J]. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2001, 49(2): H509-521

[2] Mani V, Weber T E, Baumgard L H, et al. GROWTH AND DEVELOPMENT SYMPOSIUM: Endotoxin, inflammation, and intestinal function in livestock [J]. *Journal of Animal Science*, 2012, 90(5): 1452-1465

[3] Campbell D I, Elia M, Lunn P G. Growth faltering in rural Gambian infants is associated with impaired small intestinal barrier function, leading to endotoxemia and systemic inflammation [J]. *The Journal of Nutrition*, 2003, 133(5): 1332-1338

[4] Yuexin Xu, Jingwen Chen, Xiao Yu, et al. Protective effects of chlorogenic acid on acute hepatotoxicity induced by lipopolysaccharide in mice [J]. *Inflammation Research*, 2010, 59(10): 871-877

[5] Friedman S L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis [J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(6): 1655-1669

[6] 杜延兵, 裘爱泳. 绿原酸生物活性、资源及其提取纯化[J]. 现代食品科技, 2006, 22(2), 250-252

DU Yan-bing, QIU Ai-yong. Bioactivity, Resources, Extraction and Purification of Chlorogenic Acid [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2006, 22(2), 250-252

[7] Haitao Shi, Lei Dong, Xiaoyan Dang, et al. Effect of chlorogenic acid on LPS-induced proinflammatory signaling in hepatic stellate cells [J]. *Inflammation Research*, 2013, 62(6): 581-587

[8] Cani P D, Amar J, Iglesias M A, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance [J]. *Diabetes*, 2007, 56(7): 1761-1772

[9] Kelly C J, Colgan S P, Frank D N. Of microbes and meals: the health consequences of dietary endotoxemia [J]. *Nutrition in Clinical Practice*, 2012, 27(2): 215-225

[10] Cho A S, Jeon S M, Kim M J, et al. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2010, 48(3): 937-943

[11] 王欣, 董丹丹, 邢晓越, 等. 姜黄素干预对无机砷暴露小鼠急性肝损伤的拮抗作用[J]. 中国工业医学杂志, 2012, 25(6): 411-413

WANG Xin, DONG Dan-dan, XING Xiao-yue, et al. Antagonistic effect of curcumin on inorganic arsenic-induced acute liver injuries in mice [J]. *Chinese Journal of Industrial Medicine*, 2012, 25(6): 411-413

[12] 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, 27(12): 1425-1427

LIU An-jun, WANG Ya-jing, ZHENG Jie, et al. Protective effect of dunaliella salina containing chromium on mice liver with alcoholic injury [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2011, 27(12): 1425-1427

[13] Qisen Xiang, Zhigang Liu, Yutang Wang, et al. Carnosic acid attenuates lipopolysaccharide-induced liver injury in rats via

- fortifying cellular antioxidant defense system [J]. Food and Chemical Toxicology, 2013, 53, 1-9
- [14] 李晓斐,李志珂,武双婵,等.红花红色素对小鼠急性CCL<sub>4</sub>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 CCl<sub>4</sub> in mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(7), 1569-1573

现代食品科技